



OMSC 2022

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565

Proceedings of the 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022



26 มีนาคม 2565

รูปแบบออนไลน์ (Online Conference)
ณ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
มหาวิทยาลัยรังสิต

จัดโดย

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ และหลักสูตรการแพทย์แผนจีน
วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565
Proceedings of the 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022



หน่วยงานความร่วมมือ

- วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
- หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ และหลักสูตรการแพทย์แผนจีน
วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
- คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บรรณาธิการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
อาจารย์ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง

เจ้าของลิขสิทธิ์

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

เผยแพร่ออนไลน์

26 เมษายน 2565
<https://www.orientalmedicineconference.com>

ผู้ออกแบบปก

นายวิสุทธิ์ โชคดีดำรงสุข
ฝ่ายสื่อสารองค์กร มหาวิทยาลัยรังสิต

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก

อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

โทร 02-997-2222 ต่อ 5164

โทรสาร 02-997-2222 ต่อ 5160

Line: ormrstu FB: orientalmedrsu

Website: www.rsu.ac.th/orientalmed

สารจากคณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก



ในนามผู้บริหาร คณาจารย์ บุคลากร และนักศึกษาของวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ผมรู้สึกยินดีและเป็นเกียรติอย่างยิ่งที่ได้รับเกียรติเป็นเจ้าภาพร่วมกับหลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ และหลักสูตรการแพทย์แผนจีน วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จัดการประชุมระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565 (The 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022) ในวันที่ 26 มีนาคม 2565 ในรูปแบบออนไลน์ ณ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ซึ่งเป็นการจัดประชุมวิชาการเพื่อส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพด้านวิชาการและการวิจัย โดยเปิดโอกาสให้อาจารย์ นักวิจัย และนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทั้งภาครัฐและเอกชน ได้แสดงศักยภาพของตนเองในการเข้าร่วมนำเสนอและเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่สาธารณชน

ผมขอชื่นชมคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ ที่ได้เรียนเชิญผู้ทรงคุณวุฒิทั้งในประเทศไทยและจากประเทศจีน มาบรรยายพิเศษด้านการแพทย์ทางเลือกต่างๆ ได้แก่ ระบบยาสมุนไพรไทยกับสถานการณ์โควิด-19 การใช้สมุนไพรรักษาโรคโควิด-19 การใช้สมุนไพรรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท และการดูแลสุขภาพตามศาสตร์การแพทย์แผนจีน อีกทั้งยังมีการนำเสนอผลงานวิจัยในหัวข้อที่น่าสนใจมากมาย

ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ วิทยากร อาจารย์ นักศึกษา ผู้นำเสนอผลงาน ผู้สนับสนุน และผู้เข้าร่วมการประชุมทุกท่าน ทำให้การประชุมระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565 สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี บรรลุเป้าหมาย และเป็นไปตามวัตถุประสงค์ทุกประการ



(นพ.วิชาญ เกติวิชัย)

คณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

สารจากประธานคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ

ในยุคปัจจุบันเป็นสมัยแห่งการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในทุกภาคส่วน ทั้งในภาคการศึกษาในมหาวิทยาลัย ภาครัฐกิจ และสังคม ทำให้จำเป็นต้องมีการขับเคลื่อนการเรียนรู้เพื่อปรับตัวให้ทันกับกระแสแห่งการเปลี่ยนแปลงนี้ การจัดการประชุมระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565 (The 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022) นี้ เป็นความร่วมมือระหว่างวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ และหลักสูตรการแพทย์แผนจีน วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสนับสนุนให้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนไทยประยุกต์ การแพทย์แผนจีน และการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ ซึ่งเป็นบทบาทหนึ่งที่สำคัญของวิทยาลัย ทั้งเป็นการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพด้านวิชาการและการวิจัย รวมถึงเกิดการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและประสบการณ์เชิงวิชาการของอาจารย์ นิสิต ผู้ประกอบวิชาชีพด้านการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนจีน นักวิจัยที่ใช้หลักการทางวิทยาศาสตร์ในการค้นหาคำอธิบายกลไกการรักษา รวมถึงนักพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร



วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ในฐานะเจ้าภาพการดำเนินการจัดการประชุมวิชาการครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ วิทยากร อาจารย์ นักศึกษา ผู้นำเสนอผลงาน ผู้สนับสนุน และผู้เข้าร่วมการประชุมทุกท่านที่ทำให้การประชุมวิชาการครั้งนี้ประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ของการจัดงาน คณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ หวังเป็นอย่างยิ่งว่าการจัดการประชุมวิชาการและเอกสารการประชุมวิชาการในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อผู้เข้าร่วมการประชุมทุกท่าน



(ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา)

รองคณบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

ประธานคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ

คำนำ

เอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565 (The 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022) ซึ่งจัดขึ้นในรูปแบบออนไลน์ ในวันเสาร์ที่ 26 มีนาคม 2565 ณ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต เป็นการรวบรวมบทความวิจัยที่น่าสนใจในรูปแบบบรรยายและรูปแบบโปสเตอร์ จำนวนทั้งหมด 19 บทความ โดยแบ่งออกเป็นบทความวิจัยที่น่าสนใจในรูปแบบบรรยาย จำนวน 5 บทความ และรูปแบบโปสเตอร์ จำนวน 14 บทความ บทความวิจัยที่ได้รับรวบรวมขึ้นครั้งนี้ผ่านการพิจารณาโดยผู้ทรงคุณวุฒิในสาขาวิชา (Peer review) ทั้งภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยรังสิต และผ่านการตรวจสอบความสมบูรณ์โดยผู้เขียนเจ้าของบทความก่อนการเผยแพร่แล้ว บทความวิจัยที่ตีพิมพ์เป็นข้อค้นพบ ข้อคิดเห็น ความรับผิดชอบของผู้เขียนเจ้าของผลงาน และผู้เขียนเจ้าของผลงานต้องรับผิดชอบต่อผลที่อาจเกิดขึ้นจากบทความและงานวิจัยนั้น

กองบรรณาธิการ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ กรรมการจัดการประชุมวิชาการ ผู้นำเสนอบทความวิจัย และผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนส่งเสริมและสนับสนุนให้การจัดทำเอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัย

กองบรรณาธิการ

รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาบทความวิจัย

ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยรังสิต

ศาสตราจารย์ ดร.นพ.อดิศักดิ์ ทัศนรงค์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศาสตราจารย์ ดร.ภญ.วันดี กฤษณพันธ์	บริษัท Phyto Product Research
ศาสตราจารย์ ดร.ฉวีวรรณ จันสกุล	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.วีณา สาธิตปิตติพันธ์	มหาวิทยาลัยมหิดล
รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.ปองทิพย์ สิทธิสาร	มหาวิทยาลัยมหิดล
รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี	มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
รองศาสตราจารย์ ดร.อรทัย เนียมสุวรรณ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุสุมา ศรียากุล	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริณกุล ตั้งสุขฤทัย	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มรกต ชาทาธิคุณ	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรุฒิ สมศักดิ์	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
อาจารย์ ดร.ปรัชญา เพชรเกตุ	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ ดร.จันทิมา กมลასนัทธิ์	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ ดร.ภาวดี แสงวัฒนกุล	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ มีศิลป์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
อาจารย์ ดร.ชลลรรค กองอรรถ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
อาจารย์ ดร.ศศิธร ตันทวรรณนะ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ดร.ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)

ผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัยรังสิต

รองศาสตราจารย์ ดร.ภก.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ภาสกิจ วัณนาวิบูล	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุพา เต็งวัฒนโชติ	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
อาจารย์ ดร.ภญ.นิราวรรณ กิจประไพอำพล	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
อาจารย์ ดร.วาลูกา พลายงาม	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก



อาจารย์ ดร.ลลิตลาสิน นาสมนต์

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

อาจารย์ ดร.ปิยะพงษ์ ชูชนะ

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

อาจารย์ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุมามาลย์ ปานคำ

วิทยาลัยนวัตกรรมการดิจิทัลและเทคโนโลยีสารสนเทศ



สารบัญ

	หน้า
สารจากคณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก	ก
สารจากประธานคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ	ข
คำนำ	ค
รายชื่อผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาบทความวิจัย	ง
สารบัญ	ฉ
กำหนดการประชุมวิชาการ	ช
กำหนดการนำเสนอบทความวิจัย	ฌ
• ภาควรราย (Oral Presentation)	ฌ
• ภาควโปสเตอร์ (Poster Presentation)	ญ
บทความวิจัย	ฎ
• ภาควรราย (Oral Presentation)	
การศึกษาประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอวังน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา : การศึกษาแบบสุ่ม ไม่ปกปิดทุกฝ่ายและควบคุมด้วยการรักษามาตรฐาน	1
<i>รติรัตน์ ทรัพย์เอนก ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา และ ศศิธร ตัณพวรรณะ</i>	
การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรจีนฝางเฟิง	16
<i>กาญจนา กงลิ้มมา ศศิวิมล บุญเสือ รังสิมา ใช้เทียมวงศ์ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ อรภา ศิลมัฐ และ ศรมน สุทิน</i>	
การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัลจากไบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์	24
<i>อัญจิรา ชวนะโรจนฤทธิ์ นิรดา ธเนศวร จิตติมา ลัคนากุล และ สรลัณฑ์ รังสิยานนท์</i>	
การพัฒนาเจลบำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าวสกัดเย็นและขมิ้นชันเพื่อเพิ่มความกระจ่างใส	32
<i>ดวงกมล คินขุนทด กัญญะวิมล บุญมี ปรีชา เทียมปัญญา และ พัทธดนย์ สุขพันธ์</i>	
การพัฒนายาทาพระเส้นในรูแบบไมโครอิมัลชัน	44
<i>วลัยลักษณ์ พรผล ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา ปิยะพงษ์ ชูชนะ ชนนานา ลิ้มหลัก และ นภาพรรณ บุญน่วม</i>	
• ภาควโปสเตอร์ (Poster Presentation)	
การศึกษาวิธีการกำจัดสีของสารสกัดเฟิร์น ไชโคเลซอร์ส เทอร์มิแนนส์ ที่มีสารอินเทอร์รับดินในปริมาณสูงสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง	56
<i>จินตคุจิ รักจิตพิณิจุลย์ และ สิริวรรณ แก้วสุวรรณ</i>	
การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะของไทย	65
<i>นิธินันท์ ไทยโกไศสวรรคร์ สุกัญญา เดชอดิคำย และ ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล</i>	

ฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันของสารสกัดเสาวรสต่อเซลล์แอดิพไซต์	75
สุกัญญา ชูสงคำ จิระภา พันธรัตน์ ศุภิตา ธนะเศวตร เพ็ญนภา ชลปฐมพิกุลเลิศ และ วนิดา สุขเกษศิริ	
การเปรียบเทียบลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของตำรับขึ้นขบเบื้องสูงที่ก่อนและหลังให้ความร้อนโดยวิธี HPLC	83
นภา บุญมา และ ประสาน ตั้งยี่นยงวัฒนา	
การพัฒนายาทาริดสีดวงทวารหนักที่เข้าไปกัญชาในรูปแบบไมโครอิมัลชัน	96
พรทิพย์ จิตจำนงค์ และ ประสาน ตั้งยี่นยงวัฒนา	
ฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดที่อุดมไปด้วยเพนตะไซคลิกไตรเทอร์พีนจากบัวบก	104
วิลาสินี สงวนสังพงษ์ และ ภาณุพงศ์ พุทธิรักษ์	
การศึกษาพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ดนมเสือ	112
ภัสราภรณ์ สมวงษ์ นันทพงศ์ ขำทอง อีรทัศน์ สุดสาย อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์ และ ลิดา ปรีดานนท์	
สารออกฤทธิ์ชีวภาพและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากฟลาวของเมล็ดผลไม้	124
สุทิดา สมเพชร ปวีศา อมรเดชากุล และ ชัยวัฒน์ บรรดิเดช	
การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไกลโคเจนและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดขึ้นน้ำจากพืชกระท่อม	134
ธัญพัชร บุญสุทธิ จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล เจริญวงศ์ เปรมประเสริฐ นฤมล เล่งนันท และ สุพัตรา ลิมสุวรรณ์โชติ	
ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของโสนต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส	143
วิสาตรี คงเจริญสุนทร และ พรพิมล บุตะเขียว	
ประสิทธิภาพของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	151
ชหาพา ภูณชรินทร์ นันทพงศ์ ขำทอง ประสาน ตั้งยี่นยงวัฒนา และ วาลูกา พลายงาม	
การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกัน	160
พริม รัตนพล นันทพงศ์ ขำทอง ประสาน ตั้งยี่นยงวัฒนา และ วาลูกา พลายงาม	
การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan	168
พรประภา ลัตยานันท์ทาบิล และ สันหจจุทา พวงมาลา	
การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเครื่องยาสมุนไพรในตำรับจตุผลาธิกะที่มีจำหน่ายในแขวงจกัรวรรดิ กรุงเทพมหานคร	177
ปิยะพงษ์ ชูชนะ ยุพา เต็งวัฒนโชติ วลัยลักษณ์ พรผล รัชนิ หมื่นรัก และ นาชนัน บากาสะแต	
ภาคผนวก	186
•สำเนา โครงการประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2564	187
•สำเนา คำสั่งวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ 010/2564 เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินการ	190
โครงการ Oriental Medicine and Sciences Conference	

กำหนดการประชุมวิชาการ

- 08.00-08.30 น. ลงทะเบียนการประชุมและรับเอกสาร
- 08.30-08.45 น. กล่าวรายงาน
โดย ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
รองคณบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
ประธานคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการ
- 08.45-09.00 น. กล่าวเปิดการประชุม
โดย นพ.วิชาญ เกิดวิชัย
คณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
- 09.00-09.45 น. การบรรยายพิเศษเรื่อง “ระบบยาสมุนไพรไทยกับสถานการณ์ Covid-19”
โดย ดร.ภก.ยงค์ศักดิ์ ตันติปัญญา
Chairman: รศ.ดร.ภก.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่
- 09.45-10.00 น. พักรับประทานอาหารว่าง
- 10.00-10.45 น. การบรรยายพิเศษเรื่อง “การใช้สมุนไพรรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท”
โดย รศ.ดร.ศศิธร ชูศรี
Chairman: ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา
- 10.45-12.15 น. การบรรยายพิเศษเรื่อง “การใช้สมุนไพรรักษาโรค Covid-19”
โดย นพ.จักราฐ ฝือกคง
Chairman: ดร.นันทพงศ์ ขำทอง
- 12.15-13.00 น. พักรับประทานอาหารกลางวัน
- 13.00-14.00 น. การบรรยายพิเศษเรื่อง “การดูแลสุขภาพตามศาสตร์การแพทย์แผนจีน”
โดย Prof.Yuan HongXia (TCM doctor, PhD)
Chairman: พจ.พรประภา สัตยานันทากิบาล
- 14.00-15.15 น. การนำเสนอผลงานวิจัยภาคบรรยายและโปสเตอร์ในแต่ละสาขา
-สาขาการแพทย์แผนไทย และการแพทย์แผนไทยประยุกต์
-สาขาการแพทย์แผนจีน
-สาขาการแพทย์แผนตะวันออก และวิทยาศาสตร์สุขภาพ
- 15.00-15.15 น. พักรับประทานอาหารว่าง
- 15.15-16.30 น. การนำเสนอผลงานวิจัยในแต่ละสาขา (ต่อ)
- 16.30 น. ปิดการประชุมวิชาการ

กำหนดการนำเสนอบทความวิจัย

•ภาคบรรยาย (Oral Presentation)

ผู้ทรงคุณวุฒิ	ศาสตราจารย์ ดร.ภญ.วันดี กุญชรพันธ์	บริษัท Phyto Product Research
	รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.วีณา สาธิตปติพันธ์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
	อาจารย์ ดร.วาลูกา พลายนาม	วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

ลำดับนำเสนอ	เวลานำเสนอ	ชื่องานวิจัย	ผู้นำเสนอ
OR-1	14.00-14.17 น.	การศึกษาประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข้าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา : การศึกษาแบบสุ่ม ไม่ปกปิดทุกฝ่ายและควบคุมด้วยการรักษามาตรฐาน	ระติรัตน์ ทรัพย์เอนก
OR-2	14.17-14.34 น.	การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรฝางเพ็ง	ศศิวิมล บุญเสือ
OR-3	14.34-14.51 น.	การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากใบยาสูบต่อเซลล์กระดูกไข่มดมนุษย์	อัญจิรา ชวนะโรจนฤทธิ์
OR-4	14.51-15.08 น.	การพัฒนาเจลบำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าวและขมิ้นชันเพื่อเพิ่มความกระจ่างใส	ดวงกมล คินขุนทด
OR-5	15.08-15.25 น.	การพัฒนายาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน	วลัยลักษณ์ พรพล

หมายเหตุ เวลาที่ใช้ในการนำเสนอไม่เกิน 12 นาที และถาม-ตอบคำถาม 5 นาที

•ภาคโปสเตอร์ (Poster Presentation)

ผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.ปองทิพย์ สิริธิสาร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ยุพา เต็งวัฒนโชติ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
 อาจารย์ ดร.ภญ.ณิราวรรณ กิจประไพอำพล วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

กลุ่มที่ 1

ลำดับนำเสนอ	เวลานำเสนอ	ชื่องานวิจัย	ผู้นำเสนอ
PS1-1	14.00-14.12 น.	การศึกษาวิธีการกำจัดสีของสารสกัดเฟิร์น ไชโคลซอร์ส เทอร์มิแนนส์ ที่มีสารอินเตอร์รับดินในปริมาณสูง สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง	จินต์ศุจี รักจิตพิโนจตุลย์
PS1-2	14.12-14.24 น.	การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะของไทย	นิธินันท์ โกโยโกโคสวรค์
PS1-3	14.24-14.36 น.	ฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันของสารสกัดเสาวรสต่อเซลล์แอดิพไซต์	สุกัญญา ชูสงดำ
PS1-4	14.36-14.48 น.	การเปรียบเทียบลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของตำรับขึ้นขบเปื้องสูงที่ก่อนและหลังให้ความร้อนโดยวิธี HPLC	นภา บุญมา
PS1-5	14.48-15.00 น.	การพัฒนายาทาริดสีดวงทวารหนักที่เข้าใบกัญชาในรูปแบบไมโครอิมัลชัน	พรทิพย์ จิตจำนงค์
PS1-6	15.00-15.12 น.	ฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดที่อุดมไปด้วยเพนตะไซคลิกไตรเทอร์พีนจากบัวบก	วิลาสินี สงวนสงษ์พงษ์
PS1-7	15.12-15.24 น.	การศึกษาพิษฤๅษณ์และฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ดนมเสือ	ภัชราภรณ์ สมวงษ์

หมายเหตุ เวลาที่ใช้ในการนำเสนอไม่เกิน 7 นาที และถาม-ตอบคำถาม 5 นาที

•ภาคโปสเตอร์ (Poster Presentation)

ผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร ชูศรี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
 อาจารย์ ดร.นันทพงศ์ ขำทอง วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก
 อาจารย์ ดร.ลัดณ์ลาลิน นาสมนต์ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

กลุ่มที่ 2

ลำดับนำเสนอ	เวลานำเสนอ	ชื่องานวิจัย	ผู้นำเสนอ
PS2-1	14.00-14.12 น.	สารออกฤทธิ์ชีวภาพและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากฟลาวของเมล็ดผลไม้	ชัยวัฒน์ บรรดิเทพ์
PS2-2	14.12-14.24 น.	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไกลโคเจนและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดขึ้นน้ำจากพืชกระท่อม	ธัญพัชร บุญสุทธิ์
PS2-3	14.24-14.36 น.	ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของโสนต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส	วิสาตรี คงเจริญสุนทร
PS2-4	14.36-14.48 น.	ประสิทธิภาพของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i>	ชพพา กุญชรินทร์
PS2-5	14.48-15.00 น.	การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกัน	พริ้ม รัตนพล
PS2-6	15.00-15.12 น.	การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan	พรประภา สัตยานันทาภิบาล
PS2-7	15.12-15.24 น.	การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเครื่องยาสมุนไพรในตำรับจตุผลาภิระที่มีจำหน่ายในแขวงจักรวรรดิกรุงเทพมหานคร	ปิยะพงษ์ ชูชนะ

หมายเหตุ เวลาที่ใช้ในการนำเสนอไม่เกิน 7 นาที และถาม-ตอบคำถาม 5 นาที



การประชุมวิชาการระดับชาติ 4 สถาบัน ครั้งที่ 2 ประจำปี 2565

The 2nd Oriental Medicine and Sciences Conference 2022 (OMSC2022)

26 มีนาคม 2565

March 26, 2022

บทความวิจัย



การศึกษาประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร
ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอน้อย
จังหวัดพระนครศรีอยุธยา : การศึกษาแบบสุ่ม ไม่ปกปิดทุกฝ่ายและควบคุมด้วยการรักษามาตรฐาน

Efficacy study of Abhaibhubejhr College of Traditional Medicine Thai herbal poultice in
osteoarthritis at Botalo Sub-district Health Promotion Hospital, Phra Nakhon Si Ayutthaya :
A randomized open label and standard treatment controlled trial

รติรัตน์ ทรัพย์เอนก^{1,*} ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา¹ และ ศศิธร ดัณฐวรรธนะ²
Ratirat Sap-a-nek^{1,*}, Prasan Tangyuenyongwatana¹, and Sasithorn Tandhavadhana²

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพมหานคร

¹Master of Science in Oriental Medicine Program, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

²Thai Traditional Medicine Department, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok

Corresponding author, E-mail: ratirat.sap@hotmail.com

บทคัดย่อ

การจัดทำคลินิกพอกเข้าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ซึ่งเป็นแผนพัฒนาระบบบริการสุขภาพ (service plan) สาขาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ผสมผสานจัดให้มีคลินิกที่มีการให้บริการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกแบบครบวงจร ปีงบประมาณ 2564-2565 การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบกึ่งทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรกับยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม จำนวน 50 คน ด้วยวิธีการศึกษาแบบสุ่ม ไม่ปกปิดทุกฝ่ายและควบคุมด้วยการรักษามาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า การพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรมีประสิทธิผลเทียบเท่ากับยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองหลังการพอกเข้าในแต่ละครั้งของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองพบว่า คะแนนก่อนและหลังการพอกเข้าทั้งสองกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ ดังนั้นสามารถนำยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรมาใช้แทนยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนคได้ อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมให้ผู้ป่วยเข้ารับบริการรักษาด้วยศาสตร์การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก นอกจากนี้ยังสามารถนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ต่อไปได้

คำสำคัญ: โรคข้อเข่าเสื่อม ยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค

Abstract

Establishment of a knee mask clinic for osteoarthritis patients in Botalo Sub-district Health Promotion Hospital, Phra Nakhon Si Ayutthaya, which is a health service development plan (service plan) in the field of Thai traditional medicine and integrated medicine provides a clinic that comprehensive provision Thai traditional and alternative medicine services, fiscal year 2021-2022. This research study is a quasi-experimental study, to compare the efficacy of the traditional herbal knee mask used in Abhaibhubejhr Thai Traditional Medicine College with the anti-inflammatory drug Diclofenac in the treatment of knee osteoarthritis of 50 people using a randomized, non-masked, controlled trial with standard treatment. The results show that the knee wrap with traditional herbal knee wraps used in Abhaibhubejhr College of Thai Traditional Medicine has no significant difference in efficacy compared to diclofenac topical anti-



inflammatory drug at $p < 0.05$. and when compared the experimental results after each knee wrap of the control group and the experimental group, it was found that the scores before and after both knee masking treatments were significantly increased at $p < 0.05$. Therefore, the herbal knee mask used in Abhaibhubejhr Thai Traditional Medicine College can be used instead of Diclofenac topical anti-inflammatory drug (Diclofenac). This also encourages patients to receive treatment in Thai traditional and alternative medicine. Also, this has the potential to be developed as a product further.

Keywords: Osteoarthritis, Abhaibhubejhr College of Traditional Medicine Thai herbal poultice, Diclofenac

1. บทนำ

โรคกระดูกและข้อเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะโรคข้อเข่าเสื่อม (osteoarthritis of knee) เนื่องจากข้อเข่าเป็นข้อที่มีขนาดใหญ่และต้องรับน้ำหนักของร่างกายโดยตรง ทั้งยังต้องทำหน้าที่เคลื่อนไหวขณะเดินมากที่สุด ทำให้ข้อเสื่อมได้ง่าย โดยมีอาการปวด บวม แดง ร้อนบริเวณข้อเข่า ข้อเข่าฝืด มีเสียงในข้อเข่า เมื่อเปลี่ยนอิริยาบถทำให้มีอาการปวดเพิ่มมากขึ้น เป็นต้น ซึ่งโรคข้อเข่าเสื่อมมักพบในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ (adult and elderly group) มากที่สุด จากสถิติผู้สูงอายุของประเทศไทย ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2562 พบว่า มีผู้สูงอายุ 60 ปีขึ้นไป เป็นประชากรชายทั้งหมด 4,920,297 คน และเป็นประชากรหญิงทั้งหมด 6,215,762 รวมทั้งสิ้น 11,136,059 คน คิดเป็นร้อยละ 16.73 ของประชากรทั้งหมด (กรมการปกครอง กระทรวงมหาดไทย, 2562) และมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มขึ้นอีกในปี 2564 โรคข้อเข่าเสื่อมจึงเป็นปัญหาสำคัญของระบบบริการสุขภาพของประเทศไทยเนื่องจากเป็นโรคข้อที่พบบ่อยที่สุดคิดเป็น 1 ใน 10 โรคที่เป็นสาเหตุสำคัญอันก่อให้เกิดความทุพพลภาพในผู้สูงอายุ (The Royal College of Orthopedic Technologists of Thailand, 2010)

ในทางการแพทย์แผนไทย โรคข้อเข่าเสื่อมนั้นเทียบเคียงได้กับโรคลมจับโป่งแห้งเข่า (กรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก, 2559) การรักษาทางแผนไทยจะมีหลักการหลายอย่าง เช่น การนวดรักษาสูตรราชสำนัก การประคบสมุนไพร การพอกยา การเผายา หรือการกักน้ำมันที่ได้รับอิทธิพลมาจากอายุรเวทอินเดียก็เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีภาวะข้อเข่าเสื่อมได้ดี ทั้งนี้จะต้องมีการปรับพฤติกรรมในการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น ลดน้ำหนัก ออกกำลังกาย บริหารข้อเข่า เป็นต้น

แผนพัฒนาระบบบริการสุขภาพ (service plan) สาขารักษาแผนไทยและการแพทย์ผสมผสาน จัดให้มีคลินิกบริการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกแบบครบวงจรเพื่อให้การรักษาโรคทั่วไปและเฉพาะโรค 4 โรค ได้แก่ โรคอัมพฤกษ์ อัมพาต โรคข้อเข่าเสื่อม โรคไมเกรน และโรคภูมิแพ้ทางเดินหายใจส่วนต้น (กรมการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก, 2559) ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการดูแลสุขภาพโดยใช้ศาสตร์การแพทย์แผนไทยเพื่อเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาให้กับผู้ป่วยที่มาเข้ารับบริการที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอดำรงวิทยะนัย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยใช้สูตรยาพอกเข่าที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์ตำรับยาพอกเข่าจากท่านอาจารย์กาญจนา บัวดอก แพทย์แผนไทยและปัจจุบันดำรงตำแหน่งรองผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ และอาจารย์ประจำวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร มาเปรียบเทียบกับยาทาแก้ปวดไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ซึ่งเป็นยาแก้ปวดแผนปัจจุบัน เพื่อทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข่ากับยาทาแก้ปวดไดโคลฟีแนคต่ออาการปวดเข่าและการเคลื่อนไหวข้อเข่าในผู้ป่วยที่มีอาการปวดหัวเข่าและได้รับการวินิจฉัยจากพยาบาลวิชาชีพแล้วมีภาวะของโรคข้อเข่าเสื่อม ณ โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอดำรงวิทยะนัย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ทั้งนี้ผู้วิจัยหวังว่าการวิจัยครั้งนี้จะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้กับผู้ป่วยที่มาเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม เพื่อลดปริมาณการรับประทานยาแก้ปวดแผนปัจจุบัน ช่วยบรรเทาอาการปวดข้อเข่า ลดอัตราการรักษาโดยการผ่าข้อเข่า อีกทั้งยังช่วยให้ผู้ป่วยสามารถใช้งานข้อเข่าได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เป็นการส่งเสริมให้ผู้ป่วยหันมาใช้ยาสมุนไพรและเข้ารับการรักษาโดยหัตถการแผนไทยมากขึ้น



2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรกับยาทาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ส่วนที่ 1 แบบสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยที่มีอาการปวดข้อเข่า ประกอบด้วย เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ค่าดัชนีมวลกาย (BMI) สถานภาพ การศึกษาสูงสุด อาชีพ รายได้ โรคประจำตัว

ส่วนที่ 2 ข้อมูลด้านการเจ็บป่วย ระยะเวลาที่มีอาการเกี่ยวกับข้อเข่าเสื่อม จำนวนเข่าข้างที่เป็น วิธีที่ใช้ในการพอกเข้า ประวัติการแพ้ยา/แพ้สมุนไพร

ส่วนที่ 3 แบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561)

ส่วนที่ 4 แบบประเมินความพึงพอใจ ประกอบไปด้วย ความสะดวกต่อการนำไปใช้ ความรู้สึกต่อสี ความรู้สึกต่อกลิ่น ประสิทธิภาพของยา และความพึงพอใจในการรักษา

3.2 วิธีดำเนินการวิจัยเก็บรวบรวมข้อมูลในการวิจัย

การศึกษานี้ผู้ศึกษาได้ดำเนินการตามลำดับขั้นตอน ดังแสดงในภาพที่ 1 หลังจากโครงร่างวิจัยและเครื่องมือการวิจัยที่ผ่านคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ของสำนักงานสาธารณสุข จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ผู้วิจัยเข้าพบกลุ่มตัวอย่างเพื่อแนะนำตัวและขอความร่วมมือในการวิจัย พร้อมทั้งชี้แจงวัตถุประสงค์ การวิจัย วิธีการ เก็บรวบรวมข้อมูล รวมทั้งสิทธิในการตอบรับหรือปฏิเสธการเข้าร่วมการวิจัย หรือถอนตัวจากการวิจัยโดยไม่มีผลกระทบต่อการรักษาพยาบาล ข้อมูลที่ได้ถูกเก็บไว้เป็นความลับ และนำเสนอข้อมูลเป็นภาพรวม เมื่อกลุ่มตัวอย่างยินดียินยอมเข้าร่วมการวิจัยแล้ว ผู้วิจัยจึงให้ลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

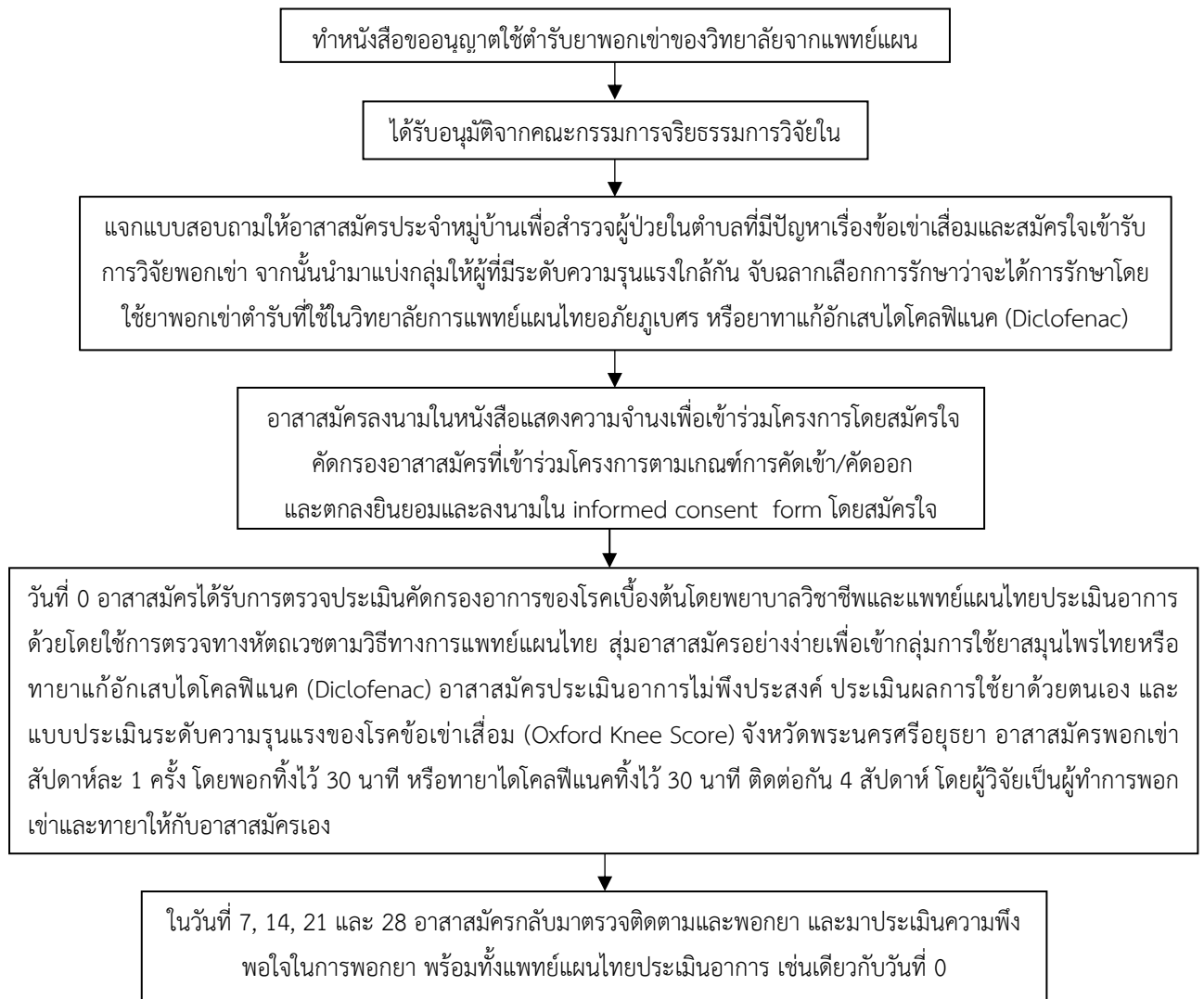
3.3 การเตรียมอุปกรณ์และยาสมุนไพร

ในกลุ่มทดลอง ใช้ยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ใช้ยาสมุนไพรที่ซื้อจากวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร

วิธีใช้ ตักยาพอกให้เหมาะสมกับบริเวณที่พอก น้ำหนัก 120 กรัม ผสมน้ำปริมาณ 120 มิลลิลิตร พอให้เป็นโคลนเนื้อเดียวกัน ไม่เหนียวหรือเหลวเกินไป พอกบริเวณที่มีความร้อน (ข้อเข่า) ในพื้นที่เข่ากว้างประมาณ 20 เซนติเมตร สูงประมาณ 15 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนยาพอกหมาดเป็นเวลาประมาณ 30 นาที และเช็ดยาออกโดยเข้าผ้าขนหนูชุบน้ำสะอาด โดยพอกสัปดาห์ละ 1 วัน และตลอดโครงการพอกทั้งหมด 4 ครั้ง

ในกลุ่มควบคุม ใช้ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ปีบจากหลอดประมาณ 4 เซนติเมตรต่อเข่า 1 ข้าง

วิธีใช้ ทาบริเวณข้อเข่าที่มีอาการอักเสบ ปวด บวม แดง ร้อน ทาทั้งไว้จนยาแห้งสนิททาบางๆบริเวณที่มีความร้อน (ข้อเข่า) ในพื้นที่เข่ากว้างประมาณ 20 เซนติเมตร สูงประมาณ 15 เซนติเมตร ทิ้งไว้จนยาประมาณ 30 นาที (ไม่มีการล้างหรือเช็ดออก) ทาสัปดาห์ละครั้ง รวม 3 ครั้ง (วันที่ 7, 14, 21 และ 28 ของการวิจัย) ตลอดโครงการวิจัย โดยผู้วิจัยเป็นผู้ทาครีมให้เอง และทำที่โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ทุกครั้ง โดยไม่มีการให้ยากับผู้ป่วยเพื่อกลับไปทาเอง



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทำหลังจากอาสาสมัครได้รับยาและติดตามผลครบถ้วนแล้ว ใช้การวิเคราะห์แบบ Intention-To-Treat (ITT) วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ดังนี้

- 1) วิเคราะห์ข้อมูลทั่วไป ระดับอาการปวดเข่า และองศาการเคลื่อนไหวข้อเข่าของผู้ป่วยด้วยสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าความถี่ ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
- 2) การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของระดับอาการปวดเข่าและองศาการเคลื่อนไหวข้อเข่าก่อนการทดลองที่ได้จากกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม ที่เป็นอิสระจากกัน (กลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม) ข้อมูลเป็น independent samples สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานคือ dependent t-test ทดสอบสมมติฐานแบบ 2 ทาง โดยมีค่านัยสำคัญที่ 5% ($\alpha=0.05$)

การควบคุมคุณภาพของข้อมูล การศึกษานี้ใช้มาตรฐานของ Good Clinical Practice (GCP)

3.5 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

3.5.1 สถานที่ทำการทดลอง และ/หรือ เก็บข้อมูล

โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์



3.5.2 ระยะเวลาที่ทำวิจัย 16 เดือน

โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนธันวาคม 2563 - มีนาคม 2565 (ทั้งนี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงตามสถานการณ์โควิด

19)

3.5.3 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	งวดที่ 1 (เดือนที่ 1-3/2563)	งวดที่ 2 (เดือนที่ 4-6/2564)	งวดที่ 3 (เดือนที่ 7-9/2564)	งวดที่ 4 (เดือนที่ 10-16/2564)
1. ดำเนินการขออนุญาตใช้ตำรับยาจากวิทยาลัยการแพทย์ แผนไทยอภัยภูเบศรในการทดลองวิจัย	↔			
2. ดำเนินการขอจริยธรรม	←	→	→	→
3. รับสมัครอาสาสมัครเพื่อเข้าร่วมโครงการวิจัย		↔	→	
4. แบ่งกลุ่มตัวอย่างโดยวิธีสุ่ม และดำเนินการวิจัย		←	→	→
5. วิเคราะห์ ประเมินผล และสรุป เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์				↔

หมายเหตุ การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการตั้งแต่เดือนธันวาคม 2563 - มีนาคม 2565 (หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงตามสถานการณ์
โควิด 19)

3.6 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

3.6.1 ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นและการป้องกันแก้ไข

ระหว่างเข้าร่วมโครงการ หากพบอาการแพ้ที่ผิวหนังเช่น มีผื่นแดง บวม คัน หรือแสบผิวหนัง ในระหว่างเข้าร่วม
โครงการ ให้อาสาสมัครหยุดการใช้ยาทันที และแจ้งแพทย์แผนไทยหรือเจ้าหน้าที่โครงการทันที จากนั้นจะให้การรักษาตาม
มาตรฐาน โดยถือว่าอาสาสมัครได้ออกจากโครงการวิจัยและโครงการวิจัย จะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายจากการการแพทย์สมุนไพรใน
โครงการนี้

3.6.2 การตอบแทนอาสาสมัคร การดูแลรักษาและการแก้ปัญหาอื่น ๆ กรณีเกิดผลแทรกซ้อนแก่อาสาสมัคร

อาสาสมัครที่มาดำเนินกิจกรรมตามนัดจะได้รับค่าชดเชยในการเดินทาง ค่าอาหารและค่าตอบแทนการขาดงานรวม
4 ครั้ง และอบรม 1 ครั้ง รวมเป็นเงิน 100 บาท ซึ่งจะถูกจ่ายหลังจากอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการครบทุกครั้งตามเกณฑ์เท่านั้น
ส่วนค่ายาและค่าตรวจผู้เข้าร่วมการวิจัยไม่ต้องรับผิดชอบ

กรณีที่อาสาสมัครได้รับบาดเจ็บหรือเกิดภาวะแทรกซ้อนขึ้นอันเป็นผลจากการใช้ยาในโครงการนี้ อาสาสมัครต้อง
ติดต่อกับแพทย์ผู้ดูแลในทันทีที่เป็นไปได้ เพื่อที่จะได้ช่วยเหลือให้การดูแลรักษาอย่างเหมาะสมต่อไป ผู้สนับสนุนโครงการวิจัย
จะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นในส่วนนี้ทั้งหมดตามความเหมาะสม แต่ถ้าผู้ป่วยไม่มีสิทธิใดๆทางด้านสุขภาพ ทางแหล่งทุน
จะรับผิดชอบค่าใช้จ่ายจากการบาดเจ็บหรือภาวะแทรกซ้อนที่เป็นผลจากการใช้ยาในโครงการนี้

3.6.3 การรักษาความลับ

ข้อมูลส่วนตัว คำตอบในแบบสอบถามและผลการตรวจเลือดจะถูกเก็บไว้เป็นความลับที่ รพ.สต. หรือคณะ
เป็นเวลา 5 ปี ชื่อของอาสาสมัครจะไม่ถูกเขียนลงในเอกสารที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่สู่สาธารณชนและจะไม่มีการนำไปใช้ในการ
ติดต่อใดๆ ทั้งสิ้น ชื่อของอาสาสมัครและข้อมูลทั้งหมดจะถูกตั้งรหัสด้วยตัวเลขและเก็บไว้ในที่ปลอดภัย จึงไม่มีชื่อของอาสาสมัคร
ในบันทึกข้อมูลงานวิจัยสำหรับกรวิเคราะห์ข้อมูล ผลการวิจัยจะนำเสนอเป็นกลุ่มอาสาสมัคร แต่ข้อมูลของผู้ร่วมการวิจัยเป็น



รายบุคคลอาจมีคณะบุคคลบางกลุ่มเข้ามาตรวจสอบได้ เช่น ผู้ให้ทุนวิจัย สถาบัน หรือองค์กรของรัฐที่มีหน้าที่ตรวจสอบ คณะกรรมการจริยธรรมฯ เป็นต้น

4. ผลการวิจัย

4.1 ข้อมูลทั่วไป

จากตารางที่ 1 พบว่าเมื่อศึกษาข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 50 ราย พบว่าส่วนใหญ่เป็นเพศหญิง คิดเป็นร้อยละ 80.0 ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระดับ BMI อยู่ในเกณฑ์อ้วนระดับ 2 คิดเป็นร้อยละ 32.0 และผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมส่วนใหญ่ประกอบอาชีพรับจ้าง คิดเป็นร้อยละ 28.0

ตารางที่ 1 จำนวนและร้อยละของกลุ่มตัวอย่างจำแนกตามเพศของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้าร่วมทดลอง

ข้อมูล		ความถี่ (n=50)	ร้อยละ
กลุ่ม	ควบคุม	25	50.0
	ทดลอง	25	50.0
เพศ	ชาย	10	20.0
	หญิง	40	80.0
ระดับ BMI	น้อยกว่าเกณฑ์	2	4.0
	ปกติ	10	20.0
	อ้วนระดับ 1	12	24.0
	อ้วนระดับ 2	16	32.0
	อ้วนระดับ 3	10	20.0
อาชีพ	ไม่ได้ประกอบอาชีพ	11	22.0
	แม่บ้าน/พ่อบ้าน	13	26.0
	ค้าขาย	10	20.0
	รับราชการ	2	4.0
	รับจ้าง/ลูกจ้างชั่วคราว	14	28.0
	ธุรกิจส่วนตัว	0	0
	อื่นๆ	0	0

4.2 ข้อมูลด้านอาการเจ็บป่วย

จากตารางที่ 2 พบว่าจากข้อมูลด้านการเจ็บป่วยของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 50 ราย ของทั้ง 2 กลุ่ม มีผู้ป่วยที่มีอาการของโรคข้อเข่าเสื่อมในระยะเวลา 1-3 ปีมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 62.0 กลุ่มตัวอย่างมีอาการปวดเข่าทั้งสองข้างมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 68.0 และไม่มีประวัติการแพ้ยาลา/แพ้สมุนไพรมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 94.0



ตารางที่ 2 จำนวนและร้อยละของกลุ่มตัวอย่างจำแนกตามเพศของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมที่เข้าร่วมทดลอง

		ความถี่ (n=50)	ร้อยละ
ระยะเวลาที่มีอาการของโรคข้อเข่าเสื่อม	1-3 ปี	31	62.0
	4-6 ปี	11	22.0
	มากกว่า 6 ปี	8	16.0
จำนวนข้างที่เป็น	ข้างขวาข้างเดียว	9	18.0
	ข้างซ้ายข้างเดียว	7	14.0
	เป็นทั้งสองข้าง	34	68.0
ประวัติการการแพทย์/แพ้สมุนไพร	ไม่มีอาการแพ้	47	94.0
	มีอาการแพ้	3	6.0

4.3 การเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมโดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ (Independent Samples Test)

จากตารางที่ 3 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ของกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม ค่าเฉลี่ยคะแนนของกลุ่มทดลองที่ใช้ยาสมุนไพรพอกเข่าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ได้ประสิทธิผลที่ดีเทียบเท่ากับยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) โดยมีค่าเฉลี่ยประสิทธิผล 42.24 และ 39.84 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ 0.262 และ 0.096 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังพอกเข่าของทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนการพอกยาของกลุ่มควบคุม	28.00	10.239	1.698	48	.096
หลังการพอกยาครั้งที่ 4 ของกลุ่มควบคุม	39.84	8.919	1.698	46.066	.096
ก่อนการพอกยาของกลุ่มทดลอง	23.52	8.317	-1.138	48	.261
หลังการพอกยาครั้งที่ 4 ของกลุ่มทดลอง	42.24	5.622	-1.138	40.470	.262

4.4 การเปรียบเทียบคะแนนก่อนและหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมในกลุ่มควบคุมด้วยยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) โดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ (Paired Samples Test)

จากตารางที่ 4 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ก่อนทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) กับหลังทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 พบว่า หลังจากผู้ป่วยทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในแต่ละครั้ง ผู้ป่วยมีระดับคะแนนที่ดีขึ้น ซึ่งหมายความว่า มีระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยประสิทธิผลในแต่ละครั้งที่ 6.640 10.600 และ 11.840 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$



ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังทายาแก้ปวดเสลดโคโลเฟนัค (Diclofenac)

กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนควบคุมเทียบกับหลังควบคุมครั้งที่ 2	-6.640	4.734	-7.014	24	.000
ก่อนควบคุมเทียบกับหลังควบคุมครั้งที่ 3	-10.600	5.164	-10.263	24	.000
ก่อนควบคุมเทียบกับหลังควบคุมครั้งที่ 4	-11.840	4.947	-11.967	24	.000

4.5 การเปรียบเทียบคะแนนก่อนและหลังเข้ารับการรักษารอคข้อเข่าเสื่อมในกลุ่มทดลองด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร โดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ (Paired Samples Test)

จากตารางที่ 5 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ก่อนพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร กับหลังพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 พบว่า หลังจากที่ถูกพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ในแต่ละครั้ง ผู้ป่วยมีระดับคะแนนที่ลดลง ซึ่งหมายความว่าระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมที่ลดลง โดยมีค่าเฉลี่ยประสิทธิผลในแต่ละครั้งที่ 18.720, 12.440 และ 17.000 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร

กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนทดลองเทียบกับหลังทดลองครั้งที่ 2	-18.720	6.889	-13.587	24	.000
ก่อนทดลองเทียบกับหลังทดลองครั้งที่ 3	-12.440	5.665	-10.980	24	.000
ก่อนทดลองเทียบกับหลังทดลองครั้งที่ 4	-17.000	6.278	-13.539	24	.000

4.6 การเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังเข้ารับการรักษารอคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละครั้งของทั้งสองกลุ่มกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องอายุ โดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ (One-Way Anova)

จากตารางที่ 6 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ของทั้งสองกลุ่มเทียบกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องอายุ ก่อนและหลังรักษา ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 พบว่า ปัจจัยเสี่ยงด้านอายุไม่มีผลต่อการรักษาและระดับคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$



ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังเข้ารับการรักษโรคข้อเข่าเสื่อมของทั้งสองกลุ่มเทียบกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องอายุ

	กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนการรักษา	กลุ่มควบคุม	4.480	2.638	1.698	48.000	.096
	กลุ่มทดลอง	4.480	2.638	1.698	46.066	.096
หลังรักษาครั้งที่ 2	กลุ่มควบคุม	-1.320	2.846	-.464	48.000	.645
	กลุ่มทดลอง	-1.320	2.846	-.464	45.509	.645
หลังรักษาครั้งที่ 3	กลุ่มควบคุม	-1.920	2.342	-.820	48.000	.416
	กลุ่มทดลอง	-1.920	2.342	-.820	41.145	.417
หลังรักษาครั้งที่ 4	กลุ่มควบคุม	-2.400	2.109	-1.138	48.000	.261
	กลุ่มทดลอง	-2.400	2.109	-1.138	40.470	.262
อายุ	กลุ่มควบคุม	2.720	2.355	1.155	48.000	.254
	กลุ่มทดลอง	2.720	2.355	1.155	47.113	.254

4.7 ตารางเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังเข้ารับการรักษโรคข้อเข่าเสื่อมในแต่ละครั้งของทั้งสองกลุ่มกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องค่าดัชนีมวลกาย (BMI) โดยการใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ (One-Way Anova)

จากตารางที่ 7 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ของทั้งสองกลุ่มเทียบกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องดัชนีมวลกาย (BMI) ก่อนและหลังรักษา ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 พบว่า ปัจจัยเสี่ยงด้านดัชนีมวลกาย (BMI) ไม่มีผลต่อการรักษาและระดับคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมก่อนและหลังเข้ารับการรักษโรคข้อเข่าเสื่อมของทั้งสองกลุ่มเทียบกับปัจจัยเสี่ยงเรื่องค่าดัชนีมวลกาย (BMI)

	กลุ่มตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนการรักษา	กลุ่มควบคุม	4.480	2.638	1.698	48.000	.096
	กลุ่มทดลอง	4.480	2.638	1.698	46.066	.096
หลังรักษาครั้งที่ 2	กลุ่มควบคุม	-1.320	2.846	-.464	48.000	.645
	กลุ่มทดลอง	-1.320	2.846	-.464	45.509	.645
หลังรักษาครั้งที่ 3	กลุ่มควบคุม	-1.920	2.342	-.820	48.000	.416
	กลุ่มทดลอง	-1.920	2.342	-.820	41.145	.417
หลังรักษาครั้งที่ 4	กลุ่มควบคุม	-2.400	2.109	-1.138	48.000	.261
	กลุ่มทดลอง	-2.400	2.109	-1.138	40.470	.262
ค่าดัชนีมวลกาย (BMI)	กลุ่มควบคุม	.17246	1.247	.138	48.000	.891
	กลุ่มทดลอง	.17246	1.247	.138	46.938	.891



4.8 การประเมินความพึงพอใจหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมของกลุ่มตัวอย่าง

จากตารางที่ 8 พบว่าคะแนนความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่างหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการทายาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ผู้ป่วยมีความพึงพอใจในด้านความสะดวก ด้านความรู้สึกต่อสี ด้านความรู้สึกต่อกลิ่น ด้านประสิทธิผลของยา และด้านความรู้สึกพึงพอใจหลังเข้ารับการรักษาอยู่ในระดับมากที่สุด

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยระดับความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่างหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการทายาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac)

รายการ	ระดับความพึงพอใจ	
	$\bar{X} \pm SD$	
1. ด้านความสะดวก ท่านคิดว่ายาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) มีความสะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้	4.76 $\pm$ 0.523	มากที่สุด
2. ด้านความรู้สึกต่อสี ท่านมีความพึงพอใจต่อสีของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac)	4.92 $\pm$ 0.277	มากที่สุด
3. ด้านความรู้สึกต่อกลิ่น ท่านพึงพอใจต่อกลิ่นของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac)	4.64 $\pm$ 0.569	มากที่สุด
4. ด้านประสิทธิผลของยา หลังใช้ยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบ ไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ท่านมีความพึงพอใจต่อประสิทธิผลในการรักษา อาการปวดลดลง ข้อฝืดลดลง การเคลื่อนไหวของข้อเข่าดีขึ้น	4.20 $\pm$ 0.764	มากที่สุด
5. ด้านความรู้สึกพึงพอใจ หลังเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้ท่านมีความพึงพอใจในประสิทธิผลของการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม	4.12 $\pm$ 0.666	มากที่สุด
รวม	4.5280 $\pm$ 0.28798	มากที่สุด

จากตารางที่ 9 พบว่าคะแนนความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่างหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ผู้ป่วยมีความพึงพอใจในด้านความสะดวก ด้านความรู้สึกต่อสี ด้านความรู้สึกต่อกลิ่น ด้านประสิทธิผลของยา และด้านความรู้สึกพึงพอใจหลังเข้ารับการรักษาอยู่ในระดับมากที่สุด



ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยระดับความพึงพอใจของกลุ่มตัวอย่างหลังเข้ารับการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยยาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร

รายการ	ระดับความพึงพอใจ	
	$\bar{X} \pm SD$	
1. ด้านความสะดวก ท่านคิดว่ายาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) มีความสะดวกและง่ายต่อการนำไปใช้	4.04 ± 0.539	มาก
2. ด้านความรู้สึกต่อสี ท่านมีความพึงพอใจต่อสีของยาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac)	4.92 ± 0.277	มากที่สุด
3. ด้านความรู้สึกต่อกลิ่น ท่านพึงพอใจต่อกลิ่นของยาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac)	4.96 ± 0.200	มากที่สุด
4. ด้านประสิทธิผลของยา หลังใช้ยาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร/ยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ท่านมีความพึงพอใจต่อประสิทธิผลในการรักษา อาการปวดลดลง ข้อฝืดลดลง การเคลื่อนไหวของข้อเข่าดีขึ้น	4.76 ± 0.523	มากที่สุด
5. ด้านความรู้สึกพึงพอใจ หลังเข้าร่วมการวิจัยในครั้งนี้ท่านมีความพึงพอใจในประสิทธิผลของการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม	4.84 ± 0.473	มากที่สุด
รวม	4.7040 ± 0.25245	มากที่สุด

5. อภิปรายผลการวิจัยและสรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

เมื่อเปรียบเทียบคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมตามแบบประเมินระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อม (Oxford Knee Score) จังหวัดพระนครศรีอยุธยา แผนกการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่, 2561) พบว่าการพอกยาสมุนไพรพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ได้ประสิทธิผลที่ดีเทียบเท่ากับยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) โดยมีค่าเฉลี่ยประสิทธิผล 42.24 และ 39.84 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมทั้ง 2 วิธี มีคะแนนที่เพิ่มขึ้นทั้ง 2 วิธี

สอดคล้องกับการศึกษาของรัชชัย เหล็กดี และ ชิตชนก พิษผล (2562) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ Pain Score ของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า ระดับความปวดเข่าของกลุ่มทดลองหลังการพอกเข่าดำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ร่วมกับ การให้ความรู้ตามหลัก 3 อ. มีระดับอาการปวดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ และระดับอาการปวดเข่าหลังการทดลองของทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับความปวดน้อยลง โดยกลุ่มทดลอง = 1.7 และ กลุ่มควบคุม = 4.2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ซึ่งหมายความว่าสมุนไพรพอกเข่าดำรับ มีสารสำคัญที่มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ลดการอักเสบ ฟกช้ำ ปวดบวม ใช้เป็นยาทาแก้เคล็ดขัดยอกได้

สอดคล้องกับการศึกษาของเจษฎา อุดมพิทยาสรณ์ และคณะ (2562) พบว่าอาการปวดเข่าและองศาการเคลื่อนไหวของข้อเข่าระหว่างยาพอกเข่า ของผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ จากการวิจัยทำให้ได้รู้ว่า



ยาพอกเข้าทั้ง 2 สูตร สามารถช่วยลดอาการปวดเข่า และทำให้องศาการเคลื่อนไหวของข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้ทั้ง 2 สูตร ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการเลือกใช้ของผู้ป่วย แต่จะให้ประสิทธิภาพที่ดีต้องรักษาอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 4 ครั้ง

สอดคล้องกับการศึกษาของกรกฎ ไชยมงคล (2562) พบว่า การรักษาด้วยยาสมุนไพรตำรับพอกเขาลดอาการปวด สามารถบรรเทาความรุนแรงของข้อเข่าได้ในระดับหนึ่ง ค่าความแตกต่างของระดับความรู้สึกปวดที่มีระดับคะแนนลดลง

สอดคล้องกับการศึกษาของนฤตล ฮตฤฎา (2560) พบว่าอาการปวดข้อเข่าก่อนและหลังแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับอาการปวดข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมลดลงเหลืออยู่ในระดับน้อย

สอดคล้องกับการศึกษาของทวีศักดิ์ มากละมาย และ สุวภัทร บุญเรือน (2559) พบว่าค่าเฉลี่ยของอาการปวดเข่าและองศาการเคลื่อนไหวของข้อเข่าของผู้ป่วยก่อนการทดลองครั้งที่ 1 กับหลังการทดลองครั้งที่ 6 ของทั้งกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดลอง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ยของอาการปวดเข่าและองศาการเคลื่อนไหวของข้อเข่าของผู้ป่วย หลังการทดลองครั้งที่ 6 ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยผู้ป่วยมีอาการปวดเข่าลดลง และองศาการเคลื่อนไหวของข้อเข่าเพิ่มขึ้น

สอดคล้องกับการศึกษาของสุตารัตน์ เกตุรัตน์ และ วุฒิลักษณ์ ส่อสืบ (2560) พบว่า ระดับความปวดเข่าหลังได้รับการพอกยาสมุนไพรแบบผสมผสาน มีค่าเฉลี่ยระดับความปวดเข่าลดลง พิสัยของข้อเข่าเพิ่มขึ้น ภาวะข้อจำกัดลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ดังนั้นจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการพอกยาสมุนไพรแบบผสมผสานมีผลลดอาการปวดเข่าในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการพอกยาสมุนไพรแบบผสมผสานร่วมกับการทาสมุนไพรด้วยตำรับยาน้ำมันเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้กับผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมได้เข้ารับการรักษาแบบผสมผสานเพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น และยังช่วยลดการรับประทานยาเพื่อบรรเทาอาการปวดได้

สอดคล้องกับการศึกษาของวันวิสาข์ พรหมเมตตา (ม.ป.ป.) แผ่นพอกเข้าสมุนไพรสามารถบรรเทาอาการปวด และบวมบริเวณเข่าได้ และน้ำมันยาสมุนไพรสามารถนำมาทาเพื่อบรรเทาอาการปวดได้ อีกทั้งยังมีสรรพคุณช่วยแก้พิษแมลงสัตว์กัดต่อยได้

สอดคล้องกับการศึกษาของชุตินันท์ ชันทะยศ และกนกพร ปัญญาดี (2560) พบว่าผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมมีคะแนนระดับความเจ็บปวดลดลงมากกว่าเมื่อเทียบกับก่อนการรักษาด้วยการใช้ยาสมุนไพร ประคบเข้า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$)

สอดคล้องกับการศึกษาของปิยะพล พูลสุข และคณะ (2561) พบว่า ระดับความปวดของข้อเข่า ระดับอาการข้อฝืด และช่วงเวลาในการลุกเดินลดลงกว่าก่อนการทดลอง และระดับความสามารถในการใช้งานข้อเข่าดีขึ้นกว่าก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังนั้นยาพอกสมุนไพรสามารถช่วยลดความปวด ความฝืด และช่วงเวลาในการลุกเดินได้ ส่งผลให้ความสามารถในการใช้งานข้อเข่าของผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมดีขึ้น

สอดคล้องกับการศึกษาของพิมศิริ สำเภาไทย และคณะ (2561) พบว่า ผู้ป่วยมีความพึงพอใจอยู่ในระดับดีมาก ร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าการใช้นวัตกรรมพอกเข้าร่วมกับการนวดไทย ให้ประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม หรือโรคลมจับโปงได้ดีกว่าสูตรเดิมหรือสูตรที่ 1 ดังนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมหรือโรคลมจับโปงโดยการพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเขาลดการอักเสบตำรับที่ 2 ร่วมกับการนวดไทยได้ เพื่อประสิทธิภาพในการรักษาที่ดียิ่งขึ้น

สอดคล้องกับการศึกษาของชัยญา นพคุณ (2562) พบว่าหลังการพอกยาสมุนไพรสามารถลดอาการปวดของโรคข้อเข่าเสื่อมในกลุ่มผู้สูงอายุได้ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.000$)

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิก (clinical research) เพื่อการศึกษาประสิทธิภาพของยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมกับยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลบ่อตาโล่ อำเภอน้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เป็นการศึกษาวิจัยกึ่งทดลอง (quasi-experimental research) โดยเลือกศึกษากลุ่มตัวอย่างแบบสุ่ม ไม่ปกปิดทุกฝ่ายและควบคุมด้วยการรักษามาตรฐาน วัดผล



ก่อนการรักษาและหลังการรักษา เริ่มเก็บข้อมูลระหว่างวันที่ 23 พฤศจิกายน 2564 - 10 มีนาคม 2565 มีผู้เข้าร่วมงานวิจัยจำนวน 50 ราย หลังการทดลองพบว่า ไม่พบผู้ที่มีการแพ้ยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร และยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) แต่มีผู้ป่วย 3 ราย มีการปวดเพิ่มมากขึ้นหลังจากทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ในครั้งแรก และลดลงในครั้งต่อไป การทดลองรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วยการพอกยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ได้ประสิทธิผลที่ดีเทียบเท่าการทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) โดยมีค่าเฉลี่ยประสิทธิผล 42.24 และ 39.84 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ค่าเฉลี่ยระดับความพึงพอใจในด้านความสะดวก ด้านความรู้สึกลดลง ด้านความรู้สึกลดลง ด้านประสิทธิผลของยา และด้านความพึงพอใจหลังเข้าร่วมงานวิจัยอยู่ที่ 4.7040 และ 4.5280 ตามลำดับ ซึ่งมีคะแนนรวมระดับความพึงพอใจอยู่ในเกณฑ์มากที่สุดทั้งสองกลุ่ม

5.3 ข้อเสนอแนะ

1) ผู้ป่วยที่ใช้การทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ส่วนใหญ่เคยได้รับการรักษาด้วยการพอกเข้าด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร และผู้ป่วยมีความพึงพอใจต่อประสิทธิผลของการรักษาด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรมากกว่าการทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) เนื่องจากระยะเวลาที่สามารถหายจากอาการปวดข้อเข่าอยู่ได้ยาวนานกว่าการทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) และ ค่าคะแนนความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมเพิ่มขึ้นมากกว่าการทายาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac) ซึ่งหมายความว่าระดับความรุนแรงของโรคข้อเข่าเสื่อมหลังรักษาด้วยยาสมุนไพรพอกเข้าตำรับที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรลดลงกว่าการรักษาด้วยยาทาแก้อักเสบไดโคลฟีแนค (Diclofenac)

2) หลังจากเข้าร่วมงานวิจัยพอกเข้าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น แต่ในบางรายกลับไปทำงานหนักเพิ่มขึ้น ทำให้มีอาการปวดเพิ่มมากขึ้น ผู้ป่วยทุกคนจึงเสนอให้มีการพอกเข้าในคลินิกโรคข้อเข่าเสื่อมต่อเนื่อง

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ศศิธร ตันทวารธนะ ที่ได้ให้คำแนะนำ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด ขอขอบคุณอาจารย์กาญจนา บัวดอก และวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร ตำบลไม้เค็ด อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี ที่กรุณาอนุญาตให้นำตำรับยาสมุนไพรพอกเข้าที่ใช้ในวิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศรมาใช้ในการทดลองวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และนางสาวจุไรรัตน์ คงล้อมญาติ หัวหน้ากลุ่มงานการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่ดำเนินเรื่องการขออนุญาตจริยธรรมจากกองวิชาการประจำจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และผู้ปกครอง ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยให้คำแนะนำดีๆ เกี่ยวกับการเลือกคำ และเกี่ยวกับงานวิทยานิพนธ์ชิ้นนี้ และขอขอบคุณผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมในตำบลบ่อตาโล่ อำเภอนาย้อย จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และในตำบล ชะไวย อำเภอไชโย จังหวัดอ่างทองที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมการทดลองวิจัย ทำแบบสอบถามโรคข้อเข่าเสื่อม และแบบประเมินความพึงพอใจ จนทำให้โครงการสำเร็จลุล่วงไปได้

7. เอกสารอ้างอิง

กรกฎ ไซมมงคล. (2562). ประสิทธิผลของการใช้ยาสมุนไพรตำรับพอกเข้าในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี. *วารสารช่อพะยอม*, 30(1), 119-128.

กรมกิจการผู้สูงอายุ กรมการปกครอง กระทรวงมหาดไทย. (2563). *สถิติผู้สูงอายุของประเทศไทย 77 ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2562*.

สืบค้นจาก <http://www.dop.go.th/th/know /1/275>



- กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2559). แนวเวชปฏิบัติการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกในคลินิกบริการการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกแบบครบวงจร (ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สามเจริญพาณิชย์.
- กระทรวงสาธารณสุข. (2557). คู่มือการคัดกรอง/ประเมินผู้สูงอายุ ปี 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานกิจการโรงพยาบาลสงเคราะห์องค์การทหารผ่านศึก.
- เจษฎา อุดมพิทยาสรรพ์, วินัย สยอวรรณ, วรายุส คดวงค์, ณัฐสุตา แก้ววิเศษ, และ อิศรา ศิริมณีนันท์. (2562). การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิผลของการพอกเข้าด้วยตำรับยาพอกสูตรที่ 1 กับยาพอกสูตรที่ 2 ต่ออาการปวดเข่าและการเคลื่อนไหวข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โรงพยาบาลบางใหญ่ อำเภอบางใหญ่ จังหวัด นนทบุรี. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 11(1), 64-72.
- ชัยญา นพคุณวิชัย. (2561). ประสิทธิผลของการพอกยาสมุนไพรต่ออาการปวดของโรคข้อเข่าเสื่อม โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลตะค่า อำเภอบางปลาม้า จังหวัดสุพรรณบุรี. ใน *การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 3 มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา* (น. 944-951). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- ชุตินันท์ ชันทยศ และ กนกพร ปัญญาดี. (2560). ผลของถุยาสมุนไพรประคบข้อเข่าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม. *วารสารสุขภาพภาคประชาชน*, 12(4), 43-49.
- เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : สำนักวิชาการป่าไม้.
- ทวีศักดิ์ มากละม้าย และ สุวภัทร บุญเรือน. (2559). ผลของการนวดรักษาแบบราชสำนักร่วมกับการพอกเข้าในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสายบุรี อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ “แพทย์แผนไทยภูมิปัญญาของแผ่นดิน. พิษณุโลก: วิทยาลัยการสาธารณสุขสิรินธร*
- ธวัชชัย เหล็กดี และ ชิตชนก พิษผล. ผลของการพอกเข้าร่วมกับการให้ความรู้ตามหลัก 3 อ. ต่ออาการปวดเข่าในผู้ป่วยเบาหวาน โรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลกองนาง อำเภอบำบอง จังหวัดหนองคาย. *วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิกโรงพยาบาลพระปกเกล้า*, 36(1), 39-46.
- นฤตล ฮตฤฎา. (2560). ประสิทธิผลของยาพอกเข้าต่อระดับความปวดของเข่า (ยาพอกเข้าดูดพิษ พิษิตปวดในผู้สูงอายุ). สืบค้นจาก: https://www.skko.moph.go.th/dward/document_file/ttm/training_file_name/20190201152032_1049756459.pdf
- ปิยะพล พูลสุข, สุชาดา ทรงผาสุข, เมริษา จันทา, เนตรยา นิยมพิทักษ์พงศ์, และ กิตรวี จิรรัตน์สถิต. (2560). ประสิทธิผลของยาพอกสมุนไพรเพื่อบรรเทาอาการปวดเข่า ในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม. *ธรรมศาสตร์เวชสาร*, 18(1), 104-111.
- พิมพ์ศิริ สำเภาไทย, สุพัตรา ม้าอูตสาห์, และ นวพร ศิริวัฒนานุรักษ์. (2561). ตำรับยาพอกสมุนไพรยาเย็นลดการอักเสบ. *วารสารวิจัยพัฒนาระบบงานสาธารณสุขแพร่*, 40(7), 40-41.
- วันวิสาข์ พรหมเมตตา. (ม.ป.ป.). ผลของการใช้แผ่นพอกสมุนไพรนานานในผู้ป่วยที่มีอาการปวดเข่า. ใน *การประชุมวิชาการ: นำเสนอประสบการณ์และงานวิจัยการแพทย์ทางเลือกในระบบบริการสุขภาพ* (น. 67-71). นนทบุรี: กองการแพทย์ทางเลือก กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. (2563). วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร จังหวัดปราจีนบุรี. สืบค้นจาก: https://th.wikipedia.org/wiki/วิทยาลัยการแพทย์แผนไทยอภัยภูเบศร_จังหวัดปราจีนบุรี
- สมพร ภูติยานันต์. (2551). *สมุนไพรใกล้ตัว เล่มที่ 13 ว่าด้วย สมุนไพรแต่งสี กลิ่น รส*. เชียงใหม่: ตูลย์การพิมพ์.
- สำนักงานหลักประกันสุขภาพ (สปสช.). (2559). *บอร์ด สปสช.ออกแนวปฏิบัติผ้าข้อเข่าเสื่อม กระจายอำนาจให้เขตช่วยผู้ป่วยเข้าถึงการรักษา*. สืบค้นจาก <https://www.nhso.go.th/frontend/NewsInformationDetail.aspx?newsid=MjA0OQ==>



สูตรรัตน์ เกตุรัตน์ และ ยุพลักษณ์ ส่อสืบ. (2560). ประสิทธิภาพของการรักษาอาการปวดเข่าด้วยการพอกยาสมุนไพรแบบผสมผสานในผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม. สืบค้นจาก: http://kantang-hospital.go.th/wp-content/uploads/2018/03/R2R_5.pdf

สุรเกียรติ์ อาชานานุภาพ. (2551). ข้อเสื่อม (Osteoarthritis) โรคข้อเข่าเสื่อม. ใน สุรเกียรติ์ อาชานานุภาพ (บรรณาธิการ), ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2 350 โรคกับการดูแลรักษาและการป้องกัน (พิมพ์ครั้งที่ 4, 752-757). กรุงเทพฯ: โฮลิสติกพับลิชติค.

Medthai. (2560). ไตโคลฟีแนค (Diclofenac) สรรพคุณ วิธีใช้ ผลข้างเคียง ฯลฯ. สืบค้นจาก <https://medthai.com/ไตโคลฟีแนค/>



การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรจีนฝางเฟิง

Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity in

Saposhnikovia divaricata (Turcz.) Schischeกาญจนา กงสิมมา¹ ศศิวิมล บุนสุเา¹ รังสิมา ไข้อย่างวงศ์¹ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ² อรภา ศิลมัฐ³ และ สรมน สุทิน^{1,*}Kanjana Kongsimma¹, Sasiwimol Bunsuea¹, Rungsima Chaitiamwong¹, Kittipat Sopitthummakhun²,Orapa Sinlamuth³, and Soramon Sutin^{1,*}¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ²สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ³คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ¹Department of Medical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan²Department of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan³Faculty of Chinese Medicine, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan

*Corresponding author, E-mail: soramon2003@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิง (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schische) สารสกัดจากรากฝางเฟิง เตรียมด้วยการสกัดในเอทานอล เพื่อนำไปทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.2702 ± 0.0347 mg/mL เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.0597 ± 0.0026 mg/mL ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก ใช้วิธีการทดสอบด้วย Folin-Ciocalteu reagent มีค่าเท่ากับ 0.1029 ± 0.0050 mg GAE g⁻¹ DM จากการวิจัยนี้อาจนำสมุนไพรจีนฝางเฟิงมาใช้เป็นทางเลือกในการสร้างเสริมสุขภาพและภูมิคุ้มกัน เช่น นำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับเพื่อระงับปวด และคลายการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ เป็นต้น

คำสำคัญ: สารสกัดจากรากฝางเฟิง สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

Abstract

This research has objected to evaluate antioxidant capacity and total phenolic contents in a Chinese herb named “Fangfeng” (*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schische). Fangfeng root was extracted in ethanol for measuring the antioxidant capacity via a DPPH scavenging assay. The IC₅₀ value of the extract was 1.2702 ± 0.0347 mg/mL compared with the standard antioxidant BHT with the IC₅₀ value of 0.0597 ± 0.0026 mg/mL. The total phenolic contents were determined by the Folin-Ciocalteu reagent having the value of 0.1029 ± 0.0050 mg GAE g⁻¹ DM. Based on this research, the Chinese herb Fangfeng may be used as an alternative to strengthen health and immunity such as an analgesic product and a muscle relaxant.

Keywords: Fangfeng root extraction, Antioxidant agent, Total phenolic contents

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (free radicals) สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกร่างกาย เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ การติดเชื้อ การที่เซลล์เกิดการบาดเจ็บและการอักเสบจากผลการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น อนุมูลอิสระคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวหรือไม่ครบคู่อยู่ในวงรอบ

ของอะตอม จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ต้องไปแย่งจับกับอิเล็กตรอนของโมเลกุลอื่น และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี ส่งผลต่อการทำลายโมเลกุลอื่น ๆ ต่อเนื่องกันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยปกติอนุมูลอิสระเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้วและมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระออกไป แต่ถ้าวร่างกายได้รับอนุมูลอิสระจากปัจจัยภายนอกมากเกินไป เช่น รังสียูวี ควันไฟ มลพิษต่าง ๆ อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพ (สุริยนา ดาทอง และ สุธีรา มณีฉาย, 2563) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค สารที่มาจากธรรมชาติเป็น สารกลุ่มที่ได้รับ ความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งใน จุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารจากสมุนไพรซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แชนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (สรินยา ขัดข่มแสง, 2551)

สารต้านออกซิเดชัน เป็นสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ลดปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกายสามารถจับคีเลตกับไอออนโลหะในร่างกายและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) (Pieniz, Colpo, Oliveira, Estefanel, & Andreazza, 2009) การรับประทานอาหารที่มีสารต้านออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบจะช่วยป้องกันและลดโอกาสเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) มะเร็ง (cancer) ภาวะชราก่อนกำหนด (premature aging) และอื่นๆ ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการเกิดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย ดังนั้นการได้รับสารต้านออกซิเดชันจะทำให้ร่างกายมีความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Mourao, Umeo, Takemura, Linde, & Colauto, 2011)

สมุนไพรจีนฝางเฟิง (Fangfeng) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schisch. เป็นสมุนไพรยืนต้นที่อยู่ในวงศ์ Umbelliferae มีความสูงประมาณ 1 เมตร มีดอกสีขาวบานที่ปลายกิ่ง เป็นหญ้ายืนต้นที่ขึ้นในทุ่งหญ้าแห้งหรือตามเชิงเขา (Kim et al., 2008) มีการกระจายอย่างกว้างขวางในเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ รากแห้งของฝางเฟิงใช้เป็นยาสมุนไพรจีนในการรักษาระบบภูมิคุ้มกัน ระบบประสาท และโรคระบบทางเดินหายใจ (Yang et al., 2020) และยังนำมาใช้ในการรักษาโรคไขข้อปวดศีรษะ อาการชักและเส้นประสาทเป็นอัมพาตในประเทศจีนและเกาหลี (Young, Yoo, Hee, Kee, & Jinwoong, 2011) ซึ่งมีรสเผ็ดและหวาน มีฤทธิ์อุ่นเล็กน้อย เข้าสู่เส้นลมปราณกระเพาะปัสสาวะ ตับ และม้าม ช่วยกระจายลม เสริมภูมิคุ้มกันของร่างกาย (หัวเฉียวแพทย์แผนจีน, 2561) มีสรรพคุณช่วยกระตุ้นให้หัวใจจากการกระทบลมภายนอกและความชื้น ระงับปวดและคลายการเกร็งของกล้ามเนื้อ ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและต้านการอักเสบ (เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, 2554) ทางแพทย์แผนจีนมักใช้สมุนไพรฝางเฟิงร่วมกับสมุนไพรจีนตัวอื่นๆรวมเป็นตำรับยาสมุนไพรจีนที่ใช้รักษาโรคต่างๆ ได้แก่ ลำไส้แปรปรวนชนิดต้อตันและม้ามพร่อง (Luo, 2022) โรคต่างขาตชนิดม้ามและกระเพาะอาหารพร่อง (Wang, 2021) เป็นต้น นอกจากนี้ สมุนไพรฝางเฟิงยังเป็นสมุนไพรจีนอันดับต้นๆที่แพทย์แผนจีนเลือกใช้ในการรักษาอาการกล้ามเนื้อกระดูกในเด็ก (TICS) (Jiang, 2021) และโรคโพรงจมูกอักเสบ (Li, 2020) เป็นต้น จากการศึกษาทางพิษวิทยาเคมีที่มีการรายงานจากสมุนไพรฝางเฟิง ได้มีการระบุองค์ประกอบทางเคมี คือ โครโมน (chromones) คูมาริน (coumarins) ลิกแนน (lignans) โพลีอะเซทิลีน (polyacetylenes) และสเตอรอล (sterols) (Kim et al., 2008) ตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพรวมถึงยาแก้ปวด (Okuyama et al., 2001) มีรายงานว่าส่วนใบประกอบไปด้วยคูมาริน ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน และรากมีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย

ปัจจุบันการใช้สมุนไพรได้รับความนิยมในวงการแพทย์ทางเลือกอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสมุนไพรมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่สูงกว่าพืชผักทั่วไป สมุนไพรของจีนมีประวัติการนำมาใช้ในการการรักษาโรคตามตำรับยาจีนโบราณมากกว่า 4,000 ปี โดยสมุนไพรจีนมีส่วนช่วยในการรักษาสมดุลภายในร่างกาย แพทย์แผนจีนจึงนำสมุนไพรจีนมาใช้สร้างเสริมสุขภาพ รักษาและป้องกันการเกิดโรค นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาสมุนไพรจีนในการลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาแผนปัจจุบันอีกด้วย สมุนไพรแต่ละชนิดมีคุณลักษณะเฉพาะตัว ในตำรับยาจีนจึงมีการใช้คุณลักษณะหลายอย่างของสมุนไพรหลายชนิดในการบำบัดโรคและแก้ไขการแปรปรวนของหยินและหยางซึ่งเป็นวิธีการรักษาโรคและทำให้ร่างกายแข็งแรง (เมฆม สอดส่องกฤษ, 2558) งานวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรจีนผางเฟิงส่วนรากที่สกัด



ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ที่อาจมีผลช่วยรักษาระบบภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น จึงทำให้เกิดการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณฟีนอลิกของสมุนไพรจีนฝางเฟิงที่ใช้เป็นตำรับยาในการรักษาโรค

2. วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิงส่วนราก เพื่อเป็นข้อมูลในการสนับสนุนการใช้สมุนไพรจีนในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ rotary evaporator (Buchi รุ่น R210, Switzerland), freeze dryer (รุ่น ALPHA 1-2 LO, Germany), spectrophotometer (PG Instrument รุ่น T60V, United Kingdom) สารเคมี ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Germany), butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma-Aldrich, Germany), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA), 95% ethanol (Merck, USA), Folin-Ciocalteu reagent (Bio-Rad, USA), sodium carbonate (Bio-Rad, USA), absolute ethanol (Sigma-Aldrich, Germany), methanol (Merck, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิง

นำสมุนไพรจีนฝางเฟิงส่วนรากที่ซื้อจากคลินิกหัวเฉียวเวชกรรม แผนกแพทย์แผนจีน มาป่นให้ละเอียด นำมาชั่งให้ได้ 200 กรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราส่วนสมุนไพรจีนฝางเฟิงต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 2) ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนฝางเฟิงไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) และทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) นำสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนฝางเฟิงที่ได้มาชั่งเพื่อคำนวณร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) ใส่ขวดสีชาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay

นำสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิงมาทดสอบโดยใช้วิธี DPPH scavenging assay ตามวิธีของ Lu และคณะ (Lu, Yuan, Zeng, & Chen, 2011) เตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH reagent) โดยชั่ง DPPH 0.004 กรัม ละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ทำการทดสอบสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้น ประกอบไปด้วย หลอดอ้างอิง 1 หลอด หลอดควบคุม 3 หลอด หลอดอ้างอิงของสารสกัด 1 หลอด และหลอดทดสอบสารสกัด 3 หลอด เติมน้ำละลาย DPPH ลงไปในสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ถ้าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีม่วงของอนุมูลอิสระ (DPPH) จางลงจนกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ (% inhibition) ที่ 50% ดังสูตรคำนวณ

$$\% \text{ inhibition} = [(C - (S - BS)) / C] \times 100$$



โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT (butylated hydroxyl toluene) และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่า % inhibition DPPH ลดลงร้อยละ 50 (50% inhibitory concentration: IC₅₀)

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารควบคุม S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด และ BS คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังเติมสารที่มีสีที่ใช้ในการทดสอบ มีไว้เพื่อหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (total phenolic content)

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent (Amin, Norazaidah, & Hainida, 2006) ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล จะได้สารสกัดสมุนไพรจีนผงเพิ่มความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอล ปริมาตร 390 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดสมุนไพรจีนผง เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกโดยแสดงผลในรูปแบบของเทียบเท่ามิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด (mg gallic acid equivalents per gram of dry material: mg GAE g⁻¹ DM)

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดสมุนไพรจีนผง

จากการนำสมุนไพรจีนผงส่วนรากมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อนำไประเหยตัวทำละลายเอทานอลออก แล้วทำให้แห้งจะได้ลักษณะสารสกัดหยาบของสมุนไพรจีนผงที่มีลักษณะหนืด สีเหลืองและนำสารสกัดหยาบของสมุนไพรจีนผงมาชั่งเพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนผงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

สมุนไพรจีน	ส่วนที่ใช้	น้ำหนักสมุนไพร	น้ำหนักสารสกัด	ร้อยละของน้ำหนัก
		(กรัม)	(กรัม)	(%Yield)
ผง	ราก	200	36.88	18.44

4.2 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay

DPPH scavenging assay เป็นวิธีการวัดความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งใช้สารอนุมูลอิสระ คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยให้สารสกัดสมุนไพรจีนผงทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร มีสีม่วงดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าสารสกัดสมุนไพรจีนผงสามารถต้านออกซิเดชันได้สารละลายสีม่วงก็จะจางลงจนไม่มีสีหรือเป็นสีเหลืองนวล ดังนั้นการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH จึงเป็นดัชนีที่วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรจีนผงที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรจีนผง สามารถวัดค่าได้จากการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่เหลืออยู่ เปรียบเทียบปริมาณกับกราฟมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกันโดยใช้สารมาตรฐาน butylated hydroxyltoluene (BHT) จากการนำสารสกัดสมุนไพรจีนผงมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT พบว่า สารสกัดสมุนไพรจีนผงมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อย โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.2702 ± 0.0347 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.0597 ± 0.0026 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดหยาบสมุนไพรจีนฝางเฟิงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

สารสกัด/สารมาตรฐาน	IC ₅₀ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
ฝางเฟิง	1.2702 ± 0.0347
BHT	0.0597 ± 0.0026

หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Feng-Lin และคณะ (2010) ที่ทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าของ trolox (TEAC) โดยมีค่า $6.39 \pm 0.81 \mu\text{mol Trolox/g}$ และสารต้านอนุมูลอิสระในการลดธาตุเหล็ก (FRAP) โดยมีค่า $14.22 \pm 1.12 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิง (Pinellia ternata) ที่มีรายงานค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.96 ± 0.3252 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โซนา ชาร์บา, สัจจวราย อวนบัง และ สิริพร รองรัตน์, 2563) แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิง เมื่อเปรียบเทียบกับสมุนไพรไทยพื้นบ้านพบว่าสารสกัดจากรากสมุนไพรจีนฝางเฟิงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากเมล็ดมะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) (สุวดี โพธิ์จิตร, ปิยานี รัตนชานอง, อุดมลักษณ์ มาตย์สถิตย์, และ วีระศักดิ์ อัครวงศ์อารยะ, 2562) สารสกัดจากตะขบฝรั่ง (*Muntingia calabura*) (อรรถพล พันธุ์งาม, สุรพงศ์ รัตน์, และ บรรลือ สังข์ทอง, 2560) และสารสกัดจากใบหนาด (*Blumea balsamifera*) (ปรุภูมิ เมืองอยู่, นันทพงศ์ ขำทอง, และ ชีรทัศน์ สุดสาย, 2559) ที่มีรายงานค่า IC₅₀ เท่ากับ 14.07 ± 1.34 , 6.86 ± 0.55 และ 45.8 ± 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิง ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นผลดีในแง่ของการรักษาสุขภาพของมนุษย์ การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมสามารถวิเคราะห์ได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสมุนไพรจีนฝางเฟิง พบว่าสารสกัดสมุนไพรจีนฝางเฟิงมีปริมาณรวมของสารฟีนอลิก เท่ากับ 0.1029 ± 0.0050 มิลลิกรัมของแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด 1 กรัม ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{DM}$) แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าปริมาณสารฟีนอลิกรวม

สารสกัด	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mg GAE g ⁻¹ DM)
ฝางเฟิง	0.1029 ± 0.0050

หมายเหตุ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หน่วยที่ใช้วัดปริมาณรวมของสารฟีนอลิก คือ mg GAE g⁻¹ DM (มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด 1 กรัม)

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Feng-Lin และคณะ (2010) ที่หาปริมาณฟีนอลิกในสมุนไพรจีนฝางเฟิง โดยมีปริมาณเท่ากับ $2.31 \pm 0.23 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{DM}$ ซึ่งมีปริมาณมากกว่าการศึกษาในครั้งนี้ โดยความคลาดเคลื่อนอาจเกิดในขั้นตอนการทดลองทำให้ปริมาณที่หาได้ค่อนข้างห่างกันและเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยจากสารสกัดจากผงผักขวยสด และผงผักขวยแห้ง โดยมีปริมาณสาร ฟีนอลิกรวมเท่ากับ 2.62 ± 0.53 และ $1.11 \pm 0.32 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{DM}$ (อรนุช นาคชาติ, วรณา เอกทอง, และ อรุณ คงลัก,



2557) สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของข้าหลวง พบว่าสารสกัดจากแก่นอ่อนของข้าหลวง มีปริมาณสาร ฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดจากใบอ่อนของข้าหลวง และสารสกัดจากเหง้าอ่อนของข้าหลวง มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.83 ± 0.15 , 0.53 ± 0.15 และ 0.46 ± 0.06 mg GAE g⁻¹ DM ตามลำดับ (ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง และ บุษยมาส รัตนดอน, 2559) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าสารสกัดจากผงผักแขยงสด ผงผักแขยงแห้ง แก่นอ่อนของข้าหลวง ใบอ่อนของข้าหลวง และเหง้าอ่อนของข้าหลวง มีปริมาณรวมของสารฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากสมุนไพรรจินผางเฟิง ที่มีปริมาณรวมของสารฟีนอลิก เท่ากับ 0.1029 ± 0.0050 mg GAE g⁻¹ DM

5. สรุปผลการวิจัย

ปัจจุบันการใช้สมุนไพรรจินผางเฟิงได้รับความนิยมในวงการแพทย์ทางเลือกอย่างกว้างขวางและสมุนไพรมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่สูงกว่าพืชผักทั่วไป สมุนไพรรจินผางเฟิงมีประวัติการนำมาใช้ในการรักษาโรคตามตำรับยาจีนโบราณมากกว่า 4,000 ปี โดยสมุนไพรรจินผางเฟิงจะเน้นความสำคัญไปที่การรักษาสมดุลภายในร่างกาย ยาสมุนไพรรจินผางเฟิงมีความสำคัญในการรักษาและป้องกันการเกิดโรค พืชสมุนไพรรจินผางเฟิงมีบทบาทสำคัญมากขึ้น จากการมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ในมนุษย์ คุณสมบัติดังกล่าวเกิดขึ้นจากสารสำคัญจำพวกฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ได้ทั้งในส่วนของราก ใบ ดอก ผล เมล็ด ทำหน้าที่ในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ช่วยยับยั้งการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และกำจัดไอออนของโลหะหนัก ทำให้สามารถชะลอความรุนแรงของสภาวะความเครียดของออกซิเจนในการทำลายเซลล์ (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010) จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรรจินผางเฟิงในเอทานอลที่ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน BHT ส่วนปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent พบว่าสารสกัดสมุนไพรรจินผางเฟิงมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.1029 ± 0.0050 มิลลิกรัมของแกลลิกต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัด 1 กรัม

สมุนไพรรจินผางเฟิงประกอบด้วยสารพฤกษเคมีจำนวนมาก สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่เป็นสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เคอร์คิวมิน (curcumin) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) แคทีชิน (catechin) และแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งจะทำงานร่วมกันทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

ข้อเสนอแนะแนวทางการวิจัยครั้งต่อไปควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์สุขภาพ และการศึกษาความเป็นพิษเพื่อประเมินถึงความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรรจินผางเฟิง และการสกัดสารด้วยตัวทำละลายอื่น เช่น เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) เฮกเซน (hexane) เพื่อเก็บเป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรรจินผางเฟิงไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

ขวัญยืน เลี่ยมสำโรง และ บุษยมาส รัตนดอน. (2559). การเปรียบเทียบปริมาณของฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอลิก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของข้าหลวงอ่อน (*Alpinia galangal* (L.) Willd.). รายงานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.



- โซนา ชาร์บา, สันวราย อวนบัง, และ สิริพร รองรัตน์. (2563). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดฟ้าป่นเขียวและจือหมู่*. โครงการงานพิเศษ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.
- ปรวดี เมืองอู่, นันทพงศ์ ขำทอง, และ อีรทัศน์ สุดสาย. (2559). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาด. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559* (น. 66-74). ปทุมธานี: สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยรังสิต.
- เมฆม สอดส่องกฤษ. (2558). *ข้อมูลสมุนไพรจีน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. อุบลราชธานี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, บรรณาธิการ. (2554). *ตำรับยาจีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย ฉบับสมบูรณ์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- สุวดี โพธิ์วิจิตร, ปิยานี รัตนขำทอง, อุดมลักษณ์ มาตย์สถิตย์, และ วีระศักดิ์ อัครวงศ์อารยะ. (2562). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นในเขตท้องถิ่นภาคเหนือ. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี*, 18(1), 25-39.
- สุรشنا ดาทอง และ สุริยา มณีฉาย. (2563). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกุ่มบก. *วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร*, 14(1), 48-57.
- สรินยา ชัดข่มแสง. (2551). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้องาช้างม้า* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- หัวเฉียวแพทย์แผนจีน [อินเทอร์เน็ต]. (2561). เข้าถึงเมื่อ 27 สิงหาคม 2564. จาก <https://www.huachiewtcm.com/content/8131/-ฟางเฟิง-ข้อมูลสมุนไพรจีน>.
- อรรถพล พันธุ์งาม, สุรพงศ์ รัตน์ะ, และ บรรลือ สังข์ทอง. (2560). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดตะขบฝรั่ง. ใน *การประชุมวิชาการ “มหาวิทยาลัยมหาสารคามวิจัย ครั้งที่ 13* (น. 563-570). มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- อรนุช นาคชาติ, วรณา เอกทอง, และ อรุณ คงลัก. (2557). สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผงผักแขยง. *วารสารวิทยาศาสตร์คชสาร*, 36(2), 55-64.
- Amin, I., Norazaidah, Y., & Hainida, K. I. E. (2006). Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. *Food Chemistry*, 94, 47-52.
- Feng-Lin, S., Ren-You, G., Yuan, Z., Qin, X., Lei, K., & Hua-Bin, L. (2010). Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 2362-2372.
- Jiang, B. (2021). Analysis of Professor Wang Sumei's medication experience in the treatment of children with tic disorder based on the Traditional Chinese Medicine inheritance assistance platform [Master Degree of Traditional Chinese Medicine]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine.
- Kim, S. J., Chin, Y.-W., Yoon, K. D., Ryu, M. Y., Yang, M. H., Lee, J.-H., & Kim, J. (2008). Chemical constituents of *Saposhnikovia divaricata*. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 39(4), 357-364.
- Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., & Chen, J. (2011). Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. *Food Research International*, 44, 530-536.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants, and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126.



- Luo, K. L. (2022). Observation of clinical efficacy of Xifeng Huashi granule in the treatment of diarrhea-type irritable bowel syndrome and preliminary exploration of drug use [Master Degree of Traditional Chinese Medicine]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine.
- Li, M. P. (2020). Based on the data method to explore the clinical experience of Professor Wang Shizhen in the treatment of Biyuan [Master Degree of Traditional Chinese Medicine]. Guangzhou: Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine.
- Mourao, F., Umeo, S. H., Takemura, O. S., Linde, G. A., & Colauto, N. B. (2011). Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 197-202.
- Okuyama, E., Hasegawa, T., Matsushita, T., Fujimoto, H., Ishibashi, M., & Yamazaki, M. (2001). Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 154-160.
- Pieniz, S., Colpo, E., Oliveira, V. R., Estefanel, V., & Andreazza, R. (2009). Avaliacao in vitro do potencial antioxidante de frutase hortalias. *Cienciae Agrotecnologia*, 33(2), 552-559.
- Wang, H. H. (2021). Observation of clinical efficacy of Xiaobai No.2 prescription in the treatment of advanced vitiligo : spleen and stomach deficiency syndrome [Master Degree of Traditional Chinese Medicine]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine.
- Yang, M., Wang, C. C., Wang, W. L., Xu, J. P., Wang, J., Zhang, C. H., & Li, M. H. (2020). Anti-proliferative and antioxidant activities of *Saposhnikovia divaricata*. *Oncology Reports*, 18, 227-234.
- Young, W. C., Yoo, H. J., Hee, S. C., Kee, D. Y., & Jinwoong, K. (2011). Anti-inflammatory constituents from the roots of *Saposhnikovia divaricata*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(6), 2132-2134.



การศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากใบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์

Biocompatibility study of tobacco mosaic virus nanoparticles on human alveolar bone cells

อัญจิตา ชวนะโรจนารัตน์^{1,*}, นิรดา ธเนศวร², จิตติมา ลัคนากุล³ และ สรสันท์ รังสิยานนท์⁴Aunjida Chawanarojanarit^{1,*}, Nirada Dhanesuan², Jittima Amie Luckanagul³, and Sorasun Rungsianont⁴¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร²รองศาสตราจารย์ ภาควิชาโสตศอนาสิก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร⁴รองศาสตราจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร¹Master Degree in Oral and Maxillofacial Sciences, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok²Associate Professor, Department of Oral Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok³Assistant Professor, Department of Food and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok⁴Associate Professor, Department of Oral Surgery and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok

*Corresponding author, E-mail: aunjida6565@gmail.com

บทคัดย่อ

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับความสำเร็จของงานทันตกรรมรากเทียม ได้แก่การมีปริมาณกระดูกรองรับรากเทียมที่เพียงพอ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอนุไวรัสจากใบยาสูบ มีคุณสมบัติสามารถเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพของอนุไวรัสจากใบยาสูบต่อเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ วิธีการศึกษาโดยใช้เซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงจำนวน 2 เซลล์ไลน์ มาทดสอบร่วมกับอนุไวรัสจากใบยาสูบ โดยประเมินความมีชีวิตของเซลล์ การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ผลการวิจัยพบว่าเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ที่เลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีไวรัสจากใบยาสูบเคลือบอยู่ทั้งสองเซลล์ไลน์ มีค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ในวันที่ 1, 3, 7 และ 14 มากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส รวมทั้งพบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มที่เลี้ยงด้วย Osteogenic media การวิจัยนี้สรุปได้ว่าอนุไวรัสจากใบยาสูบมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์และมีแนวโน้มในการเหนี่ยวนำเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น จึงมีความน่าสนใจที่จะนำไปใช้พัฒนาต่อยอดสำหรับงานทันตกรรมเนื้อเยื่อแข็งต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ความเข้ากันได้ทางชีวภาพ ไวรัสมอสเสคใบยาสูบ เซลล์กระดูกเข้าฟัน

Abstract

The most associated factor of dental implant success is an adequate amount of supporting bone for the implant. Previous studies found that nanoparticles of the tobacco virus had the ability to induce bone formation. This study aimed to evaluate the biocompatibility of tobacco mosaic virus nanoparticles with primary human alveolar bone cells. The two primary cell lines were co-culture with tobacco mosaic viral particles. The evaluation of cell viability, the alkaline phosphatase assay, calcium matrix mineralization test were performed. The results showed that both cell lines which cultured on the tobacco viral coated plate had higher average proliferation rate than the control group at day 1, 3, 7 and 14. Moreover, the alkaline phosphatase enzyme assay was positive and calcium deposition was found significantly greater than the control group on day 14, especially in the group, which was treated with osteogenic media



($p < 0.05$). The present findings concluded that the tobacco mosaic virus was biocompatible with primary human alveolar bone cells and showed osteo-inductive potential. Therefore, it is interesting for future study in the hard tissue engineering field.

Keywords: Biocompatibility, Tobacco mosaic virus, Alveolar bone cell

1. บทนำ

ปัจจุบันรากฟันเทียมเป็นที่แพร่หลายและได้รับความนิยมจากผู้ป่วยและทันตแพทย์มากขึ้น ซึ่งปัจจัยหลักที่ทำให้รากฟันเทียมมีเสถียรภาพ (implant stability) (Bowler & Dym, 2015) คือการมีปริมาณกระดูกที่เพียงพอ โดยกระดูกทดแทนที่นำมาใช้ในทางคลินิกมีความหลากหลาย และมีข้อจำกัดแตกต่างกัน วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (tissue engineering) เป็นตัวเลือกหนึ่งซึ่งเป็นการพัฒนาโครงสร้างค้ำยันของวัสดุ (scaffold) โดยใส่สารช่วยเร่งการเจริญของกระดูกหรือโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus: TMV) มีผลต่อลักษณะพื้นผิว (topographical feature) ทำให้ขรุขระมากขึ้น (roughness) เลียนแบบโปรตีนเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix protein) ส่งผลต่อการเกาะกลุ่มของเซลล์ มีผลเร่งการแสดงออกของ BMP-2 ซึ่งส่งผลเหนี่ยวนำการสร้างกระดูกด้วย (Sitasuwan et al., 2012)

ไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV) เป็นไวรัสชนิดแรกที่ถูกค้นพบ มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod like shape) มีความยาว 300 นาโนเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 18 นาโนเมตร ประกอบด้วย 2,130 protein cuspid ที่มีรูปร่างขด (helical) รอบๆ RNA สายเดี่ยว มีลักษณะโครงสร้างที่ชัดเจนและไม่สามารถก่อให้เกิดโรคหรือเพิ่มจำนวนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sitasuwan et al., 2014) โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า TMV ที่เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ TMV มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสร้างกระดูก (osteinduction) โดยเร่งการแสดงออกของ bone morphologic protein-2 (BMP-2) ส่งผลให้เกิด early osteoblastic differentiation (Sitasuwan et al., 2012) และมีผลทำให้พบ gene osteocalcin ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ mineralization ของเซลล์กระดูกเซลล์ปฐมภูมิในเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกจากหนู (rBMSC) เร็วขึ้น (Kaur et al., 2010)

นอกจากนี้ในปี 2019 ได้มีการศึกษาผลของ TMV ต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมนุษย์ (human bone marrow stem cells) พบว่า TMV-RGD1 ซึ่งเป็น mutant TMV ส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกจากการพบแสดงออกของ gene osteocalcin และ BMP-2 มากกว่าในกลุ่ม TMV และกลุ่มควบคุม โดยในการศึกษานี้ยังพบว่า TMV มีผลต่อ cell differentiation จากการวัดค่า enzyme alkaline phosphatase และมีผลต่อ calcium deposition จากการย้อมติดสี alizarin red มากกว่ากลุ่มควบคุม (Liu et al., 2019)

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่มีการศึกษาในเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ ทั้งนี้เพื่อนำข้อดีของ TMV ไปประยุกต์ใช้ทางทันตกรรม การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของอนุไวรัสจากใบยาสูบ (Tobacco Mosaic Virus, TMV) ที่มีต่อเซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ (human alveolar bone cells)

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatibility) ของ tobacco mosaic virus nanoparticles ที่มีต่อ human alveolar bone cells โดยประเมินผลสำคัญ คือ การมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) การสร้างสารอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase assay) และการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์



3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างและประชากร

เซลล์กระดูกเข้าฟันมนุษย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้การรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เลขที่ SWUEC-087/2562E โดยเก็บเนื้อเยื่อกระดูกจากกระดูกขากรรไกรของผู้ป่วยที่มาได้รับการรักษาผ่าตัดฟันคุดกรามล่างซี่ที่สาม ที่คลินิกการเรียนการสอนภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก จำนวน 2 ราย ในผู้ป่วยสุขภาพแข็งแรง ช่วงอายุระหว่าง 50ปี-20 โดยระบุชื่อเซลล์โดยให้ cell line ที่ 1 แทนด้วย OB1 (osteoblast: OB) และ cell line ที่ 2 แทนด้วย OB2 ตามลำดับ

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกเข้าฟัน

เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มเอฟ12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 Advance: DMEM-F12 Advance) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/ml, streptomycin 10,000 µg/mL, 1% amphotericin B 25 µg/mL ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยนำเซลล์เพาะเลี้ยงรุ่นที่ 3-8 มาใช้ในการทดลอง

3.2.2 กระบวนการสกัดไวรัสจากไบยาซูบ

ปั่นใบไม้ที่มีรอยโรคของไวรัสร่วมกับ 0.1 M potassium phosphate buffer และ 2-mercaptoethanol 0.1-0.3% ทำการกรองไวรัสแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงในหลอด centrifuge ที่ 4 องศาเซลเซียส 10500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วย kimwipe ทำสารให้ใส (clarifications) โดยใช้ *n*-butyl alcohol และ chloroform ในปริมาณเท่ากัน (50:50) ผสมให้เข้ากับสารละลายไวรัสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนบน แล้วทำให้สารเข้มข้นขึ้น (concentration) โดยเติม PEG 8000 ปริมาณ 8% ของสารละลายไวรัส และ 0.2 M โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บนเครื่องปั่นแกนแม่เหล็ก (stirrer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วเติม potassium phosphate buffer 0.01M pH 7.8 re-suspend ตะกอนจนหมด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อ ที่ 4 องศาเซลเซียส 9500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังปั่นเสร็จเก็บส่วนของเหลวไว้ในหลอด 15 mL จากนั้นทำการตกตะกอนขั้นสุดท้าย (final pelleting) โดยเทสารละลายไวรัสลงใน ultracentrifuge tube สูงประมาณ 2-3 เซนติเมตรจากด้านบน จากนั้นฉีด sucrose solution ใน potassium phosphate buffer โดยฉีด sucrose ที่ด้านล่างสูงประมาณ 1 เซนติเมตรจากก้นหลอด จากนั้นเติม buffer ลงไปจนถึง maximum แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ ultracentrifuge ด้วย 50.2 Ti rotor ที่ 42000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง หลังจากปั่นเสร็จให้เทของเหลวทั้งหมดออก เติมน้ำ potassium phosphate buffer 2-3 mL เพื่อละลายตะกอน 1 คืน (overnight) ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 9500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที หลังจากปั่นเสร็จให้เก็บส่วนของเหลวไว้ในหลอด conical ที่สะอาดในตู้เย็น เช็คความเข้มข้นไวรัสโดยใช้ UV absorbance (260 nm, 280 nm) (Metavarayuth et al., 2015)

3.2.3 กระบวนการทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากไบยาซูบ

1) เชื่อมวลโมเลกุลของโปรตีน (mass spectrometry analysis) โดยนำสารละลายไวรัส 1µL ผสม 9 µL matrix solution (sinapic acid in 70% acetonitrile, 0.1% TFA) จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ 1 µL หยดลงบน MALDI plate ปลอ่ยให้แห้ง ทำการวัดผลด้วย MALDI-TOF mass spectrometry (autoflex speed, Bruker®)

2) ดูลักษณะโครงสร้างของไวรัสด้วยวิธี transmission electron microscopy (TEM) analysis โดยหยด TMV ความเข้มข้น 1mg/mL 20 µL ลงบน grids ทำการย้อมด้วย 1% uranyl acetate ส่องด้วยเครื่อง JEM-2100/HR microscope (200 kV, JEOL Japan)

3.2.4 กระบวนการนำไวรัสจากไบยาซูบเคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์

เคลือบจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ด้วยสารละลาย Poly-d-lysine (PDL) โดยหยด PDL ความเข้มข้น 0.1 mg/mL หยด TMV ความเข้มข้น 0.1 mg/mL ในน้ำ เคลือบที่กันหลุมทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำไปทดสอบดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสที่เกาะบนกันหลุมจานเพาะเลี้ยง (surface characterization) ด้วย atomic force microscopy (AFM) โดยใช้เครื่อง Nanosurf CoreAFM (dynamic mode : trapping mode, contact mode with Dyn190A)

3.2.5 ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าฟัน (cell viability)

เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ทำการทดสอบโดยเติมสารละลาย resazurin (Prestobluetm cell viability reagent, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) ต่อ DMEM-F12 Advance อัตราส่วน 1:10 นำเข้าตู้บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกผลโดยดูค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทดสอบออกแล้วนำมาวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่น 560/590 nm เพื่อประเมินปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เครื่อง microplate reader (CLARIOSTAR, BMG Labtech, USA) ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้ใส่ TMV (Maturavongsadit et al., 2016)

3.2.6 ทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเข้าฟัน (alkaline phosphatase, ALP activity assay)

เพื่อตรวจสอบลักษณะเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้างกระดูก (osteoblast differentiation) เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) ซึ่งประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 200 mM, penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000 µg/mL, 1% amphotericin B 25 µg/mL, ascorbic acid 50 µg/mL, β-glycerophosphate 5 mM และ dexamethasone 250 nM เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ทดสอบด้วยสารละลาย p-nitrophenylphosphate (alkaline phosphatase yellow (pNPP), Sigma Aldrich®, USA) ความเข้มข้น 1.5 g/L ที่อุณหภูมิห้อง ปิดทับด้วยกระดาษฟอยล์แล้วบ่มนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณการดูดกลืนแสง (absorbance, O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

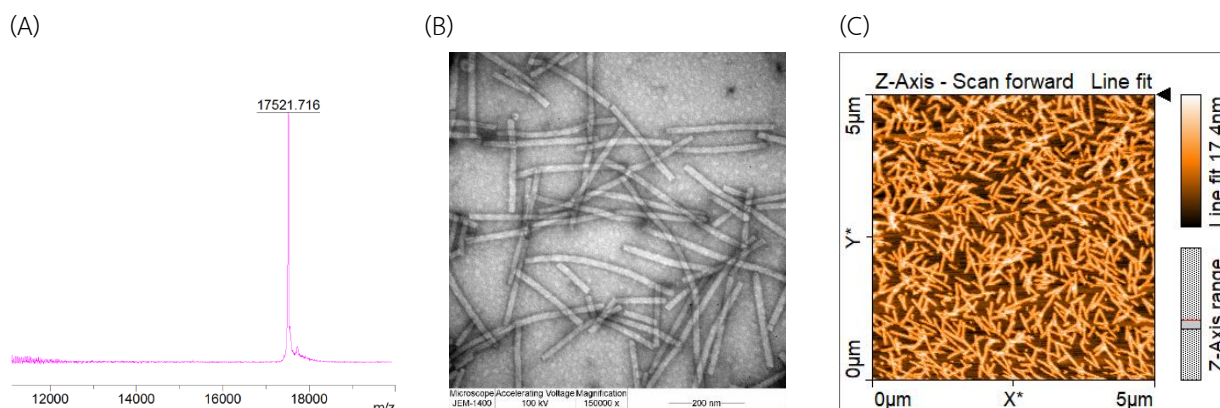
3.2.7 ทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ โดยการย้อม alizarin red

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-F12 Advance เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก (osteogenic media) เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตรึงเซลล์ด้วยสารละลาย 10% formalin เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วย้อมด้วยสารละลาย alizarin red (Sigma Aldrich, USA) ความเข้มข้น 40 mM pH 4.1-4.3 ปิดจานเลี้ยงเซลล์ด้วยกระดาษฟอยล์ บ่มนาน 30 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที วางทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการบันทึกผลเก็บข้อมูลเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มิได้ใส่ TMV และกลุ่มที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น osteogenic media

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบทดสอบคุณลักษณะโครงสร้างของไวรัสจากไบยาซูบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์

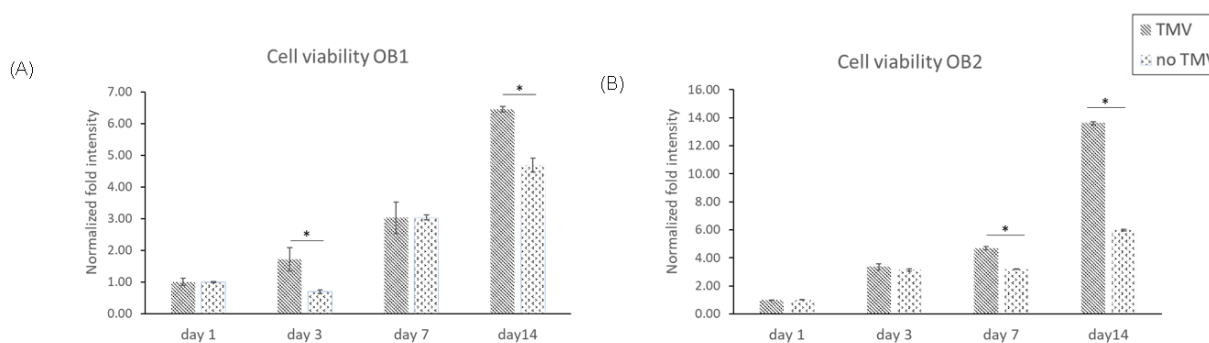
ผลการตรวจจุลโมเลกุลโปรตีนของไวรัส TMV ด้วย MALDI-TOF MS analysis พบว่ามีค่าสูงในช่วง 17521.716 m/z มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15-18 nm ความยาวประมาณ 280-350 nm และพบว่าความเข้มข้นไวรัส 0.1 mg/mL เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการปกคลุมเคลือบผิวจานเพาะเลี้ยงได้เต็มพื้นที่ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 (A) ผลตรวจมวลโมเลกุลโปรตีนของไวรัส TMV ด้วย MALDI-TOF MS analysis, (B) ผลการตรวจดูโครงสร้างของ TMV ด้วยวิธี transmission electron microscopy (TEM) magnification 150,000x scale bar 200 nm และ (C) ผลการตรวจดูลักษณะพื้นผิวของไวรัสด้วยวิธี Atomic force microscopy (AFM) พื้นที่ 5x5 μm

4.2 ผลการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าฟัน

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์กระดูกเข้าฟันพบว่า กลุ่มทดลองที่มี TMV ทั้ง 2 cell lines มีแนวโน้มค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นตลอด 14 วัน มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV ดังแสดงในภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่าไวรัสมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตและเร่งการเกิดเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะในปี 2019 ที่พบว่าผลของไวรัสจากใบยาสูบที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ที่เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ กับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดการสร้างกระดูกมนุษย์จากไขกระดูกต้นขา (human bone mesenchymal stem cells: hBMSC) พบว่าเซลล์กลุ่มทดลองและควบคุมมีการเจริญเติบโตมากขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นโดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 2 แผนภูมิค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ (A) cell line OB1 และ (B) cell line OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยง non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test ที่กำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$

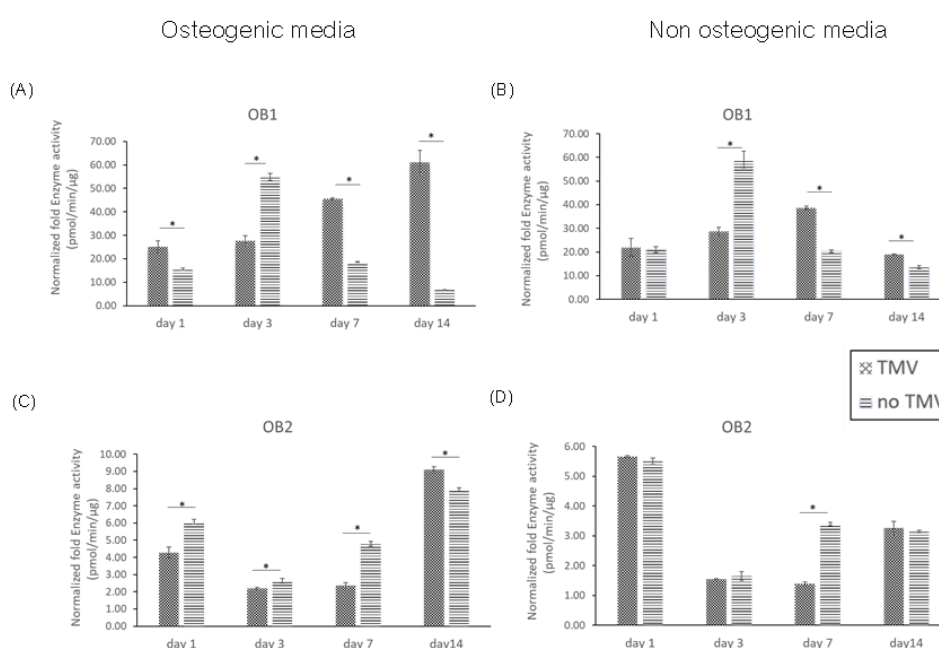
4.3 ผลการทดสอบระดับปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์กระดูกเข้าฟัน

การทดสอบคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูก โดยดูจากระดับปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เริ่มพบตั้งแต่ช่วงเซลล์มีการเจริญเติบโต (proliferation) มีค่าสูงในช่วง early marker osteoblast differentiation ในระหว่างการสังเคราะห์ extracellular matrix และเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่เข้าสู่กระบวนการ mineralization (Metavarayuth et al., 2015) โดยจากงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า ในเซลล์ OB1 เซลล์ในกลุ่มทดลองที่มี TMV สร้างเอนไซม์ปฏิกิริยาอัลคาไลด์ฟอสฟาเตส มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี TMV ในวันที่ 7 และ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 2 สภาวะ ส่วนในเซลล์ OB2 กลุ่มทดลองมี



แนวโน้มการสร้างเอนไซม์ในช่วงแรกน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในวันที่ 14 กลุ่มทดลองมีแนวโน้มการสร้างเอนไซม์มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในสภาวะ osteogenic media โดยหากลองเปรียบเทียบกราฟพบว่า เซลล์ OB1 มีพฤติกรรมการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเร็วกว่า OB2 โดยเฉพาะในช่วง 3 วันแรก ดังแสดงในภาพที่ 3

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะในปี 2019 ที่พบว่า TMV ส่งผลต่อเซลล์ hBMSC สามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมในสภาวะ osteogenic media และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sitasuwan และคณะในปี 2012 ที่พบว่าในสภาวะ osteogenic media เซลล์ rBMSC ที่มี TMV 0.2 mg/mL เคลือบบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นและมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ ส่วนในสภาวะ non osteogenic media เซลล์ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมีการสร้างเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยอัตราการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตส ใน cell line OB1 และ OB2 ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ (A, C) osteogenic media และ (B, D) non osteogenic media โดยใช้สถิติ Independent Sample T-test โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่น 95% โดย * $p < 0.05$

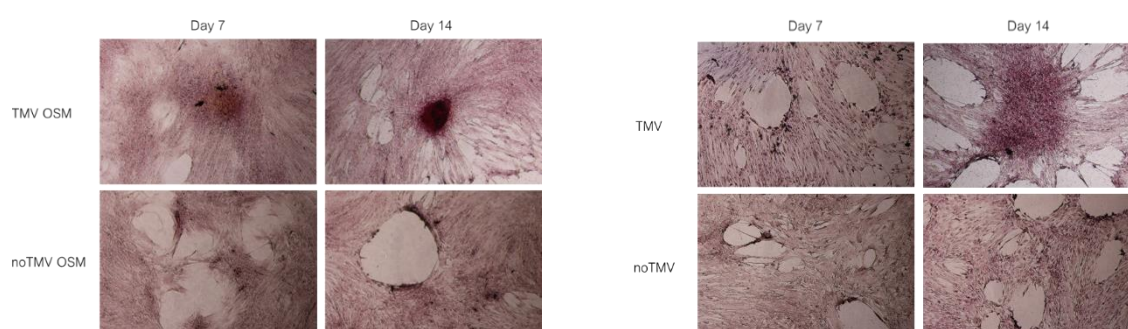
4.4 ผลการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์โดยการย้อม alizarin red

ในการทดสอบการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ เนื่องจากเซลล์ OB1 มีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสเร็วมากในช่วง 1-3 วันแรก แต่เซลล์ OB2 ในกลุ่มควบคุมมีแนวโน้มการสร้างเอนไซม์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 14 ซึ่งเซลล์ OB2 สอดคล้องกับโมเดลการเจริญเติบโตของเซลล์กระดูกมนุษย์ (primary human osteoblast) (Wrobel et al., 2016) ทั้งนี้การทดสอบด้วยการย้อม alizarin red ควรทดสอบในช่วงวันที่ 7-14 เพื่อการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก cell line OB2 มาใช้สำหรับการทดสอบวิธีนี้ โดยพบว่าเซลล์ย้อมติดสีแดงของ alizarin red ตั้งแต่วันที่ 7 ในกลุ่มทดลองที่มี TMV และกลุ่มควบคุม โดยวันที่ 14 ในกลุ่มทดลองที่มี TMV เซลล์ติดสีแดงเข้มขึ้นมีลักษณะ nodule มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในสภาวะ osteogenic media ดังแสดงในภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่า TMV ส่งเสริมการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์



สอดคล้องกับการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาในเซลล์ rBMSC ในสภาวะ osteogenic media พบว่ากลุ่มทดลองที่มี TMV พบการย้อม alizarin red มีลักษณะติดสีเข้ม (deep red color) เป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ (large nodule) มากกว่ากลุ่มควบคุม (Kaur et al., 2010; Metavarayuth et al., 2015; Liu et al., 2019)

นอกจากนี้งานวิจัยของ Sitasuwan และคณะในปี 2012 พบว่าเซลล์ rBMSC ที่มี TMV ในสภาวะ osteogenic media ติดสี alizarin red สีแดงเข้มในตำแหน่ง large nodule มากกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็น small nodule ในสภาวะ media ธรรมดา โดยเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของ alizarin red พบว่า TMV ในสภาวะ osteogenic media มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในสภาวะ media ธรรมดา 2 เท่า และยังพบว่า osteogenic media มีผลระดับปฏิกิริยาเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสและการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มทดลองที่มี TMV ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก osteogenic media มีส่วนประกอบของ dexamethasone ซึ่งช่วยส่งเสริมการเกิด actin depolymerization มีผลเพิ่มระดับปฏิกิริยาเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์ การสร้างโปรตีน osteocalcin และส่งเสริม การสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ β -glycerophosphate เป็นตัวเติมฟอสเฟต ในกระบวนการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ มีผลต่อการเพิ่มระดับปฏิกิริยาเอนไซม์อัลคาไลด์ฟอสฟาเตสของเซลล์ และ ascorbic acid เป็นแหล่งสร้างคอลลาเจนที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix)



ภาพที่ 4 ภาพการสะสมแคลเซียมในเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ใน cell line OB2 โดยการย้อม alizarin red ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope) ที่เลนส์วัตถุกำลังขยาย 4X ภายใต้สภาวะอาหารเลี้ยงเซลล์ osteogenic media (OSM) และ non osteogenic media

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การตอบสนองของ pluripotent stem cell เช่น bone mesenchymal stem cell (BMSC) จากสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัย แตกต่างจาก human bone mesenchymal stem cell (hBMSC) ที่มาจากมนุษย์ เนื่องจากเป็นคนละสปีชีส์ โดยเซลล์มนุษย์มีความสำคัญต่อการศึกษาทางคลินิกเนื่องจากไม่มีความแตกต่างทางสปีชีส์ แต่มีข้อเสียคือ รูปแบบการตอบสนองของเซลล์มนุษย์ด้าน phenotype และ potential ยังขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แหล่งที่มาของเซลล์ อายุ เพศ ตำแหน่งที่รับมา กระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น (Wrobel et al., 2016; Czekanska et al., 2012)

ดังนั้นงานวิจัยเกี่ยวกับไวรัสจากใบยาสูบต่อการกระตุ้นการสร้างกระดูก ที่ผ่านมา พบว่ามีการศึกษากับเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) แต่ยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้าที่ศึกษาเซลล์ osteoblast จากกระดูกขากรรไกรบน (human alveolar bone cells) งานวิจัยนี้คาดหวังว่าจะเป็นประโยชน์ในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนางานวิจัยทางคลินิกให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น



5. สรุปผลการวิจัย

ไวรัสจากใบยาสูบมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์กระดูกเข้าพันมนุษย์ โดยเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น มีคุณสมบัติเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกได้ทั้ง osteoblast differentiation และ matrix mineralization ซึ่งคาดหวังว่าไวรัสจากใบยาสูบสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดร่วมกับระบบโครงร่างทางชีวภาพ เพื่อใช้สำหรับงานพันธุวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากทุนวิจัยเงินรายได้ โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีงบประมาณ 2563 นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาและบุคลากร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และภาควิชาวิทยาการเภสัชและเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความกรุณาชี้แนะและช่วยสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

- Bowler, D., & Dym, H. (2015). Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. *Dental Clinics of North America*, 59(2), 493-503.
- Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Richards, R. G., & Hayes, J. S. (2012). In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials*, 24, 1-17.
- Kaur, G., Valarmathi, M. T., Potts, J. D., Jabbari, E., Sabo-Attwood, T., & Wang, Q. (2010). Regulation of osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells on 2D nanorod substrates. *Biomaterials*, 31(7), 1732-1741.
- Liu, T., Zhao, X., Wang, L., Yang, J., Metavarayuth, K., & Lin, Y. (2019). Using plant virus based nanorods to modulate the differentiation of human bone marrow stem cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 15(2), 363-372.
- Metavarayuth, K., Sitasuwan, P., Luckanagul, J. A., Feng, S., & Wang, Q. (2015). Virus nanoparticles mediated osteogenic differentiation of bone derived mesenchymal stem cells. *Advanced Science (Weinheim)*, 2(10), 1500026.
- Maturavongsadit, P., Luckanagul, J. A., Metavarayuth, K., Zhao, X., Chen, L., & Lin, Y. (2016). Promotion of in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells using in situ hyaluronic hydrogel functionalized with rod-like viral nanoparticles. *Biomacromolecules*, 17(6), 1930-1938.
- Sitasuwan, P., Lee, L. A., Bo, P., Davis, E. N., Lin, Y., & Wang, Q. (2012). A plant virus substrate induces early upregulation of BMP2 for rapid bone formation. *Integrative Biology*, 4(6), 651-660.
- Sitasuwan, P., Lee, L. A., Li, K., Nguyen, H. G., & Wang, Q. (2014). RGD-conjugated rod-like viral nanoparticles on 2D scaffold improve bone differentiation of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Chemistry*, 2, 31.
- Wrobel, E., Leszczynska, J., & Brzoska, E. (2016). The characteristics of human bone-derived cells (HBDCS) during osteogenesis in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21, 26.



การพัฒนาเจลบำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าวสกัดเย็นและขมิ้นชันเพื่อเพิ่มความกระจ่างใส

Developing skin care gel from cold-pressed rice bran oil with brightening additive

Curcuma longa L.

ดวงกมล คินขุนทด^{1,*} กันฐวุฒิ บุญมี¹ ปรีชา เทียมปัญญา² และ พัชรดนย์ สุขพันธุ์²

Duangkamon Kinkuntod ^{1,*}, Kanthawut Boonmee¹, Preecha Thiampanya², and Pattadon Sukkapan²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาลัยนวัตกรรมเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร

¹Department of Biotechnology, College of Agricultural Innovation and Food, Rangsit University, Pathum Thani

²Faculty of Science, Chandrasakorn Rajabhat University, Bangkok

*Corresponding author, E-mail: duangkamon.k61@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

ในการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการป้องกันแสงแดดของน้ำมันรำข้าวสกัดเย็นและขมิ้นชัน แล้วนำมาพัฒนาเป็นเจลบำรุงผิว จากการศึกษา พบว่า การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ของ ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น ในอัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 เท่ากับ 0.29, 0.58, 0.74, 0.77, 0.88 และ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อนำมาเติมเจลบำรุงผิว 1% w/w แล้วนำมาวิเคราะห์การป้องกันแสงแดด (sun protection factor : SPF) พบว่า ตัวอย่างควบคุม ascorbic acid เจล SPF 15 ในท้องตลาด น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น ในอัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 มีค่า SPF เท่ากับ 1.12, 3.23, 8.13, 3.65, 6.37, 7.57, 9.08 และ 8.92 และมีค่า UVA:UVB ratio 0.242, 0.941, 0.948, 0.767, 0.792, 0.835, 0.970 และ 0.930 ตามลำดับ การทดสอบในสภาพเร่ง พบว่า เนื้อสัมผัสไม่เปลี่ยนแปลง สีเข้มขึ้น และค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และเมื่อเก็บไว้ 90 วัน พบว่า เนื้อสัมผัสไม่เปลี่ยนแปลง สีอ่อนลง และค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังนั้น อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาพัฒนาเป็นเจลบำรุงผิว คือ น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น 2:1

คำสำคัญ: เจลบำรุงผิว น้ำมันรำข้าว ขมิ้น เอนไซม์ไทโรซิเนส การป้องกันแสงแดด

Abstract

This descriptive research aimed to examine to study the inhibition of tyrosinase. and sun protection of cold-pressed rice bran oil : *Curcuma longa* L. and then developed into skin care gel. From the study, it was found that the inhibition of tyrosinase at 50 percent (IC₅₀) of ascorbic acid, cold-pressed rice bran oil : *Curcuma longa* L. ratio 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 and 1:0 was 0.29, 0.58, 0.74, 0.77, 0.88 and 0.98 mg/ml. Then add skin care gel 1% w/w and analyzed it for sun protection factor (SPF). It was found that cold-pressed rice bran oil : *Curcuma longa* L. ratio 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 and 1:0 were valuable. The SPF is 3.23, 8.13, 3.65, 6.37, 7.57, 9.08 and 8.92 UVA:UVB ratio of cold-pressed rice bran oil : *Curcuma longa* L. ratio 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 and 1:0 were 0.941, 0.948, 0.767, 0.792, 0.835, 0.970 and 0.930. Testing under the accelerated condition revealed that the texture was unchanged, the color darkened and the pH changed slightly. And after 90 days of storage, it was found that the texture did not change, the color was lighter and the pH value changed slightly. The most suitable example to be developed into a skin care gel is cold-pressed rice bran oil : *Curcuma longa* L. (w/w) ratio 2:1

Keywords: Skin care gel, Cold-pressed rice bran oil, *Curcuma longa* L., Tyrosinase, Sun protection factor (SPF)



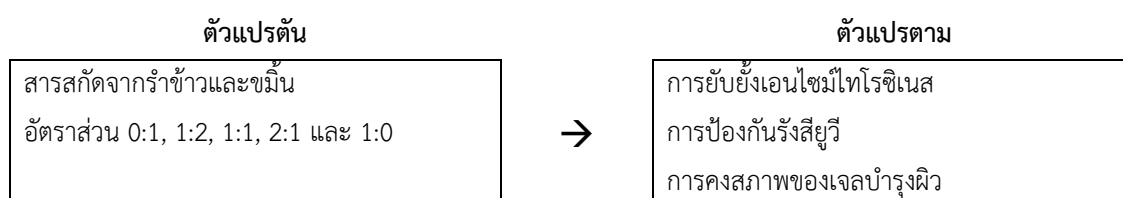
1. บทนำ

ตามยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี การนำเทคโนโลยี และนวัตกรรมสมัยใหม่ ตลอดจนนวัตกรรมจากภูมิปัญญาท้องถิ่นมาแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อเพิ่มมูลค่า และส่งเสริมผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรให้มีคุณภาพสูงขึ้นโดยการนำงานวิจัยและพัฒนาต่อยอดสู่อุตสาหกรรมบนฐานชีวภาพ เช่น อาหาร เวชสำอาง วัคซีน วัสดุชีวภาพ และสารสกัดจากสมุนไพร เป็นต้น

เอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางผิวหนัง ได้แก่ จุดด่างดำ ฝ้า กระ และความหมองคล้ำ (ประไพพิศ อินเสน, 2561) และมีแสงแดดเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เร่งกระบวนการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้ผิวหนังไหม้แดด และหากได้รับเป็นระยะเวลานานอาจก่อให้เกิดโรคมะเร็งผิวหนัง (สุริยา ขาววานิชกุล, โองการ วณิชชีวะ, และ พนิดา แสนประกอบ, 2562) ซึ่งแสงแดดประกอบด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ได้แก่ 1) ยูวี-เอ (UV-A) มีความยาวคลื่น 315-400 นาโนเมตร ยูวี-บี (UV-B) มีความยาวคลื่น 280-315 นาโนเมตรและ 3) ยูวี-ซี (UV-C) มีความยาวคลื่น 100-280 นาโนเมตร ซึ่งยูวี-ซี (UV-C) ถูกบล็อกโดยชั้นบรรยากาศของโลก ดังนั้น จึงไม่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อผิวหนังได้ น้ำมันรำข้าวสกัดเย็น มีสารแกมมาโอไรซานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการกระจายของมะเร็งผิวหนังคงความชุ่มชื้น และสามารถป้องกันรังสี UV ได้ (ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, อธิติชัย ทิมมณี, จันทรัตน์ จาริกสกุลชัยและรัฐพล ศิลปะรัมย์, 2563) จากการวิจัย พบว่า γ -oryzanol-loaded nanoethosomes สามารถป้องกันมะเร็งผิวหนังที่เกิดจาก UVB ในหนูทดลองในระยะยาว จึงเป็นสารที่ป้องกันมะเร็งผิวหนังที่เกิดจาก UVB ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมในการใช้เป็นส่วนผสมที่เป็นนวัตกรรมใหม่ในเครื่องสำอางได้ (Zeinali et al., 2021) และยังมีการนำสารสกัดจากสารสกัดจากข้าวหอมมะลิพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางกันแดด (พัทธพร ภูวดลไพศาล, 2562) ขมิ้น (*Curcuma Longa L.*) มีสารสำคัญ คือ เคอร์คูมิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส (Goenka, Johnson, & Simon, 2021) เช่น ต้านอนุมูลอิสระ และมีความปลอดภัยต่อการประกอบอาหาร (Sharifi-Rad et al., 2020) เมื่อทาครีมที่เติมเคอร์คูมินบนผิวหนังระยะยาว พบว่า ปริมาณอนุมูลอิสระลดลง และกลูต้าไธโอนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ชรินญา พิมพ์สอน, หนึ่งฤทัย ผากระกรณ์, พัชรภรณ์ นันทเพชร, จิรัฐติ ธรรมศิริ, เนตรดารา จันทร์อุตสาห, และ พิชานิกา ขอบจิตต์, 2561) สารสกัดขมิ้นชันมีคุณสมบัติในการควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันผิดปกติ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการรักษาโรคข้ออักเสบ และโรคเบาหวาน (Singletary, 2020)

จากรายงานการส่งออกเครื่องสำอางของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 พบว่า มีมูลค่าการส่งออกถึง 13,288,109,269 บาท (กรมศุลกากร, 2561) และในปี 2564 ประเทศไทยยังเป็นประเทศที่ส่งออกเครื่องสำอางเป็นอันดับ 2 ของอาเซียน และเป็นอันดับ 10 ของโลก (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2564) การพัฒนาเจลบำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าวสกัดเย็นและขมิ้น เพื่อความกระจ่างใส เป็นการนำผลผลิตทางการเกษตรมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สร้างความสามารถในการแข่งขันตามยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี และเป็นฐานข้อมูลในการนำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในระดับชุมชน และอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

กรอบแนวคิด



2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการป้องกันรังสียูวีของน้ำมันรำข้าวและขมิ้น
- 2.2 เพื่อพัฒนาเจลบำรุงผิวจากน้ำมันรำข้าวและขมิ้น



3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ เครื่องชั่งแบบละเอียด (PB303-SDR, Switzerland), UV-Visible spectrophotometer (LIBRA S22, England), spectrophotometer (721 LDC Digital Lab, China) และ pH meter (HP9010, Singapore)

สารเคมี ได้แก่ น้ำกลั่น, ascorbic acid (Chem supply, Australia), L-3,4-dihydroxyphenylamine (Sigma-Aldrich, USA) Carbomer 940 (Lubrizol, USA), disodium EDTA (Qrec, Newzealand), propylene glycol (Sigma-Aldrich, Germany), phenoxyethanol, triethanolamine (Sigma-Aldrich, Germany), methanol (AR) (RCI Labscan, Thailand), disodium hydrogen orthophosphate (Sigma-Aldrich, USA), sodium hydrogen orthophosphate (Kemaus, Australia), tyrosinase from mushroom (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันรำข้าวและขมิ้น

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองได้แก่ น้ำมันรำข้าวสกัดเย็นจากคุณปริญญ์ เลิศสุวรรณสิทธิ์ ตำบลบ้านเขย่น อำเภอนาคู จังหวัดชัยภูมิ และสารสกัดขมิ้นจากนางสาวนา คินขุนทด บ้านแปะ ตำบลอิเซ อำเภอบัวชุม จังหวัดศรีสะเกษ ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แล้วเตรียมน้ำมันรำข้าว:ขมิ้น อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0

3.2.2 การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เตรียมละลายไทโรซิเนสเข้มข้น 341.8 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร sodium phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 0.02 โมล L-3,4-dihydroxyphenylamine เข้มข้น 0.34 โมล ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 0.02 โมล ascorbic acid และสารตัวอย่างจากรำข้าว:ขมิ้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรละลายในเมทานอล เตรียมตัวอย่างควบคุม โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 มิลลิลิตร sodium phosphate buffer 1,500 ไมโครลิตรและเมทานอล 500 ไมโครลิตร เตรียมตัวอย่างมาตรฐานคือ ascorbic acid และสารตัวอย่างอัตราส่วนต่างๆ มา 500 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 ไมโครลิตร sodium phosphate buffer 1,500 ไมโครลิตร และเมทานอล 500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างมาตรฐานและตัวอย่างที่ต้องการศึกษาที่บ่ม แล้วเติม L-DOPA 500 ไมโครลิตร และปรับปริมาตร ให้ครบ 5 มิลลิตร ด้วยเมทานอล แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ของไทโรซิเนส นำทุกตัวอย่างมาวัดที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร (λ_{max}) แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำมาวัดค่าความดูดกลืนแสงเดิมจำนวน 3 ซ้ำ แล้วหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ด้วยสมการ regression

3.2.3 การวิเคราะห์การป้องกันรังสียูวี

นำ ascorbic acid และน้ำมันรำข้าว:ขมิ้น อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายในเมทานอลมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290, 295, 300, ... และ 390 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290-320 มาคำนวณหาค่า SPF โดยใช้สมการของ Mansur และคณะ (1986)

$$SPF_{\text{spectrophotometric}} = CF \sum_{320}^{290} EE \times I \times Abs$$

โดยที่ EE: erythral effect spectrum, I: solar intensity spectrum, CF = 10 และ Abs = ความยาวคลื่นที่วัดได้



ตารางที่ 1 ค่า EExII ในแต่ละความยาวคลื่น

ความยาวคลื่น(nm)	EExII
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
รวม	1

สมการคำนวณหาค่า UVA/UVB ratio

$$\text{UVA:UVB ratio} = \frac{\text{Abs.area UVA}/\lambda}{\text{Abs.area UVB}/\lambda}$$

$$\text{Abs area UVA}/\lambda = \frac{\int_{320}^{400} a_{\lambda} \times d\lambda}{\int_{290}^{400} d\lambda}$$

$$\text{Abs area UVB}/\lambda = \frac{\int_{290}^{320} a_{\lambda} \times d\lambda}{\int_{290}^{320} d\lambda}$$

$$\text{Abs.UVA}/\lambda = 1/3 \times 5 \times [(\text{Abs}320 + \text{Abs}400) + 4(\text{Abs}325 + \text{Abs}330 + \text{Abs}335... + \text{Abs}395) + 2(\text{Abs}330 + \text{Abs}340 + \text{Abs}350 + ... + \text{Abs}390)]/80$$

$$\text{Absorbs}/\lambda = 1/3 \times 5 \times [(\text{Abs}290 + \text{Abs}320) + 4(\text{Abs}295 + \text{Abs}305 + \text{Abs}315) + 2(\text{Abs}300 + \text{Abs}310)]/30$$

ตารางที่ 2 ระดับคุณภาพค่า UVA:UVB ratio

UVA/UVB Ratio	Star Category	ระดับ
0.0-0.20	-	ไม่มีคุณภาพ
0.21-0.40	*	ต่ำ
0.41-0.60	**	ปานกลาง
0.61-0.80	***	ดี
0.81-0.90	****	ดีมาก
ตั้งแต่ 0.91 ขึ้นไป	*****	ยอดเยี่ยม

3.2.4 การพัฒนาและทดสอบผลิตภัณฑ์

ซัง Carbopol 940 เติมน้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 วัน เติมน้ำ ethanol สารตัวอย่าง เติมน้ำ propylene glycol และ phenoxyethanol ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำ triethanolamine ที่ละลายในน้ำ โดยมีปริมาตร ดังตารางที่ 3 แบ่งตัวอย่างออกเป็น



2 ส่วน ส่วนที่ 1 มาทดสอบในสภาพแรง อุณหภูมิ 45 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำซ้ำจำนวน 7 รอบ และส่วนที่ 2 มาทดสอบโดยการเก็บไว้เป็นเวลา 90 วัน

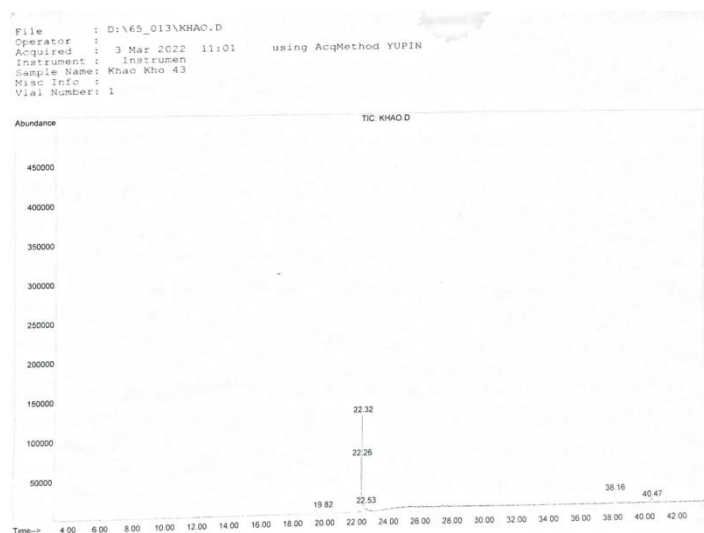
ตารางที่ 3 สารประกอบในผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิว (บัลกีส มามะ, นูริซัน นิสัน, ศฤรต์น ดวนใหญ่, และ สุชาดา มานอก, 2560)

สารประกอบ	% w/w
Carbomer 940	1.0
Disodium EDTA	0.1
Propylene glycol	30.0
Phenoxyethanol	0.8
สารตัวอย่าง	1.0
Triethanolamine	qs pH 6-7
น้ำกลั่น	qs 100.0

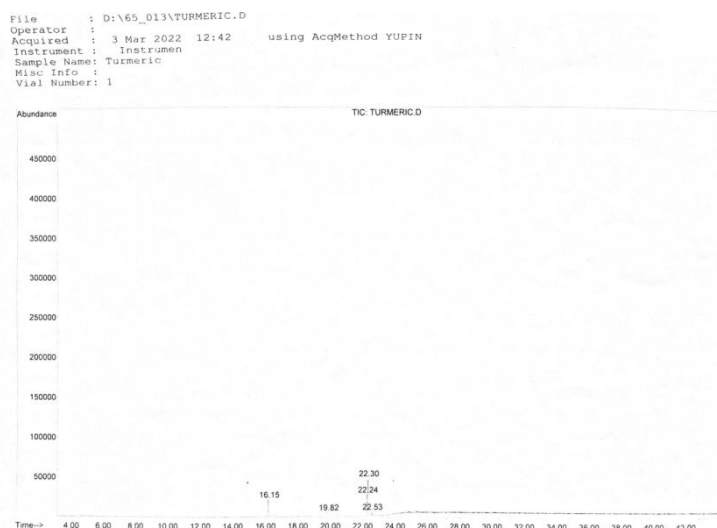
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

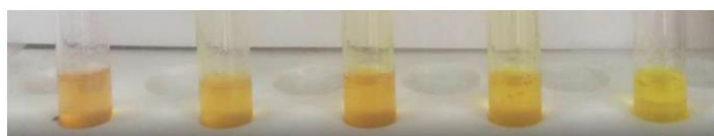
จากการส่งตัวอย่างไปตรวจที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ได้ผลดังภาพที่ 1 และ 2 จากการเตรียมสารสกัดจากน้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์น้ำมันรำข้าวสกัดเย็นด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์สารสกัดเข้มข้นด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer



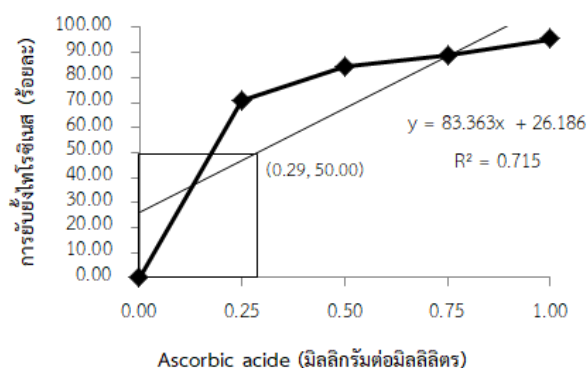
ภาพที่ 3 น้ำมันรำข้าว:น้ำมันอัตรส่วน A1:0 B2:1 C 1:1 D1:2 และ E 0:1

4.2 การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

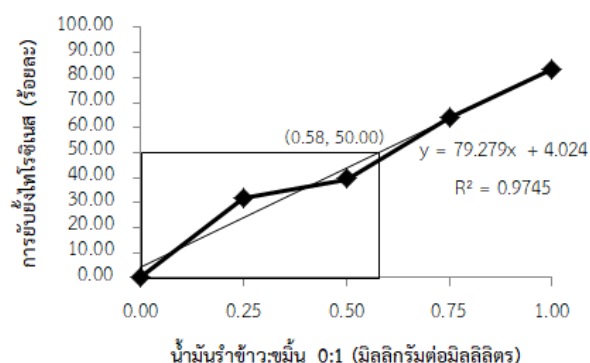
วิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 เข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50 เปอร์เซ็นต์ 0.29, 0.58, 0.74, 0.77, 0.88 และ 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ดังนั้น อัตราส่วนที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด คือ 0:1 ดังภาพที่ 4

ตารางที่ 4 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 50 เปอร์เซ็นต์

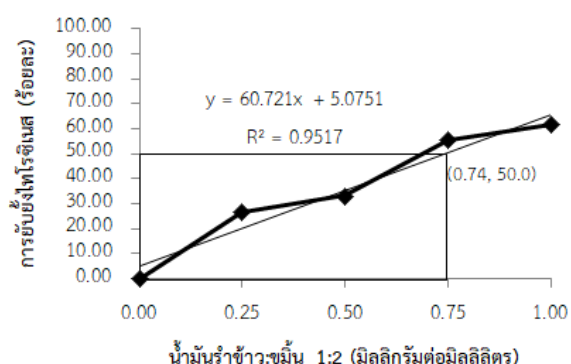
อัตราส่วนน้ำมันรำข้าว:ไขมัน	IC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)
0:0 (ตัวอย่างควบคุม)	-
Ascorbic acid	0.29
0:1	0.58
1:2	0.74
1:1	0.77
2:1	0.88
1:0	0.98



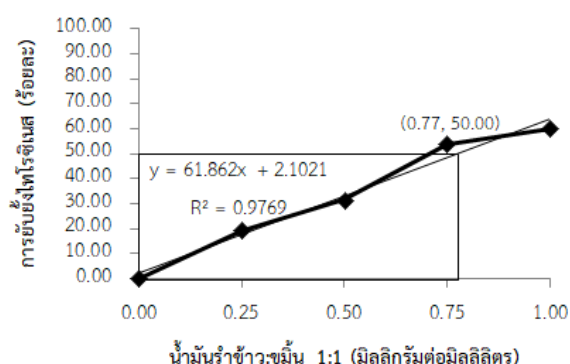
A



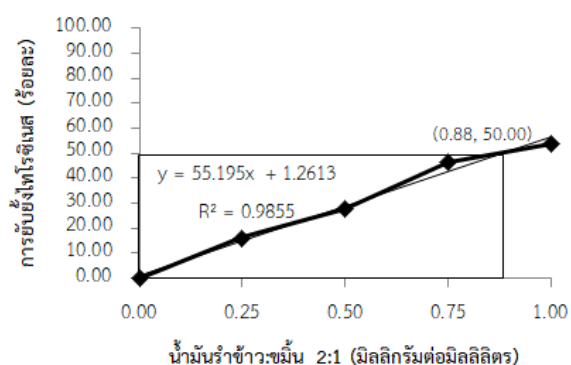
B



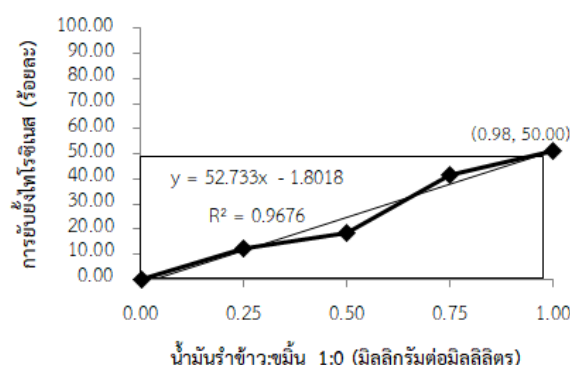
C



D



E



F

ภาพที่ 4 กราฟแสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (A คือ ascorbic acid, B คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน 0:1, C คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน 1:2, D คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน 1:1, E คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน 2:1 และ F คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน 1:0)

4.3 การวิเคราะห์การป้องกันรังสียูวี

จากการวิเคราะห์การป้องกันรังสียูวีเอ และบี พบว่า ตัวอย่างควบคุม ascorbic acid เจล SPF 15 ในท้องตลาด อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 มีค่าการป้องกันแสงแดด (sun protection factor: SPF) เท่ากับ 1.12, 3.23, 8.13, 3.48, 6.37, 7.57, 9.08 และ 8.92 ดังตารางที่ 5 จากการวิเคราะห์ ค่า UVA:UVB ratio เท่ากับ 0.242, 0.941, 0.948, 0.767, 0.792,



0.835, 0.970 และ 0.930 ดังตารางที่ 6 ดังนั้น อัตราส่วนที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ป้องกันรังสียูวีได้ดีที่สุดคือ 2:1

ตารางที่ 5 ค่าการป้องกันรังสียูวี

อัตราส่วนรำข้าว:ขมิ้น	Sun Protection Factor
0:0 (ตัวอย่างควบคุม)	1.12
Ascorbic acid	3.23
เจล SPF15 ในท้องตลาด	8.13
0:1	3.65
1:2	6.37
1:1	7.57
2:1	9.08
1:0	8.92

ตารางที่ 6 ค่า UVA:UVB ratio

อัตราส่วน น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น	UVA/λ	UVB/λ	$\frac{UVA/\lambda}{UVB/\lambda}$	ระดับคุณภาพ
0:0 (ตัวอย่างควบคุม)	0.035	0.147	0.242	-
Ascorbic acid	0.279	0.328	0.941	ดี
เจล SPF15 ในท้องตลาด	0.786	0.807	0.948	ยอดเยี่ยม
0:1	0.272	0.355	0.767	ยอดเยี่ยม
1:2	0.504	0.636	0.792	ยอดเยี่ยม
1:1	0.336	0.343	0.835	ดีมาก
2:1	0.877	0.904	0.970	ดีมาก
1:0	0.810	0.872	0.930	พอใช้

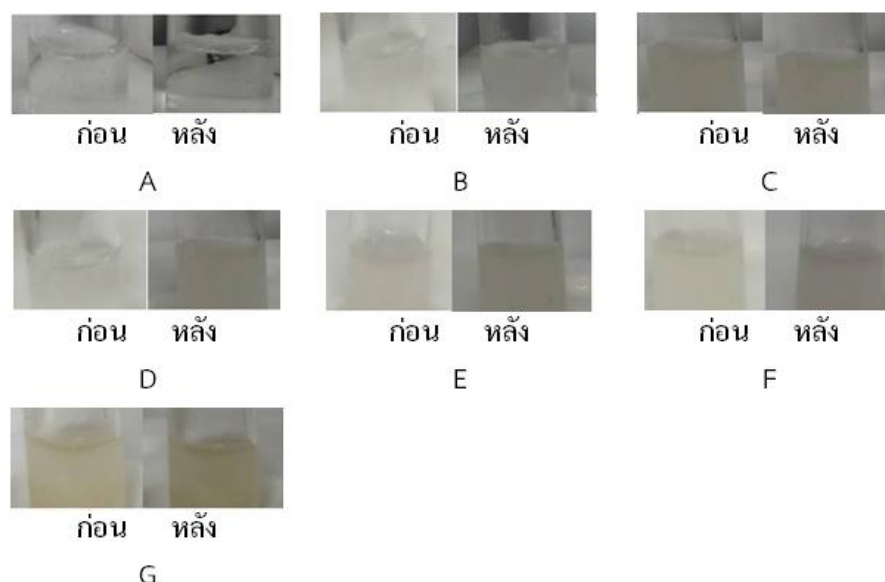
4.4 การทดสอบผลิตภัณฑ์

ในการทดสอบตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่เติม ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 ความเข้มข้น 1% w/w ในสภาพแรงอุณหภูมิ 45 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 7 รอบ พบว่า เนื้อสัมผัสไม่เปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติม ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น อัตราส่วน 0:1 ไม่เปลี่ยนแปลง และค่า pH ตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่เติม ascorbic acid น้ำมันรำข้าว ขมิ้น:อัตราส่วน 1:2, 1:1, 2:1, 1:0 ก่อนทดสอบ เท่ากับ 6.88, 6.76, 6.78, 6.74, 6.80, 6.78, 6.76 และ 6.76 ตามลำดับ และหลังทดสอบ เท่ากับ 6.87, 4.74, 6.77, 6.75 6.80, 6.78 และ 6.76 ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 5



ตารางที่ 7 ผลการทดสอบในสภาพเร่ง

1% w/w รำข้าว:ไขมัน	เนื้อสัมผัส	สี	pH	
			ก่อน	หลัง
0:0 (ตัวอย่างควบคุม)	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	6.88	6.87
Ascorbic acid	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	6.76	6.74
0:1	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	6.78	6.77
1:2	ไม่เปลี่ยน	เข้มขึ้น	6.78	6.78
1:1	ไม่เปลี่ยน	เข้มขึ้น	6.80	6.80
2:1	ไม่เปลี่ยน	เข้มขึ้น	6.74	6.75
1:0	ไม่เปลี่ยน	เข้มขึ้น	6.76	6.76



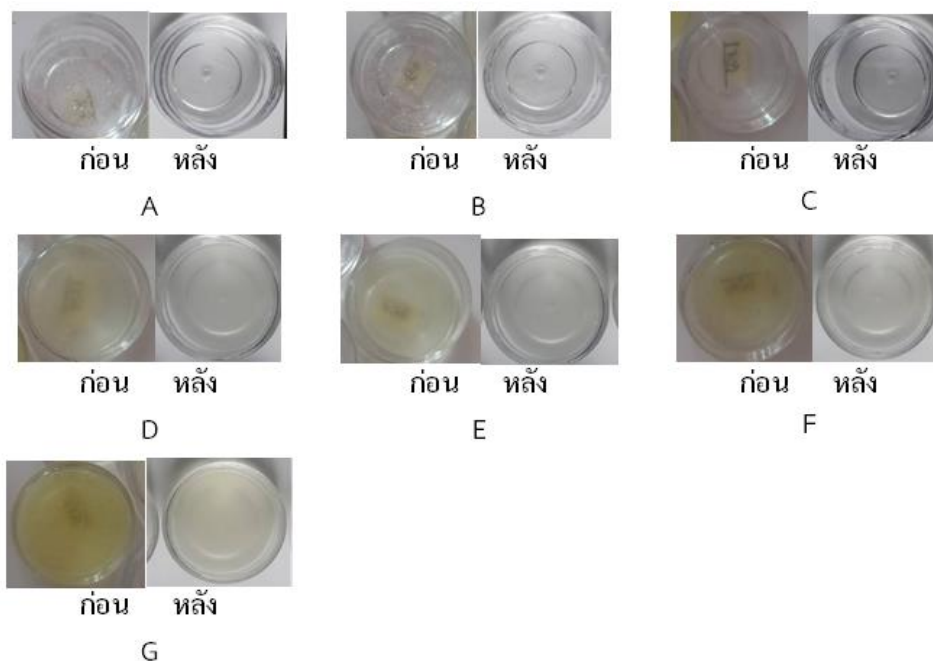
ภาพที่ 5 ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ในสภาพเร่งที่เติมน้ำมันรำข้าว:ไขมัน 1% w/w ในอัตราส่วนต่าง (A คือ ตัวอย่างควบคุม, B คือ ascorbic acid, C คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, D คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 1:2, E คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 1:1 และ F คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 2:1)

ในการทดสอบโดยการเก็บไว้เป็นเวลา วัน 90 ในตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่เติม ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, 1:2 1:1, 2:1 และ 1:0 ความเข้มข้น 1% w/w พบว่า เนื้อสัมผัสตัวอย่างที่เติม ascorbic acid เหลวขึ้น ส่วนตัวอย่างควบคุม น้ำมันรำข้าว ไขมัน:อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 ไม่เปลี่ยนแปลง สีของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่เติม ascorbic acid และน้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 1:0 ไม่เปลี่ยนแปลง น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1 และ 2:1 มีสีอ่อนลง และค่า pH ตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่เติม ascorbic acid น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, 1:2 1:1, 2:1 และ 1:0 ก่อนการทดสอบ เท่ากับ 6.88, 6.76, 6.78, 6.78, 6.80, 6.74 และ 6.80 ตามลำดับ และหลังการทดสอบ เท่ากับ 6.87, 6.73, 6.76, 6.72, 6.79 6.76 และ 6.80 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 6



ตารางที่ 8 ผลการเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 90 วัน

1% w/w รำข้าว:ไขมัน	เนื้อสัมผัส	สี	pH	
			ก่อน	หลัง
0:0 (ตัวอย่างควบคุม)	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	6.88	6.87
Ascorbic acid	เหลวขึ้นเล็กน้อย	ไม่เปลี่ยน	6.76	6.73
0:1	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	6.78	6.76
1:2	ไม่เปลี่ยน	อ่อนลง	6.78	6.76
1:1	ไม่เปลี่ยน	อ่อนลง	6.80	6.79
2:1	ไม่เปลี่ยน	อ่อนลง	6.74	6.72
1:0	ไม่เปลี่ยน	อ่อนลง	6.80	6.80



ภาพที่ 6 ผลิตภัณฑ์ก่อน-หลัง เก็บไว้ 90 วัน ที่เติมสารตัวอย่าง 1% w/w (A คือ ตัวอย่างควบคุม, B คือ ascorbic acid, C คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1, D คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 1:2, E คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 1:1 และ F คือ น้ำมันรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 2:1

จากการทดลองสารสกัดรำข้าว:ไขมันในอัตราส่วน 0:1, 1:2, 1:1, 2:1 และ 1:0 พบว่า สารสกัดรำข้าว:ไขมัน อัตราส่วน 0:1 ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุด พบว่า ไขมันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สอดคล้องกับงานวิจัยน้ำมันมะพร้าวผสมสารสกัดจากมันอ้อยมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง (เพ็ญศรี เพ็ญประไพ และ จิตติกร จันทรวงศ์, 2562) ส่วนการป้องกันรังสียูวี พบว่า ตัวอย่างที่มีค่า SPF และ UVA:UVB สูงที่สุด คือ อัตราส่วน 2:1 เนื่องจากในน้ำมันรำข้าวมีสารแกมมาโอโรซานอล มีสมบัติในการป้องกันรังสียูวี (ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, อิทธิชัย ทิมมณี, จันทรรัตน์ จาริกสกุลชัย, และ รัฐพล ศิลปะรัศมี, 2560) และ สอดคล้องกับงานวิจัยในสารสกัดไขมันมีสมบัติในการป้องกันรังสียูวีน้อยกว่าสารสกัดจากส้ม (Khelker, Haque, & Agrawal, 2017) ในการทดสอบในสภาพอุณหภูมิ 45 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 7 รอบ พบว่า เนื้อสัมผัสไม่



เปลี่ยนแปลง สีเข้มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย พบว่า อุณหภูมิส่งผลต่อสีของขมิ้น (ปาริชาติ ราชฉนิ, สุธิดา พิทักษ์วินัย, วาณิช นิพนธ์, และ วุฒิกร บัวแก้ว, 2564) และค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จากการทดสอบโดยการเก็บไว้เป็นเวลา 90 วัน พบว่า ตัวอย่างที่เติม ascorbic acid มีเนื้อสัมผัสเหลวขึ้น และมีค่า pH ลดลงมากที่สุด ดังนั้น ค่า pH จึงมีผลต่อเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของขมิ้นมีผลทำให้สีอ่อนลงและค่า pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

5. สรุปผลการวิจัย

เอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดปัญหาด้านผิวหน้า ซึ่งแสงแดดเป็นปัจจัยหลักในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ดังกล่าว จากผลการวิจัย จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และป้องกันรังสียูวีได้ดีที่สุดคือน้ำมันรำข้าว:ขมิ้น 0:1 และ 2:1 ตามลำดับ เนื่องจากสามารถป้องกันรังสียูวีซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดปัญหาด้านผิวหน้า ดังนั้น อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด คือ น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น 2:1 เพราะ สามารถป้องกันรังสียูวีได้ดี และยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อีก แม้จะน้อยกว่าอัตราส่วน 0:1 แต่หากป้องกันรังสียูวีได้ดี และลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จะเป็นการเสริมฤทธิ์ให้ผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพมากขึ้นมากขึ้น ดังนั้น น้ำมันรำข้าว:ขมิ้น 2:1 จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์

หากจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อคำนวณจุดคุ้มทุนในกรณีที่วัตถุดิบมีต้นทุนสูง และให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสามารถสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology: RSM) ต่อไปได้นอกจากขมิ้นจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แล้วยังมีคุณสมบัติอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ การต้านจุลชีพ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวชนิดอื่นๆ เช่น ครีมกันแดด เซรั่มบำรุงผิว และโลชั่น เป็นต้น และเลือกใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.กัญฐา ภูมิ ตรี.ปริชา เทียมปัญญา และ ดร.พัทธนัย สุขพันธ์ ที่ให้คำปรึกษา นางสาวสายเพชร ยะปัญญา ที่อำนวยความสะดวกในการในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณบุคลากรสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษมทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกระหว่างทำวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

- ชรินญา พิมพ์สอน, หนึ่งฤทัย ฆะระกรรม, พชรภรณ์ นันทเพชร, จิรัฐติ ธรรมศิริ, เนตรดาราร จันทรอูตสาห์, และ พิชานิกา ขอบจิตต์. (2561). ฤทธิ์สารสกัดขมิ้นชันในการรักษาผิวหน้าอักเสบในกระต่าย. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร*, 16(1), 1-13. doi: 10.14456/cmvj.2018.1
- บัลกีส มามะ, นูรีซัน นิสัน, ศฤรัตน์ ดวนใหญ่, และ สุชาดา มานอก. (2560). การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากใบมะรุมที่พบในชุมชนศรีภูมิในพื้นที่ฝั่งธนบุรี. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, 13(2), 80-89.
- ปภาวดี คล่องพิทยาพงษ์, อธิชัย ทิมมณี, จันทรรัตน์ จาริกสกุลชัย, และ รัชพล ศิลปะรัศมี (2560). การศึกษาความปลอดภัยและประสิทธิภาพของตำรับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันรำข้าวที่มีสารเกรนมาออกซานอลปริมาณ 18,000 พีพีเอ็ม. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 14(2), 291-307.
- ประไพพิศ อินเสน. (2561). การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 12(2), 69-82.



- ปาริชาติ ราชมณี, สุธิดา พิทักษ์วินัย, วาณิช นิลนนท์, และ วุฒิไกร บัวแก้ว. (2564). จลนพลศาสตร์การอบแห้งขมิ้นชันแบบชั้นบางด้วยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อน. *วารสารวิชาการเทคโนโลยีอุตสาหกรรม*, 17(2), 33-45. doi: 10.14416/j.ind.tech.2021.06.001
- พัทธพร ภูวดลไพศาล. (2562). การวิจัยการพัฒนาและการประยุกต์ใช้สารสกัดเบต้ากลูแคนจากกากรำข้าวหอมมะลิในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางกันแดด. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 50(2)(พิเศษ), 17-20.
- เพ็ญศรี เพ็ญประไพ และ จิตกร จันทร์วุ่น. (2562). ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และการยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำมันมะพร้าวผสมสารสกัดจากสกลขมิ้นเพื่อข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในเครื่องสำอาง. เข้าถึงเมื่อ 2 เมษายน 2562 จาก <https://riss.rmuts.ac.th/project/?id=3308>
- สุธิดา ชามูวานิชกุล, โองการ วณิชชีวะ, และ พนิดา แสนประกอบ. (2562). การพัฒนาตำรับกันแดดจากสารสกัดหญ้าตีนตุ๊กแก. *Walailak Procedia*, 2562(3), 1-5.
- Goenka, S., Johnson, F., & Simon, S. R. (2021). Novel chemically modified curcumin (CMC) derivatives inhibit tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Biomolecules*, 11(5), 674. doi: 10.3390/biom11050674
- Khelker, T., Haque, N., & Agrawal, A. (2017). Ultraviolet protection potential of *Curcuma longa* L. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(12), 4282-4284. doi: 10.5958/0974-360X.2017.00784.3
- Sharifi-Rad, J., Rayess, Y. E., Rizk, A. A., Sadaka, C., Zgheib, R., Zam, W., ... Martins, N. (2020). Turmeric and its major compound curcumin on health: Bioactive effects and safety profiles for food, pharmaceutical, and medicinal applications. *Frontiers in pharmacology*, 11, 01021. doi: 10.3389/fphar.2020.01021
- Singletary, K. (2020) *Turmeric: Potential Health Benefits. Nutrition Science*. 55(1), 46-56. doi: 10.1097/NT.0000000000000392
- Zeinali, M., Abbaspour-Ravasjani, S., Soltanfam, T., Paiva-Santos, A. C., Babaei, H., Veiga, F., & Hamishehkar, H. (2021). Prevention of UV-induced skin cancer in mice by gamma oryzanol-loaded nanoethosomes. *Life Sciences*, 283, 119759. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119759>



การพัฒนายาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

Development of ya-ta-pra-sen preparation in microemulsion form

วัลย์ลักษณ์ พรพล* ประสาน ตังยีนยงวัฒนา ปิยะพงษ์ ชูชนะ ชานานถ ลิมหลัก และ นภาพรณ บุญน่วม

Walailuk Pomphol*, Prasan Tangyuenyongwatana, Piyapong Choochana, Chananad Limlak, and Napawan Boonnuam

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: walailuk.p@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

ตำรับยาทาพระเส้น ยาชานที่ 58 ของตำราพระโอสถพระนารายณ์เป็นยาที่ใช้ภายนอก ไม่มีการพัฒนาตำรับยาให้มีประสิทธิภาพทั้งทางกายภาพและชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับยาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน โดยเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นตามอัตราส่วนในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม ศึกษาผลของวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และวัฏภาคน้ำ หาอัตราส่วนไมโครอิมัลชันที่มีความใสโปร่งแสง ไม่แยกชั้นบนพื้นที่แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมและวัดขนาดอนุภาค รวมทั้งศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับโดยการวัดความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดทั้งหมด 3 สูตร พบว่าสูตรตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันสูตร B2 ประกอบด้วย tween20 : citronella oil : น้ำ ในอัตราส่วน 7:2:1, 6:2:2 และ 6:1:3 มีลักษณะใส ไม่แยกชั้น ขนาดของอนุภาคเป็นไมโครอิมัลชันมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 14.20-143.40 นาโนเมตร ตามลำดับ ค่าความหนืดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 56.1-93.15 cP และค่า pH เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.68-5.22 เป็นสูตรตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันมีคุณสมบัติที่ดี คัดเลือกมาผสมสารสกัดยาทาพระเส้นที่มีเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 ในอัตราส่วน 7:2:1 และ 6:2:2 ลักษณะภายนอกมีสีเขียวเข้ม ไม่แยกชั้น ขนาดอนุภาคเล็กมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 111.6-175.4 นาโนเมตร ค่าความหนืดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 23.80-31.47 cP และค่า pH เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.43-6.53 เหมาะสมกับสภาพผิวปกติ สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในพัฒนายาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชันทางเทคโนโลยีเภสัชกรรมต่อไป

คำสำคัญ: ตำรับยาทาพระเส้น ไมโครอิมัลชัน

Abstract

YA-TA-PRA-SEN, the 58th Thai medicinal formulary listed in the Narayana Pharmacopeia, is a drug for external use. There has been no development of a medicinal formulation to be both physically and biologically effective. This research aims to develop the YA-TA-PRA-SEN as microemulsion-based preparation by preparing microemulsion-based formulations using a pseudo-ternary phase diagram, evaluating the effects of oil, surfactant, and water phase on the physicochemical properties of the formulations, finding translucent, miscible formulations and evaluating particle size distribution, physicochemical property, pH, and viscosity of 3 formulae. It was found that formula B2 consisted of tween20: citronella oil: water at ratios of 7:2:1, 6:2:2 and 6:1:3 was translucent and miscible. The particle sizes of microemulsion were between 14.20-143.40 nm. The viscosity was between 56.1-93.15 cP, and pH values ranged between 3.68-5.22. It's a formula of microemulsion with good properties. It was then selected to mix with medicinal extracts YA-TA-PRA-SEN with 3 and 5 percent in ratios of 7:2:1 and 6:2:2. The obtained product was dark green without phase separation having an average particle size of 111.8-175.4 nm. Its viscosity values were between 23.80-31.47 cP, and its pH values were between 3.43-6.53 suitable for normal skin conditions. It can be used as preliminary data in the further development of YA-TA-PRA-SEN in microemulsion in pharmaceutical technology.

Keywords: YA-TA-PRA-SEN, Microemulsion



1. บทนำ

กลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและพังผืด (myofascial pain syndrome) เป็นกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อซึ่งมีจุดปวดที่ไวต่อการกระตุ้น (trigger point) ของกล้ามเนื้อ โดยกล้ามเนื้อแต่ละกลุ่มจะมีการปวดในรูปแบบเฉพาะของกล้ามเนื้อนั้น ๆ เมื่อใช้ปลายนิ้วกดคลำจะพบก้อนพังผืดแข็งตั้งอยู่ภายในมัดกล้ามเนื้อ (วันทนา วีระถาวร และ สรศักดิ์ ศุภผล, 2549) ซึ่งในการรักษาทางการแพทย์แผนไทยเป็นระบบการแพทย์แบบองค์รวมใช้การรักษาหลากหลายวิธี ได้แก่ การนวด กดจุด การประคบด้วยลูกประคบสมุนไพร การใช้ยาพอก หรือยาทาภายนอก รวมทั้งการทานยาสมุนไพรเป็นการบำบัดรักษาโรค ซึ่งการรักษากลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและพังผืดมีการรักษาตั้งแต่สมัยอยุธยา โดยแพทย์ผู้ปรียาถวายพระนารายณ์มหาราชได้รวบรวมตำรับยาไว้ถึง 81 ขนาน โดยเฉพาะยาทาพระเส้นในตำราพระโอสถพระนารายณ์มีสรรพคุณ แก้เส้นผืดปกติ ลมอัมพาต ลมปัตฆาต แก้กตะคริว แก้กจับโปง และอาการขบเมื่อยทั้งหลาย ซึ่งตำรับยานี้ประกอบด้วยเครื่องยา 13 ชนิด คือ พริกไทย ข่า กระชาย หอม กระเทียม มหาหิงคุ์ ยาดำ ทั้ง 7 อย่างนี้สิ่งละ 1 ส่วน ตะไคร้หอม ใบขี้เหล็ก ใบตองแตก ใบมะขาม ใบเลี่ยน สิ่งละ 4 ส่วน ใบมะค่าไก่ 16 ส่วน โดยนำตัวยาทิ้งหมดมาบดให้ละเอียด ใช้เหล้าขาว หรือน้ำส้มสายชูเป็นกระสายคั้นน้ำทาบริเวณที่ปวด (ชัยนธ์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ขวลิต และ วิเชียร จีรวงส์, 2542) ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดยาทาพระเส้นพบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และลดการปวดกล้ามเนื้อได้ (สุพินดา วินิจฉัย, พัลลภา วุฒิภาพรกุล, และ ภารดี อสุโกวิท, 2559)

ในการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อและพังผืดตามคัมภีร์ มีขั้นตอนในการเตรียมที่ยุ่งยากไม่สะดวกต่อการพกพา ยาเสื่อมสภาพง่าย ตัวยามีอายุสั้น ยากต่อการเก็บรักษา ด้วยเหตุผลข้างต้น ทำให้มีการพัฒนาตำรับยาทาพระเส้นในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายเช่น เจล บาล์มและครีม ให้มีความสะดวกใช้งานมากยิ่งขึ้น (สุพินดา วินิจฉัย และคณะ, 2559; จารุวรรณ โตเชลางค์, ดลยา ใจสินธุ์, และ กุลวรากร์ กรณ์แก้ว, 2560) แต่มีประสิทธิภาพในการนำส่งยาผ่านผนังชั้นเมมเบรนและผิวหนังได้ไม่ลึก ส่งผลให้การออกฤทธิ์ของตัวยาน้อยไป จึงทำให้ผู้วิจัยจึงสนใจมาพัฒนาในรูปแบบไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นระบบระดับนาโนชนิดหนึ่งที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำมัน น้ำ และสารลดแรงตึงผิว (หรือสารชอบน้ำและไขมัน) เป็นสารละลายที่มองเห็นเป็นเนื้อเดียวและมีสมบัติเชิงแสงเหมือนกันทุกทิศทาง เป็นสารละลายมีความคงตัวทางอุณหภูมิ มีขนาดหยดของเหลวอยู่ในช่วง 20-200 nm (Talegaonkar et al., 2008) ไมโครอิมัลชันเป็นระบบกระจายของน้ำมัน และน้ำทำให้เกิดความคงตัวด้วยฟิล์มระหว่างผิวของสารลดแรงตึงผิวซึ่งส่วนใหญ่ต้องใช้ร่วมกับสารลดแรงตึงผิวร่วม และสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ใช้อย่างแพร่หลายเป็นสารประเภทโพลีไฮดรอกซี ปัจจุบันนี้ได้แบ่งไมโครอิมัลชันตามโครงสร้างระดับไมโคร (microstructure) ออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ น้ำในน้ำมัน (water-in-oil, W/O) ต่อเนื่องแบบคู่ และน้ำมันในน้ำ (oil-in-water, O/W) ดังนั้นการคัดเลือกชนิดของสารลดแรงตึงที่เหมาะสม จึงคำนึงถึงสัดส่วนการส่งผลว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ระหว่าง 3-6 จะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ในขณะที่สารลดแรงตึงที่มีค่า HLB 8-18 จะสนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ นอกจากนั้นยังมีวิธีการเตรียมที่ง่ายจากการผสมเข้าด้วยกันเป็นที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในทางเภสัชกรรมยังสามารถนำมาพัฒนาเพื่อเป็นระบบนำส่งสารสำหรับการบริหารยาได้หลายช่องทางของการให้ยา เช่น ทางช่องปาก ทางผิวหนัง และดวงตา เป็นต้น ยังสามารถเพิ่มการดูดซึมยาผ่านเมมเบรนและผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการใช้ระบบไมโครอิมัลชันช่วยแก้ปัญหาการละลายและเพิ่มการดูดซึมของสารชนิดนั้น ๆ ได้ (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2555)

สารลดแรงตึงผิวเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของไมโครอิมัลชันที่ประกอบไปด้วย น้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยการหาสัดส่วนขององค์ประกอบที่เหมาะสมผ่านทางการสร้างแผนภาคสามมิติ (pseudo-ternary phase diagram) ในการเตรียมตำรับยาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชันจำเป็นต้องเลือกชนิดของสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมให้เหมาะสมที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง เช่น tween80 (polysorbate80) มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลือง (HLB = 15.0) ทำหน้าที่เป็นตัวช่วยให้อิมัลชันชนิด oil-in-water emulsion มีความคงตัวและไขมันไม่แยกชั้นถูกใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในสบู่และเครื่องสำอาง หรือใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการละลายน้ำยาบ้วนปาก (สุกรณิการ์ ทับทิมศรี, 2560)



tween20 (polysorbate20) เป็นสารประสานน้ำมันเข้ากับน้ำ (HLB = 16.7) สามารถใช้ได้ทั้งสำหรับ oil-in-water และ water-in-oil emulsion โดยใช้ร่วมกับ emulsifier ตัวอื่น นอกจากนี้การใช้ tween20 อย่างเดียว สามารถใช้เป็นตัว stabilizer ในสูตรผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่นสูตรที่มี BHA (salicylic acid) และใช้เป็น dispersing agent ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความลื่นมากขึ้นเมื่อใช้ มีคุณสมบัติพิเศษคือเหมาะสำหรับผสมในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสเปรย์ เนื่องจากไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความหนืดขึ้น มีความปลอดภัยสูงมาก สามารถผสมในเครื่องสำอางแทบทุกชนิด และใช้ละลายหัวน้ำหอมได้ (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนพานนท์, 2553) และ span80 (sorbitan esters) ใช้เป็น emulsifier จะมีกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำมันมากกว่ากลุ่มที่ชอบน้ำ (HLB = 4.3) ละลายได้ดีในน้ำมัน จึงทำให้มีลักษณะเป็น water-in-oil emulsion ดังนั้นจึงจัดออกเป็นตัวทำอิมัลชัน 2 กลุ่ม มีลักษณะที่ไม่มีประจุ ความเป็นพิษต่ำ กลุ่ม tween ละลายได้ในน้ำ ส่วนกลุ่ม span ไม่ละลายน้ำ การใช้ร่วมกันจึงเรียงล้อมรอบอนุภาคน้ำมันได้ดีขึ้น การทำงานร่วมกันระหว่างตัวทำอิมัลชัน 2 กลุ่ม คือ tween กับ span ที่จัดเรียงตัวแบบสลับล้อมรอบอนุภาคน้ำมัน ส่งเสริมให้อิมัลชันน้ำมันในน้ำมีความเสถียรมากขึ้น (วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, 2555)

วิญญูภาคน้ำมันแต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการทำตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชัน เช่น jojoba oil (*Simmondsia chinensis*) เป็นของเหลวกึ่งแว็กซ์ มีสีเหลืองทองหรือสีเหลืองอ่อน รสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย น้ำมันโจโจบาทนต่อความร้อนและมีความคงตัวออกซิเดชันสูง มีวิตามิน E, B complex และแร่ธาตุตามธรรมชาติ ได้แก่ zinc, silicon, chromium, copper จึงนิยมใช้เป็นน้ำมันนวดตัว บำรุงผิวหน้า และเล็บ อีกทั้งยังเป็น moisturizer ชั้นดีสำหรับทุกสภาพ ยังเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง สบู่ และผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ไม่มีรายงานว่ามีผู้แพ้ผิวหนังชนิดนี้ และ citronella oil (น้ำมันตะไคร้หอม: *Cymbopogon nardus* Linn.) มีสีเหลือง กลิ่นเฉพาะผสมของดอกไม้และมะนาว ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ต้านแบคทีเรีย แก้แการัง มีรายงานที่ระดับความเข้มข้น 1 % และ 30 % พบการระคายเคืองผิวหนังน้อยมาก (Aroma Hub, 2019) นอกจากนี้ในตำรับยาทาพระเส้นก็มีตะไคร้หอมเป็นส่วนประกอบ จึงเลือกใช้ citronella oil ในวิญญูภาคน้ำมันซึ่งจะช่วยแต่งกลิ่นตำรับให้น่าใช้ยิ่งขึ้น ส่วนในวิญญูภาคน้ำใช้ pure water คือน้ำปราศจากสารอินทรีย์หรือน้ำบริสุทธิ์สูง และใช้ตำทำละลายร่วมในวิญญูภาคน้ำคือ ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol, IPA) เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติชอบไขมันมากกว่าน้ำ เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีพิษน้อยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น (ธนกร ศิริสมุทร, 2564) การประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชันโดยการนำมาช่วยในการเพิ่มการละลายของสารที่มีการละลายต่ำ และการนำส่งทางผิวหนังมีกลยุทธหลากหลายใช้ในการเอาชนะการเป็นตัวกั้นของชั้นสตราตัมคอร์เนียม (Stratum Corneum) เพื่อเพิ่มการแทรกผ่านของตัวยา ดังนั้นระบบไมโครอิมัลชันเป็นกลยุทธทางเคมีที่เป็นประโยชน์อีกแนวทางหนึ่ง จึงทำให้ผู้วิจัยจึงสนใจพัฒนายาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์รูปแบบใหม่ที่น่าใช้และมีประสิทธิภาพมากขึ้น พบว่าได้สะดวก นอกจากนี้ยังเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรให้ทันสมัยโดยการพัฒนาทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม สามารถเพิ่มมูลค่ายาสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ และนำไปใช้ในการส่งเสริมและดูแลสุขภาพได้

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อพัฒนาตำรับยาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน โดยกำหนดสัดส่วนปริมาณของสารลดแรงตึงผิว วิญญูภาคน้ำมัน และวิญญูภาคน้ำ ด้วยวิธี pseudo ternary phase diagram

2.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมยาทาพระเส้น

3. อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ rotary evaporator (Buchi, Switzerland), viscometer (Fungilab, New York), pH meter (Ionix, Singapore), particle size analyzer (Micrometrics Instrument, USA), vortex (Scientific Industries, USA), vacuum pump



(General Electric, USA), hot air oven (General Electric, USA), grinder (Chyun Tseh, china) และ analytical balance 4 digits (Sartorius, Germany) สารเคมี ได้แก่ ethanol 95% (Namsiang, Thailand), distilled water (Namsiang, Thailand), jojoba oil (Krungthepchemi, Thailand), citronella oil, span80, tween20, tween80, isopropyl alcohol และ DI-water (Chemipan, Thailand)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาทาพระเส้น

นำสมุนไพรที่บดละเอียดแล้วทั้งหมดในตำรับยาทาพระเส้น ซึ่งตัวอย่างวัตถุดิบนำมาร้านจางงเภสัชกรรมไทย (39 ซอย 8 ถนนมหาราช ตำบลปากน้ำ อำเภอเมืองกระบี่ จังหวัดกระบี่: 8°07'19.6"N 98°54'59.0"E) ตรวจสอบวัตถุดิบโดยอาจารย์ผู้เชี่ยวชาญด้านเภสัชกรรมไทยที่มีใบประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทย มาชั่งด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์ตามอัตราส่วนในตารางที่ 1 ไปหมักด้วย 95% ethanol ปริมาณ 1,100 มิลลิลิตร ในโหลแก้วนาน 7 วัน กรองสารสกัดเอทานอลด้วยเครื่อง vacuum pump ผ่าน Bucher funnel จึงนำไประเหยเอา 95% ethanol ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator และบน water bath อีกครั้ง จนตัวทำละลายระเหยออกไปหมด บันทึกน้ำหนักของสารสกัดยาทาพระเส้นเพื่อคำนวณหา % yield ของสารสกัด

ตารางที่ 1 ตำรับยาทาพระเส้น ยาชานาที่ 58 ของตำราพระโอสถพระนารายณ์ (ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2542)

สมุนไพรในตำรับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	น้ำหนักเป็นร้อยละของตำรับ
(1) พริกไทย	<i>Piper nigrum</i> L.	Piperaceae	2.32
(2) ข่า	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	Zingiberaceae	2.32
(3) กระชาย	<i>Boesenbergia rotunda</i> (L.) Mansf.	Zingiberaceae	2.32
(4) หัวหอม	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Amaryllidaceae	2.32
(5) กระเทียม	<i>Allium sativum</i> L.	Liliaceae	2.32
(6) มหาหิงคุ์	<i>Ferula assa-foetida</i> L.	Umbelliferae	2.32
(7) ยาดำ	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	Aloaceae	2.32
(8) ตะไคร้หอม	<i>Cymbopogon nardus</i> Rendle.	Poaceae	9.30
(9) ใบขี้เหล็ก	<i>Senna siamea</i> (Lam.) Irwin & Barneby	Fabaceae	9.30
(10) ใบตองแตก	<i>Baliospermum montanum</i> Muell.A.	Euphorbiaceae	9.30
(11) ใบมะขาม	<i>Tamarindus indica</i> L.	Leguminosae - Caesalpinioideae	9.30
(12) ใบเลี่ยน	<i>Melia azedarach</i> L.	Meliaceae	9.30
(13) ใบมะค่าไก่อ	<i>Drypetes roxburghii</i> (Wall.) Hurasawa	Euphorbiaceae	37.25

3.2.2 การเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชัน

การศึกษานี้เลือกใช้วิธีการสร้าง pseudo ternary phase diagram เพื่อหาสัดส่วนโดยน้ำหนักที่เหมาะสมของ สารลดแรงตึงผิว ไขมัน และน้ำของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันตามสูตรในตารางที่ 2 โดยการเตรียมตามอัตราส่วน ได้แก่ 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยน้ำหนัก แล้วจึงทำการไทเทรตด้วยไขมัน น้ำ จนถึงจุดที่ของเหลว เปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น เปรียบเทียบพื้นที่บริเวณที่เกิดไมโครอิมัลชันของระบบจากสารลดแรงตึงผิวผสมที่ศึกษาใน pseudo ternary



phase diagram คัดเลือกจุดที่เหมาะสมภายในพื้นที่ของระบบวัฏภาคเดียวใน pseudo ternary phase diagram เป็นตัวแทนของตำรับเพื่อประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ

ตารางที่ 2 สูตรตำรับการเตรียมยาพื้นไมโครอิมัลชัน

สูตรตำรับ	สารลดแรงตึงผิว	วัฏภาคน้ำมัน	วัฏภาคน้ำ
A	A1	tween80	jojoba oil
	A2	tween80	citronella oil
	A3	tween80	jojoba oil + citronella oil
B	B1	tween20	jojoba oil
	B2	tween20	citronella oil
	B3	tween20	jojoba oil + citronella oil
C	C1	span80 + tween20	jojoba oil
	C2	span80 + tween20	citronella oil
	C3	span80 + tween20	jojoba oil + citronella oil

3.2.3 การเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้น

คัดเลือกตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันทั้ง 3 สูตร (ตารางที่ 2) ที่ผ่านการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของคุณสมบัติไมโครอิมัลชันมาผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 โดยน้ำหนัก (w/w) และทำการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในแต่ละความเข้มข้น

3.2.4 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ

- ลักษณะภายนอก (visual observation) : เชน ตรวจสอบสี ความใส และการแยกชั้น
- ประเภทของไมโครอิมัลชัน : ใช้สีที่ละลายน้ำหยดลงในตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นจับเวลา 10 นาที เปรียบเทียบกับตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นที่ใช้สีที่ละลายน้ำมันหยดโดยสังเกตการณ์แพร่กระจายของสี

- ขนาดอนุภาค (particle size) : ตรวจวัดขนาดอนุภาคของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันและหลังผสมสารสกัดยาทาพระเส้นโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size analyzer) Nanoplus-3 (Micrometisc Instrument Corporation, USA) อุณหภูมิที่ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

- ความหนืด (viscosity) : ตรวจวัดค่าความหนืดของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันและหลังผสมสารสกัดยาทาพระเส้นด้วยเครื่องวัดความหนืด (viscometer) VISCO STAR Plus (Fungilab, New York) อุณหภูมิที่ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

- ความเป็นกรด-ด่าง (pH) : ตรวจวัดค่า pH ของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันและหลังผสมสารสกัดยาทาพระเส้นด้วยเครื่อง pH Meter (Hanna Instruments, USA) อุณหภูมิที่ 25°C วัดซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- ผลการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพที่วัดซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)
- วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ของโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS รุ่น 24.0 ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าขนาดอนุภาคของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชัน และค่าความหนืดและขนาดอนุภาคของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้น



4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

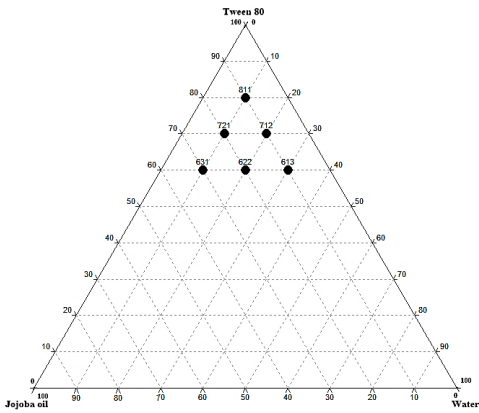
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดตำรับยาทาพระเส้น

การสกัดตำรับยาทาพระเส้น 1,290 กรัม ด้วย 95% ethanol ปริมาตร 1,100 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน กรองกากทิ้งและนำมาระเหยตัวทำละลายระเหยออกหมดพบว่ามีลักษณะสีเขียวอมน้ำตาลเข้มข้น กลิ่นเฉพาะของตำรับยา และค่า % yield เท่ากับ 4

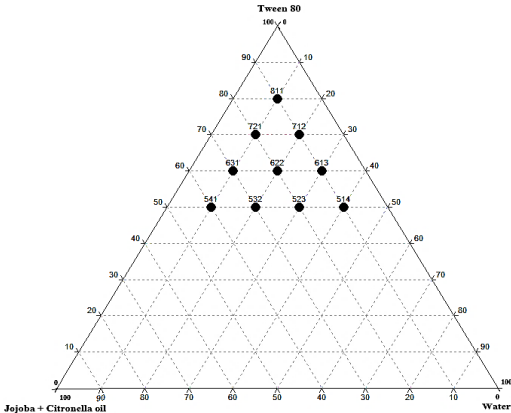
4.2 ผลการเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชัน

การเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันประกอบด้วย สาร jojoba oil และ citronella oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ทั้งสูง, ต่ำ และใช้ผสมกับสารลดแรงตึงผิวร่วม คือ tween20, tween80 และ span80 : tween20 ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ส่วนวัฏภาคน้ำใช้ distilled water และเติม IPA (ตัวทำละลายร่วม) เข้าไปในวัฏภาคน้ำด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยแบ่งออกได้เป็น 3 สูตรหลัก คือ สูตร A, B และ C (A1-A3, B1-B3 และ C1-C3) จากการสร้าง pseudo ternary phase diagram (ภาพที่ 1) พบว่า สูตร A1, A3, B2, C2 และ C3 มีขอบเขตของไมโครอิมัลชันมากกว่าสูตรอื่นๆ (A2, B1, B3 และ C1) โดยเฉพาะสูตร A3 ที่มีอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่ำ คือ 5:5 โดยน้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับสูตร A1, B2, C2 และ C3

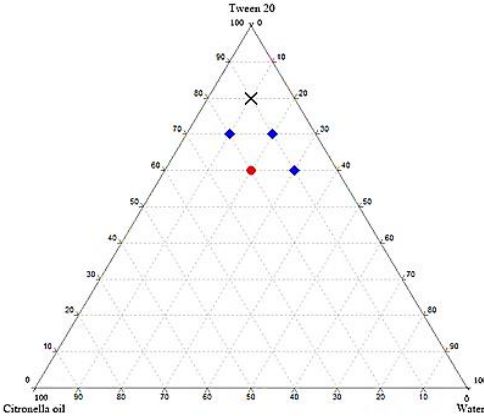
ในขณะเดียวกันสูตร A3 แม้ว่าจะพบขอบเขตไมโครอิมัลชันกว้างเนื่องจากมีสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่ำจากผล pseudo ternary phase diagram แต่มีค่าขนาดอนุภาคที่ไม่ได้อยู่ในช่วง 20–200 นาโนเมตร ส่วนสูตร B2 และ C2 ประกอบด้วย tween20 : citronella oil : pure water และ tween20 : span80 : citronella oil : jojoba oil : pure water : IPA ตามลำดับ มีขอบเขตไมโครอิมัลชันน้อยกว่า A3 เมื่อวัดขนาดอนุภาคพบว่ามีค่าขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20–200 นาโนเมตร แสดงให้เห็นว่า ชนิดของน้ำมัน ชนิดของความเข้มข้น และตำแหน่งของสารลดแรงตึงผิว มีผลต่อขนาดอนุภาคของอิมัลชัน ซึ่งจากการศึกษาของ Ostertag และคณะ (2012) พบว่าขนาดอนุภาคของอิมัลชันที่เตรียมในวัฏภาคน้ำมันโดย MCT (น้ำมันไตรกลีเซอไรด์สายกลาง) < น้ำมันส้ม และเมล่อน (น้ำมันหอมระเหย) < น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดองุ่น น้ำมันงา น้ำมันถั่ว และน้ำมันดอกแคโนล่า (ไตรกลีเซอไรด์สายยาว) ในส่วนชนิดของสารลดแรงตึงผิวส่งผลต่อขนาดอนุภาค คือ $\text{tween } 80 < \text{tween } 20 < \text{tween } 85$ และอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวต่อวัฏภาคน้ำมันที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การผลิตในระดับไมโครอิมัลชัน และนาโนอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 160 นาโนเมตร และจากการรายงานผลการศึกษ pseudo ternary phase diagram ในตำรับประกอบด้วย jojoba oil เป็นวัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวผสมแตกต่างกันคือ span80 : cremophor RH40, span80 : kolliphor EL, span80 : kolliphor HS15 ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักพบว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีขอบเขตไมโครอิมัลชันมากที่สุดคือ span80 : cremophor RH40 จึงเลือกมาศึกษาต่อโดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมจากร้อยละ 1:1 เป็น 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับการสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA พบว่า IPA ช่วยขยายขอบเขตของไมโครอิมัลชันให้กว้างขึ้นได้แต่การเพิ่มอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมเป็น 2:1 กลับทำให้ขอบเขตไมโครอิมัลชันลดลง เมื่อนำตำรับไมโครอิมัลชันมาผสมสารสกัดชาเขียวพบว่าขนาดอนุภาคค่อนข้างเล็กในสูตร GLM 4 เท่ากับ 28.33 นาโนเมตร (อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ และ รัตนา อินทรานุกุล, 2558) รวมทั้งการศึกษาพัฒนาตำรับน้ำมันมหาจักรในรูปแบบไมโครอิมัลชันพบว่าตำรับ MHJE 2 มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 10-100 นาโนเมตร ประกอบด้วย tween 80 : Mahajak oil ผสม peppermint oil ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก : Water มีขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันจาก pseudo ternary phase diagram มากกว่าตำรับ MHJE 1 ที่มีวัฏภาคน้ำมันเดี่ยว (วลัยลักษณ์ พรผล และ ประสาน ตั้งยีนยวงวัฒนา, 2563) ซึ่งจะเห็นได้ว่าทั้ง 3 การศึกษามีเส้นทางการผลิตที่แตกต่างกันส่งผลให้อิมัลชันที่มีสัดส่วนขององค์ประกอบเดียวกันมีขนาดอนุภาคแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าสิ่งสำคัญที่มีผลต่ออนุภาคคือโครงสร้างการจัดเรียงตัวอิมัลซิไฟเออร์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต (Prasert & Gohtani, 2016a, b) และในส่วนผลของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันของสูตร A1, A3, B2, C2 และ C3 แสดงดังตารางที่ 3 ได้แก่ ผล visual observation และขนาดอนุภาค เป็นต้น



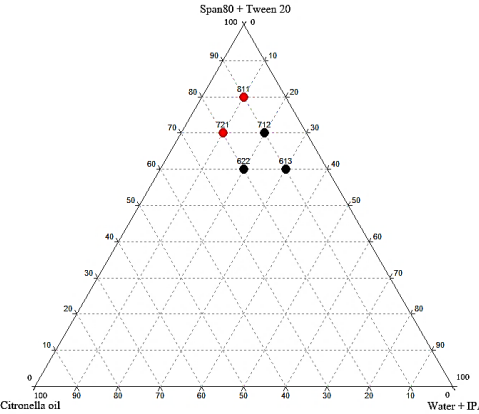
A1



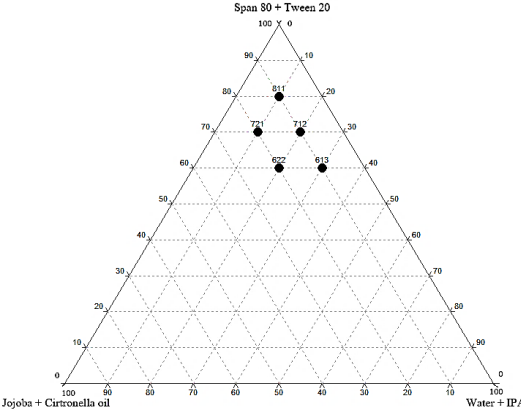
A3



B2



C2



C3

ภาพที่ 1 ผล pseudo ternary phase diagram ของการเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันประกอบด้วยวัฏภาคสารลดแรงตึงผิว คือ tween80 (สูตร A), tween20 (สูตร B) และ span80 : tween20 (สูตร C) วัฏภาคน้ำมันแตกต่างกัน ได้แก่ jojoba oil (A1), citronella oil (B2, C2) และ jojoba oil : citronella oil (A3, C3) ที่สัดส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อขอบเขต มีวัฏภาคน้ำโดยเฉพาะ สูตร C (C2, C3) ผสมสารลดแรงตึงผิวร่วม IPA ในวัฏภาคน้ำ (● ≠ ขนาดอนุภาคช่วง 20-200 nm, ● = ขนาดอนุภาคช่วง 20-200 nm และ ◆ = ขนาดอนุภาคช่วง 10-100 nm)



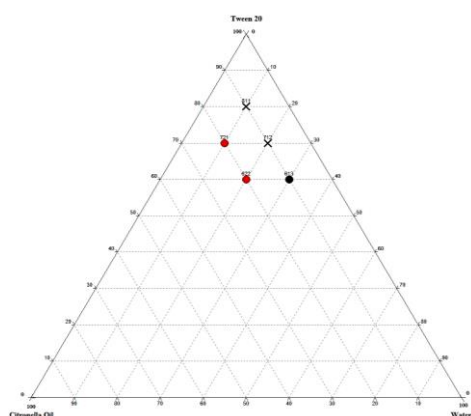
ตารางที่ 3 ผลของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันของสูตร A1, A3, B2, C2 และ C3

สูตร	อัตราส่วน	ผล visual observation	ขนาดอนุภาค (nm $\pm$ SD)
A1	8:1:1	สีเหลืองอ่อนใส ไม่แยกชั้น	510.00 $\pm$ 0.32
	7:1:2		303.81 $\pm$ 0.21
	7:2:1		247.10 $\pm$ 0.33
A3	8:1:1	สีส้มอ่อนใส ไม่แยกชั้น	425.30 $\pm$ 0.52
	7:1:2		353.50 $\pm$ 0.03
	7:2:1		261.81 $\pm$ 0.06
	6:2:2		1476.30 $\pm$ 0.03
	6:1:3		822.00 $\pm$ 0.42
B2	8:1:1	สีใส ไม่แยกชั้น	125.60 $\pm$ 0.07*
	7:1:2		125.00 $\pm$ 0.02*
	7:2:1		14.20 $\pm$ 0.39*
	6:2:2		143.40 $\pm$ 0.17*
	6:1:3		106.50 $\pm$ 0.15*
C2	8:1:1	สีเหลืองใส ไม่แยกชั้น	778.50 $\pm$ 1.51
	7:1:2		724.80 $\pm$ 0.12
	7:2:1		608.90 $\pm$ 0.65
	6:2:2		800.70 $\pm$ 0.62
C3	8:1:1	สีใส ไม่แยกชั้น	167.70 $\pm$ 0.41*
	7:1:2		367.50 $\pm$ 0.44
	7:2:1		154.40 $\pm$ 0.17*
	6:2:2		238.50 $\pm$ 0.69
	6:1:3		323.00 $\pm$ 0.06

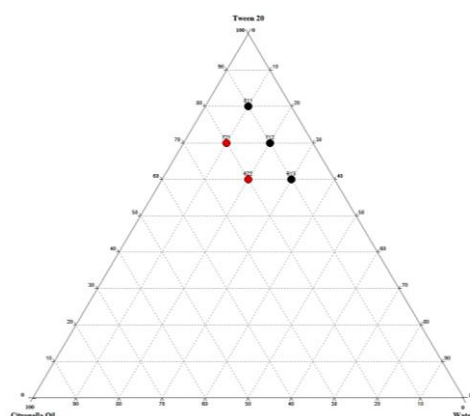
*ขนาดอนุภาคช่วง 20-200 nm

4.3 ผลของการเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้น

จากการคัดเลือกตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันโดยการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพพบว่าสูตร B2 (tween20 : citronella oil : pure water) มีลักษณะสีใส ไม่แยกชั้น ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคเล็กอยู่ระหว่าง 14.20-143.40 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ย pH อยู่ระหว่าง 3.86-5.22 และค่าเฉลี่ยความหนืดอยู่ระหว่าง 56.15-93.15 cP ซึ่งมีคุณสมบัติไมโครอิมัลชันที่เหมาะสมได้นำมาผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 5 โดยสร้าง pseudo ternary phase diagram พบว่าขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของความเข้มข้นที่ร้อยละ 3 อัตราส่วน 7:2:1, 6:1:3, 6:2:2 โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 111.6-318.5 นาโนเมตร และขอบเขตการเกิดไมโครอิมัลชันของความเข้มข้นที่ร้อยละ 5 มีอัตราส่วน 8:1:1, 7:1:2, 7:2:1, 6:1:3, 6:2:2 โดยมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 155.9-1252.6 นาโนเมตร (ภาพที่ 2)



T1: B2 + 3%TPSE

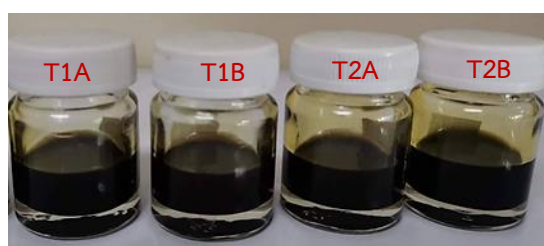


T2: B2 + 5%TPSE

ภาพที่ 2 ผล pseudo ternary phase diagram ของการเตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในความเข้มข้นร้อยละ 3 (T1: B2+3%TPSE) และความเข้มข้นร้อยละ 5 (T2: B2+5%TPSE) (X = ไม่สามารถวัดขนาดอนุภาคได้,

● ≠ ขนาดอนุภาคช่วง 20-200 nm, ● = ขนาดอนุภาคช่วง 20-200 nm)

ผลการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้พบว่าลักษณะตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นมีสีเขียวเข้มใส ไม่แยกชั้น (ภาพที่ 3) และมีผลการตรวจสอบประเภทของไมโครอิมัลชันของตำรับทั้ง 2 โดยการหยดสีละลายน้ำและสีละลายน้ำมันพบว่าเมื่อครบ 10 นาที สีละลายน้ำมันกระจายตัวได้เร็วกว่าสีละลายน้ำ เนื่องจากมีวัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมันจึงสรุปได้ว่าตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นที่เตรียมได้เป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (Xu et al., 2010) ส่วนขนาดอนุภาคของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 (T1) และร้อยละ 5 (T2) มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงในตารางที่ 4 ซึ่งค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของตำรับ T1 มีขนาดอนุภาคค่อนข้างเล็กกว่าตำรับ T2 ในอัตราส่วน 7:2:1 และ 6:2:2 ค่าเฉลี่ย pH ของตำรับ T1, T2 อยู่ระหว่าง 3.31-3.69 และ 5.52-6.53 ตามลำดับ จากผลช่วงของค่าเฉลี่ย pH ที่วัดได้มีค่าที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับค่า pH ของผิวประมาณ 5.00-6.00 ทำให้เกิดการรักษาสสมดุลความเป็นกรด-ด่างของผิวหนังได้ (Lambers, Piessens, Bloem, Pronk, & Finkel, 2006) ค่าเฉลี่ยความหนืดของทั้ง 2 ตำรับมีค่าต่ำกว่า T1 อยู่ระหว่าง 23.80-30.60 cP และ T2 อยู่ระหว่าง 25.73-57.73 cP เป็นคุณสมบัติที่แสดงลักษณะเฉพาะของไมโครอิมัลชันมีคุณสมบัติไอโซโทรปิก ความหนืดต่ำและมีการไหลแบบนิวตัน (Bhargava, Narurkar, & Leieb, 1987; Eccleston, 1988; Lawrence & Rees, 2000; Paul & Moulik, 1997) เมื่อทดสอบทาลงบนผิวหนังมีลักษณะของเนื้อตำรับ T1 และ T2 เกลี่ยบนผิวง่าย มีเนื้อสัมผัสดี ไม่รู้สึกเหนียวเหนอะหนะ



ภาพที่ 3 ลักษณะของตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในความเข้มข้นร้อยละ 3 ในอัตราส่วน 7:2:1 (T1A) และ 6:2:2 (T1B) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในอัตราส่วน 7:2:1 (T2A) และ 6:2:2 (T2B)



ตารางที่ 4 ผลของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของผสมสารสกัดยาทาพระเส้นในความเข้มข้นร้อยละ 3 (T1) และความเข้มข้นร้อยละ 5 (T2)

ตำรับ	อัตราส่วน	ขนาดอนุภาค (nm±SD)	ความหนืด (cP±SD)	pH±SD
T1	7:2:1	111.60 ± 1.72 ^{a*}	30.60 ± 1.43 ^{a, bc}	3.69 ± 0.10
	6:1:3	318.50 ± 1.42 ^C	42.85 ± 2.41 ^{bc}	3.31 ± 0.01
	6:2:2	142.90 ± 0.28 ^a	23.80 ± 2.27 ^{a*}	3.43 ± 0.02
T2	7:2:1	155.90 ± 1.67 ^C	31.47 ± 1.43 ^{a, bc}	6.53 ± 0.02
	6:1:3	359.20 ± 1.65 ^C	41.33 ± 2.41 ^{bc}	5.74 ± 0.03
	6:2:2	175.40 ± 1.92 ^b	25.73 ± 2.57 ^{a*}	5.52 ± 0.02

^{a, b, c} คือ ค่าขนาดอนุภาคในแต่ละตำรับที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

* คือ ค่าขนาดอนุภาคที่มีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ทั้งในตำรับ T1 และ T2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาส่วนประกอบและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชันที่มีส่วนผสมของยาทาพระเส้นประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกันคือ tween20, tween80 และ span80 วัฏภาคน้ำมันมี jojoba oil และ citronella oil วัฏภาคน้ำมีตัวทำละลายรวมคือน้ำ : IPA ในอัตราส่วน 1:1 เตรียมตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันสูตรพื้นฐานด้วยวิธี pseudo ternary phase diagram ที่มีการกำหนดอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว : วัฏภาคน้ำมัน : วัฏภาคน้ำที่แตกต่างกัน ได้ทั้งหมด 3 สูตรคือ สูตร A, B และ C (ตารางที่ 2 และ 3) พบว่าตำรับยาพื้นไมโครอิมัลชันสูตร B2 (tween20 : citronella oil : pure water) มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงการเกิดไมโครอิมัลชันคือ 20-200 นาโนเมตร (Talegaonkar et al., 2008) จึงคัดเลือกมาพัฒนาในรูปแบบไมโครอิมัลชันผสมสารสกัดยาทาพระเส้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 (T1) และ 5 (T2) ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพพบว่าสามารถพัฒนาในรูปแบบไมโครอิมัลชันได้ในอัตราส่วน 6:2:2 มีค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคเท่ากับ 142.90 และ 175.40 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยความหนืดต่ำเท่ากับ 23.80 และ 25.73 cP ค่าเฉลี่ย pH เท่ากับ 3.43 และ 5.52 เป็นค่ากรด - ด่าง ที่ค่อนข้างเหมาะสมต่อสภาพผิว และทั้ง 2 ตำรับมีลักษณะเนื้อที่นาใช้สัมผัสดี ทาเกลี่ยง่ายและไม่พบคราบสีหลังจากทาตำรับบนผิว อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในพัฒนายาทาพระเส้นในรูปแบบไมโครอิมัลชัน เพื่อความเสถียรภาพของตำรับไมโครอิมัลชันควรศึกษาความคงตัวของกายภาพ เคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถนำไปศึกษาทดลองทางคลินิกต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้การสนับสนุนการวิจัย และขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้ความอนุเคราะห์ความสะดวกด้านเครื่องมือวิจัยและห้องปฏิบัติการ

7. เอกสารอ้างอิง

- จารุวรรณ โตกลางค์, ดลยา ใจสินธุ์, และ กุลวรงค์ กรณ์แก้ว. (2560). การพัฒนาตำรับยาทาพระเส้นจากพระคัมภีร์โอสถพระนารายณ์ในรูปแบบยาเตรียมประเภทเจล. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ ครั้งที่ 1; 7-8 ธันวาคม 2560* (น. 1-7). เชียงราย: สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- ธนกร ศิริสมุทร. (2564). พิษวิทยาของเอธิลแอลกอฮอล์และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์. *วารสารเภสัชกรรมโรงพยาบาล*, 31(1), 14-23.



- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนานนท์. (ม.ป.ป.). *Emulsifier / อิมัลซิไฟเออร์*. เข้าถึงเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2563 จาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0303/emulsifier>.
- วลัยลักษณ์ พรผล และ ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา. (2563). การพัฒนาตำรับยาน้ำมันมหาจักรในรูปแบบไมโครอิมัลชัน. ใน *งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 12; 9 - 10 กรกฎาคม 2563* (น. 2-10). นครปฐม: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.
- วันทนา วีระถาวร และ สรศักดิ์ ศุภผล. (2549). *กลุ่มอาการปวดพังผืด กล้ามเนื้อ*. เข้าถึงเมื่อ 20 กุมภาพันธ์ 2563 จาก <https://med.mahidol.ac.th/ortho/sites/default/files/public/file/pdf/Myofascial.pdf>.
- วรารณ จรรยาประเสริฐ. (2555). *นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง*. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- สุกรณิการ์ ทับทิมศรี. (2560). *ยาดำจลชีสำหรับใช้ภายนอกในรูปแบบไมโครอิมัลชัน*. เข้าถึงเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2563 จาก https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=230.
- สุนิดา วินิจฉัย, พัลลภา วุฒิภาพรกุล, และ ภารดี อสุโกวิท. (2559). ฤทธิ์การต้านอักเสบ ความเป็นพิษ และต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรของตำรับทาพระเส้นไอสถพระนารายณ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมนวดทาพระเส้นตำรับไอสถพระนารายณ์. *วารสารการแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก*, 14(2)(ฉบับเสริม), 72.
- อัจฉราภรณ์ สิงห์หาญ และรัตนา อินทรานุปกรณ์. (2558). การพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อช่วยความคงตัวของสารสกัดชาเขียว. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*, 11, 40-56.
- Aromahub. (2019). *ประเภทของน้ำมันนวด*. เข้าถึงเมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2563 จาก <https://aromahub.com/th/articles-thai/26-base-oil-and-massage-oil-articles/104-5>.
- Bhargava, H. N., Narurkar, A., & Leieb, L. M. (1987). Using microemulsions for drug delivery. *Pharmaceutical Technology*, 11, 46-50.
- Eccleston, G. M. (1988). *Microemulsion*. In: Swarbrick, J., Boylan, J. C., editors. *Encyclopedia of pharmaceutical Technology* (pp. 375-421). New York: Marcel Dekker.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(5), 359-370.
- Lawrence, M. J., & Rees, G. D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45, 89-121.
- Ostertag, F., Weiss, J., & McClements D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *The Journal of Colloid and Interface Science*, 388(1), 95-102.
- Paul, B. K., & Moulik, S. P. (1997). Microemulsion: an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 18(4), 301-367.
- Prasert, W., & Gohtani, S. (2016a). Effect of sucrose on phase behavior in water/polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Tween®/vegetable oil system and food nano-emulsification using low-energy methods. *Journal of Food Engineering*, 168, 119-128.
- Prasert, W., & Gohtani, S. (2016b). Effect of temperature on low-energy nano-emulsification and phase behavior in water/polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester (Tween®)/vegetable oil systems. *Journal of Food Engineering*, 180, 101-109.



- Talegaonkar, S., Azeem, A., Ahmad, F.J., Khar, R.P., Pathan, S.A., & Khan, Z.I. (2008). Microemulsions: A novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2, 238-257.
- Xu, J., Fan, J.Q., Yin, Q.Z., Yin, Z.Q., Li, X.T., Du, Y.H., ... Jia, R.Y. (2010). The preparation of neem oil microemulsion (*Azadirachta indica*) and the comparison of acaricidal time between neem oil microemulsion and others formulations in vitro. *Veterinary Parasitology*, 169, 399-403.



การศึกษาวิธีการกำจัดสีของสารสกัดเฟิร์น ไชโคลซอรัส เทอร์มินันส์ ที่มีสารอินเทอร์รับดินในปริมาณสูง สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

Study on decolorization methods of interruptin rich *Cyclosorus terminans* extract for cosmeceutical product development

จินตจุจี รักษิตพินิจดุญ^{1,2} และ สิริวรรณ แก้วสุวรรณ^{1,2,*}

Jinsujee Rakkhitpinitdun^{1,2} and Sireewan Kaewsuwan^{1,2,*}

¹สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

²สถานวิจัยความเป็นเลิศยาสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

¹Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Prince of Songkla University, Songkhla

² The Phytomedicine and Pharmaceutical Biotechnology Excellence center, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Prince of Songkla University, Songkhla

* Corresponding author, E-mail: songsri.k@psu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการกำจัดสีของสารสกัดเฟิร์น ไชโคลซอรัส เทอร์มินันส์ (*Cyclosorus terminans*) ด้วยวิธีการต่างๆ ที่ยังคงสารอนุพันธ์อินเทอร์รับดิน (interruptins) ในปริมาณสูงและปลอดภัยต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง วิธีการกำจัดสีที่นำมาทดสอบ ได้แก่ วิธีการแยกชั้น โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ไอโซพรอปานอล และน้ำ และวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งใช้ amberlite IRA-67 และ C18 ซิลิกาเจล เป็นเฟสคงที่ และใช้ตัวทำละลายไอโซพรอปานอล เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากการทดสอบทั้ง 3 วิธี พบว่าส่วนเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้น ให้ผลผลิตร้อยละสูงที่สุด ตามด้วยส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากการแยกโดยใช้คอลัมน์ amberlite IRA-67 และส่วนสกัดที่ 1 จากการแยกด้วยคอลัมน์ C18 โดยให้ผลผลิตเท่ากับ ร้อยละ 71, 64 และ 47 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า ส่วนของเฮกเซนในวิธีการแยกชั้น ให้ปริมาณสารสำคัญเท่ากับ 11.59, 4.43 และ 51.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนสกัดที่ 1 จากการแยกด้วยคอลัมน์ C18 ให้ปริมาณสารสำคัญเท่ากับ 9.72, 4.56 และ 29.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และส่วนสกัดที่ 1 จากการแยกด้วยคอลัมน์ amberlite IRA-67 มีปริมาณสารสำคัญเท่ากับ 1.13, 2.15 และ 35.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าส่วนสกัดที่ 1 จากการแยกด้วยคอลัมน์ C18 ให้ปริมาณสารอินเทอร์รับดินน้อยกว่าส่วนเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้น แต่วิธีดังกล่าวสามารถลดสีได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น และตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีนี้เป็นไอโซพรอปานอลที่มีความปลอดภัยกว่าเฮกเซน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วย C18 เป็นวิธีการกำจัดสีที่เหมาะสมสำหรับการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป

คำสำคัญ: การกำจัดสี เฟิร์น อินเทอร์รับดิน

Abstract

The objective of this study was to prepare decolorization methods of interruptin rich *Cyclosorus terminans* extract (IRCE). For efficiency and usability of the green plant extract in cosmeceutical application, it is necessary to reduce the green color with still retaining the high active component in the corresponding extract. The partition method and column chromatography using amberlite IRA-67 and C18 silica gel as stationary phases were applied in this study. Among the three tested methods, the highest percentage of extract yield was presented in the hexane part of the partition method as high as 71%w/w, followed by fraction 1 collected from amberlite IRA-67 column, and fraction 1 collected from C18 column which were 64 and 47 %w/w, respectively. Analysis of interruptins A, B, and C contents by

HPLC also exhibited the highest yield in the hexane part obtained from partition method as 11.59, 4.43, and 51.6 µg/mg, respectively, following fraction 1 from the C18 column method showed 9.72, 4.56, and 29.88 µg/mg, respectively. Whereas using amberlite IRA-67 column provided 1.13, 2.15 and 35.38 µg/mg in fraction 1, respectively. However, even fraction 1 from C18 column chromatography method provided interruptins contents less than hexane part from the partition method, the corresponding extract obtained from the C18 column chromatography method exhibited the most decolorized appearance when compared with its original IRCE. Moreover, the eluent used in C18 column chromatography was isopropanol which is safer than hexane. Therefore, decolorization of interruptin rich *C. terminans* extract using C18 column chromatography with isopropanol eluent was considered as the suitable method for preparation cosmeceutical product development.

Keywords: Decolorization, Fern *Cyclosorus terminans*, Interruptin A

1. บทนำ

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรไทยได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย ในหลากหลายรูปแบบ รวมถึงเวชสำอางจากสมุนไพรไทยเพื่อสุขภาพและความงาม เนื่องจากสมุนไพรไทยมีประโยชน์ ได้รับความนิยมต่อผู้บริโภค ประกอบกับการมีงานวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรไทยออกมาอย่างแพร่หลาย ทำให้ผู้บริโภคเกิดความเชื่อมั่นในความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสมุนไพรไทย ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการนำความรู้ด้านสมุนไพรมาต่อยอดและประยุกต์ใช้ให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยและนำใช้ต่อผู้บริโภค

เฟิร์นชนิดหนึ่งที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cyclosorus terminans* อยู่ในวงศ์ Thelypteridaceae เป็นพืชขึ้นต่ำมักพบบริเวณเนินเขาที่ค่อนข้างแห้งในระดับความสูง 600-1,200 เมตร จากระดับน้ำทะเล พบได้ทั่วไปในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพืชเฟิร์นที่อยู่ในสกุลเดียวกับ *Cyclosorus interruptus* ซึ่งเฟิร์นชนิดนี้มีการศึกษาพิษวิทยา และค้นพบสารอนุพันธ์กลุ่ม coumarins จำนวน 3 ชนิด คือ อินเตอร์รับดิน เอ บี และ ซี (interruptins A, B, C) ในขณะเดียวกันพบสารกลุ่ม furanocoumarins จำนวน 3 ชนิด คือ อินเตอร์รับดิน ดี อี และ เอฟ (interruptins D, E, F) และพบสารกลุ่ม dioxocane derivative คือ อินเตอร์รับดิน จี (interruptin G) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สารสำคัญอินเตอร์รับดิน เอ มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Micrococcus luteus* ได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) เท่ากับ 2, 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน chloramphenicol ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 4, 8 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสำคัญอินเตอร์รับดิน เอ และ บี มีรายงานความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cell) โดยมีค่าความเข้มข้นครั้งหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์ (IC₅₀) เท่ากับ 5.1 และ 3.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน podophyllotoxin ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.006 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Quadri-Spinelli, Heilmann, Rali, & Sticher, 2000)

สำหรับสารสกัดเฟิร์น *C. terminans* มีรายงานการค้นพบสารอนุพันธ์กลุ่ม coumarins จำนวน 3 ชนิด คือ อินเตอร์รับดิน เอ บี และ ซี โดยระบุว่า สารสำคัญอินเตอร์รับดิน เอ เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *S. epidermidis* และ *Bacillus subtilis* ซึ่งให้ค่า MIC เท่ากับ 4, 4, 2 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน vancomycin ที่มีค่า MIC เท่ากับ 1, 1, 2 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Kaewsuan et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสำคัญอินเตอร์รับดิน เอ ยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกก่อให้เกิดสิว *Propionibacterium acnes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน clindamycin ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ



0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chaiwong, Putarak, & Kaewsuwan, 2018) ยิ่งไปกว่านั้น สารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกระบวนการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Chaiwong, Putarak, Sretrirutchai, & Kaewsuwan, 2019) อีกทั้งมีรายงานถึงฤทธิ์ในการลดความอ้วน และฤทธิ์ต้านเบาหวานจากสารสำคัญอินเทอร์รับดิน บี ด้วยเช่นกัน (Kaewsuwan et al., 2016)

ผลการวิจัยข้างต้นบ่งชี้ว่า สารอนุพันธ์กลุ่ม coumarins ชื่อ อินเทอร์รับดิน เอ ซึ่งแยกได้จากสารสกัดเฟิร์น *C. terminans* เป็นสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ประกอบกับมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบร่วมกับต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและต้านการอักเสบได้ในสภาพหน้า แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากเฟิร์นที่อุดมไปด้วยสารอินเทอร์รับดิน เอ ที่เตรียมออกมาได้เป็นสารสกัดที่มีสีเขียวน้ำ ซึ่งรบกวนต่อภาพลักษณ์ของผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ดังนั้น วิธีการกำจัดสีออกจากสารสกัดจึงเป็นสิ่งที่ผู้วิจัยมีความสนใจ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสีเขียวน้อยลง แต่ยังคงมีสารอนุพันธ์อินเทอร์รับดิน เอ ในปริมาณสูงเช่นเดิม และมีความปลอดภัยต่อการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการกำจัดสีจากสารสกัดเฟิร์น *C. terminans* ด้วยวิธีการต่างๆ ที่ยังคงมีสารอนุพันธ์อินเทอร์รับดิน เอ ในปริมาณสูงต่อการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

3. อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ rotary evaporator (Heidolph, Germany), spectrophotometer (Konica-Minolta, Japan), ultrasonic bath (Elma, Germany), HPLC C18 column (TOSHO Bioscience, Japan), HPLC quaternary pump (Shimadzu, Japan)

สารเคมี ได้แก่ isopropanol (RCI Labscan, Thailand), methanol HPLC grade (RCI Labscan, Thailand), methanol AR grade (RCI Labscan, Thailand), hexane commercial grade (RCI Labscan, Thailand), glacial acetic acid (RCI Labscan, Thailand), amberlite IRA-67 (Sigma-Aldrich, USA), reverse phase silica gel (C18) (Vertical, Thailand)

ส่วนเนื้อดินของเฟิร์น *Cyclosorus terminans* เก็บจากอำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดย ศ.ดร. ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับหมายเลขตัวอย่างพืช SKP 208 03 20 001 ปัจจุบันถูกเก็บไว้ที่ พิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดเฟิร์นที่มีอินเทอร์รับดินสูง (interruptin rich *C. terminans* extract: IRCE)

นำผงเฟิร์น 1 กิโลกรัม แช่ในไอโซพโรพานอล 3 ลิตร และนำไป sonicate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไป reflux ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง ส่วนของกากนำมา reflux ซ้ำ อีก 2 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ผ่านการกรองทั้งหมดรวมเข้าด้วยกัน และระเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดหยาบเฟิร์น

นำสารสกัดหยาบเฟิร์น 15 มิลลิกรัม ละลายด้วยไอโซพโรพานอล 35 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ตั้งส่วนผสมดังกล่าวให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนสารละลายมาเติมน้ำกลั่น

อีก 30 มิลลิลิตร ที่ให้ตกตะกอนอีกครั้ง และกรองเช่นเดิม นำส่วนที่ตกตะกอนทั้งหมดไปละลายด้วยไอโซพรอปานอล แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดเฟิร์นที่มีสารอินเทอร์รับดินสูง (IRCE)

3.2.2 การกำจัดด้วยวิธีการต่างๆ

- การแยกชั้น (partition)

นำสารสกัดเฟิร์น IRCE 15 มิลลิกรัม ละลายด้วยไอโซพรอปานอล นำไป sonicate จนสารสกัดละลายหมด แล้วนำมาใส่ใน separation funnel เติมหกเซน และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นเขย่าร่วมกับไล่อากาศออก ทำซ้ำเช่นนี้จำนวน 5 ครั้ง และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จนสารละลายเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ส่วน (1. ไอโซพรอปานอล+น้ำ และ 2. เฮกเซน) จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนไประเหยแห้ง ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC (Vatsala & Rekha, 2013)

- การกำจัดด้วยการใช้คอลัมน์ reverse phase (C18)

นำสารสกัดเฟิร์น IRCE 15 มิลลิกรัม ละลายด้วยไอโซพรอปานอลแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ reverse phase (C18) จากนั้นเติมไอโซพรอปานอลในคอลัมน์ เพื่อชะสารที่ต้องการออกมา แล้วนำสารส่วนที่สกัดได้แต่ละส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC (Sui et al., 2019)

- การกำจัดด้วยการใช้คอลัมน์ amberlite IRA-67

นำสารสกัดเฟิร์น IRCE 15 มิลลิกรัม ละลายด้วยไอโซพรอปานอลแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ จากนั้นเติมไอโซพรอปานอลในคอลัมน์ เพื่อชะสารที่ต้องการออกมา แล้วนำสารส่วนที่สกัดได้แต่ละส่วนไปวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย HPLC (Panichayupakaranant, Charoonratana, & Sirikatitham, 2009)

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น Prominence-i_Halal LC-2030C คอลัมน์ชนิด TSK-gel ODS-100V (เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 4.6 x 250 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ฉีดสารตัวอย่างปริมาตร (20 ไมโครลิตร) วัดการดูดกลืนแสงยูวีที่ 290 นาโนเมตร อัตราไหลของตัวทำละลาย 1 มิลลิิตรต่อนาที เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอล และ 1% กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (Chaiwong et al, 2018)

3.3.4 การวิเคราะห์สีด้วยเครื่อง spectrophotometer

วิเคราะห์สีด้วยลักษณะทางกายภาพโดยสังเกตจากสีที่มองเห็น และทดสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยบันทึกผลค่าสีเป็นค่า $L^*a^*b^*$ ซึ่งวิเคราะห์จากระบบสี CIE $L^*a^*b^*$ ที่ความแตกต่างระหว่างความสว่างและความมืด (L^*) โดย L^*+ แสดงถึงสว่างเป็นสีขาว, L^*- แสดงถึงมืดเป็นสีดำ ค่า a^* บรรยายถึงความแตกต่างระหว่างสีเขียวและสีแดง (a^*) โดย a^*+ แสดงถึงค่าสีแดง, ส่วน a^*- แสดงถึงค่าสีเขียว และค่า b^* กล่าวถึงความแตกต่างระหว่างสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดย b^*+ แสดงถึงสีเหลือง และ b^*- แสดงถึงสีน้ำเงิน (Tatsuzawa & Hosokawa, 2016)

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ค่าร้อยละผลผลิต (%yield) ของสารสกัดเมื่อผ่านการกำจัดสี

ตารางที่ 1 แสดงค่าร้อยละผลผลิตของส่วนสกัดที่ผ่านการกำจัดสีด้วยวิธีการ พบว่า ส่วนสกัดเฮกเซนจากการใช้วิธีการแยกชั้น ให้ผลผลิตมากที่สุด คือ ร้อยละ 71 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามด้วย ส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากการแยกโดยใช้คอลัมน์ amberlite IRA-67 และส่วนสกัดที่ 1 จากการแยกด้วยคอลัมน์ C18 โดยให้ผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ ร้อยละ 64 และ 47 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ



ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตสารสกัดเมื่อผ่านการกำจัดด้วยวิธีการต่างๆ

วิธีการสกัด	ส่วนสกัด	ร้อยละผลผลิต
วิธีการแยกชั้น	ส่วนสกัดไอโซพรופןอล และน้ำ	45
(Partition)	ส่วนสกัดเฮกเซน	71
วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (C18)	ส่วนสกัดที่ 1	47
	ส่วนสกัดที่ 2	22
	ส่วนสกัดที่ 3	7
วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Amberlite IRA-67)	ส่วนสกัดที่ 1	64
	ส่วนสกัดที่ 2	9
	ส่วนสกัดที่ 3	5

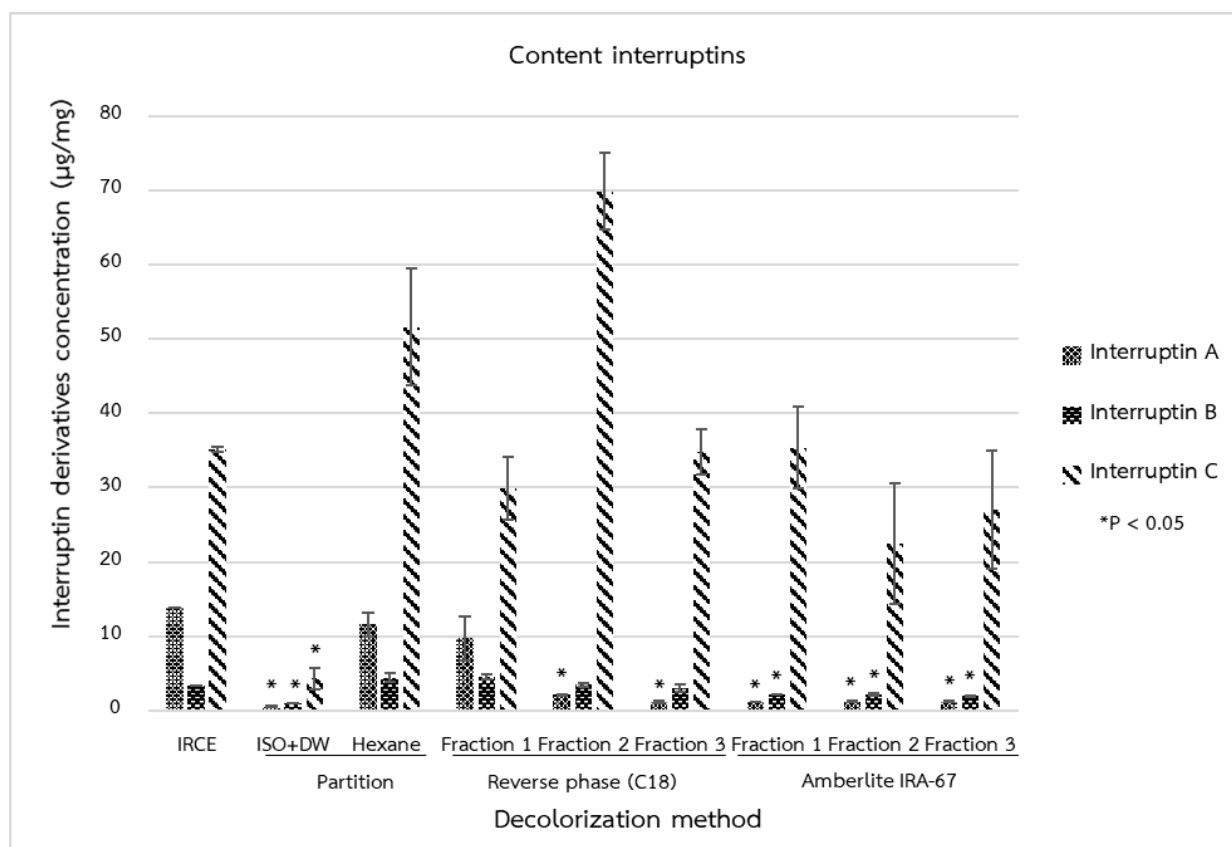
4.2 ผลวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของสารสกัดเฟิร์นเมื่อผ่านการกำจัดด้วยวิธีการที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 วิธี ให้ผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 1 โดยพบว่า ในส่วนเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้น มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี ที่มากพอ เท่ากับ 11.59, 4.43 และ 51.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และส่วนของส่วนสกัดไอโซพรופןอลและน้ำที่ได้จากวิธีนี้ ให้ปริมาณสารอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี เท่ากับ 0.54, 0.94 และ 4.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณที่น้อยกว่าส่วนเฮกเซนอย่างมีนัยยะสำคัญ แต่ให้ค่าความสว่างที่เปลี่ยนแปลงสว่างขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ

ในขณะเดียวกันเมื่อทำการกำจัดโดยใช้คอลัมน์ชนิด reverse phase (C18) พบว่าในส่วนสกัดที่ 1 ให้ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี ที่มากพอ เท่ากับ 9.72, 4.56 และ 29.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ โดยส่วนสกัดที่ 2 และ 3 ให้ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ ที่น้อยกว่าส่วนที่ 1 อย่างมีนัยยะสำคัญ ส่วนปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน บี และ ซี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยยะสำคัญ

สำหรับการกำจัดด้วยวิธีคอลัมน์ amberlite IRA-67 พบว่าทั้ง 3 ส่วนที่ได้มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ บี และ ซี ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ เท่ากับ 1.13, 1.21 และ 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน บี เท่ากับ 2.15, 2.15 และ 1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน ซี เท่ากับ 35.38, 22.40 และ 26.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ (* $p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากทั้ง 3 วิธี พบว่าส่วนเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้นซึ่งให้ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี เท่ากับ 11.59 และ 4.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากวิธีการใช้คอลัมน์ reverse phase (C18) ที่มีปริมาณสารสำคัญ เท่ากับ 9.72 และ 4.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น IRCE ซึ่งมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี เท่ากับ 13.79 และ 3.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสำคัญอินเทอร์รับดิน ซี ในส่วนเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้น , ส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากวิธีการใช้คอลัมน์ reverse phase (C18) และส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากวิธี amberlite IRA-67 มีปริมาณสารสำคัญเท่ากับ 51.6, 29.88 และ 35.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น IRCE ในขณะเดียวกัน ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี ในส่วนสกัดที่ 1 ที่ได้จากวิธี amberlite IRA-67 น้อยกว่าสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น IRCE ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ



ภาพที่ 1 แสดงปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับติน เอ บี และ ซีของสารสกัดเฟิร์นเมื่อผ่านการกำจัดสีด้วยวิธีต่างๆ

IRCE: interruptin rich *C. terminans* extract; ISO: isopropanol; DW: distilled water, $p^* < 0.05$ (n = 3)

*เมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น IRCE

4.3 ผลวิเคราะห์สีของสารสกัด

ผลการวิเคราะห์สีของสารสกัดที่ผ่านการกำจัดสีด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 3 วิธี แสดงดังตารางที่ 2 โดยพบว่าสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE) มีค่าความสว่าง (L^*) เท่ากับ 24.37 ± 0.48 , ค่า a^* เท่ากับ 0.69 ± 0.07 และค่า b^* เท่ากับ 0.30 ± 0.06 แสดงว่าสารสกัดเฟิร์นมีความสว่างออกไปทางสีแดงและสีเหลือง ลักษณะสีสารสกัดที่ได้เป็นสีเขียวเข้ม สำหรับสารสกัดเฟิร์นที่ผ่านการกำจัดสีด้วยวิธีการแยกชั้น พบว่าส่วนสกัดเฮกเซน มีสีเขียวเข้มและใส มีค่าความสว่างเท่ากับ 24.18 ± 0.44 ในขณะเดียวกันเมื่อกำจัดสีด้วยวิธีการใช้คอลัมน์ reverse phase (C18) พบว่าสารสกัดส่วนที่ 1 ได้มีสีเขียวเหลืองและใส มีค่าความสว่างเท่ากับ 25.53 ± 0.89 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของสีที่สว่างขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE) และสำหรับการกำจัดสีเมื่อใช้คอลัมน์ amberlite IRA-67 พบว่าทั้งส่วนสกัดที่ 1, 2 และ 3 มีความใสทั้งหมดโดยมีสีเขียวเข้ม สีเหลืองอ่อน และไม่มีสีตามลำดับ และให้ค่าความสว่าง เท่ากับ 23.71 ± 0.97 , 35.25 ± 1.96 และ 37.99 ± 0.19 ตามลำดับ ซึ่งในส่วนสกัดที่ 2 และ 3 มีการเปลี่ยนแปลงของสีที่สว่างขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE)



ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์สีของสารสกัดเฟิร์นเมื่อผ่านการกำจัดสีด้วยวิธีต่างๆ

สารสกัด		สี	ความขุ่น	ตัวแปร		
				L*	a*	b*
IRCE		เขียวเข้ม	ใส	24.37±0.48	0.69±0.07	0.30±0.06
วิธีการแยกชั้น (Partition)	ส่วนสกัด					
	ไอโซพรอปานอล และน้ำ	เหลือง	ใส	26.10±0.64*	0.95±0.04	2.59±0.25
	ส่วนสกัด					
	เฮกเซน	เขียวเข้ม	ใส	24.18±0.43	0.88±0.06	0.32±0.21
วิธีคอลัมน์	ส่วนสกัดที่ 1	เขียวเหลือง	ใส	25.53±0.89*	0.91±0.40	2.56±0.86
โครมาโทกราฟี (C18)	ส่วนสกัดที่ 2	เขียวเข้ม	ใส	25.01±0.16*	0.62±0.21	0.91±0.40
	ส่วนสกัดที่ 3	เขียวเข้ม	ใส	22.32 ±0.27*	1.09±0.02	0.62±0.21
วิธีคอลัมน์	ส่วนสกัดที่ 1	เขียวเข้ม	ใส	23.71±0.97	0.92±0.08	0.54±0.12
โครมาโทกราฟี (Amberlite IRA-67)	ส่วนสกัดที่ 2	เหลืองอ่อน	ใส	35.25±1.96*	-1.83±0.02	12.49±0.37
	ส่วนสกัดที่ 3	ไม่มีสี	ใส	37.99±0.19*	-1.30±0.15	8.34±0.41

L* = ค่าความสว่าง (L*+ = สว่างถึงสีขาว, L*- = มืดถึงสีดำ), a* = ค่าความแตกต่างระหว่างสีแดงและสีเขียว (a*+ = ค่าสีแดง, a*- = ค่าสีเขียว), b* = ค่าความแตกต่างระหว่างสีเหลืองและสีน้ำเงิน (b*+ = ค่าสีเหลือง, b*- = ค่าสีน้ำเงิน), $p^* < 0.05$ (n = 3)

5. สรุปผลการวิจัย

การกำจัดสีจากสารสกัดเฟิร์นที่มีอินเทอร์รับดินสูง ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า ส่วนสกัดที่ได้จากแต่ละวิธีให้ผลผลิต ปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน และความสว่างของสารสกัดที่ต่างกัน โดยส่วนสกัดเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้นให้ผลผลิตมากที่สุด คือ ร้อยละ 71 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ, บี และ ซี เท่ากับ 11.59, 4.43 และ 51.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และสารสกัดมีสีเขียวเข้มใส ซึ่งมีค่าความสว่าง เท่ากับ 24.18±0.43 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญกับความสว่างของสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE) ในขณะที่เดียวกันการกำจัดสีด้วยคอลัมน์ reverse phase (C18) ให้ผลผลิตร้อยละ 47 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ, บี และ ซี เท่ากับ 9.72, 4.56 และ 29.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ สารสกัดมีสีเขียวเหลือง ใส และมีค่าความสว่าง เท่ากับ 25.53±0.89 ซึ่งมีความสว่างที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE) และการกำจัดสีด้วย amberlite IRA-67 ส่วนสกัดที่ 1, 2 และ 3 ให้ผลผลิตร้อยละ 64, 9 และ 5 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ, บี และ ซี ที่ใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ เท่ากับ 1.13, 1.21 และ 1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ อินเทอร์รับดิน บี เท่ากับ 2.15, 2.15 และ 1.93 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ โดยพบว่าทั้ง 3 ส่วน มีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ และมีปริมาณสารสำคัญ อินเทอร์รับดิน ซี เท่ากับ 35.38, 22.40 และ 26.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญ ทั้งนี้ มีเพียงส่วนสกัดที่ 2 และ 3 เท่านั้นมีค่าความสว่างที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ

จากผลการวิจัยดังกล่าว สารสกัดที่ผ่านการกำจัดสีที่ดีที่สุดและเหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางต่อไป คือ ส่วนสกัดที่ 1 ที่ผ่านการกำจัดสีด้วยคอลัมน์ reverse phase (C18) เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีสีที่สว่างขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ และยังคงมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี ที่มากและไม่แตกต่างจากสารสกัดเฟิร์นเริ่มต้น (IRCE) อีกทั้งตัวทำละลายไอโซพรอปานอลมีใช้ มีความปลอดภัยและความเป็นพิษต่ำ อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวให้ผลผลิตที่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ซึ่ง



ในส่วนสกัดเฮกเซนที่ได้จากวิธีการแยกชั้น ให้ผลผลิตมากที่สุด และมีปริมาณสารสำคัญอินเทอร์รับดิน เอ และ บี ที่มากพอโดยไม่มี การเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยยะสำคัญ แต่ค่าความสว่างของสารสกัดไม่มีการเปลี่ยนแปลง และตัวทำละลายเฮกเซน เป็นสารอันตราย มีความเป็นพิษสูง ไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้บนผิวหนัง ดังนั้น เพื่อให้ได้สารสกัดที่ดียิ่งขึ้นและมากพอ ควรมีการ ทดลองซ้ำ และศึกษาวิธีการกำจัดสีในปริมาณเพิ่มขึ้น (scale up) เพื่อยกระดับพืชชั้นต่ำให้เป็นพืชที่มีมูลค่าสูง สามารถนำไป พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ นอกจากผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ ปฏิบัติงาน อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ สำหรับปฏิบัติในงานวิจัยนี้ และ ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัยความเป็นเลิศยาสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

- Chaiwong, S., Puttarak, P., & Kaewsuwan, S. (2018). Anti *Propionobacterium acnes* activity, HPLC method validation for simultaneous analysis and extraction of coumarins from the fern *Cyclosorus terminans*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 37(9), 1791-1797.
- Chaiwong, S., Puttarak, P., Sretrirutchai, S., & Kaewsuwan, S. (2019). In vitro anti-inflammatory and antioxidative activities of isolated interruptins from *Cyclosorus terminans*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38(8), 1677-1682.
- Kaewsuwan, S., Plubrukarn, A., Utsintong, M., Kim, S.-H., Jeong, J.-H., Cho, J.G., Park, S.G., & Sung, J.-H. (2016). Interruptin B induces brown adipocyte differentiation and glucose consumption in adipose-derived stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2078-2086.
- Kaewsuwan, S., Yueanyongsawad, S., Plubrukarn, A., Kaewchothong, A., Raksawong, A., Puttarak, P., & Apirug, C. (2015). Bioactive interruptins A and B from *Cyclosorus terminans*: anti-bacterial, anticancer, stem cell proliferation and ROS scavenging activities. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 37(3), 309-317.
- Panichayupakaranant, P., Charoonratana, T., & Sirikatitham, A. (2009). RP-HPLC analysis of *Rhinacanthus nasutus*: validation and application for the preparation of rhinacanthin high-yielding extract. *Journal of Chromatographic Science*, 47(8), 705-708.
- Quadri-Spinelli, T., Heilmann, J., Rali, T., & Sticher, O. (2000). Bioactive coumarin derivatives from the fern *Cyclosorus interruptus*. *Planta Medica*, 66(8), 728-733.
- Sui, Z., Luo, J., Yao, R., Huang, C., Zhao, Y., & Kong, L. (2019). Functional characterization and correlation analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in coumarin biosynthesis from *Peucedanum praeruptorum* Dunn. *Phytochemistry*, 158, 35-45.
- Tatsuzawa, F., & Hosokawa, M. (2016). Flower colors and their anthocyanins in *Saintpaulia* Cultivars (Gesneriaceae). *The Horticulture Journal*, 85(1), 63-69.



Vatsala, T.M., & Rekha, R. (2013). An efficient method for extracting lutein from Indian medicinal plant *Commelina benghalensis*. A comparative study on solvents efficiency. *Indian Journal of Science and Technology*, 6: 25-31.



การตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะของไทย

Screening on tyrosinase inhibitory activity of Thai rejuvenating remedies

นิตินันท์ โกยโกโคสวรค์* สุกัญญา เดชอดิศัย และ ฉัตรชัย วัฒนากิริมย์สกุล

Nitinant Koyphokaisawan*, Sukanya Dej-adisai, and Chatchai Wattanapiromsakul

สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Prince of Songkla University, Songkhla

*Corresponding author, E-mail: nitinant.kp@gmail.com

บทคัดย่อ

ยาอายุวัฒนะ เป็นตำรับยาสมุนไพรที่เหมาะสมสำหรับผู้สูงอายุ โดยในหนึ่งตำรับจะประกอบด้วยพืชสมุนไพรหลากหลายชนิดอยู่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ทำให้ตำรับยาอายุวัฒนะมีสรรพคุณที่กว้าง ไม่เฉพาะเจาะจงต่อการรักษาโรค หรืออาการใดเป็นพิเศษ ข้อมูลจากการศึกษาด้านเภสัชวิทยา และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับรองรับการใช้ตำรับยาอายุวัฒนะอย่างถูกต้อง และปลอดภัยก่อนข้างมีจำกัดนอกจากนี้หนึ่งในปัญหาสำหรับผู้สูงอายุ คือการเพิ่มขึ้นของเม็ดสีผิว และจุดด่างดำ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะของไทย ซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกลดการสร้างเม็ดสีด้วยวิธีโดปาโครม ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบด้วย 80% เอทานอลของตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11, 16 และ 19 แสดงค่าการยับยั้งสูงเป็น 3 อันดับแรก เท่ากับร้อยละ 84.87 ± 0.79 , 75.32 ± 2.68 และ 78.76 ± 1.80 ตามลำดับ และมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 9.98, 18.37 และ 15.62 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม ตามลำดับ ในขณะที่กรดโคจิก (สารมาตรฐาน) แสดงค่าการยับยั้ง เท่ากับร้อยละ 86.77 ± 2.97 และค่า IC_{50} เท่ากับ 3.08 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม จึงสรุปได้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะของไทยสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีใกล้เคียงกับกรดโคจิก โดยมีชะเอมเทศซึ่งเป็นส่วนผสมในตำรับยาทั้ง 3 ที่คาดว่าเป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว โดยเฉพาะตำรับยาหมายเลข 11 ซึ่งมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด สามารถพัฒนาเป็นแหล่งของสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากธรรมชาติแหล่งใหม่ ที่มีประสิทธิภาพ และเป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว หรือเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: ยาอายุวัฒนะ สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตำรับยาสมุนไพร เมลานิน ผู้สูงอายุ

Abstract

Rejuvenating remedies called “Yaa-Aa-Yu-Wat-Ta-Na” in Thai are herbal remedies specially created for elderly people. The ingredients of each remedy consist of various herbal plants with different proportions resulting in a variety of therapeutic properties. However, the information on their pharmacology and biological activities that will be further used as the supportive database for reliable and safe utilization of Thai rejuvenating remedies is limited. Moreover, one of the problems in elderly people is also hyperpigmentation. So, the objective of this study was to investigate the effectiveness of Thai rejuvenating remedies on tyrosinase inhibition which is one of the mechanisms that involves melanogenesis inhibition. This study was done using the dopachrome method. According to the results, it was found that the 80% ethanol crude extract of Thai rejuvenating remedy Nos. 11, 16 and 19 were the top 3 most effective remedies with percent inhibitions of 84.87 ± 0.79 , 75.32 ± 2.68 and $78.76 \pm 1.80\%$, respectively. Their half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) were 9.98, 18.37 and 15.62 $\mu\text{g/mL}$, respectively, whereas the standard kojic acid gave the percent inhibition of $86.77 \pm 2.97\%$ with the IC_{50} value of 3.08 $\mu\text{g/mL}$. In summary, Thai rejuvenating remedies exhibited the potential tyrosinase inhibitory effect the same as kojic acid. *Glycyrrhiza glabra* was one of the compositions in the 3 remedies and it could be the active component which inhibited tyrosinase. Especially, remedy No. 11 which was the



most effective remedy might be further developed as a new natural tyrosinase inhibitor and utilized in cosmetics or skincare products.

Keywords: Rejuvenating remedies, Tyrosinase inhibitor, Herbal remedies, Melanin, Elderly people

1. บทนำ

คำจำกัดความของ “ยาอายุวัฒนะ” ในทางการแพทย์แผนไทย หมายถึง ยาที่มีฤทธิ์ชะลอความแก่ ช่วยให้อายุยืนยาว บำรุงร่างกายให้แข็งแรง มีกำลัง และคืนความเป็นหนุ่มสาวอีกครั้ง (เพ็ญศรี เนื่องสิขาเพียร, 2545; ธีรวัฒน์ สุดขาว, 2556) ในยาอายุวัฒนะหนึ่งตำรับจะประกอบไปด้วยพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด อยู่ในอัตราส่วนที่ต่างกันไป ทำให้ตำรับยาอายุวัฒนะมีสรรพคุณที่กว้าง ไม่เฉพาะเจาะจงต่อการรักษาโรค หรืออาการใดเป็นพิเศษ ซึ่งจากคำจำกัดความข้างต้นชี้ให้เห็นเพียงว่า ตำรับยาอายุวัฒนะ เป็นตำรับยาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกลุ่มผู้สูงอายุเป็นอย่างมาก

ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางการแพทย์ และยารักษาโรคในปัจจุบัน ได้ส่งเสริมให้คุณภาพชีวิตความเป็นอยู่ของผู้คนดีขึ้น และมีชีวิตที่ยืนยาวมากยิ่งขึ้น ในปี พ.ศ. 2563 ประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป มีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นถึง 12 ล้านคน หรือเทียบเท่าร้อยละ 18.1 ของประชากรไทยทั้งหมด และยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงร้อยละ 31.4 ภายในอีก 20 ปีข้างหน้า (มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุ, 2564)

อายุที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลกระทบต่อการทำงาน และโครงสร้างของระบบผิวหนัง จากสาเหตุดังกล่าวทำให้ผิวหนังชั้นนอกบางลง เส้นใยคอลลาเจน และเส้นใยอีลาสติกที่ปกคลุมผิวหนังชั้นบนสุดลดลง กระบวนการฟื้นฟูสภาพผิวของเซลล์ผิวหนังลดลง ปัญหาเหล่านี้ล้วนเป็นปัญหาหลักที่พบได้บ่อยในผิวหนังของผู้สูงอายุ (Singh, 2017) ยิ่งไปกว่านั้น อีกปัญหาหนึ่งที่พบมากที่สุด คือ การเพิ่มมากขึ้นของเม็ดสีเมลานิน หรือ ภาวะ hyperpigmentation ที่มีผลมาจากการที่ผิวหนังสัมผัสกับแสงแดดจ้าๆ เป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดเป็นจุดด่างดำ ที่เรียกว่า Solar lentigo กว่า 90% ของผู้สูงอายุ มักพบรอยจุดด่างดำเหล่านี้ในบริเวณผิวหนังที่สัมผัสกับแสงแดดได้ง่าย เช่น ใบหน้า หลังมือ หน้าอกส่วนบน และหลังส่วนบน ปัญหาจุดด่างดำ และสีผิวที่ไม่สม่ำเสมอ เป็นสาเหตุทำให้ความมั่นใจเรื่องความสวยงามภายนอกลดลง และอาจไม่ใช่ปัญหาที่อันตรายถึงแก่ชีวิต แต่อาจเป็นสัญญาณหนึ่งของความเสี่ยงต่อโรคมะเร็งผิวหนัง หรือโรคอื่นๆ ที่ร้ายแรงได้ในอนาคต (Armenta, Henkel, & Ahmed, 2019) วิธีการดูแลรักษาจุดด่างดำเหล่านี้ นอกจากจะใช้ครีมกันแดดเพื่อปกป้องผิวจากแสงแดดแล้ว การเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวที่มีสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ยังเป็นอีกวิธีการรักษาที่ดีที่สุด เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการผลิตเม็ดสีเมลานิน (Pandya & Guevara, 2000; Pillaiyar, Manickam, & Namasivayam, 2017)

ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากธรรมชาติกำลังเป็นที่นิยมอย่างมากในท้องตลาด มีแบรนด์ชั้นนำมากมายเลือกใช้สารสกัดจากธรรมชาติ มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิว และเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เช่น ผลิตภัณฑ์จากแบรนด์ Three®, Yves Rocher®, Origins® และ Sulwhasoo® เป็นต้น ตำรับยาสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ที่จะนำมาพัฒนาเป็นแหล่งของสารสกัดจากธรรมชาติ แหล่งใหม่สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำรับยาอายุวัฒนะ ที่เหมาะสมจะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวสำหรับแก้ปัญหาผิวในผู้สูงอายุ ถึงแม้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะมีการใช้รักษาในมนุษย์ โดยแพทย์พื้นบ้านของไทยมาอย่างยาวนาน ด้วยการเตรียมเป็นยาต้มดื่ม ทำให้อาจเป็นไปได้ว่าตำรับยาอายุวัฒนะ ปลอดภัย และไม่มีพิษต่อมนุษย์ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาอายุวัฒนะนั้นยังคงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อรองรับการนำตำรับยาอายุวัฒนemas มาประยุกต์ใช้อย่างถูกต้อง และปลอดภัย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตำรับยาอายุวัฒนemas โดยงานวิจัยชิ้นนี้จะมุ่งเน้นในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนemas ของไทย ที่ได้จากการรวบรวมจากหนังสือ ตำรายาแผนโบราณ และบันทึกของหมอพื้นบ้าน เพื่อจัดทำฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ที่สามารถรองรับการพัฒนาการใช้ตำรับยาอายุวัฒนemas ให้เป็นแหล่งสารสกัดจากธรรมชาติแหล่งใหม่ของผลิตภัณฑ์บำรุงผิว และเครื่องสำอางต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของตำรับยาอายุวัฒนะของไทย ด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme-based assay)

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ 200 μ L and 1000 μ L of micropipette tips, 1.5 mL of microcentrifuge tube (Shanghai Kirgen Medical Equipment, China), 20-200 μ L and 100-1000 μ L of micropipette, 20-200 μ L of multichannel pipette (Socorex Isba SA, Switzerland), 96 well plate (flat bottom with lid) (Costar Corning, China), analytical balance AB135-S 0.01 mg - 120 g (METTLER TOLEDO, Switzerland), microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Thailand), refrigerator (Hitachi, Japan), vacuum rotary evaporator (Heidolph, Germany), vortex (Corning, USA) and water bath (Mettmert, Germany)

สารเคมี ได้แก่ (3,4-dimethoxyphenyl)-L-alanine (L-DOPA), kojic acid (Fluka, Sigma-Aldrich, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (RCI Labscan, Thailand), ethanol (commercial grade) (Thai Oil, Thailand), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) and sodium phosphate monobasic dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MAY & BAKER, UK), mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, Germany) and water extract of *Atrocarpus lakoocha* wood (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Thailand)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบตำรับยาอายุวัฒนะ

รวบรวมข้อมูลตำรับยาอายุวัฒนะ เกี่ยวกับชนิดของพืชสมุนไพรที่ใช้ในตำรับยา ตลอดจนอัตราส่วนของพืชสมุนไพรที่ใช้ในแต่ละตำรับ รวมทั้งสิ้น 62 ตำรับ จากหนังสือ ตำรายาแผนโบราณ และบันทึกของหมอพื้นบ้าน ดังแสดงต่อไปนี้

- 1) ประมวลยอดตำรา ยาสมุนไพร ตำรับเก่าดั้งเดิม หลวงปู่ศุข วัดปากคลองมะขามเฒ่า (ดำรงธรรม, 2556)
- 2) ตำรายากลางบ้าน (มีสรรพคุณชะงัด) (พระธรรมวโรดม, 2537)
- 3) ตำรายาสมุนไพร หลวงปู่ศุข วัดมะขามเฒ่า หลวงปู่พันอจาโร และคณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ (ส.ธรรมภักดี, 2539)
- 4) ประมวลตำรับยาไทย (ชมพร ไชยล้อม, 2554)
- 5) ตำรายาประจำบ้าน เล่มที่ 1 (หมอนาค วิชัยดิษฐ, 2481)
- 6) ตำรายาสมุนไพรไทยโบราณ (สำนักพิมพ์พิมพ์อักษร, 2556)

หลังจากนั้น ได้จัดซื้อตัวอย่างตำรับยาอายุวัฒนะ ในรูปแบบสมุนไพรแห้งบดหยาบ จากร้านขายยาสมุนไพรโอบุรี ในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวนตำรับละ 200 กรัม เพื่อนำมาสกัดด้วยวิธีการแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย (maceration) โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล 80% เนื่องจากเป็นสารละลายพื้นฐานในอัตราส่วนที่มีความสามารถในการดึงสารประกอบทางเคมีในพืชออกมาได้มากที่สุด ทั้งส่วนที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ตามหลักการทางพฤกษเคมี จากนั้นแช่สกัดสมุนไพรแห้งบดหยาบแต่ละตำรับทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะปิด นาน 72 ชั่วโมง ทำการคนสารละลายทุก ๆ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่างด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองหยาบ นำกากที่เหลือไปแช่สกัดซ้ำในตัวทำละลายเดิม ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง ส่วนสารละลายตัวอย่างที่กรองแล้วจะนำไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (vacuum rotary evaporator) และนำไประเหยต่อบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายแห้ง ได้เป็น

สารสกัดหยาบ เก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อบรรณาไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme-based assay) ต่อไป

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme-based assay)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธีการทางเอนไซม์ จะดำเนินการโดยประยุกต์จาก dopachrome method ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยมาอย่างยาวนาน (Masamoto, Iida, & Kubo, 1980; Morita et al., 1994; Iida et al., 1995; Dej-adisai et al., 2019) โดยจะใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ใช้กรดโคจิก (kojic acid) และปวกหาด [สารสกัดชั้นน้ำจากแก่นมะหาด (water extract of *Atrocarpus lakoocha* wood)] เป็นสารมาตรฐาน

โดปาโครม (dopachrome) เป็นตัวกลางตัวหนึ่งของสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน สีแดงของโดปาโครม สามารถตรวจวัดได้ในช่วงของรังสีที่มองเห็นได้ (visible light) โดยในการทดลองนี้ จะตรวจวัดสีแดงของโดปาโครมด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร โดยถ้าหากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี จะมีปริมาณของโดปาโครมที่เกิดขึ้นน้อย สังเกตได้จากความเข้มของสีแดงที่เกิดขึ้นจะมีสีแดงจาง และค่าดูดกลืนแสงต่ำ

3.2.2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

- 1) การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 10 mM

เตรียมสารละลาย A: ชั่งสาร $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 156 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DI (deionized water) 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย B: ชั่งสาร Na_2HPO_4 จำนวน 142 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย A และ B มาผสมกัน ให้ได้สารละลาย AB ที่มีค่า pH เท่ากับ 6.8

- 2) การเตรียมสารละลายสารตั้งต้น L-DOPA ความเข้มข้น 1 mM

ชั่ง L-DOPA จำนวน 0.98 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

- 3) การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส จำนวน 81.32 unit/mL

ชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนส จำนวน 0.15 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น 10 mM ปริมาณ 5 มิลลิลิตร

- 4) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 80 $\mu\text{g/mL}$

ชั่งสารตัวอย่าง และสารมาตรฐาน ละลายใน 40% dimethylsulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 80 $\mu\text{g/mL}$

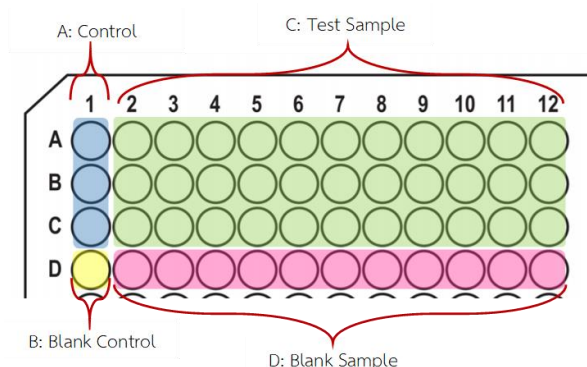
3.2.2.2 วิธีการทดสอบ

การทดสอบปฏิกิริยายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำได้โดยนำสารละลายทั้งหมดที่เตรียมไว้มาทำปฏิกิริยาในไมโครเวลเพลท 96 หลุม (96 well plate) โดยในหนึ่งไมโครเวลเพลทจะแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ดังแสดงในภาพที่ 1 ได้แก่ กลุ่ม Control (A), กลุ่ม Blank Control (B), กลุ่ม Test Sample (C) และกลุ่ม Blank Sample (D) ซึ่งในแต่ละหลุม มีปริมาณรวมเท่ากับ 200 μL นำสารละลายที่เตรียมไว้เติมลงในแต่ละหลุมเพื่อทำการทดสอบ ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

A	Control	50 μL	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM (pH 6.8)
		50 μL	สารละลาย 40% DMSO
		50 μL	สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส
B	Blank Control	100 μL	สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 10 mM (pH 6.8)



	50 μ L	สารละลาย 40% DMSO
C Test Sample	50 μ L	สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 10 mM (pH 6.8)
	50 μ L	สารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน 80 μ g/mL
	50 μ L	สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส
D Blank Sample	100 μ L	สารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 10 mM (pH 6.8)
	50 μ L	สารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน 80 μ g/mL



ภาพที่ 1 รูปแบบการแบ่งกลุ่มของการเติมสารละลายลงในไมโครเวลเพลท 96 หลุม

เมื่อผสมสารละลายที่เตรียมไว้ตามลำดับข้างต้น ลงในหลุมเรียบร้อยแล้ว ให้ทำการบ่มไมโครเวลเพลท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายสารตั้งต้น L-DOPA ความเข้มข้น 1 mM ลงในไมโครเวลเพลททุกหลุม หลุมละ 50 μ L และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ Time0 หรือ หมายถึงค่าดูดกลืนแสงก่อนการเกิดปฏิกิริยา จากนั้นนำไมโครเวลเพลทออกมาบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อรอให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้น และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้ง บันทึกค่าดูดกลืนแสงที่ Time20 หรือ หมายถึงค่าดูดกลืนแสงหลังการเกิดปฏิกิริยาแล้ว 20 นาที สุดท้ายค่าดูดกลืนแสงทั้ง 2 ช่วงเวลา จะนำมาคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตรดังแสดงต่อไปนี้

$$\text{ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = \left[\frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \right] \times 100$$

(% tyrosinase inhibitor)

- โดย
- A หมายถึง ความแตกต่างของค่าดูดกลืนแสงก่อน และหลังการเกิดปฏิกิริยา ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในกลุ่ม Control
 - B หมายถึง ความแตกต่างของค่าดูดกลืนแสงก่อน และหลังการเกิดปฏิกิริยา ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในกลุ่ม Blank Control
 - C หมายถึง ความแตกต่างของค่าดูดกลืนแสงก่อน และหลังการเกิดปฏิกิริยา ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในกลุ่ม Sample
 - D หมายถึง ความแตกต่างของค่าดูดกลืนแสงก่อน และหลังการเกิดปฏิกิริยา ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ในกลุ่ม Blank Sample



การคำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}) คำนวณโดยการสร้างกราฟ ระหว่างค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน (แกน X) ซึ่งควรจะใช้ค่าความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น จากนั้นจึงคำนวณหา IC_{50} ได้จากความสัมพันธ์ของกราฟ โดยแทนค่า $y = 50$ ในสมการเชิงเส้น

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme-based assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะของไทยด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme-based assay) ได้ทำการทดสอบในสารสกัดหยาบ 80% เอทานอลของตำรับยาอายุวัฒนะ 62 ตำรับ ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้กรดโคจิก (kojic acid) และ ปวกหาด (water extract of *Atrocarpus lakoocha* wood) เป็นสารละลายมาตรฐาน มีผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 1 จากผลการทดสอบพบว่า ตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11, 16 และ 19 แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สูงกว่าร้อยละ 70 และมีค่าสูงที่สุดเป็น 3 อันดับแรก โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 84.87 ± 0.79 , 75.32 ± 2.68 และ 78.76 ± 1.80 ตามลำดับ ในขณะที่สารละลายมาตรฐานกรดโคจิก และปวกหาด แสดงค่าร้อยละของการยับยั้ง เท่ากับ 86.77 ± 2.97 และ 95.12 ± 0.49 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะ 62 ตำรับ (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ลำดับที่	ตำรับยาอายุวัฒนะ (Sample code)	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส* (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1.	No. 1	18.39 ± 1.49
2.	No. 2	36.75 ± 1.06
3.	No. 3	15.94 ± 2.46
4.	No. 4	17.00 ± 0.47
5.	No. 5	24.42 ± 1.19
6.	No. 6	57.30 ± 1.64
7.	No. 7	31.77 ± 0.43
8.	No. 8	16.11 ± 1.68
9.	No. 9	7.05 ± 2.03
10.	No. 10	23.62 ± 3.14
11.	No. 11	84.87 ± 0.79
12.	No. 12	-5.56 ± 2.87
13.	No. 13	8.48 ± 1.75
14.	No. 14	20.57 ± 3.55
15.	No. 15	4.95 ± 0.85
16.	No. 16	75.32 ± 2.68
17.	No. 17	6.40 ± 1.20
18.	No. 18	30.77 ± 3.63



ตารางที่ 1 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะ 62 ตำรับ (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (ต่อ)

ลำดับที่	ตำรับยาอายุวัฒนะ (Sample code)	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส* (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
19.	No. 19	78.76 ± 1.80
20.	No. 20	-3.73 ± 3.68
21.	No. 22	-27.62 ± 3.70
22.	No. 24	1.90 ± 2.69
23.	No. 27	-37.34 ± 1.22
24.	No. 28	-13.5 ± 2.59
25.	No. 31	-7.60 ± 1.49
26.	No. 32	-25.86 ± 0.30
27.	No. 34	-33.32 ± 0.54
28.	No. 35	-32.28 ± 2.53
29.	No. 36	-42.65 ± 1.55
30.	No. 39	-28.90 ± 0.91
31.	No. 43	-21.35 ± 3.40
32.	No. 44	-21.69 ± 1.47
33.	No. 45	-51.68 ± 3.32
34.	No. 46	-28.28 ± 2.28
35.	No. 47	-50.28 ± 3.15
36.	No. 48	-55.75 ± 0.28
37.	No. 49	-17.33 ± 0.44
38.	No. 50	-44.81 ± 3.19
39.	No. 51	-29.49 ± 1.47
40.	No. 52	-1.29 ± 2.57
41.	No. 53	-7.14 ± 1.16
42.	No. 54	-12.11 ± 2.16
43.	No. 55	-8.23 ± 1.22
44.	No. 57	-8.66 ± 0.61
45.	No. 58	-13.86 ± 1.30
46.	No. 59	-21.95 ± 1.10
47.	No. 60	-44.47 ± 3.18
48.	No. 61	0.49 ± 2.63
49.	No. 62	-39.40 ± 0.16
50.	No. 63	-30.49 ± 0.53



ตารางที่ 1 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของตำรับยาอายุวัฒนะ 62 ตำรับ (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) (ต่อ)

ลำดับที่	ตำรับยาอายุวัฒนะ (Sample code)	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส* (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
51.	No. 64	-7.47 ± 2.53
52.	No. 65	-3.04 ± 2.36
53.	No. 66	-2.05 ± 2.91
54.	No. 67	7.01 ± 1.87
55.	No. 68	-14.2 ± 1.40
56.	No. 70	-17.51 ± 3.64
57.	No. 71	-5.71 ± 3.20
58.	No. 72	-9.90 ± 0.63
59.	No. 73	-11.19 ± 2.43
60.	No. 74	41.19 ± 1.89
61.	No. 75	-29.24 ± 2.94
62.	No. 76	-14.36 ± 0.54
Kojic acid ^P		86.77 ± 2.97
<i>Artocarpus lakoocha</i> ^P		95.12 ± 0.49

*ค่าร้อยละการยับยั้ง คือ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันอย่างอิสระ 3 ซ้ำ (n=3) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD); ^P = สารละลายมาตรฐาน (positive control)

จากนั้นจึงเลือกตำรับยาอายุวัฒนะ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สูงกว่าร้อยละ 70 ทั้ง 3 ตำรับข้างต้น มาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เท่ากับร้อยละ 50 หรือ ค่า IC₅₀ ดังแสดงในตารางที่ 2 จากผลการทดสอบพบว่า ตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 แสดงค่า IC₅₀ ที่ดีที่สุด ซึ่งเท่ากับ 9.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารละลายมาตรฐาน กรดโคจิก และปวกหาด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.08 และ 0.07 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของตำรับยาอายุวัฒนะ ที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ≥ ร้อยละ 70

ลำดับที่	ตำรับยาอายุวัฒนะ (Sample code)	ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส* (ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1.	No. 11	84.87 ± 0.79	9.98
2.	No. 16	75.32 ± 2.68	18.37
3.	No. 19	78.76 ± 1.80	15.62
Kojic acid ^P		86.77 ± 2.97	3.08
<i>Artocarpus lakoocha</i> ^P		95.12 ± 0.49	0.07

*ค่าร้อยละการยับยั้ง คือ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันอย่างอิสระ 3 ซ้ำ (n=3) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD); ^P = สารละลายมาตรฐาน (positive control)



4.2 การอภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธีการทางเอนไซม์ของตำรับยาอายุวัฒนะทั้ง 62 ตำรับ พบว่า ตำรับยาอายุวัฒนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ตำรับยาหมายเลข 11, 16 และ 19 จากผลการทดสอบดังกล่าวคาดการณ์ได้ว่าอาจสอดคล้องกับปริมาณของชะเอมเทศ ซึ่งเป็นส่วนประกอบพืชสมุนไพรเพียงชนิดเดียวที่มีเหมือนกันในตำรับยาทั้ง 3 ตำรับ โดยตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 มีอัตราส่วนของชะเอมเทศเป็นส่วนประกอบในตำรับมากที่สุด รองลงมาได้แก่ตำรับยาหมายเลข 16 และ 19 ซึ่งมีอัตราส่วนของชะเอมเทศที่ใกล้เคียงกันตามลำดับ ส่งผลให้ตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ชะเอมเทศ หรือที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycyrrhiza glabra* มีรายงานการศึกษาอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดี ทั้งในรูปแบบของสารสกัด และสารบริสุทธิ์ (Nerya et al., 2003; Damle, 2014; Pastorino et al., 2018) โดยสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่พบได้ในชะเอมเทศ ได้แก่ glabridin, glabrene, licochalcone A, isoliquiritigenin, isoliquiritin, และ liquiritin ซึ่งส่วนใหญ่จัดเป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Pastorino et al., 2018)

5. สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเบื้องต้นของตำรับยาอายุวัฒนะทั้ง 62 ตำรับ พบว่า สารสกัดหยาบ 80% เอทานอลของตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11, 16 และ 19 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงถึงร้อยละ 84.87 ± 0.79 , 75.32 ± 2.68 และ 78.76 ± 1.80 ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดหยาบ 80% เอทานอลของตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 ยังแสดงค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50 หรือ ค่า IC_{50} เท่ากับ 9.98 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าการยับยั้งที่ดีที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่แสดงค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เท่ากับร้อยละ 86.77 ± 2.97 และ ค่า IC_{50} เท่ากับ 3.08 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นสารสกัดจากตำรับยาอายุวัฒนะของไทยหมายเลข 11 จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นแหล่งของสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากธรรมชาติแหล่งใหม่ และสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต อาจมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสมุนไพรเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบในตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 เพื่อระบุและหาปริมาณของสารออกฤทธิ์หลัก ตลอดจนทำการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุดในตำรับต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาเรื่องความเป็นพิษ และความคงตัวของสารสกัด หรือสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตำรับยาอายุวัฒนะหมายเลข 11 มีความจำเป็นอย่างมากสำหรับการพัฒนาสารสกัด หรือสารบริสุทธิ์เหล่านี้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว หรือเครื่องสำอางได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัย ตลอดจนสามารถใช้ทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่มีราคาแพงได้อีกด้วย

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับสถานที่ปฏิบัติงาน อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ตลอดจนสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ และขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิธานพันธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย และโครงการสู่ความเป็นเลิศสาขาวิชาเภสัชศาสตร์ ตลอดจนทุนสนับสนุนงานวิจัยแบบมุ่งเป้า กองทุนคณะเภสัชศาสตร์ ปี 2564 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

ชมพร ไชยล้อม. (2554). *ประมวลตำรับยาไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ศรีปัญญา.



- ดำรงธรรม. (2556). ยาอายุวัฒนะ (ยาอายุยืน). *ประมวลยอดตำรา ยาสมุนไพร ตำรับเก่าดั้งเดิม หลวงปู่ศุข วัดปากคลองมะขามเฒ่า* (หน้า 315-317). กรุงเทพฯ: ไทยควอลิตี้บุ๊คส์.
- ธีรวัฒน์ สุดขาว. (2556). *ค้นความหนุ่มสาวด้วยยาอายุวัฒนะ*. เข้าถึงเมื่อ 8 มกราคม 2563 จาก <https://www.ttmed.psu.ac.th/th/blog/109>
- พระธรรมวโรดม (บุญมา คุณสมปโน). (2537). *ตำรายากลางบ้าน (มีสรรพคุณชะงัด)* (พิมพ์ครั้งที่ 110). กรุงเทพฯ: ม.ป.ท.
- เพ็ญศรี เนื่องสิกขาเพียร. (2545). ยาอายุวัฒนะ. *วารสารไทยเภสัชชนิพนธ์*, 1(1), 44-56.
- มูลนิธิสถาบันวิจัยและพัฒนาผู้สูงอายุไทย. (2564). *สถานการณ์ผู้สูงอายุไทย พ.ศ. 2563*. นครปฐม: สถาบันวิจัยประชากร และสังคม มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ส.ธรรมภักดี. (2539). *ตำรายาสมุนไพร หลวงปู่ศุข วัดมะขามเฒ่า หลวงปู่พันอาจาโร และคณาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ลูก ส.ธรรมภักดี.
- สำนักพิมพ์พิมพ์อักษร. (2556). *ตำรายาสมุนไพรไทยโบราณ* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนัก.
- หมอนาก วิชัยดิษฐ์. (2481). *ตำรายาประจำบ้าน เล่มที่ 1* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: บุญช่วยเจริญ.
- Armenta, A. M., Henkel, E. D., & Ahmed, A. M. (2019). Pigmentation disorders in the elderly. *Drugs & Aging*, 36(3), 235-245.
- Damle, M. (2014). *Glycyrrhiza glabra* (Licorice)-a potent medicinal herb. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(2), 132-136.
- Dej-adisai, S., Parndaeng, K., Wattanapiromsakul, C., Nuankaew, W., & Kang, T. H. (2019). Effects of selected Moraceae plants on tyrosinase enzyme and melanin content. *Pharmacognosy Magazine*, 15(65), 708-714.
- Iida, K., Hase, K., Shimomura, K., Sudo, S., Kadota, S., & Namba, T. (1995). Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. *Planta Medica*, 61, 425-428.
- Masamoto, Y., Iida, S., & Kubo, M. (1980). Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plant. *Planta Medica*, 40, 361-365.
- Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K., & Itokawa, H. (1994). Pseudostellalin A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla*. *Tetrahedron*, 50, 6797-6804.
- Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R., & Tamir, S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1201-1207.
- Pandya, A. G., & Guevara, I. L. (2000). Disorders of hyperpigmentation. *Dermatologic Clinics*, 18(1), 91-98.
- Pastorino, G., Cornara, L., Soares, S., Rodrigues, F., & Oliveira, M.B.P. (2018). Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2323-2339.
- Pillaiyar, T., Manickam, M., & Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403-425.
- Singh, S. (2017). *Common skin problems in the elderly*. Retrieved May 24, 2020, from <https://www.gmjournals.co.uk/common-skin-problems-in-the-elderly>



ฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันของสารสกัดเสาวรสต่อเซลล์แอดิพไซต์

Anti-adipogenesis effect of passion fruit extract on 3T3-L1 adipocytes

สุกัญญา ชูสงดาม¹, จิระภา พันธรัตน์¹, ศุภิตา ธนะเศวตร², เพ็ญนภา ชลปฐมพิกุลเลิศ³ และ วนิดา สุขเกษศิริ^{1*}

Sukanya Chusongdam¹, Jirapa Puntarut¹, Supita Tanasawet², Pennapa Chonpathompikunlert³, and Wanida Sukketsiri^{1*}

¹หลักสูตรเภสัชวิทยา สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

²หลักสูตรกายวิภาคศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

³ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี

¹Pharmacology Program, Division of Health and Applied Sciences, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla

²Anatomy Program, Division of Health and Applied Sciences, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla

³Expert Centre of Innovative Health Food. (InnoFood), Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: wanida.su@psu.ac.th

บทคัดย่อ

โรคอ้วนมักมีการสะสมของไขมันเพิ่มขึ้นและเก็บสะสมไว้ในเซลล์ไขมันของร่างกาย ทำให้จำนวนเซลล์ไขมันและขนาดของเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ adipogenesis ทำให้ได้เซลล์ไขมันที่โตเต็มที่ที่มีเม็ดไขมันขนาดใหญ่สะสมในไซโตพลาสซึม เนื้อเยื่อเสาวรสปะกอบด้วยสารในกลุ่ม phenolic, alkaloid, flavonoid และ carotenoids ส่วนเมล็ดเสาวรสมีองค์ประกอบของ phenolic เช่น piceatannol และ resveratrol เป็นหลัก การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเนื้อเสาวรสด้วยน้ำ และสารสกัดเมล็ดเสาวรสด้วยเอทานอล ในการยับยั้งการเกิด adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 โดยศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดทั้งสองชนิดด้วยวิธีเอ็ม ที ที และศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดทั้งสองต่อการสะสมไขมันในเซลล์แอดิพไซต์ 3T3-L1 ด้วยวิธีการย้อม oil red O ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเนื้อเสาวรสด้วยน้ำ และสารสกัดเมล็ดเสาวรสด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ สารสกัดเนื้อเสาวรสด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์แอดิพไซต์ ในขณะที่สารสกัดเมล็ดเสาวรสด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์แอดิพไซต์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 12 วัน จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดเมล็ดเสาวรสมีผลลดการสะสมไขมันผ่านการยับยั้งกระบวนการ adipogenesis

คำสำคัญ: การสะสมไขมัน เซลล์ไขมัน เนื้อเสาวรส เมล็ดเสาวรส โรคอ้วน

Abstract

Obesity is characterized by an excessive accumulation of lipids and storage in adipose tissue. Expansion of adipocyte cells and increasing the cell number known as adipogenesis lead to the collection of large lipid droplets in the cytoplasm of mature adipocytes. Passion fruit pulp mainly consists of phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, and carotenoids, whereas passion fruit seeds mainly contain phenolic compounds such as piceatannol and resveratrol. Therefore, the purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of passion fruit pulp water extract and passion fruit seed ethanol extract on adipogenesis in 3T3-L1 cells. The cytotoxicity of both extracts was studied by MTT method and examined lipid accumulation by oil red O staining. We found that passion fruit pulp water extract and passion fruit seed ethanol extract at the concentrations of 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, and 500 µg/mL did not cause any cytotoxicity to 3T3-L1 cells. Furthermore, passion fruit pulp water extract at the concentrations of 10, 50, and 100 µg/mL showed no inhibitory lipid accumulation effect in adipocyte cells, while passion fruit seed ethanol extract at the concentrations of 50, and 100 µg/mL significantly inhibited lipid accumulation in adipocyte cells when the cells were



treated with both extracts for 12 days compared with the control. These results suggest that passion fruit seed ethanol extract decreased lipid accumulation through the inhibition of adipogenesis.

Keywords: Lipid accumulation, Adipose tissue, Passion fruit pulp, Passion fruit seed, Obesity

1. บทนำ

ประเทศไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุแบบเต็มขั้นในอีก 5 ปีข้างหน้า ปัญหาด้านสุขภาพจึงเป็นปัญหาลำดับต้น ๆ ที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ จากรายงานพัฒนานโยบายสุขภาพระหว่างประเทศ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับประชากรไทยกลุ่มอายุ 60 ปีขึ้นไป พบว่าโรคที่ทำให้ผู้สูงอายุสูญเสียสุขภาพ 5 อันดับแรกในผู้ชาย ได้แก่ โรคหลอดเลือดสมอง โรคหลอดเลือดหัวใจ ภาวะปอดอุดกั้นเรื้อรัง โรคเบาหวานและโรคเมตาบอลิซึม ส่วนเพศหญิง ได้แก่ โรคหลอดเลือดสมอง โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคสมองเสื่อมและโรคซึมเศร้า ตามลำดับ ซึ่งเป็นโรคในกลุ่มที่ไม่ติดต่อ (noncommunicable diseases; NCDs) นอกจากนี้ปัญหาภาวะน้ำหนักเกินและความอ้วนก็จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงทางสุขภาพที่สำคัญอันดับต้น ๆ ของประชากรโลก สร้างผลกระทบทางสุขภาพมากมาย ทั้งผลกระทบต่อสุขภาพและปัญหาเรื้อรัง เช่น โรคหลอดเลือดสมอง โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น ทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิตและลดคุณภาพชีวิตเนื่องจากเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกลุ่มที่ไม่ติดต่อ ในปัจจุบันพบว่าโรคอ้วน (obesity) มีความชุกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากในปัจจุบันมีการเข้าถึงแหล่งอาหารและเทคโนโลยีได้ง่ายซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้คนมีภาวะอ้วนเพิ่มสูงขึ้น โรคอ้วนจะมีการเพิ่มขึ้นของการสะสมไขมันและเก็บสะสมไว้ในเซลล์ไขมันของร่างกายทำให้จำนวนเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น (hyperplasia) และขนาดของเซลล์ไขมันขยาย (hypertrophy) (Atawia et al., 2019) การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ไขมันจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ adipogenesis หรือ adipocyte differentiation (Ahmad et al., 2020) มี transcription factors ที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่สำคัญ เช่น CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) เช่น C/EBP- α , - β , และ - δ และ peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) ซึ่งจะทำงานร่วมกัน ทำให้มีสัญญาณส่งไปกระตุ้น adipogenic genes อื่น ๆ เช่น ยีน fatty acid synthase (FAS), adiponectin, adipocyte-specific fatty acid binding protein (aP2), stearoyl-CoA desaturase (SCD1) และ glucose transporter 4 (GLUT-4) เป็นต้น ทำให้ได้เซลล์ไขมันที่โตเต็มที่ที่มีเม็ดไขมัน (lipid droplet) ขนาดใหญ่สะสมในไซโตพลาสซึม (Atawia et al., 2019; Chang et al., 2019)

เสาวรส หรือกะทกรกฝรั่ง (passion fruit) เป็นพืชในตระกูล *Passifloraceae* มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สีม่วง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Passiflora edulis* Sims และพันธุ์สีเหลือง มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Passiflora edulis* Flavicarpa ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ในประเทศบราซิล ปารากวัย และอาร์เจนตินา สำหรับประเทศไทยได้นำพันธุ์เสาวรสมาปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2498 พบปลูกมากในภาคเหนือ และภาคตะวันออก (อนุสรณ์ พลบุญ, 2560) โดยเนื้อเสาวรสปะกอบด้วยสารในกลุ่ม phenolic compound, alkaloid, flavonoid และ carotenoids (Dos Reis et al., 2018) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านโรคอ้วน ฤทธิ์ต้านไขมันในเลือด ฤทธิ์ต้านความดันโลหิตสูง ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อและระบบประสาท และฤทธิ์ต้านเนื้องอก ในขณะที่เมล็ดเสาวรสมีองค์ประกอบของ phenolic compound เช่น piceatannol และ resveratrol เป็นหลัก (Santos et al., 2020) พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างเช่นกัน เช่น ฤทธิ์ต้านการสร้างเมลาโท닌 ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านโรคอ้วน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์คลายหลอดเลือด ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาท และฤทธิ์ต้านไขมันในเลือดสูง จากข้อมูลข้างต้นพบว่าเสาวรสและองค์ประกอบสำคัญในเสาวรสมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านโรคอ้วน งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันของสารสกัดเสาวรสต่อเซลล์แอดิพอไซต์

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเสาวรสต่อการยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์ไขมันในเซลล์แอดิพโอไซต์ 3T3-L1

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือที่ใช้ดำเนินการวิจัย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่ต่อกับชุดถ่ายภาพ (inverted microscope; Olympus IX73, Japan) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader, Bio-tex, USA) ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator, Thermo Forma Scientific, USA) และตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood, Bioquell, UK)

สารเคมีที่ใช้ดำเนินการวิจัย ได้แก่ 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma-Aldrich, USA), dexamethasone (Sigma-Aldrich, USA), dimethyl sulfoxide (VWR chemicals, France), Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, USA), fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), insulin (Sigma-Aldrich, USA), L-glutamine (Gibco, USA), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, USA), oil red O (Sigma-Aldrich, USA), paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, USA), sodium bicarbonate (Ajax Finechem, Australia) และ trypsin EDTA 0.25% (Gibco, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สารสกัดและวิธีการเตรียมสารสกัดสำหรับการใช้ในเซลล์เพาะเลี้ยง

สารสกัดจากเสาวรสทั้ง 2 ชนิดได้รับจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญภา ชลปฐมพิกุลเลิศ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมอาหารสุขภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ก่อนนำมาทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงจะเตรียมสารสกัดเนื้อเสาวรส ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (stock solution) จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย syringe filter 0.22 µm เพื่อนำมาใช้ในการเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่จะใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

การเตรียมสารสกัดเมล็ดเสาวรสด้วยเอทานอลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ร้อยละ 10 แล้วกรองด้วย syringe filter 0.22 µm เพื่อนำมาใช้ในการเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่จะใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

3.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสาวรสต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1 ด้วยวิธี เอ็ม ที ที

เลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes เริ่มต้น 1×10^4 เซลล์ต่อหลุมใน 96 well-plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-high glucose ที่มี FBS (ร้อยละ 10), penicillin-streptomycin (ร้อยละ 1) และ L-glutamine (ร้อยละ 1) บ่มในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 คืน หลังจากครบเวลา เซลล์จะได้รับสารสกัดเนื้อเสาวรสด้วยน้ำ (passion fruit water extract; PFWE) และสารสกัดเมล็ดเสาวรสด้วยเอทานอล (passion fruit seed ethanolic extract; PFSEE) ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาละลายพิก formazan ด้วย DMSO นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

3.2.3 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดเสาวรสต่อการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันของเซลล์เพาะเลี้ยงแอดิพโอไซต์ด้วยวิธีย้อมสี oil red O



เลี้ยงเซลล์ 3T3-L1 preadipocytes เริ่มต้น 1×10^4 เซลล์ต่อหลุมใน 24 wells-plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-high glucose ที่มี FBS (ร้อยละ 10), penicillin-streptomycin (ร้อยละ 1) และ L-glutamine (ร้อยละ 1) บ่มเซลล์ในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 1 คืน แล้วชักนำให้เซลล์ 3T3-L1 กลายเป็นเซลล์ไขมันโดยเลี้ยงเซลล์ด้วย DMEM-high glucose ที่มี FBS (ร้อยละ 10), penicillin-streptomycin (ร้อยละ 1) และ L-glutamine (ร้อยละ 1) และเมื่อครบรอบของสารกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน คือ 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1- methylxanthine และ 1 μ g/mL insulin เป็นเวลา 12 วัน โดยเซลล์จะได้รับสารสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 12 วัน และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก ๆ 2 วัน เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นตรึงเซลล์ด้วย paraformaldehyde (ร้อยละ 4) เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างเซลล์ด้วย DI จำนวน 2 ครั้ง และเติม isopropanol (ร้อยละ 60) แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าเพลาเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย DI จำนวน 1 ครั้ง แล้วย้อมเซลล์ด้วยสารละลาย oil red O (ร้อยละ 0.5) เป็นเวลา 40 นาที ในที่มีดบนเครื่องเขย่าเพลาที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ด้วย DI จำนวน 5 รอบ และนำไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับที่ต่อกับกล้องถ่ายภาพ จากนั้นนำมาสกัด oil red O จากเซลล์ด้วยการใช้ isopropanol (ร้อยละ 100) และนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader

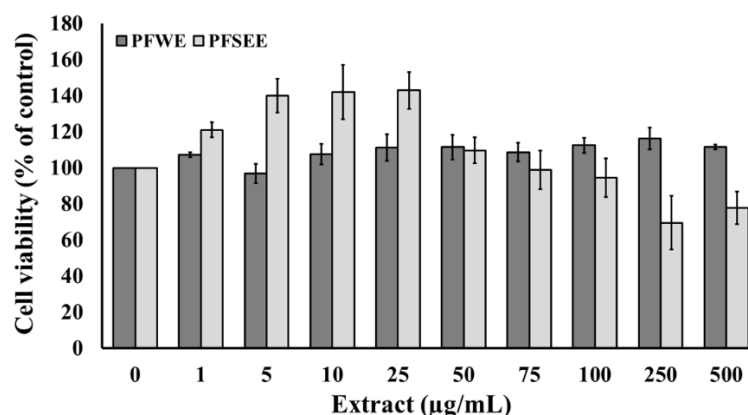
3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean: SEM) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ one-way ANOVA และ post hoc tests ด้วย tukey ซึ่งพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลความเป็นพิษของสารสกัดเนื้อเสาวรด้วยน้ำและสารสกัดเมล็ดเสาวรด้วยเอทานอลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1

การพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืช สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ ความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพราะความปลอดภัยมีความสำคัญในการพัฒนาใหม่ (Morobe et al., 2012) ระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบทางชีวภาพจะพิจารณาจากผลของสารต่อเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ในหลอดทดลอง โดยหากเซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะถือว่าเป็นสารที่เปอร์เซ็นต์ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ หากเซลล์มีชีวิตรอด 60-80 เปอร์เซ็นต์ สารนั้นจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย เซลล์มีชีวิตรอด 40-60 เปอร์เซ็นต์ จะบ่งบอกความเป็นพิษต่อเซลล์ระดับปานกลาง และเซลล์ที่มีชีวิตต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าสารนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง (López-García et al., 2014) ในการทดลองนี้พบว่า สารสกัดเนื้อเสาวรด้วยน้ำที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ทำให้เซลล์มีชีวิตรอด 107.35 ± 1.3 , 96.91 ± 5.42 , 107.44 ± 5.65 , 111.23 ± 7.28 , 111.56 ± 6.87 , 108.70 ± 5.10 , 112.42 ± 4.26 , 116.27 ± 6.16 และ 111.68 ± 1.38 ตามลำดับ เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และสารสกัดเมล็ดเสาวรด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้เซลล์มีชีวิตรอด 121.10 ± 4.26 , 139.85 ± 9.37 , 142.11 ± 14.98 , 142.89 ± 10.24 , 109.74 ± 7.21 , 98.83 ± 10.63 , 94.49 ± 10.62 , 69.53 ± 14.93 และ 89.92 ± 14.08 ตามลำดับ ที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 1) สารสกัดเสาวรทั้งสองชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงเลือกความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปใช้ในการทดลองถัดไป

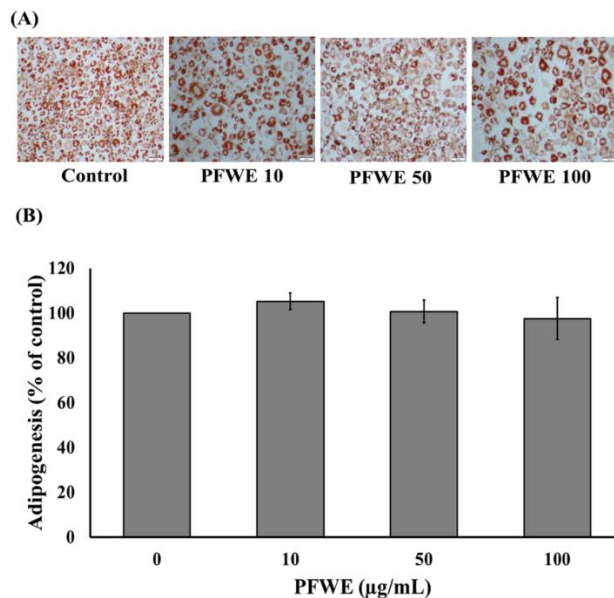


ภาพที่ 1 ความเป็นพิษของสารสกัดเนื้อเสาวรสดด้วยน้ำและสารสกัดเมล็ดเสาวรสดด้วยเอทานอลต่อเซลล์ pre-adipocyte 3T3-L1 โดยเซลล์ได้รับสารที่ความเข้มข้น 1-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (SEM) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มประเมินโดย ANOVA แบบทางเดียวตามด้วยการทดสอบ post hoc ของ turkey

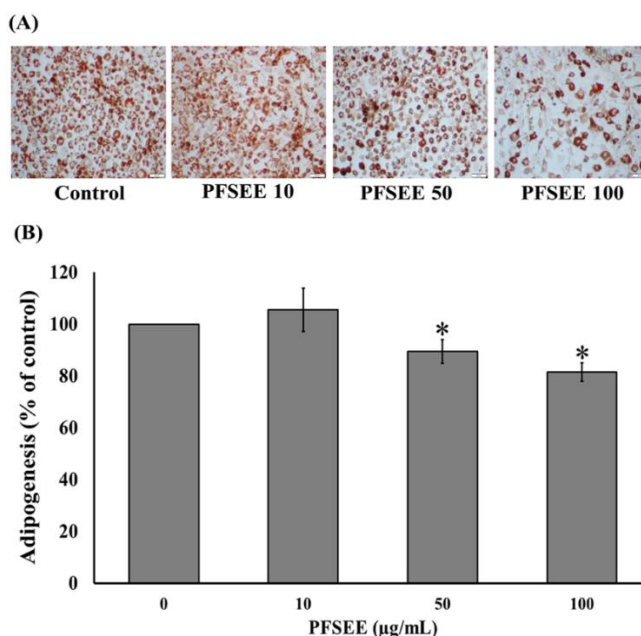
4.2 ผลของสารสกัดเนื้อเสาวรสดด้วยน้ำและสารสกัดเมล็ดเสาวรสดด้วยเอทานอลต่อการสะสมไขมันในเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1 ด้วยการย้อมสี oil red O

ในปัจจุบันพบว่าโรคอ้วนมีความชุกเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากในปัจจุบันมีการเข้าถึงแหล่งอาหารและเทคโนโลยีได้ง่ายซึ่งเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้คนมีภาวะอ้วนเพิ่มสูงขึ้น โรคอ้วนจะมีการเพิ่มขึ้นของการสะสมไขมันและเก็บสะสมไว้ในเซลล์ไขมันของร่างกายทำให้จำนวนเซลล์ไขมันและขนาดของเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น (Atawia et al., 2019) การเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์ไขมันจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ adipogenesis (Ahmad et al., 2020) จากการทดลองนี้ พบว่า สารสกัดเนื้อเสาวรสดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งการสะสมไขมัน (lipid accumulation) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันในเซลล์ 3T3-L1 ที่ได้รับสารสกัดเนื้อเสาวรสดด้วยน้ำเท่ากับ 105 ± 3.75 , 100.72 ± 5.01 และ $97.58 \pm 9.37\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ในขณะที่สารสกัดเมล็ดเสาวรสดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์แอดิพไซโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีเปอร์เซ็นต์ของการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมัน 89.55 ± 4.61 และ $81.50 \pm 3.59\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) จากการทดลองพบว่าสารสกัดจากเมล็ดเสาวรสดมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดจากเนื้อเสาวรสดในการยับยั้งการสะสมไขมันภายในเซลล์ สาร piceatannol เป็นสารในกลุ่ม polyphenolic compounds ที่พบมากในเมล็ดเสาวรสดและมีโครงสร้างคล้ายกับ resveratrol (Matsui et al., 2010) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ระบุว่าสาร piceatannol มีฤทธิ์ยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์แอดิพไซโตโดยขึ้นกับขนาดของสาร (Carpéné et al., 2018; Kwon et al., 2012; Park et al., 2021) นอกจากนี้สาร piceatannol มีผลลดระดับไขมันในเลือด ลดน้ำตาลในเลือดของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (Tung et al., 2016) โดยผ่านการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ไขมันในระยะเริ่มต้นโดยทำให้เซลล์อยู่ในระยะ G2/M ของวัฏจักรเซลล์เพิ่มขึ้น และยับยั้ง insulin receptor (IR)/insulin receptor substrate-1 (IRS-1)/Akt pathway (Kwon et al., 2012) นอกจากนี้สาร piceatannol และ resveratrol สามารถยับยั้งกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไขมันโดยยับยั้งที่ตัวควบคุมหลัก เช่น C/EBP- β , PPAR- γ และ C/EBP- α (Kwon et al., 2012) สาร resveratrol ยังยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ไขมันโดยลดการส่งสัญญาณผ่าน protein kinase B และ mitogen-activated protein kinase และยังส่งผลยับยั้งกระบวนการสร้างไขมันผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ FAS และ acetyl CoA carboxylase (ACC) ทำให้มีการสังเคราะห์กรดไขมันลดลง (Pandey et al., 2011; Gnoni & Paglialonga, 2009) จากการทดลองนี้พบว่าสาร

สกัดเมล็ดเสาวรสมิฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมไขมันได้ดีกว่าสารสกัดเนื้อเสาวรสน่าจะเกิดจากในเมล็ดเสาวรสมิสาร piceatannol ที่สูงกว่าเนื้อเสาวรส



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดเนื้อเสาวรสดำน้ำต่อการสะสมไขมันในเซลล์ 3T3-L1 โดยเซลล์ได้รับสารสกัดเนื้อเสาวรสดำน้ำที่ขนาด 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 12 วัน (A) ภาพถ่ายการยับยั้งการสะสมไขมันด้วยการย้อมสี oil red O (กำลังขยาย 20 เท่า) (B) % adipogenesis ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้รับการประเมินโดย ANOVA แบบทางเดียวตามด้วยการทดสอบ post hoc ด้วย turkey



ภาพที่ 3 ผลของสารสกัดเมล็ดเสาวรสดำน้ำต่อการสะสมไขมัน adipogenesis ในเซลล์ 3T3-L1 โดยเซลล์ได้รับสารสกัดเมล็ดเสาวรสดำน้ำที่ขนาด 10, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 12 วัน (A) ภาพถ่ายวิเคราะห์การยับยั้งการสะสมไขมันด้วยการย้อมสี oil red O (กำลังขยาย 20 เท่า) (B) % adipogenesis ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้รับการประเมินโดย ANOVA แบบทางเดียวตามด้วยการทดสอบ post hoc ด้วย turkey

* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสาร)



5. สรุปผลการวิจัย

สารสกัดเนื้อเสาวรสดด้วยน้ำและสารสกัดเมล็ดเสาวรสดด้วยเอทานอล ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 3T3-L1 นอกจากนี้ สารสกัดเมล็ดเสาวรสดที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร สามารถลดการสะสมไขมันผ่านการยับยั้งกระบวนการ adipogenesis ในขณะที่สารสกัดเนื้อเสาวรสดไม่มีผลยับยั้งการสะสมของไขมัน จึงสรุปได้ว่าเมล็ดเสาวรสดมีฤทธิ์ลดการสะสมไขมัน ผ่านการยับยั้งกระบวนการ adipogenesis ได้ดีกว่าเนื้อเสาวรสด แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดเสาวรสดในการยับยั้งกระบวนการ adipogenesis

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหลักสูตรเภสัชวิทยา หลักสูตรกายวิภาคศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

- อนุสรฯ พลบจ. (2560). การผลิตผงใยอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเสาวรสดสีม่วงและการประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารจำลองสำหรับผู้สูงอายุ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., & Wong, E. H. (2020). Molecular mechanisms of adipogenesis: the anti-adipogenic role of AMP-activated protein kinase. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(76), 1-22. doi: 10.3389/fmolb.2020.00076
- Atawia, R. T., Bunch, K. L., Toque, H. A., Caldwell, R. B., & Caldwell, R. W. (2019). Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. *Frontiers in Bioscience*, 24, 890-934.
- Carpéné, C., Pejenaute, H., del Moral, R., Boulet, N., Hijona, E., Andrade F., ... Arbones-Mainar, J. M. (2018). The dietary antioxidant piceatannol inhibits adipogenesis of human adipose mesenchymal stem cells and limits glucose transport and lipogenic activities in adipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1-14. doi: 10.3390/ijms19072081
- Chang, E., & Kim, C. Y. (2019). Natural products and obesity: a focus on the regulation of mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Molecules*, 24, 1-25. doi: 10.3390/molecules24061157
- Dos Reis, L. C. R., Pesamosca Facco, E. M., Salvador, M., Flores, S. H., & Oliveira Rios, A. (2018). Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. *Journal of Food Science and Technology*, 55(7), 2679-2691. doi: 10.1007/s13197-018-3190-2
- Gnoni, G. V., & Paglialonga, G. (2009). Resveratrol inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat hepatocytes. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(3), 211-218. doi: 10.1111/j.1365-2362.2008.02077.x
- Kwon, J. Y., Seo, S. G., Heo, Y. S., Yue, S., Cheng, J. X., Lee, K. W., & Kim, K.H. (2012). Piceatannol, natural polyphenolic stilbene, inhibits adipogenesis via modulation of mitotic clonal expansion and insulin receptor-dependent insulin signaling in early phase of differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11566-11578. doi: 10.1074/jbc.M111.259721



- López-García, J., Lehocý M., Humpolíček, P., & Sáha, P. (2014). HaCaT keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5, 43-57. doi: 10.3390/jfb5020043
- Matsui, Y., Sugiyama, K., Kamei, M., Takahashi, T., Suzuki, T., Katagata, Y., & Ito, T. (2010). Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11112–11118. doi: 10.1021/jf102650d
- Morobe, I. C., Mthethwa, N. S., Bisi-Johnson, M. A., Vasaikar, S. D., Obi, C. L., Oyedele, A. O., ... Hattori T. (2012). Cytotoxic effects and safety profiles of extracts of active medicinal plants from South Africa. *Journal of Microbiology Research*, 2(6), 176-182. doi: 10.5923/j.microbiology.20120206.04
- Mosqueda-Solís, A., Lasa, A., Gómez-Zorita, S., Eseberri, I., Picó, C., & Portillo, M. P. (2017). Screening of potential anti-adipogenic effects of phenolic compounds showing different chemical structure in 3T3-L1 preadipocytes. *Food & Function*, 8(10), 3576-3586. doi: 10.1039/C7FO00679A
- Pandey, P. R., Okuda, Hi., Watabe, M., Pai, S. K., Liu, W., Kobayashi, A., ... Watabe, K. (2011). Resveratrol suppresses growth of cancer stem-like cells by inhibiting fatty acid synthase. *Breast Cancer Research and Treatment*, 130(2), 387–398. doi: 10.1007/s10549-010-1300-6
- Park, I. S., Han, Y., Jo, H., Lee, K. W., & Song, Y. S. (2021). Piceatannol is superior to resveratrol at suppressing adipogenesis in human visceral adipose-derived stem cells. *Plants*, 10(2), 366-378. doi: 10.3390/plants10020366
- Santos, O. V., Santos Vieira, E. L., Soares, S. D., Vieira da CONCEIÇÃO, L. R., Alves do Nascimento, F. D. C., & Teixeira-Costa, B. E. (2020). Utilization of agroindustrial residue from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds as a source of fatty acids and bioactive substances. *Food Science and Technology*, 41(1), 1-8. doi: 10.1590/fst.16220
- Tung, Y. C., Lin, Y. H., Chen, H. J., Chou, S. C., Cheng, A. C., Kalyanam, N., ... Pan, M. H. (2016). Piceatannol exerts anti-obesity effects in C57BL/6 mice through modulating adipogenic proteins and gut microbiota. *Molecules*, 21(11), 1419. doi: 10.3390/molecules21111419



การเปรียบเทียบลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงที่ก่อนและหลังให้ความร้อนโดยวิธี HPLC

Comparison of chromatographic fingerprinting of LOM-KHUN-KHOB-BEUN-SUNG recipe before and after detoxification with heat using HPLC method

นภา บุญมา* และ ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา

Napa Boonma* and Prasan Tangyuenyongwatana

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: napa.b@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

อาการปวดศีรษะข้างเดียวหรือปวดไมเกรน ส่วนใหญ่มักมีอาการปวดแบบเดียวกัน ซ้ำๆ หลายครั้ง และมีระดับความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรง ทางแพทย์แผนไทย เรียกอาการของโรคดังกล่าวว่า ลมปะกังหรือลมตะกัง หมายถึง โรคชนิดหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะมาก อาจจะปวดข้างเดียวหรือสองข้างก็ได้ ตามหลักฐานการบันทึกของเส้นประธานสิบ ได้กล่าวถึงลมปะกังไว้ในเส้นอิทาและปิงลา และมีการให้แนวทางการรักษาโดยการนวดแก้อาการตามเส้นอิทาแล้วจึงวางยาตำรับ “ลมชื้นขบเบื้องสูง” ตำรับนี้มีส่วนประกอบของสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ ยอดกุ่มน้ำ ยอดตะขบ ยอดเจตมูลเพลิงแดง ดอกตี่ง ชิง กระเทียม และพริกไทย โดยมีวิธีการเตรียมโดยใส่พอเข้ากันลงในหม้อ เติมน้ำให้ท่วม บดละเอียด ผสมสุราพอกบริเวณที่ปวด งานวิจัยนี้สนใจที่จะวิเคราะห์สารสกัดของสมุนไพรเดี่ยวและสารสกัดของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงทั้งก่อนและหลังเผา พบว่ามีผลลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีการกระจายตัวจากมีขั้วน้อยไปหามาก มีสมุนไพร 2 ชนิด คือ ยอดตะขบ และพริกไทย โดยการเปลี่ยนแปลงทางสารเคมีพบได้มากในพริกไทย ส่วนสารกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่มีสารมีขั้วสูงเป็นองค์ประกอบ มีสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ยอดกุ่มน้ำ เจตมูลเพลิงแดง ดอกตี่ง ชิง และขิง พบการเปลี่ยนแปลงมากหลังเผาใน ยอดกุ่มน้ำ และดอกตี่ง เมื่อพิจารณาตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงพบว่า หลังเผา พบพืชของสารหลัก 1 พืชใช้เวลา 24.27 นาที ซึ่งเป็นสารปิเปอร์นินที่ไม่ได้สลายตัวไปเหมือนปรากฏในสมุนไพรเดี่ยว และมีพืชโดยรวมมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับก่อนเผา จากผลการทดลองที่ได้ทำให้ทราบว่าสารที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรบางชนิด ไม่ได้เป็นสารหลักหรือสารรองที่พบในสารสกัดสมุนไพรก่อนการเผา ซึ่งข้อมูลของสารหลังการเผาจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป เพื่อพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีซึ่งจะทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

คำสำคัญ: ไมเกรน ชื้นขบเบื้องสูง การเผา ลายพิมพ์โครมาโตกราฟี การสะสม

Abstract

One-sided headache or migraine is a primary headache disorder characterized by recurrent headaches that are moderate to severe. In Thai traditional medicine called the symptoms of such disease as “Lom Pakang” or “Lom Ta Kang” refers to a type of disease that causes the patient to have a lot of headaches. It may be pain on one side or both sides. According to the recording evidence of the tenth president line. The wind has been mentioned in the Itha and Pingla lines, and there is a guideline for massage the Itha line and then using “Lom-Khun-Khob-Beun-Sung” preparation. This recipe contains 7 herbs, which are *Crateva religiosa* G.Forst., *Muntingia calabura* L., *Plumbago indica* L., *Gloriosa superba* L., *Zingiber officinale* Roscoe., *Allium sativum* L., and *Piper nigrum* L. By putting each herb into the clay pot, heat to brown color, finely crushed, mixed with liquor, and mask to the painful area. This research is interested in analyzing the extract of every single herb and the whole preparation of “Lom-Khun-Khob-Beun-Sung” before and after being subjected to heat. It was found that the chromatographic fingerprinting of each single herbal extract before and after heating was different. They can be divided into 2 groups which were a group composed of low polarity to



high polarity compounds which were *M. calabura* and *P. nigrum*. The latter herb showed tremendous changes in chemical composition. The second group contained highly polar compounds and there were 5 herbs which were *C. religiosa*, *P. indica*, *G. superba*, *Z. officinale*, and *A. sativum*. Two herbs, *C. religiosa* and *G. superba* were found to be highly modified. When noticing the “Lom-Khun-Khob-Beun-Sung” after heating, one peak at 24.27 min, which was piperine that did not decompose as appeared in a single herb and showed a smaller overall peak compared to before firing. From the results, it was revealed that the active compounds in the preparation may not be the compounds that were found in each single herb before incineration. The data on the substance after heating need further study to prove the chemical structure and connect it to pharmacological activities.

Keywords: Migraine, Lom-Khun-Khob-Beun-Sung, Heating, Chromatographic fingerprinting, Detoxification

1. บทนำ

ปัจจุบันมีประชากรที่มีอาการปวดศีรษะข้างเดียวหรือปวดไมเกรนมากขึ้น ส่วนใหญ่มักมีอาการปวดแบบเดียวกัน ซ้ำๆ หลายครั้ง และมีระดับความรุนแรงระดับปานกลางถึงรุนแรง โดยทั่วไปมักจะปวดนาน 4-72 ชั่วโมงซึ่งอาจมีความรุนแรงและความถี่ต่างกันในแต่ละราย ร่วมกับอาการอื่นๆ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ตาพร่ามัว ตาสู้แสงไม่ได้ เวียนศีรษะ บางสาเหตุที่เกิดจากสภาวะอารมณ์หรือความเครียดที่ทำให้หลอดเลือดแดงบางส่วนบริเวณศีรษะเกิดการหดเกร็ง ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุของอาการไมเกรนอย่างแน่ชัด (Hall & Guyton, 2011) การรักษาทางการแพทย์ที่เหมาะสมเพื่อบรรเทาอาการปวดและอาการร่วมที่เกิดขึ้น เช่น ไข้ยากรุ่น (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, NSAID) หรือ ergotamine บางรายอาจมีอาการปวดได้บ่อยขึ้นเรื่อยๆ หรือปวดรุนแรง ทำให้ส่งผลกระทบต่อการเรียนรู้หรือการทำงาน

ทางการแพทย์แผนไทย เรียกอาการของโรคดังกล่าวว่า ลมปะกำหรือลมตะกำ หมายถึง โรคชนิดหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะมาก อาจจะปวดข้างเดียวหรือสองข้างก็ได้ บางตำราว่ามักเป็นเวลาเช้า ผู้ป่วยอาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ตาพร่า วิงเวียน อาเจียน ลมตะกำหรือสันนิบาตลมปะกำก็เรียก (พจนานุกรมศัพท์แพทย์และเภสัชกรรมแผนไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน, 2559) การรักษาทางการแพทย์แผนไทยยังมีแนวทางการรักษาได้ด้วยการนวดไทย การประคบความร้อนขึ้น การอบไอน้ำ การรับประทานตำรายาสมุนไพร การใช้ยาพอกหรือยาใช้ภายนอก เป็นต้น ทั้งนี้ตามหลักฐานการบันทึกของเส้นประธานสิบ ได้กล่าวถึงลมปะกำไว้ในเส้นอิทา และปิงคลา และมีการให้แนวทางการรักษาโดยการนวดแก้อาการตามเส้นอิทาแล้วจึงวางยา “ลมขึ้นขบเบื้องสูง” ตำรับ “ลมขึ้นขบเบื้องสูง” มีส่วนประกอบของสมุนไพร 7 ชนิด ได้แก่ กุ่มน้ำ (*Crateva religiosa* G.Forst.) ยอดตะขบ (*Muntingia calabura* L.) เจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* L.) ดอกตี่ (*Gloriosa superba* L.) ชิง (*Zingiber officinale* Roscoe) กระเทียม (*Allium sativum* L.) และพริกไทย (*Piper nigrum* L.) โดยมีวิธีการเตรียม โดยใส่พอกเข้ากันลงในหม้อ เเผาให้เกรียม บดละเอียด ผสมสุราพอกบริเวณที่ปวด (ตำรานวดไทย 1, 2552) การใช้ยาพอกสมุนไพรในรูปแบบตามวิธีโบราณด้วยวิธีการเผาให้เกรียมเป็นสิ่งที่น่าสนใจ น่าจะเข้าข่ายการสะตุยาก่อนนำมาใช้

การแปรสภาพตัวยา หรือ การสะตุ คือ การทำลายตัวยาหรือทำให้ตัวยามีฤทธิ์อ่อนลง หรือทำให้พิษของตัวยาน้อยลง หรือทำให้ตัวยานั้นสะอาดขึ้น หรือทำให้ตัวยานั้นปราศจากเชื้อโรค หรือทำให้ตัวยาที่ผ่านการสะตุผสมเข้ากันง่ายขึ้น เช่นการสะตุสารส้ม ทำโดยนำสารส้มมาบดให้ละเอียด นำมาใส่หม้อดิน เอาตั้งไฟจนสารส้มละลายฟูขาวดี แล้วยกออกจากไฟ นำมาใช้เป็นยาได้ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540; สมพร ภูติยานันต์, 2542) ทางศาสตร์การแพทย์แผนจีนก็มีการแปรสภาพตัวยาก่อนนำมาใช้เช่นกัน เช่น Aconitum เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Ranunculaceae มีมากกว่า 400 สายพันธุ์ทั่วโลก จัดเป็นพืชที่มีพิษ อย่างไรก็ตาม สมุนไพรชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในโรคหลาย ๆ โรค เช่น โรคไขข้อ ปวดข้อ บวม น้ำ กระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคหอบหืด และความผิดปกติทางนรีเวช เช่นประจำเดือนมาไม่ปกติ (Chan, Wang, & Feng, 2021) การแปรสภาพตัวยา หรือ การสะตุ ในการแพทย์แผนจีน



เรียกว่า Paozhi คือ การแปรรูปสมุนไพรดิบหรือยาที่ใช้ โดยอาจเป็นการลดความเป็นพิษ ทั้งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของยา การแปรรูปยาตัวหนึ่ง ๆ ทำได้หลายวิธี และให้ผลทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (Wang & Wang, 2021) ในกรณีของ Aconitum ชนิดที่เรียกว่า Shengchuanwu จะลดความเป็นพิษได้โดยนำรากมาแช่น้ำ แล้วต้มเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง หรือนำมานึ่ง 6-8 ชม. แล้วนำมาตากให้แห้ง

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาเบื้องต้นของการแปรรูปขององค์ประกอบสารเคมีในสารสกัดสมุนไพรเตี้ยและสารสกัดตำรับ “ลมชื้นขบเบื้องสูง” ก่อนเผาและหลังเผา โดยการวิเคราะห์หลายพิมพ์โครมาโตกราฟี (chromatographic fingerprinting) ด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเตี้ยและตำรับ “ลมชื้นขบเบื้องสูง” ก่อนเผาและหลังเผา
- 2.2 เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดตำรับ “ลมชื้นขบเบื้องสูง” ในรูปแบบครีม

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ rotary evaporator, vacuum pump, water bath, hot plate, vortex mixer, hot air oven, beaker, flask, funnel, cylinder, vial, เครื่องชั่งดิจิตอล, กระจกทรง, ถ้วยระเหย, แท่งแก้วคนสาร, ฟอยล์, หม้อดิน, เตาถ่าน, ถ่าน และเครื่อง HPLC (SHIMAZU, Japan) รุ่น LC-20A system [pump LC-20 AD, column ACE C-18 (5 μ m, 4.6 mm ID x 25 cm), detector Shimadzu UV LC-20 AD PDA, autosampler SIL-20A/C]

สารเคมี ได้แก่ 95% ethanol commercial grade, methanol (ADC Lab) และ acetonitrile HPLC (ADC Lab)

สมุนไพร ได้แก่ ยอดตะขบ ยอดกุ่มน้ำ ยอดเจตมูลเพลิงแดง ดอกตี่ง ชิง กระเทียม พริกไทย ซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสด และนำมาตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร โดย ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยีนยงวัฒนา

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 วิธีการเตรียมสารสกัดสมุนไพรเตี้ยของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

นำสมุนไพรแต่ละชนิดของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงมาเผา โดยใส่ลงในหม้อดิน เเผาให้เกรียม ใช้เวลาประมาณ 5 นาที หรือมากกว่า หลังจากหม้อร้อน ระหว่างนั้นต้องสังเกตความไหม้เกรียมพอดี นำสมุนไพรก่อนและหลังเผามาหั่นให้ละเอียด ไปชั่งน้ำหนักตามสัดส่วน ในตารางที่ 1 ใส่ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นตวงเอทานอล 95% จำนวน 150 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทใส่ลงใน flask ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ หมักทิ้งไว้ 7 วัน คนทุกวัน จากนั้นกรองสารสกัด แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดเข้มข้นใส่ขามระเหย แล้วนำไประเหยให้แห้งบน water bath ชั่งหาน้ำหนัก และหาผลผลิตร้อยละ (%yield)

3.2.2 วิธีการเตรียมสารสกัดของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

นำสมุนไพร ทั้ง 7 ของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง ไปชั่งน้ำหนักตามสัดส่วน ในตารางที่ 1 นำสมุนไพรทั้ง 7 ชนิดใส่ลงในหม้อดิน เเผาให้เกรียม ใช้เวลาประมาณ 5 นาที หรือมากกว่า หลังจากหม้อร้อน ระหว่างนั้นต้องสังเกตความไหม้เกรียมพอดี นำสมุนไพรที่ได้ก่อนและหลังเผาไปหั่นให้ละเอียด ใส่ลงใน flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร จากนั้นตวงเอทานอล 95% จำนวน 1,000 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทใส่ลงใน flask ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ หมักทิ้งไว้ 7 วัน คนทุกวัน จากนั้นกรองสารสกัด แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดเข้มข้นใส่ขามระเหย แล้วนำไประเหยให้แห้งบน water bath ชั่งหาน้ำหนัก และหาผลผลิตร้อยละ (%yield)



ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

ลำดับ	ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (กรัม)
1	ยอดกุ่มน้ำ	11.54
2	ยอดตะขบ	5.70
3	ยอดเจตมูลเพลิงแดง	6.53
4	ดองดึง	15
5	กระเทียม	15
6	ขิง	15
7	พริกไทย	15

3.2.3 การวิเคราะห์สารสกัดด้วย HPLC

1) ชั่งสารสกัดของสมุนไพรแต่ละชนิดและตำรับ อย่างละ 10 มิลลิกรัม นำมาใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เจือจางด้วย Methanol จนครบปริมาตร

2) ปิเปตสารละลายแต่ละชนิด มา 1 มิลลิลิตร นำมาใส่ลงใน vial จนครบปริมาตร จากนั้นนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 20 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้

คอลัมน์ (column): ACE C-18 (5 ไมครอน, 4.6 มม. ID x 25 ซม.)

วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase): 1% acetic acid/acetonitrile (gradient system)

อัตราการไหล (flow-rate): 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจจับ (detector): 254 นาโนเมตร

ปริมาตรที่ฉีด (injection volume): 10 ไมโครลิตร

ตารางที่ 2 HPLC Gradient system

เวลา (นาที)	1% acetic acid	acetonitrile
0	60	40
5	50	50
20	30	70
25	0	100
35	0	100

3.2.4 วิธีการเตรียมครีมจากสารสกัดตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

นำสารสกัดตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงเตรียมให้อยู่ในรูปแบบ O/W emulsion ซึ่งมีส่วนผสมดังต่อไปนี้

1) Water phase

- Water	66.8 กรัม
- 1,3-Butylene glycol	5.0 กรัม
- Carbopol Ultrez 21	0.1 กรัม
- L-Arginine	0.1 กรัม



2) Oil phase

- NIKKOMULESE 41 5.0 กรัม
- Cetosteary alcohol 3.0 กรัม
- Lexol G7 15.0 กรัม
- สารสกัดตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง 2, 5, และ 10 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดซึ่งตามปริมาณแล้วนำไปอุ่นทั้ง 2 เฟสที่ 75 องศาเซลเซียส จากนั้นเทเฟสน้ำมันลงในเฟสน้ำ แล้วปั่นโดยใช้หัว homogenizer ไปให้เข้ากันจนเนื้อครีมเหนียวขึ้น เทลงใส่ภาชนะกระปุก บันทึกการแสดงลักษณะทางกายภาพ และทางเคมีของครีม มีดังต่อไปนี้ เนื้อครีม สี กลิ่น การแยกชั้น ค่า pH การกระจายตัวและซึมเข้าผิว

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 ผลผลิตร้อยละ (%yield) ของสมุนไพรสด

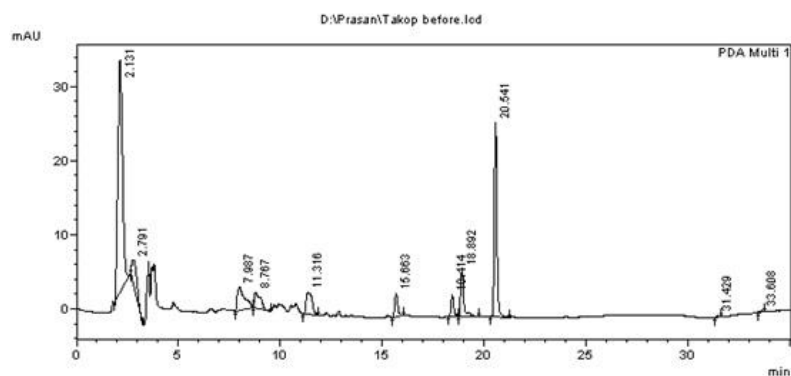
ตารางที่ 3 ผลผลิตร้อยละ (%yield) ของสมุนไพรสด

ลำดับ	ส่วนประกอบ	%yield (w/w)
1	ยอดกุ่มน้ำ	14.87
2	ยอดตะขบ	14.85
3	ยอดเจตมูลเพลิงแดง	14.63
4	ดอกตี่ง	17.13
5	กระเทียม	16.76
6	ขิง	28.21
7	พริกไทย	17.08
8	ตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง	19.77

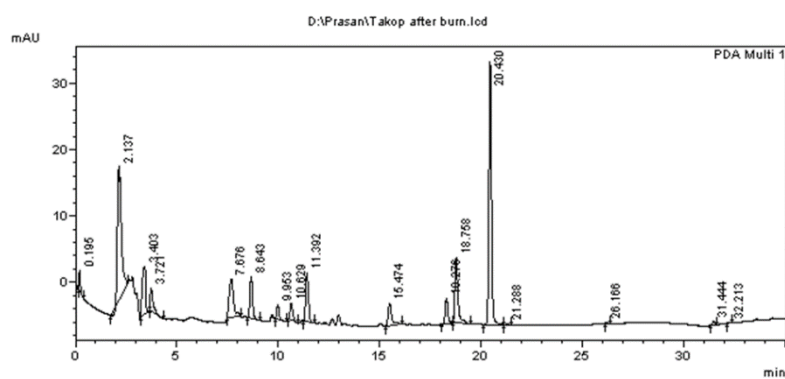
4.2 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

จากผลการทดลองวิเคราะห์สารสกัดของสมุนไพรเดี่ยวของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงทั้งก่อนและหลังเผา พบว่ามีผลลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดที่น่าสนใจ โดยจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีการกระจายตัวจากมีขั้วน้อยไปหามาก มีสมุนไพร 2 ชนิด และกลุ่มที่มีสารมีขั้วสูงเป็นองค์ประกอบ มีสมุนไพร 5 ชนิด

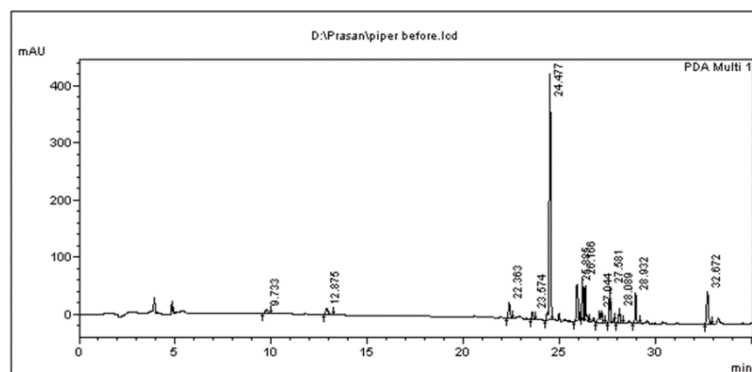
4.2.1 กลุ่มที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีการกระจายตัวจากมีขั้วน้อยไปหามาก ได้แก่ ยอดตะขบ และเมล็ดพริกไทย จากภาพที่ 1 ยอดตะขบก่อนเผาพบพิกที่เด่นมีขนาดใหญ่อยู่ 2 พิก ที่เวลา 2.13 และ 20.54 นาที และพบพิกขนาดเล็กอื่นๆกระจาย (ภาพที่ 1) หลังเผาพบพิกที่เด่นที่เวลา 2.13 มีปริมาณที่ลดลงกว่าครึ่ง และพิกที่เวลา 5.0-20.0 นาที พบว่าเป็นกลุ่มพิกที่มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งพอจะอธิบายได้ว่า องค์ประกอบของพิก ที่เวลา 2.13 ได้ถูกความร้อนเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารไปเป็นสารที่พบในช่วงเวลา 5.0-20.0 และ 20.54 นาที (ภาพที่ 2) สำหรับพริกไทยก่อนเผา พบพิกของสารหลัก 1 พิกที่เวลา 24.47 นาที และมีพิกขนาดเล็กที่มีพื้นที่ภายใต้พิกต่ำอยู่ในช่วง 3.12-6.42 % ในช่วงเวลา 22.36-30.0 นาที (ภาพที่ 3) ซึ่งพิกหลักนี้เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานปิเปอริน (ภาพที่ 5) ส่วนพริกไทยหลังเผา พบพิกของสารหลัก 1 พิกที่เวลา 13.38 นาที และมีพิกขนาดเล็กที่มีพื้นที่ภายใต้พิกต่ำอยู่ในช่วง 1.14-4.32 % ในช่วงเวลา 12.17-23.0 นาที ส่วนพิกของปิเปอรินที่ 24.47 นาที หายไป แปรเปลี่ยนเป็นพิกหลักที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น สืบเนื่องจากเวลาที่ออกมาจากคอลัมน์เร็วกว่าปิเปอรินประมาณ 10 นาที บนคอลัมน์ชนิด reverse phase C18 ที่มีความไม่มีขั้วสูง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ในการรักษาจากพริกไทยไม่ใช่สารปิเปอริน



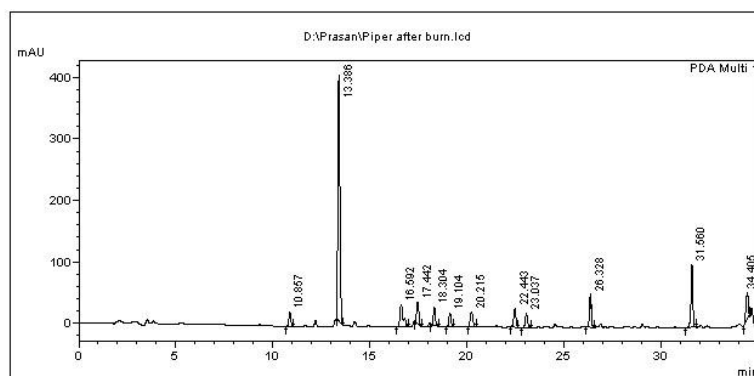
ภาพที่ 1 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของยอดตะขบก่อนเผา



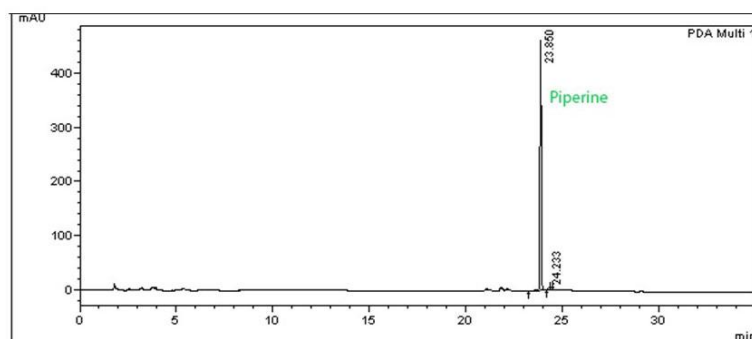
ภาพที่ 2 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของยอดตะขบหลังเผา



ภาพที่ 3 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพริกไทยก่อนเผา



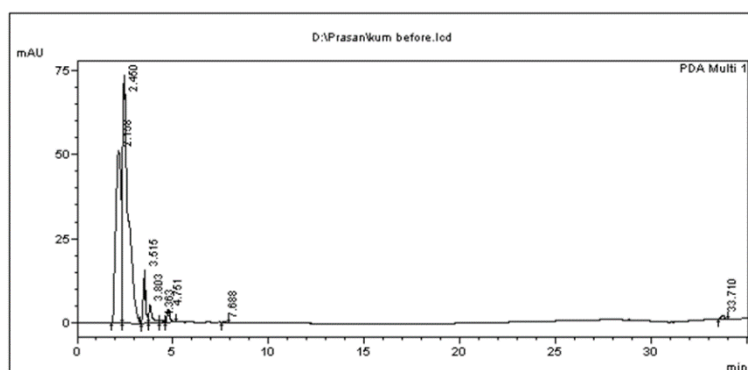
ภาพที่ 4 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพริกไทยหลังเผา



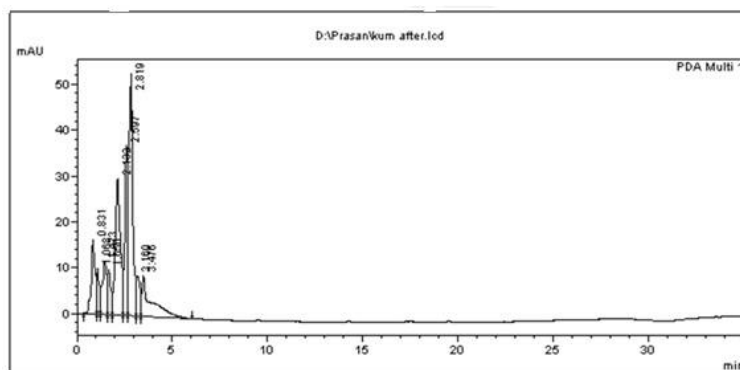
ภาพที่ 5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานปิเปอริน (piperine)

4.2.2 กลุ่มที่มีสารมีขั้วสูงเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ยอดกุ่มน้ำ ยอดเจตมูลเพลิงแดง ดอกตี่ง กระเทียม และขิง จากการทดลองพบว่าพืชสมุนไพรเหล่านี้มีสารที่มีความเป็นขั้วสูงเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ทำให้พืชของสารออกมาจากคอลัมน์เร็ว

1) ยอดกุ่มน้ำ ก่อนเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดใหญ่ 2 พืช ที่ 2.15 และ 2.45 นาที ที่มีพื้นที่ภายใต้พีกเท่ากับ 90.85% และยังพบขนาดเล็กหลายพีกในช่วงเวลา 3.51-4.75 นาที (ภาพที่ 6) หลังเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดเล็กหลายพีกที่มีพื้นที่ภายใต้พีกต่ำอยู่ในช่วง 100.0 % ในช่วงเวลา 0.8-3.47 นาที ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพริกไทยจะมีลักษณะแตกต่างจากก่อนเผา (ภาพที่ 7)

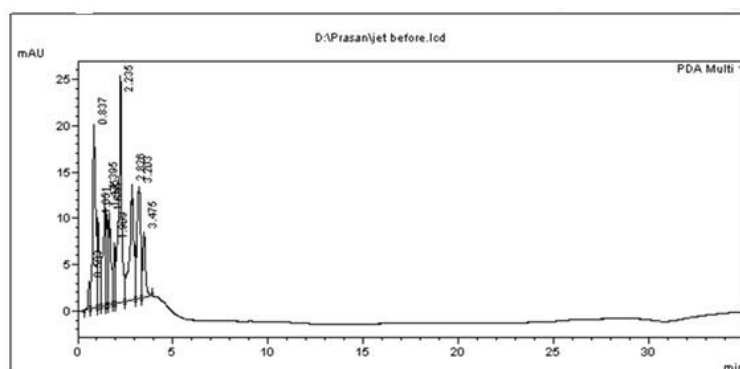


ภาพที่ 6 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟียอดกุ่มน้ำก่อนเผา

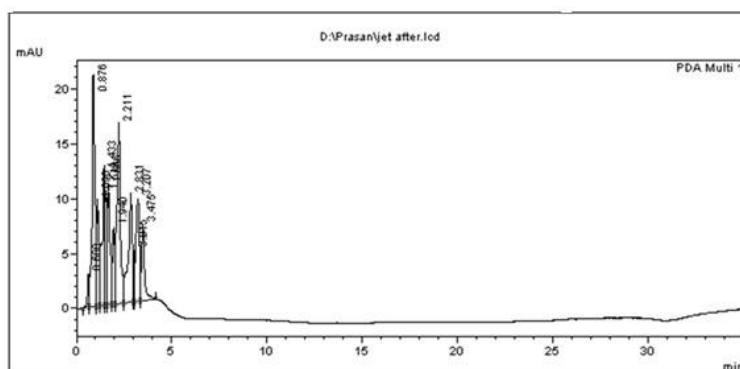


ภาพที่ 7 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟียอดกุ่มน้ำหลังเผา

2) ยอดเจตมูลเพลิงแดง ก่อนเผาพบพีคของสารเป็นพีคขนาดเล็กหลายพีคที่มีพื้นที่ภายใต้พีคต่ำอยู่ในช่วง 98.47 % ในช่วงเวลา 0.6-3.47 นาที (ภาพที่ 8) หลังเผาพบพีคของสารเป็นพีคขนาดเล็กหลายพีคที่มีพื้นที่ภายใต้พีคต่ำอยู่ในช่วง 98.82 % ในช่วงเวลา 0.6-3.47 นาที ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพีคจะมีลักษณะแตกต่างจากก่อนเผาล็กน้อย (ภาพที่ 9) ดูเหมือนเจตมูลเพลิงแดงได้รับผลกระทบจากการเผาไม่มากนัก



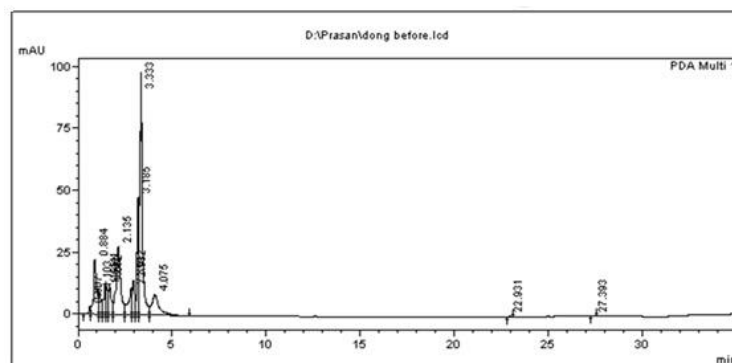
ภาพที่ 8 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของยอดเจตมูลเพลิงแดงก่อนเผา



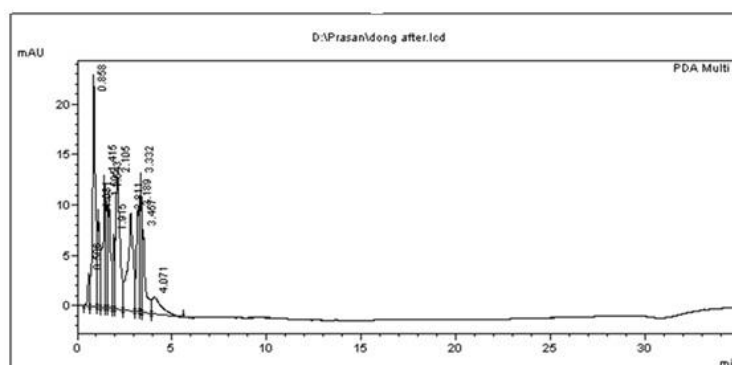
ภาพที่ 9 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของยอดเจตมูลเพลิงแดงหลังเผา



3) ดองดึง ก่อนเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดกลาง 2 พืช และพืชขนาดใหญ่ 1 พืช รวมพื้นที่ภายใต้พีคอยู่ในช่วง 97.87% ในช่วงเวลา 0.6-5.0 นาที (ภาพที่ 10) หลังเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดเล็กหลายพืชที่มีพื้นที่ภายใต้พีคต่ำในช่วงเวลา 0.6-5.0 นาที ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพืชจะมีลักษณะแตกต่างจากก่อนเผามาก (ภาพที่ 11)

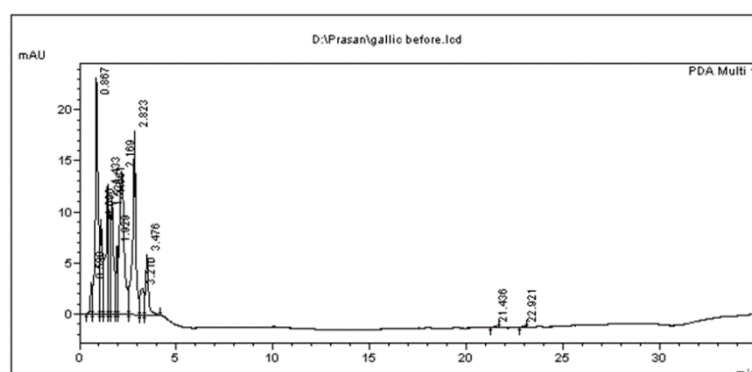


ภาพที่ 10 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของดองดึงก่อนเผา

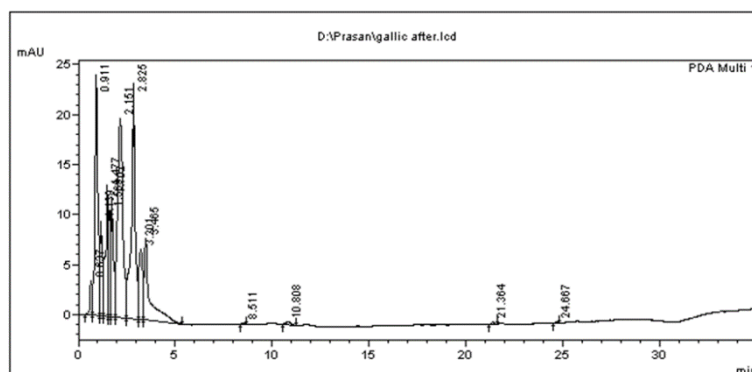


ภาพที่ 11 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของดองดึงหลังเผา

4) กระเทียม ก่อนเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดเล็กหลายพืชที่มีพื้นที่ภายใต้พีคต่ำอยู่ในช่วง 91.71 % ในช่วงเวลา 0.6-3.4 นาที (ภาพที่ 12) หลังเผาพบพืชของสารเป็นพืชขนาดเล็กหลายพืชที่มีพื้นที่ภายใต้พีคต่ำอยู่ในช่วง 93.82 % ในช่วงเวลา 0.7-5.0 นาที (ภาพที่ 13) ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพืช จะมีลักษณะแตกต่างจากก่อนเผาล็กน้อย แสดงว่าการเผาอาจไม่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบของสารทุติยภูมิของกระเทียมมากนัก

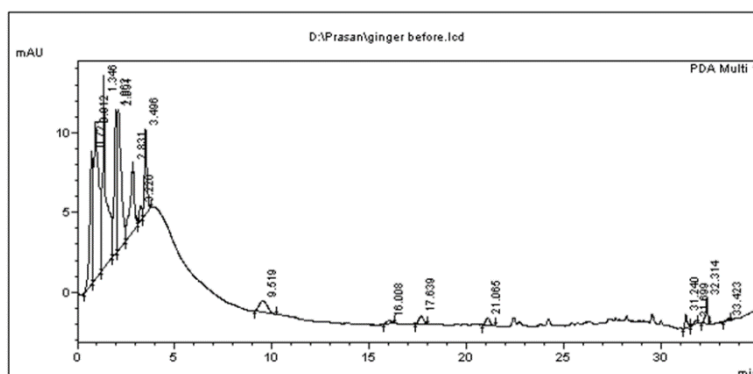


ภาพที่ 12 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของกระเทียมก่อนเผา

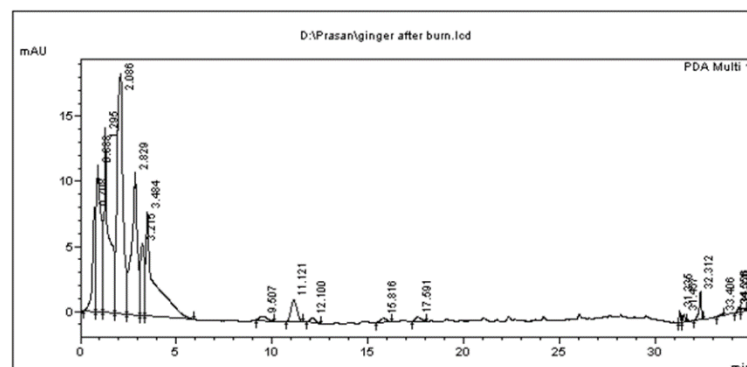


ภาพที่ 13 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของกระเทียมหลังเผา

5) จึง ก่อนเผาพบพิกของสารเป็นพิกขนาดเล็กหลายพิกอยู่ในลักษณะเนินเขาที่มีพื้นที่ภายใต้พิกต่ำอยู่ในช่วง 85.49 % ในช่วงเวลา 0.7-3.49 นาที และพบพิกย่อยขนาดเล็กที่เวลา 9.52, 16.00, 17.63, 21.06 และ 31.24 นาที (ภาพที่ 14) หลังเผาพบพิกของสารเป็นพิกมีลักษณะชัดขึ้นและเนินเขาได้หายไปซึ่งคิดเป็นพื้นที่ภายใต้พิกอยู่ในช่วง 93.81% ในช่วงเวลา 0.07-3.48 นาที (ภาพที่ 15) ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของพิก จะมีลักษณะแตกต่างจากก่อนเผา



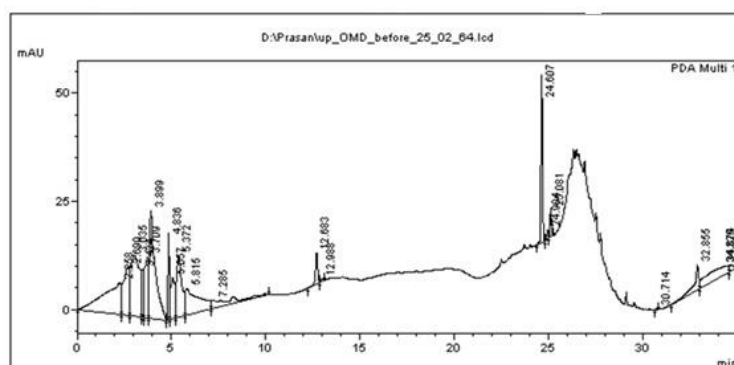
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของซิงก์ก่อนเผา



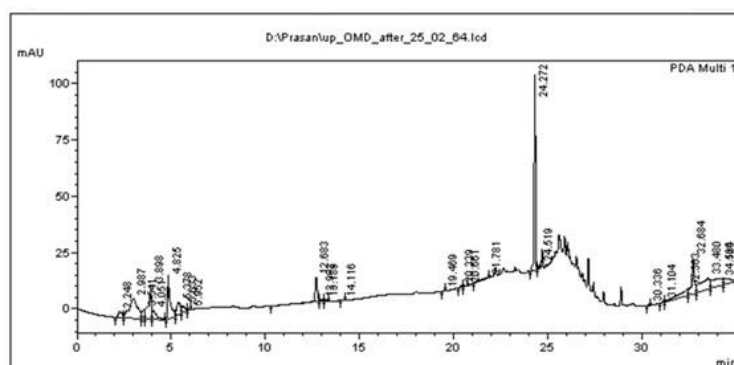
ภาพที่ 15 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟี่ของชิงหลั่งเผา



6) ตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงรวม ก่อนเผาพบพิกของสารหลัก 1 พิกที่เวลา 24.60 นาที ซึ่งก็คือสารปิเปอรินจาก เมล็ดพริกไทย และมีพิกขนาดใหญ่ที่มีพื้นที่ภายใต้พิกหลายพิกรวมกันอยู่ในช่วง 30.45% และ 18.63-43.66% ในช่วงเวลา 1.00-7.00 นาที และ 24.60-29.0 นาทีที่มีลักษณะเหมือนเนินเขา ตามลำดับ (ภาพที่ 16) หลังเผา พบพิกของสารหลัก 1 พิกที่เวลา 24.27 นาที ซึ่งเป็นสารปิเปอรินที่ไม่ได้สลายตัวไปเหมือนปรากฏในสมุนไพรเดี่ยว และมีพิกโดยรวมมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับก่อนเผา โดยมีพื้นที่ภายใต้พิกอยู่ในช่วง 16.91% และ 12.53-24.02 % ในช่วงเวลา 1.00-7.00 นาที และ 21.60-28.0 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 17) ซึ่งลักษณะของโครมาโตแกรมมีลักษณะปรากฏพิกน้อย เป็นลักษณะเนินเป็นส่วนใหญ่ ลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการหมักผสมพืชสมุนไพรหลายชนิดร่วมกัน อาจมีการทำปฏิกิริยาทำให้ได้สารที่แตกต่างออกไปจากที่พบสมุนไพรเดี่ยว และการผสมสารหลาย ๆ ชนิดเข้าด้วยกัน ประสิทธิภาพในการแยกและสภาวะในการแยกที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันเป็นพิกได้



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงก่อนเผา



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงหลังเผา

4.3 การเตรียมครีมจากสารสกัดตำรับลมชื้นขบเบื้องสูง

จากการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่า ครีมสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับลมชื้นขบเบื้องสูงที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุด สามารถใช้ได้ดีกับผิวหนัง และเมื่อวัดค่า pH มีค่าเท่ากับ 5.2 แล้ว และประเมินลักษณะทางกายภาพและทางเคมี พบว่าครีมที่เตรียมได้มีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี อยู่ในเกณฑ์ที่ดี คือเนื้อครีมมีความเนียน ละเอียดยืด สีของครีมลักษณะสีน้ำตาลอ่อนน่าใช้ มีกลิ่นสมุนไพร เนื้อครีมไม่แยกชั้น มีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงค่าของผิวหนังคน เมื่อทาหลังผิวพบว่ากระจายตัว และซึมเข้าผิวได้ดี



ตารางที่ 3 สรุปลักษณะตำรับลมชื้นขบเปื้องสูงในรูปแบบครีม

ปริมาณสารสกัด (%w/w)	เนื้อครีม	สี	กลิ่น	การแยกชั้น	ค่า pH	ความรู้สึกเมื่อทา
0.0	เนียนละเอียดหนืด	ขาวขุ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่แยกชั้น	5.6	กระจายตัวและซึมเข้าผิวได้ดี
2.0	เนียนละเอียดหนืด	น้ำตาลอ่อน	กลิ่นฉุนเล็กน้อย	ไม่แยกชั้น	6.2	กระจายตัวและซึมเข้าผิวได้ดี
5.0	เนียนละเอียดหนืด	น้ำตาลเข้ม	กลิ่นฉุนเล็กน้อย	ไม่แยกชั้น	5.2	กระจายตัวและซึมเข้าผิวได้ดี
10.0	เนียนละเอียดหนืด	น้ำตาลเข้มมาก	กลิ่นฉุนเล็กน้อย	ไม่แยกชั้น	5.7	กระจายตัวและซึมเข้าผิวได้ดี

5. สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์สารสกัดของสมุนไพรเดี่ยวของตำรับลมชื้นขบเปื้องสูงทั้งก่อนและหลังเผา พบว่ามีผลลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีการกระจายตัวจากมีขั้วน้อยไปหามาก มีสมุนไพร 2 ชนิด คือ ยอดตะขบ และพริกไทย โดยการเปลี่ยนแปลงทางสารเคมีพบได้มากในพริกไทย ในขณะที่ยอดตะขบสารส่วนใหญ่ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงในเชิงคุณภาพ แต่เปลี่ยนในเชิงปริมาณ ส่วนสารกลุ่มที่มีสารมีขั้วสูงเป็นองค์ประกอบ มีสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ยอดกุ่มน้ำ เจตมูลเพลิงแดง ดอกคิง กระเทียม และขิง พบการเปลี่ยนแปลงมากหลังเผาใน ยอดกุ่มน้ำ และดอกคิง เมื่อพิจารณาตำรับลมชื้นขบเปื้องสูงพบว่า หลังเผา พบพีคของสารหลัก 1 พีคที่เวลา 24.27 นาที ซึ่งเป็นสารปิเปอรินที่ไม่ได้สลายตัวไปเหมือนปรากฏในสมุนไพรเดี่ยว และมีพีคโดยรวมมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับก่อนเผา ซึ่งลักษณะของโครมาโตแกรมมีลักษณะปรากฏพีคน้อย เป็นลักษณะเนินเป็นส่วนใหญ่ ลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการหมักผสมพืชสมุนไพรหลายชนิดร่วมกัน ที่อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยากันของสมุนไพรในตำรับทำให้ได้สารที่แตกต่างออกไปจากที่พบสมุนไพรเดี่ยว และการผสมสารหลาย ๆ ชนิดเข้าด้วยกัน ประสิทธิภาพในการแยกและสภาวะในการแยกที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันเป็นพีคได้ สำหรับครีมสารสกัดลมชื้นขบเปื้องสูง พบว่า ครีมสูตรที่มีส่วนผสมของสารสกัดตำรับลมชื้นขบเปื้องสูงที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก มีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่สุด สามารถใช้ได้กับผิวหน้า และเมื่อวัดค่า pH มีค่าเท่ากับ 5.2

ผลการทดลองที่ได้จากการเปรียบเทียบลายพิมพ์โครมาโตกราฟีของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับ ทำให้ทราบได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรบางชนิด ไม่ได้เป็นสารหลักหรือสารรองที่พบในสารสกัดสมุนไพรก่อนการเผา ซึ่งข้อมูลของสารหลังการเผา จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป เพื่อพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีซึ่งจะทำให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทำให้เข้าใจภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทยได้ลึกซึ้งมากขึ้นโดยใช้เครื่อง HPLC ในการทดสอบสารในสมุนไพร แต่ละตัวทำในตำรับลมชื้นขบเปื้องสูง และทำออกมาในรูปแบบครีม โดยดูลักษณะ เนื้อครีม สี กลิ่น การแยกชั้นความหนืด ค่า pH

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์สารสกัด และขอขอบคุณคณาจารย์วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกที่ให้การปรึกษา คำแนะนำในการเตรียมตำรับยาให้ถูกต้องตามหลักการแพทย์แผนไทย



7. เอกสารอ้างอิง

กิตติ กิตติจารุวงศ์. (2549). ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเวชกรรม เล่มที่ 1 (พิมพ์ครั้งที่ 1). นนทบุรี: กองการประกอบโรคศิลปะ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ.

ราชบัณฑิตยสถาน. (2559). พจนานุกรมศัพท์แพทย์และเภสัชกรรมแผนไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ: พิมพ์ลักษณ์.

มูลนิธิสาธารณสุขกับการพัฒนา. (2552). ตำราการนวดเล่ม 1 (ปรับปรุงแก้ไข ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: พิมพ์ดี.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). เภสัชกรรมไทย รวมสมุนไพร (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สมพร ภูติยานันต์. (2542). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรและการแพทย์แผนไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

Chan, Y. T., Wang, N., & Feng, Y. (2021). The toxicology and detoxification of Aconitum: traditional and modern views. *Chinese Medicine*, 16(1), 61. doi: 10.1186/S13020-021-00472-9

Hall, J. E., & Guyton, A. C., (2011). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.

Wang, R., & Wang, Q., (2021). Research progress in the chemical constituents, pharmacological effects, and history of Aconiti Radix processing. *Central South Pharmacy*, 19(5), 915-920.



การพัฒนาอาหาริตติตวาทรรหนักที่เข้าใบกัญชาในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

Development of hemorrhoids and skin diseases preparation which included *Cannabis sativa* leave in microemulsion form

พรทิพย์ จิตจันทน์* และ ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา

Phonthip Chitchamnong* and Prasan Tangyuenyongwatana

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

Master of Science in Oriental Medicine Program, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: ponrtip.j@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตำรับยาอาหาริตติตวาทรรหนักและโรคผิวหนังซึ่งประกอบด้วย ขมิ้นชัน ใบกัญชา น้ำมันในเมล็ดฝ้ายในรูปแบบไมโครอิมัลชัน การเตรียมตำรับดังกล่าวในรูปแบบไมโครอิมัลชันทำโดยการใช้อิงค์ประกอบ peppermint oil, tea tree oil, Tween 20, Tween 80 และน้ำ โดยแบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม ในกลุ่ม A1-A5 ที่ใช้ตำรับดั้งเดิมผสมกับน้ำมันให้สารที่ไม่ค่อยคงตัวเมื่อทำการผสมกับน้ำเพื่อวัดขนาดอนุภาค ในขณะที่กลุ่ม B1-B5 เป็นไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดเอทานอลของตำรับ พบว่าตัวอย่างทั้งหมดให้สารไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใสสีเข้ม โดยมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 46.0 ± 5.2 ถึง 376.1 ± 16.4 นาโนเมตร และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีตอยู่ในช่วง -5.90 ± 0.92 ถึง 15.55 ± 1.76 มิลลิโวลต์ ตัวอย่างที่เด่นคือ B1 ซึ่งประกอบด้วย Tween 80, peppermint oil และน้ำ ในอัตราส่วน 6 : 3 : 1 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กเท่ากับ 46.0 ± 5.2 นาโนเมตร และมีประจุเล็กน้อย เป็นตัวอย่างที่ทาลงผิวแล้ว ซึมเข้าสู่ผิวได้เร็ว ไม่เหนียวเหนอะหนะ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.7 ± 0.1 และจากการวิเคราะห์สารสกัดใบกัญชาด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบสาร cannabidiol (CBD) ในปริมาณ $0.57 \pm 0.01\%w/w$ ที่เวลา 50.58 นาที ซึ่งเป็นปริมาณที่อยู่ในช่วงปกติ จากผลการวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันของตำรับยาอาหาริตติตวาทรรหนักและโรคผิวหนังต่อไป

คำสำคัญ: ยาอาหาริตติตวาทรรหนักและโรคผิวหนัง ใบกัญชา ไมโครอิมัลชัน

Abstract

The objective of this research was to develop a formulation for hemorrhoids and skin diseases preparation (HSDP) which consisted of turmeric, cannabis leaf, and cottonseed oil in microemulsion form. The microemulsion formulation of HSDP was prepared using a composition of peppermint oil, tea tree oil, Tween 20, Tween 80, and water. The samples were divided into two groups, in group A1-A5 using traditional formula mixed with oil and most of them provided less stable microemulsion when mixed with water to measure particle size whereas group B1-B5 used the ethanol extract of the formula showed a good microemulsion nature. A special characteristic of the B1-B5 microemulsion was a dark brown colour but transparent. The zeta potential ranged from 5.90 ± 0.92 to 15.55 ± 1.76 mV. Notable is B1, which consisted of Tween 80, Peppermint oil, and water in a 6 : 3 : 1 ratio. It gave a particle size as small as 46.0 ± 5.2 nm and has a small charge. This sample was absorbed into the skin quickly, not sticky, the pH value was 3.7 ± 0.1 . When analyzing the cannabidiol (CBD) with Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), the CBD content was in the normal range equal to $0.57 \pm 0.01\%w/w$ at 50.58 min. From the results of this research, data will be obtained for further study of microemulsion formulation of hemorrhoids and skin diseases preparation.

Keywords: Hemorrhoids and skin diseases preparation, Cannabis leaves, Microemulsion



1. บทนำ

ในปัจจุบันสมุนไพรไทยเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการรักษาเพิ่มมากขึ้น ทำให้ภาครัฐและเอกชนมีการส่งเสริมและพัฒนาตำรับยาสมุนไพรไทยให้ทันสมัย สอดคล้องกับความต้องการในการรักษา มีความสะดวกในการใช้งานเพิ่มมากขึ้น แต่ยังคงประสิทธิภาพของยาตำรับไว้ดังเดิม หลักการทางวิทยาศาสตร์ในการพัฒนาตำรับมีหลากหลายในการเลือกพัฒนาตำรับ ทำให้ปัจจุบันการพัฒนาตำรับในรูปแบบใหม่สามารถทำให้มีความจำเพาะในรูปแบบของการใช้งานที่สอดคล้องกับรักษามากขึ้น (สมภพ ประธานธรรักษ์ และคณะ, 2548)

กัญชา เป็นพืชสกุล *Cannabis* อยู่ในวงศ์ CANNABACEAE มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) สายพันธุ์ชาติวา (*Cannabis Sativa*) พบในแถบเส้นศูนย์สูตร เช่น โคลัมเบีย เม็กซิโก ตอนกลางของทวีปแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทย 2) สายพันธุ์อินดิกา (*Cannabis Indica*) พบในอินเดียและตะวันออกกลาง และ 3) สายพันธุ์รูเดราลิส (*Cannabis Ruderalis*) พบในยุโรปบริเวณตอนกลาง และตะวันออก โดยแต่ละสายพันธุ์ มีแหล่งกำเนิด ลักษณะสายพันธุ์และคุณสมบัติที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่กำเนิดในประเทศไทย เป็นสายพันธุ์ชาติวา ที่ให้ปริมาณสาร THC (delta-9-tetrahydrocannabinol) สูง และสารอีกชนิดหนึ่งคือ cannabidiol (CBD) เป็นสารออกฤทธิ์ที่แพร่หลายมากเป็นอันดับที่ 2 ในพืชตระกูลกัญชา เป็นสารที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์มากเพราะไม่มีฤทธิ์หลอนระบบประสาท (Andre et al., 2016; Kicman & Toczek, 2020) ประเทศไทยอนุญาตให้ประชาชนสามารถเข้าถึงการใช้ประโยชน์จากกัญชาทางการแพทย์ ในการรักษาโรคและการศึกษาวิจัย ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ ๗) พ.ศ. ๒๕๖๒ และประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท ๕ พ.ศ. ๒๕๖๓ ซึ่งนอกจากประโยชน์ทางการแพทย์แล้ว ยังสามารถต่อยอดทางเศรษฐกิจได้ ภายใต้กรอบและเงื่อนไขที่ถูกต้องตามกฎหมาย (กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2564)

เนื่องจากมีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข เรื่องการกำหนดตำรับยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ในยาเสพติดเพื่อการรักษาโรค หรือการศึกษาวิจัยได้ โดยมีกำหนดให้ใช้ตั้งแต่ วันที่ 14 กุมภาพันธ์ 2564 หนึ่งในตำรับดังกล่าวได้แก่ ยาตำรับทาริตสิดวงทวารหนัก และโรคผิวหนัง ที่ประกอบไปด้วย ขมิ้นชัน ใบกัญชา และน้ำมันเมล็ดฝ้าย จากตำราอายุรเวทศึกษาเล่ม 2 (ขุนนิเทศสุขกิจ, 2496) ที่เป็นหนึ่งในตำรับยาที่สามารถนำมาศึกษาวิจัยได้อย่างถูกกฎหมาย การพัฒนายาตำรับมีหลากหลายรูปแบบ โดยพัฒนาการนำสารสำคัญที่ไม่ละลายในน้ำได้ เช่น น้ำมัน อาจทำให้ไม่สามารถนำส่งตัวยาสำคัญเข้าสู่สู่อวัยวะ หรือเซลล์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นผลิตภัณฑ์ของเหลวที่มีลักษณะใสเป็นเนื้อเดียว ประกอบด้วยวัฏภาคน้ำ (water phase) และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ซึ่งทำให้เกิดเสถียรภาพโดยฟิล์มที่ผิวประจันของสารลดแรงตึงผิวหรือของผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (surfactant/cosurfactant mixture) ไมโครอิมัลชัน แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ ประเภทน้ำมันในน้ำ (oil in water) ประเภทน้ำในน้ำมัน (water in oil) และประเภทต่อเนื่องแบบคู่ (bi-continuous) ไมโครอิมัลชันเป็นที่นิยมเพื่อใช้เป็นตัวกลางในการนำส่งยาหรือสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางผิวหนัง (ณัฐธิดา ภัคพยัค, ทรงวุฒิ ยศวิมลรัตน์, และ ประภาพร บุญมี, 2554)

จากการปลดล็อกกัญชาจากสมุนไพรต้องห้าม ทำให้ผู้วิจัยเห็นถึงโอกาสของตำรับโรคจิตสิดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง ที่จะสามารถนำมาพัฒนาตำรับรูปแบบใหม่ด้วยวิธีไมโครอิมัลชัน การพัฒนาในรูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถช่วยในการทำให้สารที่จะซึมสู่ผิวของสารสำคัญผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น และการพัฒนารูปแบบไมโครอิมัลชันสามารถนำมาปรับใช้ในการรักษาโรคจิตสิดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังได้สะดวกและอยู่ในรูปแบบที่น่าใช้มากขึ้น ซึ่งอาจเป็นแนวทางการส่งเสริมการรักษาทางแพทย์แผนไทยและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น



2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อพัฒนาตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชัน
- 2.2 การศึกษาปริมาณสาร CBD โดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ขมิ้นชันสด (ร้านเวชพงศ์โอสด กรุงเทพ), ใบกัญชาสด (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร), น้ำมันเมล็ดฝ้าย (Statfold Seed Oils, UK), jojoba oil, tea tree oil (ฮงฮวด, ปทุมธานี), coconut oil, Tween 20, Tween 80 (ฮงฮวด, ปทุมธานี), water bath, กระดาษกรอง No. 1 (Whatman, USA), เครื่องชั่ง (Sartorius, Germany)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 นำขมิ้นชันสด และใบกัญชาสด นำมาผสมกันในปริมาณอย่างละ 40 กรัม คลุกให้เข้ากัน ผสมกับ ethanol 95% ปริมาณ 500 mL ในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด และหมักทิ้งไว้ 3 วัน แล้วจึงนำมากรองเอาแต่น้ำสกัด จากนั้นทำการแยกสารสกัดที่ได้โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ในอุณหภูมิ 45-48 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปแยกสารสกัดต่อบน water bath อีกครั้ง ในอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักรีดสีจะคงที่ และจึงนำเอาสารสกัดที่ได้เก็บใส่ไว้ในขวดที่มีฝาปิดมิดชิด

3.2.2 นำขมิ้นชันสด และใบกัญชาสด อย่างละ 400 กรัม มาเคี้ยวในน้ำมันเมล็ดฝ้าย 800 กรัม โดยใช้เขี่ยร่อนหม้อต้มไว้ เพื่อไม่ให้ขมิ้นชันสด และใบกัญชาสดไหม้ เคี้ยวไปเรื่อย ๆ จนสีเข้มได้ที่ แล้วจึงนำมากรองเอาแต่น้ำมัน เก็บใส่ไว้ในขวดที่มีฝาปิดมิดชิด

ตารางที่ 1 แสดงตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังจากตำราอายุรเวทศึกษา เล่ม 2 (ขุนนิเทศสุขกิจ, 2496)

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	สัดส่วน
ขมิ้นชัน	<i>Curcuma longa</i> L.	ZINGIBERACEAE	500 กรัม
ใบกัญชา	<i>Cannabis sativa</i> L.	CANNABACEAE	500 กรัม
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	<i>Gossypium herbaceum</i> L.	MALVACEAE	800 กรัม

3.2.3 การเตรียมไมโครอิมัลชันตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนัง จากการทดลองพัฒนาตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชัน (ตารางที่ 2) โดยการหาสัดส่วนของวัตถุดิบน้ำมันเตาและผสมได้แก่ pepper mint oil ผสมตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง tea tree oil ผสมตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง ในความเข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งในปริมาณน้ำหนักรีดสี สารลดแรงตึงผิว และวัตถุดิบที่เหมาะสมผ่านทางการสร้างแผนภาพสามเหลี่ยม (pseudo-ternary phase diagram) เพื่อศึกษาขอบเขตพื้นที่การเกิดไมโครอิมัลชัน ลักษณะใส และปริมาณสารลดแรงตึงผิวน้อยประเภณลักษณะทางกายภาพของตำรับ

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของตำรับยาทาโรคริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

สูตรตำรับ	สารลดแรงตึงผิว	วัตถุดิบน้ำมัน	วัตถุดิบน้ำ
1	Tween20, Tween80	Pepper mint oil	Deionized water
2	Tween20, Tween80	Tea tree oil	Deionized water
3	Tween20, Tween80	Jojoba oil	Deionized water



3.2.4 การศึกษาลักษณะทางกายภาพตำรับยาทาโรคติดเชื้อดวงตารุนแรง และโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

- 1) สังเกตลักษณะภายนอก ด้วยตาเปล่า (visual observation) ได้แก่ สี ความใส และการแยกชั้น
- 2) วัดขนาดอนุภาค (particle size) ด้วยเครื่อง Nanoplus-3 (Micrometrics Instrument Corporation, USA)
- 3) วัดค่าเป็นกรดต่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Hanna Instruments, USA)
- 4) วัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, μS) (Nicety ST-3030, China)

3.2.5 การศึกษาปริมาณสาร CBD โดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

นำสารสกัดใบกัญชามา 15 มิลลิกรัม (ซึ่งผ่านสาร anhydrous sodium sulfate เพื่อกำจัดน้ำออก) มาละลายใน 1 มิลลิลิตร ของเมทานอล (methanol) นำมาฉีดในเครื่อง GC-MS ของ Agilent Technology HP 6890 โดยมีตัวตรวจจับสัญญาณเป็น FID (flame ionization detector) นำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลมาตรฐาน

ตารางที่ 3 สภาวะของการวิเคราะห์ GC-MS

หัวข้อ	สภาวะที่ใช้
Carrier gas	Hydrogen gas
Flow	10.0 มิลลิลิตรต่อนาที
Injector temperature	250 องศาเซลเซียส
Detector	Series II triple-axis Mass detector
Detector temperature	260 องศาเซลเซียส
Column	HP-Wax (0.25 มิลลิเมตร I.D. $\times$ 30 เมตร) ชั้นฟิล์มหนา 0.25 ไมโครเมตร

ตารางที่ 4 การโปรแกรมอุณหภูมิ (temperature program)

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
0.01	60
2.00	60
55.00	220
65.00	220
65.00	30

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลอง 3 ครั้ง บันทึกเป็นค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) และคำนวณด้วยโปรแกรม Excel

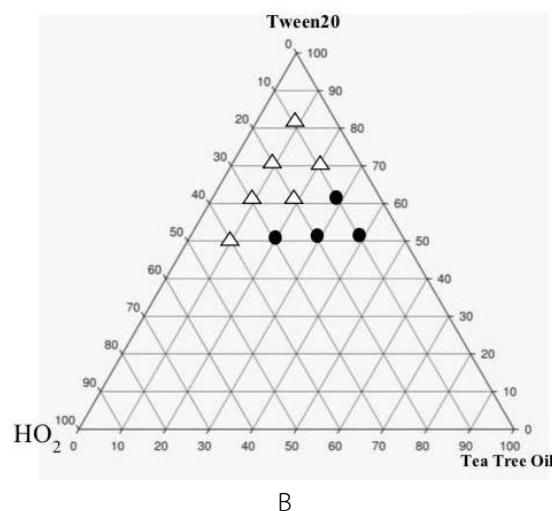
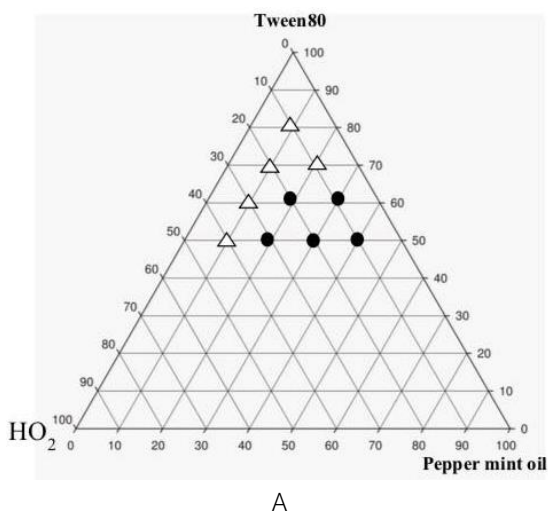
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมตำรับยาทาโรคติดเชื้อดวงตารุนแรงและโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชัน

การเตรียมตำรับยาทาโรคติดเชื้อดวงตารุนแรงและโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันโดยการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาค (ternary phase diagram) (ภาพที่ 1) ใช้ peppermint oil, tea tree oil และ jojoba oil พบว่ามีเพียง peppermint oil และ tea tree oil ที่ให้สารในรูปแบบไมโครอิมัลชัน ในขณะที่ jojoba oil ให้สารที่ขุ่นในทุกอัตราส่วน จากแผนภาพที่ 1 ผู้วิจัยได้

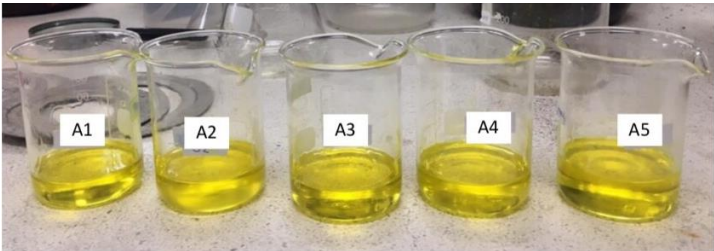


คัดเลือกอัตราส่วนที่มีสารลดแรงตึงผิวต่ำที่สุดมาผสมตำรับยาทาโรคติดเชื้อผิวหนังและโรคผิวหนังในแบบดั้งเดิมที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยการทดลองใช้วัตถุดิบน้ำมัน tea tree oil, peppermint oil และใช้ Tween 20, Tween 80 แทนด้วยสัญลักษณ์ A1-A5 (ตารางที่ 5) โดยมีอัตราที่เหมาะสมคือ 6:3:1 และ 5:4:1 (สารลดแรงตึงผิว : น้ำมัน : น้ำ) ในส่วนของ peppermint oil พบว่าขนาดของอนุภาคในขณะที่วัดไม่คงตัว โดยการผสมไมโครอิมัลชันที่ใสกับน้ำ มีผลทำให้ไมโครอิมัลชันขุ่นและขนาดอนุภาคที่ได้อยู่ในช่วง 11.46 ± 1.28 ถึง 55.78 ± 4.68 ไมโครเมตร สำหรับ tea tree oil ให้ผลที่ดีกว่าคือมีขนาดอนุภาคที่ได้อยู่ในช่วง 3.56 ± 0.28 ถึง 15.19 ± 1.55 ไมโครเมตร สำหรับ A3-A4 ส่วน A5 กลับให้ขนาดอนุภาคในระดับนาโนเมตรคือ 391.7 ± 5.3 นาโนเมตร สำหรับค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential, mV) ของ A1-A4 อยู่ในช่วง -2.72 ± 0.51 ถึง 0.51 ± 0.08 มิลลิโวลต์ แสดงให้เห็นว่าไมโครอิมัลชันมีค่าประจุรอบอนุภาคน้อย ทำให้เสถียรภาพไม่ดี เกิดการรวมตัวเป็นขนาดใหญ่ขึ้นได้ง่าย มีเพียง A5 ที่มีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเท่ากับ -50.36 ± 7.79 มิลลิโวลต์ ทำให้ยังคงสภาพของไมโครอิมัลชันได้ดี เพราะมีประจุรอบนอกอนุภาคเป็นประจุลบสูง จะผลักกับอนุภาคที่มีประจุลบสูงข้างเคียงได้ ทำให้เกิดความเสถียรของไมโครอิมัลชัน ไม่ตกตะกอนหรือรวมตัวเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ผสมตำรับยาทาโรคติดเชื้อผิวหนังและโรคผิวหนัง ตำรับที่หมักด้วยเอทานอล 95% โดยใช้วัตถุดิบน้ำมัน และใช้ สารลดแรงตึงผิวในลักษณะเดียวกัน แทนสัญลักษณ์ B1-B5 (ตารางที่ 6) พบว่าทั้งหมดให้สารไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใส สีเข้ม เนื่องจากเป็นสารสกัดเอทานอล มีผลทำให้สีของใบผสมออกมาด้วย (ภาพที่ 3) โดยมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 46.0 ± 5.2 ถึง 376.1 ± 16.4 นาโนเมตร และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าอยู่ในช่วง -5.90 ± 0.92 ถึง 15.55 ± 1.76 มิลลิโวลต์ ซึ่งเป็นค่าที่จัดอยู่ในช่วงปานกลาง ตัวอย่าง B1 ซึ่งประกอบด้วย Tween 20, peppermint oil และน้ำ ในอัตราส่วน 6 : 3 : 1 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กเท่ากับ 46.0 ± 5.2 นาโนเมตร และมีประจุเล็กน้อย เป็นตัวอย่างที่ทาแล้วผิวแล้ว สัมผัสผิวได้เร็ว ไม่เหนียวเหนอะหนะ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.7 ± 0.1 ซึ่งดีที่สุดในตัวอย่างกลุ่ม B (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามความเป็นกรดยังสูงไปบ้าง อาจทำให้เกิดการระคายเคืองเมื่อนำไปใช้ จึงต้องทำการทดลองปรับสูตร หรือปริมาณสารสกัดสมุนไพรใหม่อีกครั้ง

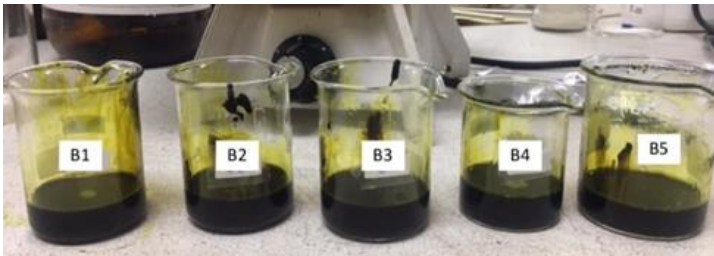


ภาพที่ 1 แสดงผลการศึกษาทำแผนภาพวิภาคไตรภาคของการเตรียมตำรับยาทาโรคติดเชื้อผิวหนังและโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันที่มี Tween 80 (A) และ Tween 20 (B) (● = ลักษณะขุ่น และ Δ = ลักษณะใส)

จากการศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของตำรับยาทาโรคติดเชื้อผิวหนัง และโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันที่คัดเลือกตำรับที่เหมาะสมจากแผนภาพวิภาคไตรภาค สังเกตลักษณะภายนอก พบว่าทั้ง 2 ตำรับคือ A1-A5 (ภาพที่ 2) และ B1-B5 (ภาพที่ 3) มีลักษณะใส สีเข้ม ไม่ขุ่น ไม่แยกชั้น ไม่เหนียว



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของตำรับ A1-A5



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของตำรับ B1-B5

ตารางที่ 5 ผลจากการวัดขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) ของตำรับดั้งเดิม

ลำดับ	น้ำมัน	สารลดแรงตึงผิว	อัตราส่วน	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)
A1	Peppermint oil	Tween 80	6 : 3 : 1	55.78 ± 4.68	-0.25 ± 0.72
A2	Peppermint oil	Tween 80	5 : 4 : 1	11.46 ± 1.28	-1.02 ± 0.10
A3	Tea tree oil	Tween 20	6 : 3 : 1	3.56 ± 0.28	0.51 ± 0.08
A4	Tea tree oil	Tween 20	6 : 2 : 2	15.19 ± 1.55	-2.72 ± 0.51
A5	Tea tree oil	Tween 20	5 : 4 : 1	391.7 ± 5.3	-50.36 ± 7.79

ตารางที่ 6 ผลจากการวัดขนาดอนุภาคและศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) ของตำรับที่หมักด้วยเอทานอล 95%

ลำดับ	น้ำมัน	สารลดแรงตึงผิว	อัตราส่วน	ขนาดอนุภาค (nm)	ศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)
B1	Peppermint oil	Tween 80	6 : 3 : 1	46.0 ± 5.2	-3.64 ± 1.65
B2	Peppermint oil	Tween 80	5 : 4 : 1	121.5 ± 2.4	-5.90 ± 0.92
B3	Tea tree oil	Tween 20	6 : 3 : 1	91.0 ± 0.6	10.41 ± 1.32
B4	Tea tree oil	Tween 20	6 : 2 : 2	376.1 ± 16.4	1.83 ± 0.08
B5	Tea tree oil	Tween 80	5 : 4 : 1	213.4 ± 4.1	15.55 ± 1.76



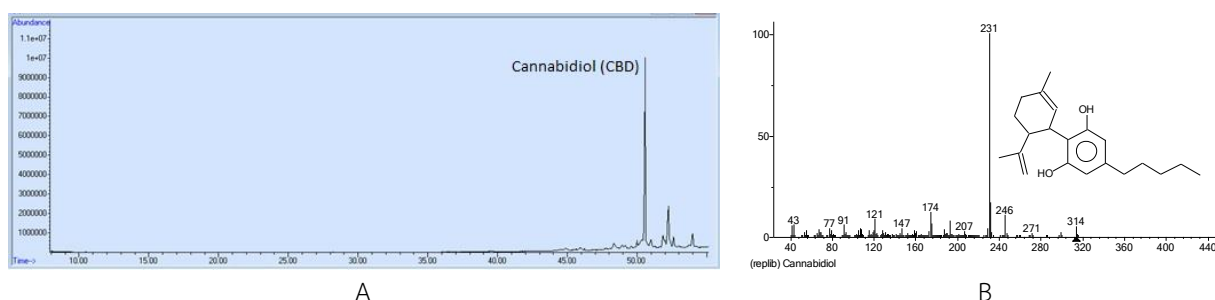
ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษาคูณลักษณะทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชัน

ตำรับ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ค่าการนำไฟฟ้า (μS/cm)
A1	4.1 ± 0.3	280 ± 10.0
A2	3.0 ± 0.1	230 ± 10.0
A3	3.3 ± 0.1	210 ± 10.0
A4	3.6 ± 0.1	160 ± 10.0
A5	3.5 ± 0.1	160 ± 10.0
B1	3.7 ± 0.1	190 ± 10.0
B2	3.0 ± 0.1	180 ± 0.0
B3	3.1 ± 0.1	260 ± 10.0
B4	3.0 ± 0.0	180 ± 0.0
B5	2.9 ± 0.1	150 ± 10.0

สำหรับค่าการนำไฟฟ้าของตำรับในตารางที่ 7 พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 150 ± 10.0 ถึง 280 ± 10.0 ไมโครซีเมนตต่อเซนติเมตร โดยค่าดังกล่าวจะเป็นค่าที่บอกสัดส่วนของปริมาณน้ำมันในไมโครอิมัลชันชนิด oil in water (o/w) ยิ่งมีสัดส่วนปริมาณน้ำมันมากเท่าใด ค่าการนำไฟฟ้าจะมีค่าน้อยลง (Growcock et al., 1994) อย่างไรก็ตามค่าการนำไฟฟ้าของตำรับอาจจะขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดของน้ำมัน อุณหภูมิขณะการวัด เป็นต้น

4.2 การศึกษาปริมาณสาร CBD โดยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

จากการวิเคราะห์สารสกัดใบกัญชาด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบสาร CBD ในปริมาณ 0.57 ± 0.01% w/w ที่เวลา 50.58 นาที (ภาพที่ 5A) เมื่อตรวจหาน้ำหนักมวลโมเลกุล และเปรียบเทียบรูปแบบการแตกตัวของโครงสร้างในแมสสเปกตรัม (ภาพที่ 5B) พบว่าตรงกับรูปแบบของสารมาตรฐาน CBD สำหรับปริมาณสาร CBD ที่พบในสารสกัดใบกัญชามีปริมาณสอดคล้องกับการรายงาน คือ 0.48 ± 0.02% w/w (Mandrioli et al., 2019)



ภาพที่ 5 GC-MS chromatogram ของสารสกัดใบกัญชา (A) และ mass spectrum ของสารที่เวลา 50.582 นาที มี $[M]^+ = 314$ ซึ่งตรงกับสาร cannabidiol (CBD) (B)

5. สรุปผลการวิจัย

การเตรียมตำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนังในรูปแบบไมโครอิมัลชันโดยใช้ peppermint oil, tea tree oil, Tween 20, Tween 80 และน้ำ ในกลุ่ม A1-A5 ที่ใช้ตำรับดั้งเดิมผสมกับวัตถุดิบไขมัน ให้สารที่ไม่ค่อยคงตัวเมื่อทำการผสม



กับน้ำเพื่อวัดขนาดอนุภาค ในขณะที่กลุ่ม B1-B5 เป็นไมโครอิมัลชันที่ใช้สารสกัดเอทานอลของตำรับ พบว่าทั้งหมดให้สารไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะใสสีเข้ม เนื่องจากสีของใบผสมออกมาด้วย โดยมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 46.0 ± 5.2 ถึง 376.1 ± 16.4 นาโนเมตร และมีค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้อยู่ในช่วง -5.90 ± 0.92 ถึง 15.55 ± 1.76 มิลลิโวลต์ ตัวอย่าง B1 ซึ่งประกอบด้วย Tween 20, peppermint oil และน้ำ ในอัตราส่วน 6 : 3 : 1 ให้ขนาดอนุภาคที่เล็กเท่ากับ 46.0 ± 5.2 นาโนเมตร และมีประจุเล็กน้อย เป็นตัวอย่างที่ทาลงผิวแล้ว ซึมเข้าสู่ผิวได้เร็ว ไม่เหนียวเหนอะหนะ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3.7 ± 0.1 และจากการวิเคราะห์สารสกัดใบกัญชาด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบสาร CBD ในปริมาณ $0.57 \pm 0.01\%$ w/w ที่เวลา 50.58 นาที ซึ่งเป็นปริมาณที่อยู่ในช่วงปกติ จากผลการวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่จะได้นำไปพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันของตำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนังต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิเคราะห์ มหาวิทยาลัยรังสิต และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

- กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2564). *คู่มือชุดความรู้สุขภาพ “กัญชาทางการแพทย์แผนไทย”* (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: ปิยอนด์ พับลิชชิง.
- ขุนนิเทศสุขกิจ. (2496). *ตำราอายุรเวทศึกษา* (พิมพ์ครั้งที่ 1). นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข.
- ณัฐธิดา ภาคพิชัย, ทรงวุฒิ ยศวิมลรัตน์, และ ประภาพร บุญมี. (2554). กรีนไมโครอิมัลชันสำหรับเครื่องสำอาง. *วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*, 6(4), 290-298.
- สมภพ ประธานธรรักษ์, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, และ ชีรเดช อุทัยวิทยารัตน์. (2548). *ศึกษาทบทวนการพัฒนามาตรการด้านวิจัยและการจัดการความรู้เพื่ออนุรักษ์ พัฒนาและคุ้มครองภูมิปัญญาไทย สุขภาพวิถีไทย*. นนทบุรี: สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข.
- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Gueriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, 19. doi: 10.3389/FPLS.2016.00019
- Growcock, F. B., Ellis, C. F., & Schmidt, D. D. (1994). Electrical stability, emulsion stability, and wettability of invert oil-based muds. *SPE Drilling and Completion*, 9(1), 39-46. doi: 10.2118/20435-PA
- Kicman, A., & Toczek, M. (2020). The effects of cannabidiol, a non-intoxicating compound of cannabis, on the cardiovascular system in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1-45. doi: 10.3390/IJMS21186740
- Mandrioli, M., Tura, M., Scotti, S., & Toschi, T. G. (2019). Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in *Cannabis sativa* L. *Molecules*, 24(11). doi: 10.3390/MOLECULES24112113



ฤทธิ์เพิ่มจำนวนเซลล์และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดที่อุดมไปด้วยเพนตะไซคลิกไตรเทอร์พีนจากบัวบก

Cell proliferation and anti-inflammatory activity of pentacyclic triterpene rich extract from *Centella asiatica*

วิลาสินี สวงนสังพงษ์^{1,2,*} และ ภาณุพงศ์ พุทธิรักษ์^{1,2}

Vilasinee Sangunsajapong^{1,2,*} and Panupong Puttaruk^{1,2}

¹สาขาวิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

²ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศยาสมุนไพรและเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา

¹Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Prince of Songkla University, Songkhla

²Phytomedicine and Pharmaceutical Biotechnology Excellence Center, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Prince of Songkla University, Songkhla

*Corresponding author, E-mail: kvilasinee_kaew@hotmail.com

บทคัดย่อ

Centella asiatica (*C. asiatica*) รู้จักกันทั่วไปในชื่อบัวบก ถูกใช้สำหรับรักษาบาดแผลมาเป็นเวลานาน ในบัญชียาหลักแห่งชาติระบุให้หาบริเวณที่มีอาการเพื่อรักษาแผล ปัจจุบันมีหลายรายงานการวิจัยแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการรักษาของบัวบก และสารออกฤทธิ์มากมาย โดยเฉพาะสารกลุ่ม pentacyclic triterpenes (asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid) ว่ามีผลทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ซึ่งสารสกัดที่อุดมไปด้วยเพนตะไซคลิกไตรเทอร์พีน (PRE) จากบัวบกที่เตรียมโดยการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ และทำให้สารสกัดบริสุทธิ์โดยใช้ Diaion® HP-20 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณ pentacyclic triterpene ในสารสกัดได้เป็น 59.60% w/w (จากการสกัดสารสกัดหยาบบนแบบเดิมมีปริมาณ pentacyclic triterpene อยู่ที่ 8.23% w/w) สาร PRE ได้แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ที่ดีโดยมีค่า IC₅₀ ที่ 20.59 ± 3.48 µg/mL ซึ่งสูงกว่าสารสกัดหยาบ *C. asiatica*, indomethacin, MS, AS และ MA แต่น้อยกว่า AA (IC₅₀ 5.07 ± 0.23 µg/mL) โดยไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ในทุกความเข้มข้น และยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (165.67%) ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL ในเซลล์ human dermal fibroblast (HDF) โดยมีคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ HDF ที่สูงกว่าทั้งสารสกัดหยาบและสารได้บริสุทธิ์ (MS, AS, MA และ AA)

คำสำคัญ: บัวบก สารสกัดที่อุดมไปด้วยเพนตะไซคลิกไตรเทอร์พีน PRE ฤทธิ์ด้านการอักเสบ การเพิ่มจำนวนเซลล์

Abstract

Centella asiatica (*C. asiatica*) commonly known as Bua-bok, has long been used for wound healing. In the Thailand National List of Essential Medicines (NLEM), *C. asiatica* is recommended for use as an oral medication to treat fever and wound healing. Nowadays, a number of publications have revealed the effectiveness of *C. asiatica* and its active constituents, especially pentacyclic triterpenes (asiaticoside, madecassoside, asiatic acid, and madecassic acid), in modulating diverse biological and pharmacological outcomes. A pentacyclic triterpene rich extract (PRE) was prepared from *C. asiatica* by microwave-assisted extraction (MAE) method. It was found that purification of the extract using Diaion® HP-20 step was capable of increasing the pentacyclic triterpene content up to be 59.60% w/w (The crude extracts contained total pentacyclic triterpene content of 8.23% w/w) The PRE showed potent anti-inflammatory activity by inhibition of nitric oxide (NO) production with an IC₅₀ value of 20.59 ± 3.48 µg/mL, the PRE was higher than those of *C. asiatica* crude extract, indomethacin, MS, AS and MA but less than AA



(IC₅₀ 5.07 ± 0.23 µg/mL) and non-cytotoxicity found with % cell viability > 80% at all concentration. The PRE also exerted a potent proliferative effect (165.67%) at concentrations of 10 µg/mL in human dermal fibroblast (HDF). The PRE from *C. asiatica* showed a higher proliferation property than crude extract and pure isolated compounds (MS, AS, MA, and AA)

Keywords: *Centella asiatica*, Pentacyclic triterpene rich extract, PRE, Anti-inflammatory, Proliferative

1. บทนำ

Centella asiatica (L.) Urban อยู่ในวงศ์ Apiaceae รู้จักกันทั่วไปในชื่อ บัวบก เป็นไม้เลื้อย มีรากอยู่ที่โคน มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย ศรีลังกา จีน อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ตลอดจนแอฟริกาใต้และมาดากัสการ์ (Orhan, 2012) มีประวัติการใช้เป็นยาอายุรเวทและยาจีนโบราณมาอย่างยาวนานหลายศตวรรษ (Orhan, 2012) โดยปกติ *C. asiatica* จะใช้ส่วนต่างๆ เกือบทั้งหมด ทั้งลำต้น ใบ พบได้ทั่วไปและใช้กันมานานในเอเชีย นิยมใช้ในการรักษาบาดแผลและอาการต่างๆบนผิวหนัง ในประเทศไทยแนะนำให้ใช้ ในการรักษาแผลไฟไหม้ มีผลข้างเคียงหรือความเป็นพิษน้อยและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ (Yasurin et al., 2016) ในบัญชียาหลักแห่งชาติระบุให้หาบริเวณที่มีอาการเพื่อรักษาแผล ปัจจุบันมีหลายรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการรักษาของบัวบก และสารออกฤทธิ์มากมาย โดยเฉพาะสารกลุ่ม pentacyclic triterpenes (asiaticoside, madecassoside, asiatic acid และ madecassic acid) ว่ามีผลทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่หลากหลาย ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากบัวบกมากมาย ได้แก่ กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Yulianti et al., 2015) ฤทธิ์การสมานแผล (Meeran et al., 2018) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Oyenih et al., 2017) ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Idris & Nadzir, 2017) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Arora et al., 2018) กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Duggina et al., 2015) ต้านมะเร็ง (Vaishali et al., 2016) และบำรุงตับ (Qi et al., 2017) เป็นต้น จากงานวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการเตรียมสารที่อุดมด้วย pentacyclic triterpene (PRE) จาก *C. asiatica* ด้วยวิธี MAE สามารถเพิ่มปริมาณ pentacyclic triterpenes ได้มากถึงสองเท่า (Puttarak & Panichayupakaranant, 2013) ดังนั้นสาร PRE ที่อุดมไปด้วยปริมาณสารออกฤทธิ์กลุ่ม pentacyclic triterpenes ที่มากขึ้น อาจจะทำให้ประสิทธิภาพในทางชีววิทยาเกี่ยวกับการรักษาของสารสกัดบัวบกมากขึ้นตามไปด้วย โดยในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผล ได้แก่ ฤทธิ์การเพิ่มจำนวนเซลล์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ อาจจะสามารถผลักดันสาร PRE ไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์การรักษาบาดแผลที่มีประสิทธิภาพในอนาคตได้

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาเพื่อศึกษาคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ของสาร PRE ที่สกัดจาก *C. asiatica*
- 2.2 เพื่อศึกษาเพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบของสาร PRE ที่สกัดจาก *C. asiatica*

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

HPLC quaternary pump (Chromaster 5000 series, Hitachi, Japan), HPLC C18 column (TSK gel ODS-100V, TOSHO Bioscience, Japan), microwave (EMM20K18GWI, Electrolux, ประเทศไทย), rotary evaporator (G3 Heidolph, Germany), spectrophotometer (GENESYS 6, Thermo Scientific, USA), UV lamp (18W) (Philips, Holland)

Ethanol analytical grade (RCI Labscan, ประเทศไทย), acetonitrile HPLC grade (Sigma Aldrich, Germany), Diaion® HP-20 (Mitsubishi, Japan), dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, USA), fetal bovine serum (Gibco, USA), thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, USA), trypsin-EDTA (Gibco, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, USA), Roswell Park Memorial Institute medium (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างพืช

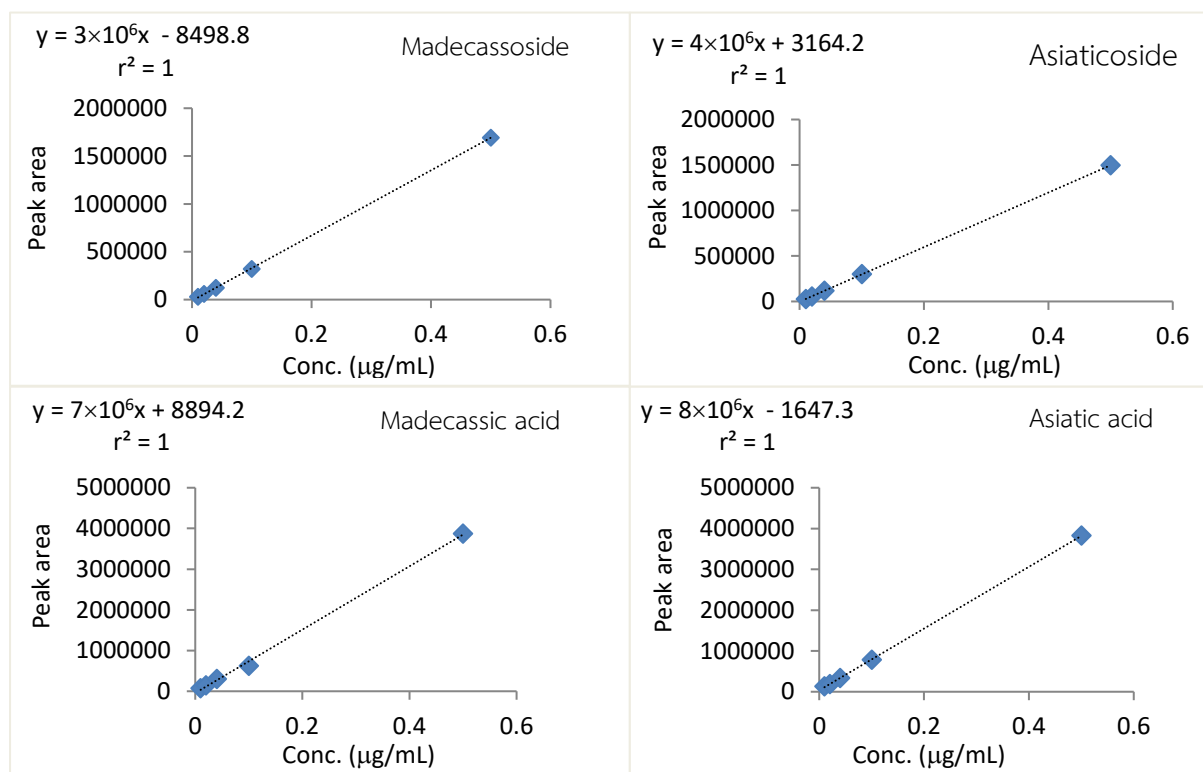
เก็บ *C. asiatica* ส่วนเหนือดิน จากจังหวัดสงขลา ตัวอย่างพืช (หมายเลขตัวอย่าง SKP 199 03 01 01) ได้รับการรับรองโดย รองศาสตราจารย์ ดร.ภก.ภานุพงศ์ พุทธิรักษ์ และได้ฝากไว้ที่หอสมุนไพรของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พืชถูกล้างและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในตู้อบลมร้อนสมุนไพร ทำให้เป็นผงโดยใช้เครื่องบดและผ่านร่อนเบอร์ 45 จากนั้นเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท

3.2.2 การเตรียมสารสกัด PRE

วิธีการเตรียม PRE ดำเนินตามรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ (Puttarak & Panichayupakaranant, 2013) โดยสังเขป ผงแห้งของ *C. asiatica* สกัดโดยใช้วิธีไมโครเวฟ (MAE) ระบบ MAE ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้สกัด ได้แก่ การสกัดด้วยเอทานอล ไมโครเวฟกำลังไฟ 600 W ที่ 75°C ทำทั้งหมดสี่รอบ นำสารสกัดที่ได้มารวมกันแล้วนำไประเหยแห้ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ละลายใน 25% เอทานอลในน้ำ กรองผ่านสำลีแล้วบรรจุลงในคอลัมน์แมโครพอร์สเรซิน (Diaion® HP-20) และชะด้วย 25% เอทานอล 50% เอทานอล และ 75% เอทานอล ตามลำดับ ส่วนที่ออกมาด้วย pentacyclic triterpenes ที่ได้รับ ถูกรวมเข้าด้วยกันและระเหยจนแห้งในสุญญากาศเพื่อให้ได้ PRE

3.2.3 การวิเคราะห์สาร PRE เติ่งปริมาณด้วยวิธี HPLC

สารสกัดหยาบ *C. asiatica* และ PRE ถูกวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC โดยการชั่งตัวอย่าง 15 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล แล้วปรับเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.5 mg/mL สารละลายที่เตรียมไว้ถูกกรองผ่านตัวกรองเมมเบรน PVDF 0.45 µm วิธี HPLC ได้ดำเนินการตามงานวิจัยที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Puttarak & Panichayupakaranant, 2012) โดยสังเขป ดำเนินการระบบ HPLC โดยใช้ TSK gel ODS-100 V (250 มม. × 4.6 มม.) ใช้ส่วนผสมระหว่าง acetonitrile และน้ำ เป็นเฟสเคลื่อนที่ (อัตราส่วน: 0-5 นาที, 20:80; 5-10 นาที, 30:70; 10-20 นาที, 65:35; 20-30 นาที, 70:30) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร วิเคราะห์สารสำคัญ pentacyclic triterpenes ที่ 210 นาโนเมตร โดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ ที่ได้จากสารมาตรฐาน madecassoside (MS), asiaticoside (AS), madecassic acid (MA) และ asiatic acid (AA) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.03-0.50 µg/mL (MS: $y = 3 \times 10^6 x - 8498.8$ $R^2 = 1$; AS: $y = 4 \times 10^6 x + 3164.2$ $R^2 = 1$; MA: $y = 7 \times 10^6 x + 8894.2$ $R^2 = 1$; AA: $y = 8 \times 10^6 x - 1647.3$ $R^2 = 1$) ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 The standard curve of pentacyclic triterpenes

3.2.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร PRE และ สกัดหยาบจาก *C. asiatica*

สารสกัดหยาบจาก *C. asiatica*, PRE และสารประกอบที่แยกได้บริสุทธิ์ (MS, AS, MA และ AA) ถูกทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation assay) และคุณสมบัติด้านการอักเสบ (anti-NO production assay) ตามที่อธิบายไว้ด้านล่าง

1) การทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี proliferation assay

ทำการทดสอบด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนเซลล์ ในเซลล์ human dermal fibroblast (HDF) (Balekar และคณะ, 2555) โดยเพาะเซลล์ HDF ใน 96 wellplate (1 × 104 เซลล์/หลุม) ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% fetal calf serum เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเพิ่มสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ สารตัวอย่างถูกละลายใน DMSO เพื่อให้ได้ ความเข้มข้น 1, 3, 10, 30 และ 100 µg/mL โดยผสมกับอาหารในแต่ละหลุม เว้นให้เซลล์ที่ไม่ใส่สารตัวอย่างเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ จากนั้นนำไปบ่มใน CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนเป็นอาหารที่มี 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 µg/mL ใน PBS) 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายออก แล้วเติม DMSO 200 µL เพื่อละลายผลึกฟอมาซาน วัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนี้

$$\% \text{ cell proliferation} = (\text{Absorbance of sample}) / (\text{Absorbance of control}) \times 100$$

2) การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการผลิต NO

ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ โดยการยับยั้งการผลิต NO จากเซลล์ murine macrophages (RAW 264.7) (ดัดแปลงวิธีจาก Banskota et al., 2003) เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน Roswell Park Memorial Institute (RPMI) ที่มี



10% fetal calf serum (FBS) บ่มใน 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหาร RPMI แล้วใส่เซลล์ลง 96 wellplate (1x10⁵ เซลล์/หลุม) นำไปบ่มเป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้น ล้างเซลล์ RAW 264.7 ด้วย PBS แล้วเติม RPMI 100 ไมโครลิตรที่มี lipopolysaccharide (LPS) เพื่อกระตุ้นการผลิต NO เตรียมตัวอย่างและกลุ่มควบคุม (standard indomethacin) โดยใช้ 1% DMSO ใน RPMI ที่ ความเข้มข้นต่างๆ (3-100 µg/mL) จากนั้นเติมตัวอย่าง 100 µL ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง แล้วใช้ Griess reagent เพื่อตรวจการสะสมของ NO ที่เซลล์ผลิต แล้ววัดโดย spectrophotometry ที่ 570 นาโนเมตร หาค่า IC₅₀ โดยใช้การกำหนดจุดของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการผลิต NO ได้ 50% (n=4)

$$\% \text{ inhibition} = (A - B) / (A - C) \times 100$$

A - C = nitrite concentration (µM)

A = LPS (+), sample (-)

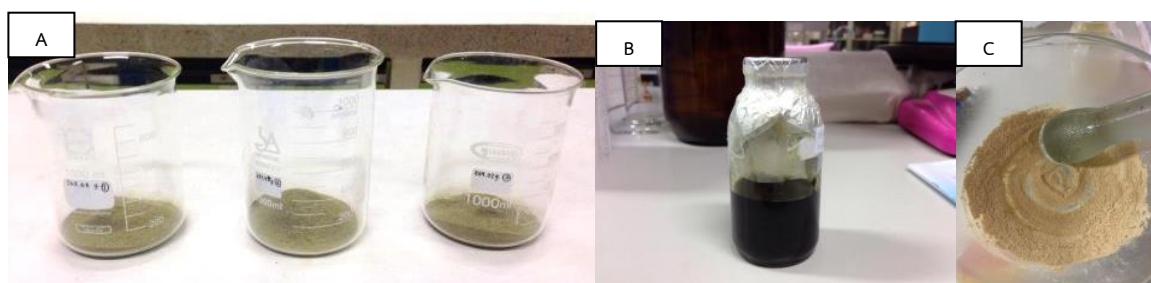
B = LPS (+), sample (+)

C = LPS (-), sample (-)

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสาร PRE (pentacyclic triterpene rich extract: PRE)

ผงแห้ง 270 กรัมของ *C. asiatica* (ภาพที่ 2A) ที่สกัดด้วยวิธี MAE ด้วยเอทานอล ได้สารสกัดหยาบ (ภาพที่ 2B) (% ผลผลิตของผง *C. asiatica* = 30.59% โดยน้ำหนัก) มีปริมาณ pentacyclic triterpene ทั้งหมด 8.23% โดยน้ำหนัก แบ่งเป็น โกลโคไซด์ 3.69% โดยน้ำหนัก และ อะไกลโคโคน 4.53% w/w จากการวิเคราะห์ HPLC ส่วนสารสกัดหยาบที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้คอลัมน์ Diaion® HP-20 ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ pentacyclic triterpene ของสารสกัด โดยใช้สารสกัดหยาบ (82.59 กรัม) ละลายในเอทานอล 25% v/v ในน้ำ หลังจากกรองผ่านสำลีแล้ว โหลด สารละลายลงในคอลัมน์ Diaion® HP-20 และชะด้วยเอทานอล 25% v/v ทำซ้ำโดยเปลี่ยนเป็นเอทานอล 50 และ 75% v/v ตามลำดับ ส่วนที่อุดมด้วย pentacyclic triterpene ถูกรวมเข้าด้วยกัน แล้วนำไประเหยแห้งออกจนได้ PRE (% yield ของสารสกัดหยาบ *C. asiatica* = 4.06% w/w) (ภาพที่ 2C) พบว่าการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Diaion® HP-20 สามารถเพิ่มปริมาณ pentacyclic triterpene ได้ถึง 59.60% w/w (ตารางที่ 4.1) และให้รูปลักษณะที่น่าพึงพอใจ (ผงสีขาวนวล) ดังนั้นสาร PRE ที่อุดมด้วย pentacyclic triterpene นี้จึงเป็นสารที่มีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 2 ผงแห้ง (A), สารสกัดหยาบ (B) และ PRE (C) จาก *C. asiatica*

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสาร pentacyclic triterpene ของ PRE และสารสกัดหยาบจาก *C. asiatica*

ตัวอย่าง	Yield (mg/g)	ปริมาณสาร pentacyclic triterpene (% w/w) (Mean $\pm$ SD)						
		MS	AS	MA	AA	Glycoside	Aglycone	Total
สารสกัด หยาบ	30.59	2.22 $\pm$ 0.04	1.47 $\pm$ 0.20	2.90 $\pm$ 0.44	1.63 $\pm$ 0.04	3.70 $\pm$ 0.20	4.53 $\pm$ 0.41	8.23 $\pm$ 0.22
PRE	1.24	13.43 $\pm$ 0.22	21.50 $\pm$ 0.48	17.94 $\pm$ 0.20	6.730 $\pm$ 0.49	34.93 $\pm$ 0.18	24.67 $\pm$ 0.69	59.60 $\pm$ 0.76

MS: madecassoside; AS: asiaticoside; MA: madecassic acid; AA: asiatic acid

4.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ PRE และสารสกัดหยาบจาก *C. asiatica*

สาร PRE และสารสกัดหยาบของ *C. asiatica* คือ ได้รับการประเมินคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation assay) และคุณสมบัติการต้านการอักเสบ (anti-NO production assay) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดตามที่อธิบายด้านล่าง

4.2.1 การเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยวิธี proliferation assay

PRE และสารสกัดหยาบของ *C. asiatica* ได้รับการประเมินคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation assay) ในเซลล์ HDF (Balekar et al., 2012) โดยวิธี MTT ผลการวิจัยพบว่า PRE มีประสิทธิภาพ ในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากที่สุด (165.67%) ที่ความเข้มข้น 10 μ g/mL และมีระดับได้น้อยลงเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น ที่ 30 และ 100 μ g/mL (148.51 $\pm$ 1.96% และ 117.80 $\pm$ 1.16%) ตามลำดับ แต่ก็ไม่ได้แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ในทุกความเข้มข้น ทั้งนี้สาร PRE แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนที่สูงกว่าสารสกัดหยาบเนื่องจากมีปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ที่มากกว่าถึง 7 เท่า และยิ่งสูงกว่าบริสุทธิ์ (MS, AS, MA และ AA) อีกด้วย การค้นพบของเราสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความซับซ้อนทางเคมีของสารสกัดที่มีข้อได้เปรียบมากกว่าสารประกอบที่แยกได้บริสุทธิ์ในแง่ของกิจกรรมทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย (Puttarak et al., 2016) ความมีชีวิตรอดและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทดสอบทั้งหมดที่ความเข้มข้น 1, 3, 10, 30 และ 100 μ g/mL นำเสนอในตารางที่ 4.2

4.2.2 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ PRE, สารสกัดหยาบ, indomethacin และสารที่แยกได้บริสุทธิ์

ฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดำเนินการโดยใช้วิธียับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) จากเซลล์ murine macrophages (RAW 264.7) (ดัดแปลงวิธีการจาก Banskota et al., 2003) การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบของ PRE, สารสกัดหยาบและสารประกอบที่แยกได้บริสุทธิ์ โดยผลการทดสอบพบว่า PRE มีผลการยับยั้ง NO ที่น่าพอใจด้วยค่า IC₅₀ ที่ 20.59 $\pm$ 3.48 μ g/mL โดยฤทธิ์ต้านการอักเสบจาก PRE มีค่ามากกว่าสารสกัดหยาบ, Indomethacin, MS, AS และ MA แต่น้อยกว่า AA (IC₅₀ 5.07 $\pm$ 0.23 μ g/mL) โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ในทุกความเข้มข้น (1, 3, 10, 30 และ 100 μ g/mL) ขณะที่สารบริสุทธิ์ AA แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 30 และ 100 μ g/mL โดยแสดงความมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่า 10% (ผล IC₅₀ ของ AA ที่ปรากฏจึงเป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่เซลล์ตายและไม่สามารถสร้าง NO ได้ จึงไม่ถือเป็นคุณสมบัติการยับยั้ง NO ที่ดีของสาร AA) (ตารางที่ 4.3)



ตารางที่ 4.2 ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ HDF ของสารสกัดหยาบ PRE และสารบริสุทธิ์

ตัวอย่าง	% Proliferation				
	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL
PRE	147.97 ± 1.66* [#]	153.93 ± 1.11* [#]	165.67 ± 1.95* [#]	148.51 ± 1.96* [#]	117.8 ± 1.16* [#]
สารสกัดหยาบ	87.10 ± 4.10*	90.54 ± 3.05*	97.73 ± 3.26	98.75 ± 1.15	106.72 ± 1.80*
MS	103.60 ± 0.73*	113.00 ± 0.73*	98.46 ± 0.73	99.42 ± 1.73	91.06 ± 1.18*
AS	104.57 ± 0.46*	108.94 ± 0.09*	117.70 ± 0.27*	99.42 ± 0.09	86.87 ± 0.36*
MA	99.29 ± 0.23	105.77 ± 0.62*	94.29 ± 0.85*	90.26 ± 0.69*	36.72 ± 1.00*
AA	101.20 ± 0.15	103.43 ± 0.23*	102.45 ± 1.00	35.26 ± 0.31*	31.61 ± 0.23*
กลุ่มควบคุม	100 ± 1.98	100 ± 1.98	100 ± 1.98	100 ± 1.98	100 ± 1.98

Results were represented as the mean ± SD of three independent determination (n=3), values in the PRE, crude extract, the biomarker of *C. asiatica* and control column followed by symbol (*) are significantly different ($p<0.05$), and values in the crude extract and PRE column followed by symbol (#) are significantly different ($p<0.05$).

ตารางที่ 4.3 การยับยั้ง nitric oxide ของ PRE, สารสกัดหยาบ จาก *C. asiatica*, indomethacin และสารบริสุทธิ์

ตัวอย่าง	% Cell viability					NO inhibition IC ₅₀ (µg/mL)
	1 µg/mL	3 µg/mL	10 µg/mL	30 µg/mL	100 µg/mL	
PRE	95.86 ± 2.85	105.28 ± 1.85	103.71 ± 2.24	104.48 ± 1.62	127.37 ± 1.22	20.59 ± 3.48 ^b
สารสกัดหยาบ	88.14 ± 0.47	89.55 ± 3.87	96.62 ± 2.25	98.80 ± 3.32	106.59 ± 3.42	64.61 ± 0.04 ^s
MS	77.53 ± 0.14	75.44 ± 0.33	67.15 ± 0.19	58.53 ± 0.14	56.21 ± 0.12	56.21 ± 0.12 ^f
AS	102.44 ± 0.1	99.32 ± 0.20	85.59 ± 0.07	66.71 ± 0.14	52.23 ± 0.17	52.23 ± 0.17 ^e
MA	106.53 ± 0.32	103.50 ± 0.07	93.07 ± 0.23	52.77 ± 0.17	50.99 ± 0.11	50.99 ± 0.11 ^d
AA	109.80 ± 0.10	105.78 ± 0.12	100.71 ± 0.15	8.35 ± 0.20	5.07 ± 0.23	5.07 ± 0.23 ^a
Indomethacin	82.75 ± 0.57	75.27 ± 3.28	82.10 ± 1.42	78.51 ± 4.20	76.52 ± 3.45	32.45 ± 2.63 ^c

Results were represented as the mean ± SD of three independent determination, values in the column followed by a different letter superscript (a-g) are significantly different ($p<0.05$), and values having the same superscript are not statistically significant.

5. สรุปผลการวิจัย

การเตรียมสารสกัด *C. asiatica* ในรูปแบบ PRE ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ pentacyclic triterpenes ได้มากกว่าการสกัดหยาบถึง 7 เท่า นอกจากนี้เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์สามารถกำจัดสารปนเปื้อนและสีเขียวเข้มของสารสกัดหยาบออกไป จึงทำให้มีลักษณะที่ปรากฏน่าพึงพอใจ (ผงสีขาวนวล) สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายมากขึ้น เมื่อพิจารณาคุณสมบัติการเพิ่มจำนวนเซลล์และคุณสมบัติการต้านการอักเสบ ผลการทดลองพบว่า PRE สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์พร้อมทั้งต้านการอักเสบได้ดีกว่าสารสกัดหยาบและสารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 4 (MS, AS, MA และ AA) และการค้นพบของเราสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านการอักเสบของ pentacyclic triterpenes จาก *C. asiatica* ซึ่ง AA และ MA แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิต NO และ PGE2 ต่อ lipopolysaccharide มากกว่า มากกว่า AS และ MS (Yun et al., 2008;



Won et al., 2009) การศึกษานี้ จึงบรรจุเป้าหมายเกี่ยวกับการคาดหวังคุณสมบัติของสาร PRE จาก *C. asiatica* โดยสามารถยืนยันคุณสมบัติทางชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับการรักษาบาดแผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงสามารถนำไปต่อยอดด้านการพัฒนารักษาบาดแผลจากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพสูงในอนาคต ซึ่งผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรมีความปลอดภัย สามารถช่วยลดการใช้ยาและสารเคมีมากเกินในผู้ป่วย อีกทั้งวัตถุดิบสมุนไพรบวบนี้นี้ได้ในประเทศไทยทำให้ช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย

6. เอกสารอ้างอิง

- Arora, R., Kumar, R., Agarwal, A., Reetaa, H. K., & Gupta, K. Y. (2018). Comparison of three different extracts of *Centella asiatica* for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: in vitro and in vivo study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 1344-1352.
- Duggina, P., Kalla, C., & Varikasuvu, S. (2015). Protective effect of *Centella* triterpene saponins against cyclophosphamide induced immune and hepatic system dysfunction in rats: Its possible mechanisms of action. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71, 435-454.
- Idris, F. N., & Nadzir, M. M. (2017). Antimicrobial activity of *Centella asiatica* on *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. *Chemical Engineering Transactions*, 56, 1381-185.
- Orhan, I. E. (2012). *Centella asiatica* (L.) Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 946259.
- Oyenihi, A. B., Chegou, N. N., Oguntibeju, O. O., & Masola, B. (2017). *Centella asiatica* enhances hepatic antioxidant status and regulates hepatic inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 55, 1671-1678.
- Puttarak, P., & Panichayupakaranant, P. (2012). Factors affecting the content of pentacyclic triterpenes in *Centella asiatica* raw materials. *Pharmaceutical Biology*, 50(12), 1508-1512.
- Puttarak, P., & Panichayupakaranant, P. (2013). A new method for preparing pentacyclic triterpene rich *Centella asiatica* extracts. *Natural Product Research*, 27(7), 684-686.
- Puttarak, P., Brantner, A., & Panichayupakaranant, P. (2016). Biological activities and stability of a standardized pentacyclic triterpene enriched *Centella asiatica* extract. *Natural Product Sciences*, 22(1), 20-24.
- Qi, Z., Ci, X., & Huang, J. (2017). Asiatic acid enhances Nrf2 signaling to protect HepG2 cells from oxidative damage through Akt and ERK activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 252-259.
- Vaishali, A., Rupali, N., & Sagar, A. (2016). Analysis of bioactive compounds in leaves extract of *Centella asiatica* by using HPLC-MS & IR techniques. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8, 122-125.
- Yasurin, P., Sriariyanun, M., & Phusantisampan, T. (2016). Review: The bioavailability activity of *Centella asiatica*. *International Journal of Applied Science and Technology*, 9(1), 1-9.
- Yun, K. J., Kim, J. Y., Kim, J. B., Lee, K. W., Jeong, S. Y., Park, H. J., & Lee, K. T. (2008). Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *International Immunopharmacology*, 8(3), 431-441.



การศึกษาพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ดนมเสือ

Phytochemical and biological activity studies of *Lignosus rhinocerotis* mycelium

ภัชราภรณ์ สมวงศ์^{1,*}, นันทพงศ์ ขำทอง¹, อีรทัศน์ สุดสาย², อัมพรรัตน์ ประไพวงศ์³ และ สิตา ปรีดานนท์⁴

Patcharaporn Somwong^{1,*}, Nanthaphong Khamthong¹, Teeratad Sudsai², Ampornrut Prapaiwong³, and Sita Preedanont⁴

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี กรุงเทพมหานคร

³วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

⁴ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี

¹Master of Science in Oriental Medicine Program, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

²Faculty of Medicine, Bangkokthonburi University, Bangkok

³College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

⁴National Biobank of Thailand (NBI), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: patcharaporn.gik@gmail.com

บทคัดย่อ

เห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerotis*) เป็นเห็ดสมุนไพรที่สำคัญในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมใช้เป็นยารักษาโรคตับอักเสบเรื้อรัง มะเร็งตับ และแผลในกระเพาะอาหาร ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดนมเสือเพิ่มมากขึ้นและพบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดี แต่ยังไม่มีการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน การศึกษานี้จึงเกี่ยวข้องกับพฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ดนมเสือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการหลั่ง NO โดยการสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือด้วย EtOH แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย hexane, CH₂Cl₂, EtOAc และน้ำ นำส่วนสกัดไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ พบว่าส่วนสกัด CH₂Cl₂ มีฤทธิ์ดีที่สุด (IC₅₀ 6.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) รองลงมาคือ ส่วนสกัด hexane (6.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) จึงนำส่วนสกัด CH₂Cl₂ ไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารด้วยเทคนิค NMR พบว่าสามารถแยกสารได้ 2 สาร คือ monocerin (1) และ 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (2) สาร 2 มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ที่ดีกว่าสาร 1 ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 10.9 และ 24.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐาน indomethacin (IC₅₀ 21.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และ L-NA (IC₅₀ 30.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) โดยสารที่แยกได้ทั้งสองมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ คือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในระดับอ่อน การศึกษานี้รายงานการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใยเห็ดนมเสือเป็นครั้งแรก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าเห็ดนมเสือต่อไป

คำสำคัญ: เห็ดนมเสือ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์

Abstract

Tiger milk mushroom (*Lignosus rhinocerotis*) is a medicinal mushroom used as a herbal medicine in Southeast Asia to cure chronic hepatitis, liver cancer, and peptic ulcer. There have been studies on the biological activities of tiger milk mushroom so far exhibiting that it possesses good anti-inflammatory activity. However, there has been no report on bioactive chemical constituents from this mushroom. Thus, this research involved phytochemical and biological activity studies of tiger milk mushroom mycelium focusing on anti-inflammatory activity through inhibition of NO production mechanism. The mycelium was first extracted with EtOH to give an ethanolic extract. It was then partitioned over hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and water, respectively. The resulting fractions were tested for the anti-inflammatory activity. Among the four fractions, the CH₂Cl₂ fraction displayed the best anti-inflammatory activity (IC₅₀ 6.1 µg/mL) followed by the hexane one (6.4 µg/mL). The CH₂Cl₂ fraction was then purified by chromatographic techniques to give



pure compounds, monocerin (**1**) and 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (**2**). The structures of the isolated compounds were identified by analyses of NMR data. Compound **2** exhibited better inhibition of NO production than compound **1** with respective IC₅₀ values of 10.9 and 24.8 µg/mL. In addition, compound **2** showed the better activity than those standard compounds (indomethacin, IC₅₀ 21.5 µg/mL; L-NA, IC₅₀ 30.8 µg/mL). The two compounds displayed cytotoxicity at the maximum test concentration of 100 µg/mL, while they were mildly active against DPPH. This is the first report on the isolation of bioactive compounds from the mycelium of tiger milk mushroom which would further additionally fulfill research of tiger milk mushroom.

Keywords: *Lignosus rhinocerotis*, Anti-inflammatory activity, Antioxidant activity, Cytotoxicity

1. บทนำ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่เนื้อเยื่อของร่างกายตอบสนองเมื่อได้รับการบาดเจ็บจากการติดเชื้อแบคทีเรียและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เข้ามาในร่างกาย หรือร่างกายได้สัมผัสกับความร้อน ความเย็น การแผ่รังสี พลังงานไฟฟ้า และสารเคมี ส่งผลให้เกิดอาการปวด บวม แดง และร้อน การตอบสนองของกระบวนการอักเสบประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด มีการหลั่งสารที่เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ เช่น ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) โมโนไซต์ (monocyte) นิวโทรฟิล (neutrophil) อีโอซิโนฟิล (eosinophil) เบโซฟิล (basophil) และเซลล์มาสต์ (mast cell) ออกมายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม (Marchesi, 1985)

สารสื่อกลาง (mediator) ที่มีบทบาทและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ พรอสตาแกลนดิน อีทู (prostaglandin E₂, PGE₂) และทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) โดย PGE₂ เป็นสารที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะราคิโดนิค (arachidonic acid) โดยเอนไซม์ไซโคลออกซิเจเนส-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) โดยเซลล์โมโนไซต์และแมโครฟาจ (macrophage) จะผลิต PGE₂ ในปริมาณมาก ในขณะที่ TNF-α ผลิตโดยเซลล์แมโครฟาจ เซลล์มาสต์ และเบโซฟิล สารบางชนิดสามารถกระตุ้นให้แมโครฟาจผลิตสารสื่อกลาง ได้ เช่น ลิโปลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (interferon-gamma, INF-γ) โดยพบว่า LPS ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบสามารถกระตุ้นแมโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลาง เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO), TNF-α, PGE₂ และอื่นๆ ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ละลายในน้ำได้ สร้างขึ้นโดยการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (nitric oxide synthase, NOS) ชนิดอินดิวซิเบิลไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible NO, iNOS) ซึ่งจะกระตุ้นให้มีการสร้าง NO ขึ้นภายในเซลล์ได้มาก ออกฤทธิ์สั้นและเฉพาะที่มีฤทธิ์สำคัญในการส่งเสริมการอักเสบ (Korhonen, Lahti, Kankaanranta, & Moilanen, 2005) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ NO นับเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุมและบรรเทาการอักเสบ การรักษาการอักเสบมักใช้ยาในกลุ่มต้านการอักเสบชนิดที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ซึ่งมีผลข้างเคียงและผลไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูง ดังนั้นการนำสมุนไพรและเห็ดเป็นยาต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบมาพัฒนาเป็นยาต้านการอักเสบที่มีผลข้างเคียงน้อยน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาการอักเสบ

เห็ดนมเสือ (*Lignosus rhinocerotis*) เป็นเห็ดสมุนไพรที่สำคัญในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และปาปัวนิวกินี โดยในจีนนั้นใช้เป็นยาพื้นบ้านซึ่งมีราคาสูง แพทย์จีนแผนโบราณจะใช้รักษาโรคตับอักเสบเรื้อรัง โรคกระเพาะ และแผลในกระเพาะอาหาร (Lee, Tan, Fung, Tan, & Ng, 2012) ส่วนในชุมชนท้องถิ่นของมาเลเซียใช้รักษาอาการไข้ ไอ หอบหืด มะเร็ง อาหารเป็นพิษ และใช้เป็นยาชูกำลัง (Lee, Tan, Fung, Pailoor, & Sim, 2011) โดยนิยมนำส่วนหัวของเห็ดนมเสือ (sclerotium) ซึ่งเป็นส่วนที่ประกอบด้วยเส้นใย (mycelium) จำนวนมากที่อัดแน่นเป็นก้อนมารักษาอาการเจ็บป่วยข้างต้น (Lee, Enchang, Tan, Fung, & Pailoor, 2013) เห็ดนมเสือจึงได้รับการยกย่องว่าเป็นยาท้องถิ่นที่สำคัญในการ



รักษาโรคมาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ไวรัสตับอักเสบเรื้อรัง และแผลในกระเพาะอาหาร (Lau, Abdullah, Aminudin, Lee, & Tan, 2015) ยิ่งไปกว่านั้นมิตัวอย่างงานวิจัยของ Lee และคณะ (2014) ที่พบว่า สารสกัดน้ำเย็นจากส่วนหัวเห็ดนมเสือมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเฉียบพลันในอุ้งเท้าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสารคาราจีแนน (carrageenan) เทียบเท่ากับยาอินโดเมทาซิน (indomethacin) และเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปแยกส่วนจะได้ส่วนสกัดโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการผลิต TNF- α ที่ดีมาก ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดนมเสือข้างต้น ประกอบกับยังไม่มีรายงานการศึกษาพิษวิทยาเพื่อแยกสารสำคัญจากเห็ดนมเสือ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาพิษวิทยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดนมเสือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการหลั่ง NO เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนการใช้ตามภูมิปัญญาต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อหาปริมาณฟีนอลลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และสกัดแยกสารสำคัญจากสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ
- 2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเส้นใยเห็ดนมเสือ

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ glass column (NK Laboratory, Thailand), rotary evaporator (Buchi, Switzerland), thin layer chromatography silica gel 60 F254 (Merck, Germany), filter paper 150 mm (Whatman, USA), 96-well plate (Nunc, Denmark), centrifuge (Boeco, Germany), uv-visible spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), CO₂ incubator (LTE Scientific, UK), laminar air flow (Esco, USA), microplate reader (BIO-TEK, USA), micropipette (Thermo Scientific, Germany) และ pH meter (Sartorius, Germany)

ตัวทำละลายชนิด commercial grade ได้แก่ hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), acetone และ methanol (MeOH) (TTK Science, Thailand) ตัวทำละลายชนิด analytical reagent ได้แก่ deuterated chloroform (CDCl₃) และ tetramethyl silane (TMS) (Merck, Germany) และ chloroform (CHCl₃), methanol (MeOH) และ ethanol (EtOH) (RCI Labscan, Thailand) สารเคมีอื่นๆ ได้แก่ silica gel G60 (Silicycle, Canada), *p*-anisaldehyde (Merck, Germany), gallic acid (Merck, Germany), Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, USA), sodium carbonate (Na₂CO₃) (Sigma, USA), sodium nitrate (NaNO₃) (Kemaus, Australia), aluminium chloride (AlCl₃) (Kemaus, Australia), sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Germany), catechin (Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck, Germany), Griess reagent (Sigma, USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Gibco, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA), butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma, USA), quercetin (Sigma, USA), lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, USA), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) medium (Gibco, USA), phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen, USA), caffeic acid phenethyl ester (CAPE) (Sigma, USA), indomethacin (Sigma, USA) และ L-nitro arginine (L-NA) (Sigma, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การจำแนกชนิดของเห็ดนมเสือ



ตัวอย่างเห็ดนมเสือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จ.นครปฐม การจำแนกชนิดพันธุ์เบื้องต้นใช้วิธี blast search บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับรายต่างๆ โดยใช้ค่าร้อยละ nucleotide identity (Cui, Tang, & Dai, 2011; Cui et al., 2019) ซึ่งสามารถจำแนกตัวอย่างเห็ดเป็น *Lignosus rhinocerotis*

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดนมเสือ

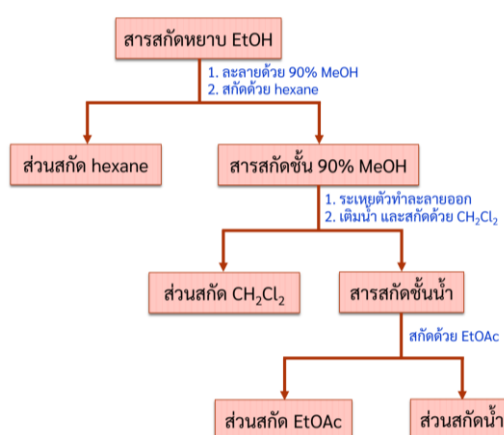
วิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดนมเสือได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Lai, Siti Murni, Fauzi, Abas Mazni, & Saleh (2011) โดยนำเชื้อเห็ดนมเสือมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นใช้ที่เจาะลูกคอร์ก (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 เซนติเมตร เจาะไปที่ชั้นวุ้นที่มีการเจริญเติบโตของส่วนปลาย เส้นใยจำนวน 3 ชิ้น แล้วใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ที่มี pH 6-7 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปบ่มไว้ในห้องมืดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน

3.2.3 การเตรียมสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ

นำเห็ดนมเสือที่เพาะเลี้ยงครบ 90 วัน มากรองแยกเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำเส้นใยที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักแห้ง นำไปบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วย EtOH จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 วัน กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้

3.2.4 การสกัดแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ EtOH มาสกัดแยกส่วน โดยใช้วิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) ด้วยตัวทำละลาย hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc และน้ำ ตามลำดับ แล้วนำสารละลายไประเหยให้แห้ง จะได้ส่วนสกัดทั้ง 4 ส่วน (ภาพที่ 1) จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 นำส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี วิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์แล้วนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



ภาพที่ 1 การเตรียมส่วนสกัดจากเส้นใยเห็ดนมเสือ

3.2.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

บันทึกข้อมูล ^1H และ ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) ของสารบริสุทธิ์ใน CDCl_3 ที่มี TMS เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยเครื่อง Bruker FT-NMR spectrometer 500 MHz จากนั้นวิเคราะห์



โครงสร้างจากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ที่ได้ หรือเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวกับข้อมูลที่ได้รายงานมาแล้ว โดยรายงานค่า chemical shift (δ) ในหน่วย ppm

1) Monocerin (1): ของหนืดสีเหลืองอ่อน; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.90 (t, $J = 7.5$ Hz, H-13), 1.33 (m, H_b-12), 1.41 (m, H_a-12), 1.56 (m, H_b-11), 1.68 (m, H_a-11), 2.14 (ddd, $J = 14.5, 6.0, 1.0$ Hz, H_b-9), 2.58 (ddd, $J = 14.5, 8.5, 6.0$ Hz, H_a-9), 3.88 (s, H-15), 3.94 (s, H-14), 4.11 (m, H-10), 4.53 (d, $J = 3.0$ Hz, H-4), 5.04 (ddd, $J = 6.0, 3.0, 1.0$ Hz, H-3), 6.58 (s, H-5), 11.27 (s, 8-OH); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 13.90 (C-13), 19.06 (C-12), 37.98 (C-11), 38.96 (C-9), 56.20 (C-14), 60.65 (C-15), 74.41 (C-4), 78.66 (C-10), 81.21 (C-3), 101.98 (C-8a), 104.34 (C-5), 131.14 (C-4a), 137.25 (C-7), 156.18 (C-8), 158.64 (C-6), 167.76 (C-1) (Zhang et al., 2008)

2) 6-*n*-Pentyl-2H-pyran-2-one (2): ของหนืดสีเหลืองอ่อน; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 0.90 (t, $J = 6.6$ Hz, H-5'), 1.32 (m, H-3', H-4'), 1.67 (qn, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 2.49 (t, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 6.01 (d, $J = 6.6$ Hz, H-5), 6.16 (d, $J = 9.3$ Hz, H-3), 7.29 (dd, $J = 9.3, 6.6$ Hz, H-4); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 13.92 (C-5'), 22.32 (C-4'), 26.58 (C-2'), 31.12 (C-3'), 33.79 (C-1'), 102.78 (C-5), 113.01 (C-3), 143.99 (C-4), 163.18 (C-2), 166.83 (C-6) (Cooney, Lauren, Philip, & Whitaker, 1997)

3.2.6 การศึกษาปริมาณฟีนอลลิกรวมของสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ

วิธีการทดลองได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Kong และคณะ (2016) โดยเตรียมสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน gallic acid 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน EtOH (absolute ethanol) หลังจากนั้นดูดสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือมา 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 6 นาที เติมน้ำละลาย 7 เปอร์เซ็นต์ Na_2CO_3 จำนวน 80 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยในรูปไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด โดยทำการทดสอบตัวอย่างละ 4 ครั้ง

3.2.7 การศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ

วิธีการทดลองได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Rebaya และคณะ (2014) โดยการทดลองจะเตรียมสารสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ 25 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ 125 ไมโครลิตร แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ NaNO_3 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที แล้วเติมน้ำละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ AlCl_3 แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 1 โมลาร์ NaOH ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณจากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐานแคทีชิน (catechin) โดยมีความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลที่ได้ให้แสดงเป็นไมโครกรัมของแคทีชินต่อมิลลิกรัมสารสกัด โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ

3.2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบจะศึกษาการยับยั้งการหลั่งของ NO ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ใน 96-well plate (เซลล์ที่ใช้มีความเข้มข้น 1×10^5 เซลล์ต่อหลุม) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ที่ได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* 055:B5 โดยมี RPMI-1640 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำเซลล์ไปบ่มในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติม RPMI-1640 ที่ประกอบไปด้วย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร LPS ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมน้ำตัวอย่างซึ่งเป็นสารละลายของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเส้นใยเห็ดนมเสือใน DMSO ลงไปปริมาณ 100 ไมโครลิตร และนำเซลล์ไปบ่มในตู้



CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย (supernatant) แต่ละหลุมมาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติม Griess reagent แต่ละหลุมปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา Griess reaction ขึ้น แล้วตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความยับยั้งการหลั่งของ NO และสร้างกราฟระหว่างความยับยั้งการหลั่งของ NO และความเข้มข้นของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ NO ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 (Tewtrakul, & Subhadhirasakul, 2008) โดยการทดสอบนี้จะทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 4 ครั้งต่อ 1 สารตัวอย่าง ซึ่งสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ CAPE, indomethacin และ L-NA

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งของ NO ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = [(A-B)/(A-C)] \times 100$$

โดยที่ A-C: nitrite concentration (μM) [A: LPS (+), sample (-); B: LPS (+), sample (+); C: LPS (-), sample (-)]

3.2.9 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในตู้ CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 ไมโครลิตร, 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในแต่ละหลุม แล้วนำไปต่อในตู้ CO₂ incubator ที่มีปริมาณ CO₂ อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทิ้ง แล้วเติม DMSO ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วย microplate reader โดยจะถือว่าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีค่าร้อยละการรอดชีวิตน้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sudsai, Wattanapiromsakul, Nakpheng, & Tewtrakul, 2013)

3.2.10 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH เริ่มจากการเตรียม stock solution ของตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างออกเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเริ่มจากการเติมตัวอย่างลงไปที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม แล้วเติม 6 × 10⁻⁵ โมลาร์ DPPH ลงในเอทานอลปริมาณ 100 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตรวจวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Sudsai et al., 2013) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ BHT และ quercetin เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ แล้วนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ และสร้างกราฟระหว่างความยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ (percent inhibition) และความเข้มข้นของตัวอย่าง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่าง (inhibition concentration) ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀) โดยการทดลองนี้จะทำการทดลองซ้ำจำนวน 4 ครั้ง ต่อ 1 ตัวอย่าง

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต้านอนุมูลอิสระ DPPH Radical มีดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดย A_{control} = absorbance of control - absorbance of control blank

A_{sample} = absorbance of sample - absorbance of sample blank



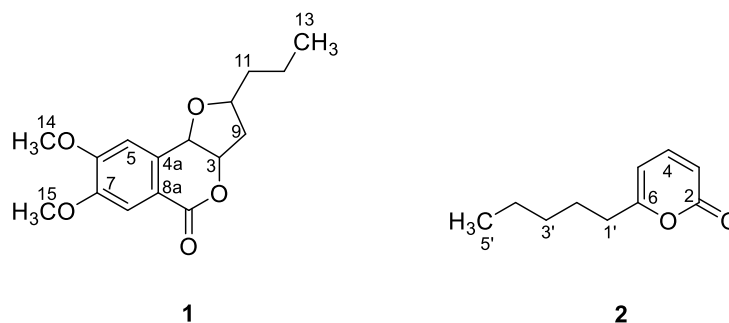
3.2.11 สถิติและการแปลผล

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) ในการศึกษางานวิจัยนี้นำเสนอในค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหา ค่า IC_{50} ซึ่งจะวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Microsoft Excel, One-Way Analysis of Variance (ANOVA) ร่วมกับ Dunnett's Test โดยค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การสกัดแยกสารให้บริสุทธิ์

การศึกษาดูฤทธิ์ด้านการอักเสบของส่วนสกัดทั้งหมดทำให้ทราบว่า ส่วนสกัด CH_2Cl_2 มีฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์ RAW 264.7 ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จึงนำส่วนสกัด CH_2Cl_2 มาแยกสารให้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค NMR และเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับข้อมูลที่มีการรายงานมาแล้ว พบว่าสามารถแยกสารที่มีการรายงานโครงสร้างแล้ว 2 สาร คือ monocerin (1) ซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซคูมาริน (Zhang et al., 2008) และ 6-*n*-Pentyl-2*H*-pyran-2-one (2) ซึ่งเป็นสารกลุ่มไพโรน (Cooney, Lauren, Philip, & Whitaker, 1997)



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้

4.2 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากส่วนต่างๆ (ตารางที่ 1) คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟมาตรฐานของ gallic acid ($y = 0.0029x + 0.0034$, $R^2 = 0.9995$) จากการทดลอง พบว่าสารสกัด EtOH จากเส้นใยเห็ดนมเสือมีปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 108.6 ± 1.2 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด เมื่อนำสารสกัดไปสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า ส่วนสกัด EtOAc มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมมากที่สุด (166.3 ± 3.7 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด) รองลงมาคือ ส่วนสกัดน้ำ (102.5 ± 0.7 ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด) เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Yap และคณะ (2013) ที่ศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากสารสกัดน้ำร้อน น้ำเย็น และเมทานอลของส่วนหัวเห็ดนมเสือ ซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 19.32-29.42 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ทำให้ทราบว่าสารสกัดส่วนหัวเห็ดนมเสือด้วย EtOH จะได้ปริมาณสารฟีนอลิกที่มากกว่า ซึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมจะพบว่าการสกัดส่วนหัวเห็ดนมเสือด้วยน้ำร้อนจะให้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในช่วง 110.84-136.92 มิลลิกรัมต่อกรัม (Jamil, Rashid, Hamid, Rahmad, & Al-Obaidi, 2018) ซึ่งมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ศึกษาในครั้งนี้ โดยสารสกัด EtOH มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 43.1 ± 0.2 ไมโครกรัมของแคทีชินต่อมิลลิกรัมสารสกัด และพบปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดในส่วนสกัด hexane



รองลงมาคือ ส่วนสกัด EtOAc ซึ่งมีค่าเท่ากับ 62.1 ± 0.7 และ 57.4 ± 0.1 ไมโครกรัมของแคทีชินต่อมิลลิกรัมสารสกัด ตามลำดับ (คำนวณได้จาก linear regression equation ของกราฟมาตรฐานของ catechin ($y = 0.0024x - 0.007$, $R^2 = 0.9983$))

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดและส่วนสกัดเส้นใยเห็ดนมเสือ

สารสกัด/ส่วนสกัด	ปริมาณฟีนอลิกรวม (ไมโครกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมสารสกัด)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (ไมโครกรัมของแคทีชินต่อมิลลิกรัมสารสกัด)
สารสกัด EtOH	108.6 ± 1.2	43.1 ± 0.2
ส่วนสกัด hexane	79.5 ± 1.2	62.1 ± 0.7
ส่วนสกัด CH_2Cl_2	91.8 ± 3.0	50.0 ± 0.4
ส่วนสกัด EtOAc	166.3 ± 3.7	57.4 ± 0.1
ส่วนสกัดน้ำ	102.5 ± 0.7	40.0 ± 0.5

ค่าที่ได้แสดงในรูป ค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n = 4)

4.3ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัด EtOH มีฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์ RAW 264.7 ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับส่วนสกัดที่ได้จากการสกัดแยกสารสกัด EtOH คือ ส่วนสกัด hexane, ส่วนสกัด CH_2Cl_2 , ส่วนสกัด EtOAc และส่วนสกัดน้ำ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.4, 6.1, 25.4 และ 35.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีส่วนสกัด CH_2Cl_2 มีฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ คือ CAPE, indomethacin, L-NA ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.1, 21.5 และ 30.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการผลิต $\text{TNF-}\alpha$ พบว่าสารสกัดน้ำเห็ดนมเสือมีฤทธิ์ที่ดี (IC_{50} 32.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปแยกส่วนจะได้ส่วนสกัดโปรตีนที่มีฤทธิ์ที่ตีความ ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารสกัดน้ำเห็ดนมเสียวยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเฉียบพลันในอุ้งเท้าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสารคาราจีแนน (carageenan) เทียบเท่ากับยาอินโดเมทาซิน (indomethacin) อีกด้วย (Lee et al., 2014)

ดังนั้นจะเห็นว่าสารสกัดและส่วนสกัดต่างๆ ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดนมเสือมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ จึงนำส่วนสกัด CH_2Cl_2 ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ตีความแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค NMR สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 สาร คือ 1 และ 2 พบว่าสาร 2 มีฤทธิ์การยับยั้งการสร้าง NO ที่ดีกว่าสาร 1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 10.9 และ 24.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ดีกว่าสารมาตรฐาน indomethacin (IC_{50} 21.5 ± 2.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และ L-NA (IC_{50} 30.8 ± 2.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่มีกลไกยับยั้งการทำงานของ iNOS ส่วนสาร 1 (IC_{50} 24.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ที่ดีกว่า L-NA แสดงให้เห็นว่าสาร 2 อาจจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 และ iNOS ได้ ซึ่งทั้ง 2 เอนไซม์นั้นมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่ไปกระตุ้นการสร้าง NO ที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ ส่งผลทำให้เกิดเซลล์โดยรอบของเนื้อเยื่อตายและทำลายสถานะสมดุลของเนื้อเยื่อได้ สาร monocerin (1) ที่แยกได้จากเชื้อรา *Botryosphaeria* sp. KcF6 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ >10 ไมโครโมลาร์ (Ju et al., 2015) ส่วนสาร 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (2) นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ที่มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.8 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีฤทธิ์มากกว่ากรดโคจิก (kajic acid) ที่มีค่า ED_{50} เท่ากับ 7.7 ไมโครโมลาร์ (Li et al., 2005)



ตารางที่ 2 การยับยั้งการสร้าง NO จากเซลล์ RAW 264.7 และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ส่วนสกัด และสารบริสุทธิ์จากเส้นใยเห็ดคนเสือ

สารตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง NO ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)							IC ₅₀ (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
	0	0.3	1	3	10	30	100	
สารสกัด EtOH	0.0±2.1	-	25.4±2.3	22.8±1.7	41.5±2.2	80.2±1.4	95.1±1.0	10.4±0.0 ^{b, c}
ส่วนสกัด Hexane	0.0±3.3	-	11.6±1.9	24.6±1.3	68.4±2.0	93.9±1.9	97.0±1.6*	6.4±0.2 ^{b, c}
ส่วนสกัด CH ₂ Cl ₂	0.0±3.3	-	10.2±2.9	26.1±2.3	69.2±1.9	98.8±1.9	100.9±1.7*	6.1±0.4 ^{b, c}
ส่วนสกัด EtOAc	0.0±3.3	-	3.8±2.4	13.3±2.9	26.9±2.5	56.2±2.5	89.6±1.3	25.4±0.8
ส่วนสกัดน้ำ	0.0±3.3	-	4.7±1.9	10.3±1.5	18.3±1.3	36.0±1.5	84.4±2.2	35.4±1.1
สาร 1	0.0±2.4	-	8.6±1.9	11.0±1.8	32.9±1.6	47.6±2.1	85.7±2.1*	24.8±1.8 ^c
สาร 2	0.0±2.4	-	12.7±1.1	16.8±1.6	39.0±2.2	84.4±1.9	101.4±1.9*	10.9±0.7 ^{b, c}
CAPE	0.0±3.1	24.2±1.1	50.0±1.8	68.1±2.1	91.6±0.7	92.0±0.7*	95.2±0.9*	1.1±0.2 ^{b, c}
Indomethacin	0.0±2.4	-	6.9±0.5	8.6±1.9	33.3±2.9	58.7±3.3	81.7±0.5*	21.5±2.4 ^c
L-NA	0.0±1.1	-	2.7±1.3	9.2±1.2	26.0±1.2	48.9±2.4	77.2±3.1	30.8±2.2

ค่าที่ได้แสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 4); *มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์; ความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่า IC₅₀ ของกลุ่มควบคุมกับกลุ่มตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ ^aCAPE, ^bindomethacin และ ^cL-NA

4.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 (ตารางที่ 2) พบว่า สารสกัด EtOH ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) แต่เมื่อนำสารสกัด EtOH มาสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย พบว่าส่วนสกัด hexane และส่วนสกัด CH₂Cl₂ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แต่ส่วนสกัด EtOAc และส่วนสกัดน้ำไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับจากรายงานการทดสอบความเป็นพิษของเห็ดคนเสือในหนูทดลอง โดยการป้อนผงยาขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ให้หนูกินเป็นเวลา 28 วันๆ ละ 1 ครั้ง พบว่าไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ต่ออัตราการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาใดๆ จึงแสดงให้เห็นว่าเห็ดคนเสือไม่มีความเป็นพิษที่ปริมาณ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (Lee et al., 2011) สำหรับส่วนสาร 1 และ 2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ในขณะที่สารมาตรฐาน CAPE และ indomethacin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งที่ความเข้มข้น 30 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม แต่ L-NA ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งจากรายงานของ Sappapan และคณะ (2008) พบว่าสาร monocerin (1) ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) มะเร็งปอด (CHAGO) มะเร็งตับ (Hep-G2) มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-3) และมะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW-620) ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับสาร 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (2) ไม่พบรายงานความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน

4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากเส้นใยเห็ดคนเสือ พบว่า สารสกัด EtOH มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ (IC₅₀ เท่ากับ 63.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin และ BHT ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1.6 และ 22.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ สำหรับส่วนสกัด EtOAc มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 24.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม รองลงมา ได้แก่ ส่วนสกัด CH₂Cl₂, น้ำ และ hexane ตามลำดับ ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 53.4, 96.4 และ >200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ จากรายงานของ Yap และคณะ (2013) ที่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดน้ำร้อน น้ำเย็น และเมทานอลของส่วนหัวเห็ดคนเสือ ด้วยวิธี DPPH, ABTS, และ superoxide anion radical scavenging



assay พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.52-1.12, 0.05-0.20 และ -0.98-11.23 มิลลิโมลของโทรลล็อกซ์ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ส่วนวิธี FRAP assay มีค่าอยู่ในช่วง 0.006-0.016 มิลลิโมลต่อนาที่ต่อกรัมสารสกัด ส่วนสาร 1 และ 2 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 180.4 และ >200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า monocerin (1) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ค่อนข้างต่ำ (IC_{50} เท่ากับ >324 ไมโครโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.2 ไมโครโมลาร์ (Tianpanich et al., 2011) และ 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (2) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 60.73 มิลลิโมลของโทรลล็อกซ์ต่อกรัม ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐาน trolox acid (77.50 มิลลิโมลของโทรลล็อกซ์ต่อกรัม) (Gallo et al., 2013)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด ส่วนสกัด และสารบริสุทธิ์จากเส้นใยเห็ดนมเสือ

ตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
สารสกัด EtOH	63.8±1.1
ส่วนสกัด Hexane	>200
ส่วนสกัด CH_2Cl_2	53.4±3.2
ส่วนสกัด EtOAc	24.5±2.1
ส่วนสกัดน้ำ	96.4±1.8
สาร 1	>200
สาร 2	180.4±3.5
Quercetin	1.6±0.1
BHT	22.9±0.7

ค่าที่ได้แสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 4)

5. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาพิษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเส้นใยเห็ดนมเสือ โดยเน้นศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการหลั่ง NO เป็นตัวนำทางในการแยกสารบริสุทธิ์ จากการนำส่วนสกัด CH_2Cl_2 ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบฤทธิ์ดีที่สุด (IC_{50} 6.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ไปแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารได้ 2 สาร คือ monocerin (1) และ 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (2) สารทั้งสองมีฤทธิ์ด้านการอักเสบฤทธิ์ดี โดยสาร 2 มีฤทธิ์ที่ต่ำกว่า 1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 10.9 และ 24.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ สารที่แยกได้ทั้งสองมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในระดับอ่อน งานวิจัยนี้ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเห็ดนมเสือ และเป็นรายงานการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเส้นใยเห็ดนมเสือเป็นครั้งแรก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าเห็ดนมเสือสำหรับการศึกษาวิจัยและพัฒนาและผลิตภัณฑ์จากเห็ดนมเสือต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จ.นครปฐม ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเห็ดนมเสือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต สำหรับห้องปฏิบัติการวิจัย และทุนวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต



7. เอกสารอ้างอิง

- Cooney, J. M., Lauren, D. R., Poole, P. R., & Whitaker, G. (1997). Microbial transformation of the *Trichoderma* metabolite 6-*n*-pentyl-2H-pyran-2-one. *Journal of Natural Products*, 60(12), 1242-1244.
- Cui, B.-K., Li, H.-J., Ji, X., Zhou, J.-L., Song, J., Si, J., ... Dai, Y.-C. (2019). Species diversity, taxonomy and phylogeny of Polyporaceae (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*, 97, 137-392. doi: 10.1007/s13225-019-00427-4
- Cui, B.-K., Tang, L.-P., & Dai, Y.-C. (2011). Morphological and molecular evidences for a new species of *Lignosus* (Polyporales, Basidiomycota) from tropical China. *Mycological Progress*, 10(3), 267-271. doi: 10.1007/s1 1557-010-0697-y
- Jamil, N. A. M., Rashid, N. M. N., Hamid, M. H. A., Rahmad, N., & Al-Obaidi, J. R. (2018). Comparative nutritional and mycochemical contents, biological activities and LC/MS screening of tuber from new recipe cultivation technique with wild type tuber of tiger's milk mushroom of species *Lignosus rhinoceros*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 1-10. doi: 10.1007/s11274-017-2385-4
- Johnathan, M., Gan, S. H., Ezumi, M. F. W., Faezahtul, A. H., & Nurul, A. A. (2016). Phytochemical profiles and inhibitory effects of tiger milk mushroom (*Lignosus rhinoceros*) extract on ovalbumin-induced airway inflammation in a rodent model of asthma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 1-13. doi: 10.1186/s12906-016-1141-x
- Ju, Z., Lin, X., Lu, X., Tu, Z., Wang, J., Kaliyaperumal, K., . . . Liu, Y. (2015). Botryoisocoumarin A, a new COX-2 inhibitor from the mangrove *Kandelia candel* endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. KcF6. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 1-4. doi: 10.1038/ja.2015.46
- Kong, B.-H., Tan, N.-H., Fung, S.-Y., Pailoor, J., Tan, C.-S. & Ng, S.-N. (2016). Nutritional composition, antioxidant properties, and toxicology evaluation of the sclerotium of tiger milk mushroom *Lignosus tigris* cultivar E. *Nutrition Research*, 36, 174-183. doi: 10.1016/j.nutres.2015.10.004
- Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H., & Moilanen E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation and Allergy*, 4, 471-479. doi: 10.2174/15680100545 26359
- Marchesi, V. T. (1985) Inflammation and healing. In J. M. Kissane, & W. A. D Anderson (Eds.), *Anderson's pathology* (8th ed., pp. 22-60). St. Louis, MO: C.V. Mosby.
- Lai, W. H., Siti Murni, M. J., Fauzi, D., Abas Mazni, O., & Saleh, N. M. (2011). Optimal culture conditions for mycelial growth of *Lignosus rhinoceros*. *Mycobiology*, 39(2), 92-95. doi: 10.4489/myco.2011.39.2.092
- Lau, B. F., Abdullah, N., Aminudin, N., Lee, H. B., & Tan, P. J. (2015). Ethnomedicinal uses, pharmacological activities, and cultivation of *Lignosus* spp. (tiger's milk mushrooms) in Malaysia-A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 169, 441-458. doi: 10.1016/ j.jep. 2015.04.042
- Lee, M. L., Tan, N. H., Fung, S. Y., Tan, C. S., & Ng, S. T. (2012). The Antiproliferative activity of sclerotia of *Lignosus rhinoceros* (tiger milk mushroom). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-5. doi: 10.1155/2012/697603



- Lee, S. S., Enchang, F. K., Tan, N. H., Fung, S. Y., & Pailoor J. (2013). Preclinical toxicological evaluations of the sclerotium of *Lignosus rhinoceros* (Cooke), the tiger milk mushroom. *Journal of Ethnopharmacology*, 147, 157-163. doi: 10.1016/j.jep.2013.02.027
- Lee, S. S., Tan, N. H., Fung, S. Y., Pailoor, J., & Sim, S. M. (2011). Evaluation of the sub-acute toxicity of the sclerotium of *Lignosus rhinoceros* (Cooke), the tiger milk mushroom. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 192-200. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.004
- Lee, S. S., Tan, N. H., Fung, S. Y., Sim, S. M., Tan, C. S., & Ng, S. T. (2014). Anti-inflammatory effect of the sclerotium of *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryvarden, the tiger milk mushroom. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1-8. doi: 10.1186/1472-6882-14-359
- Li, X., Kim, M. K., Lee, U., Kim, S.-K., Kang, J. S., Choi, H. D., & Son, B. W. (2005). Myrothenones A and B, Cyclopentenone Derivatives with Tyrosinase Inhibitory Activity from the Marine-Derived Fungus *Myrothecium* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(4), 453-455. doi: 10.1248/cpb.53.453
- Rebaya, A., Belghith, S. I., Baghdikian, B., Leddet, V. M., Mabrouki, F., Olivier, E., ... Ayadi, M. T. (2014). Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(1), 52-57. doi: 10.7324.2015.50110
- Sappapan, R., Sommit, D., Ngamrojanavanich, N., Pengpreecha, S., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., & Pudhom, K. (2008). 11-Hydroxymonocerin from the Plant Endophytic Fungus *Exserohilum rostratum*. *Journal of Natural Products*, 71(9), 1657-1659. doi: 10.1021/np8004024
- Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Nakpheng, T., & Tewtrakul, S. (2013). Evaluation of the wound healing property of *Boesenbergia longiflora* rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 223-231. doi: 10.1016/j.jep.2013.08.038
- Tewtrakul, S., & Subhadhirasakul, S. (2008). Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(1), 81-84. doi: 10.1016/j.jep.2008.07.033
- Tianpanich, K., Prachya, S., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2011). Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Isocoumarins and a Phthalide from the Endophytic Fungus *Colletotrichum* sp. *Journal of Natural Products*, 74(1), 79-81. doi: 10.1021/np1003752
- Yap, Y. H. Y., Tan, N., Fung, S., Aziz, A. A., Tan, C., & Ng, S. (2013). Nutrient composition, antioxidant properties, and anti-proliferative activity of *Lignosus rhinoceros* Cooke sclerotium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2945-2952. doi: 10.1002/jsfa.6121
- Zhang, W., Krohn, K., Draeger, S., & Schulz, B. (2008). Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1078-1081.



สารออกฤทธิ์ชีวภาพและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากฟลาวของเมล็ดผลไม้

Bioactive compounds and antioxidant capacities of extracts obtained from flour of fruit seeds

สุธิศา สมเพชร ปวริศา อมรเดชากุล ชีรวัฒน์ รังกฤษณ์ และ ชัยวัฒน์ บรรดิษฐ์

Suthisa Somphet, Pavarisa Amordachakul, Theerawat Runguphan, and Chaiwat Bandaiphet

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhon Pathom

*Corresponding author, E-mail: Bandaiphet_C@silpakorn.edu

บทคัดย่อ

งานนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบของแป้งฟลาวจากเมล็ดผลไม้ 10 ชนิด เมล็ดผลไม้ทั้งหมดถูกเตรียมเป็นผงแป้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายผสม (น้ำ: 70% เอทานอล: กรดอะซิติก) กรอง ระเหยน้ำออกและทำแห้งเยือกแข็งจนได้แป้งเมล็ดผลไม้ โดยเมื่อประเมินสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากแป้งเมล็ดผลไม้ สารสกัดจากแป้งเมล็ดทับทิมมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (112.43 ± 1.1 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) แต่ฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดที่ได้จากสารสกัดจากแป้งเมล็ดเสาวรส (98.45 ± 1.4 มิลลิกรัม CE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และค่า IC_{50} ต่ำสุด ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรูปแบบ DPPH ยังคงพบในสารสกัดจากแป้งเมล็ดทับทิม (4.61 ± 0.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) ทำให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพมากในการทำลายปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ ค่าการต้านอนุมูลอิสระแบบ FRAP พบสูงจากสารสกัดหยาบของแป้งเมล็ดทับทิมซึ่งมีศักยภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) ได้ ในขณะที่การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการขจัดของ ABTS ได้มากพบในแป้งจากเมล็ดมะขาม (1.31 ± 0.16 มิลลิกรัม AC ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ทับทิมและเสาวรส งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าแป้งจากเมล็ดผลไม้ที่แสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ ผลที่ได้นำไปใช้ศึกษาการใช้ประโยชน์ที่เป็นไปได้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยาและเครื่องสำอาง ทั้งยังใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มได้ด้วย

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ เมล็ดผลไม้ แป้ง สารสกัด เอทานอล

Abstract

This work aimed to investigate the antioxidant activities of crude extracts of 10 fruits seed flours. All fruit seeds were prepared into flour powders, extracted with ethanolic mix solution (water: 70% ethanol: acetic acid), filtered, evaporated, and freeze-dried, and then their antioxidant activities of crude extract were evaluated. The flour extract from pomegranate seed had the highest phenolic content (112.43 ± 1.1 mg GAE /g DS), but the highest total flavonoid obtained from extracts of passion fruit seed flour (98.45 ± 1.4 mg CE/ g DS). The lowest IC_{50} value of DPPH antioxidant activity still was found in pomegranate extracts (4.61 ± 0.74 mg /ml), thus, it was a very potent free radical scavenger to break the free radical chain reaction. The high FRAP value was found from crude extracts of tamarind, manila tamarind, and pomegranate seeds that presented the antioxidant potential through the reduction of ferric iron (Fe^{3+}). The high values of ABTS scavenging assay were found in ethanolic extracts from seed flours of pomegranate, manila tamarind, and passion fruit (1.31 ± 0.16 , 1.19 ± 0.11 , 1.17 ± 0.15 , and 1.07 ± 0.12 mM AC/g DS, respectively) that displayed good free radical-scavenging capacity. These results can be further studied and used in food supplements, drugs, and cosmetic products. This also takes advantage of waste utilization into a value-added product.

Keywords: Antioxidant, Fruit seed, Flour, Extract, Ethanol



1. บทนำ

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดภาวะที่ไม่พึงประสงค์ อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจนสมดุลนี้เป็นผลมาจากมลพิษ แสงแดดและความเครียด เป็นเวลานาน เช่น การได้รับแสงแดดที่แรงเป็นเวลานาน ผิวหนังจะเกิดมีปริมาณเมลานินมากเกินไปส่งผลให้ผิวหมองคล้ำเกิดจุดด่างดำ กระและฝ้า ซึ่งปัจจุบันมีเครื่องสำอางหลายชนิดที่นำสารสกัดจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ มาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สามารถป้องกันแสงแดดช่วยชะลอการเกิดริ้วรอยโดยยับยั้งการเกิดเม็ดสีเมลานินเครื่องสำอางได้ สารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่สกัดได้จากพืช โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมักถูกตรวจวิเคราะห์ส่วนใหญ่ในเนื้อ ดอก น้ำผลไม้หรือทั้งผล มีรายงานการศึกษาในเมล็ดตองและเมล็ดวอลนัท (Wang et al., 2021) แต่เมล็ดผลไม้ในประเทศไทยยังมีน้อยมาก

สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติมักได้จากพืช มีบทบาทสำคัญในการควบคุมหรือป้องกันกระบวนการออกซิเดชันและโรคที่เกี่ยวข้อง (Liu et al., 2014) เมล็ดผลไม้ส่วนใหญ่ในประเทศไทยเป็นวัสดุเศษเหลือเมื่อนำมาพบปะกับคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน น้ำมัน และเอ็นโดคาร์ปหรือเปลือกที่ลอกออกไม่ได้ (Ahmed et al., 2022) เต็มไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่อาจรับประทานได้โดยตรงหรือบางชนิดใช้ประโยชน์เป็นสารเพิ่มความข้นหนืดและสารเพิ่มเนื้อสัมผัสในอาหาร (Liu et al., 2014) แป้งจากเมล็ดผลไม้ยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหารเสริมและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ความงาม เช่น การผลิตแป้งทาหน้าในการเสริมสวยได้ เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ (Ugwuona & Onweluzo, 2013) เมล็ดน้อยหน่า (*Annona squamosa* L.) มีสารประกอบอัลคาลอยด์ แทนนิน โปรตีน ซาโปนิน ฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Pramitkumar et al., 2019) และน้ำมันหอมระเหยมีสารช่วยฆ่าเชื้อปราศจากพิษผิวหนัง กลากเกลื้อน โรคเรื้อน หิดและหูดได้ (Ololad & Anuoluwa, 2020) นำไปทำสบู่หรือนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวความงาม

สารต้านอนุมูลอิสระที่รู้จักกันดีได้แก่สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ที่พบตามธรรมชาติในพืช โมเลกุลของฟีนอลจะให้อิเล็กทรอนิกส์กับอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระสิ้นสุดลงและไม่ก่อตัวเป็นอนุมูลอิสระใหม่ ทำให้โมเลกุลร่างกายไม่ถูกทำลายจึงช่วยชะลอและป้องกันการเสื่อมของเซลล์ มีรายงานว่าเมล็ดลูกหว้า (*S. claviflorum*) อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลที่มีศักยภาพมากในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพ เครื่องสำอางและยา ส่วนฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบรูปแบบหนึ่งของฟีนอลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยหากรับประทานเข้าไปฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่จะถูกย่อยสลายเป็นกรดฟีนอลิกต่างๆที่ช่วยต้านอนุมูลอิสระได้ (Pietta, 2000 Rakariyatham และคณะ (2020) รายงานว่าสารสกัดหยาบของเมล็ดเงาะ (สกัดด้วยเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3 น้ำหนักโดยปริมาตรเป็นเวลา 4.5 ชม. ที่ 25°C) อุดมไปด้วยแทนนินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 43 ชนิด (5 มิลลิกรัม GAE/กรัมน้ำหนักแห้ง) Ayu และคณะ (2017) ได้รายงานที่สารสกัดจากเมล็ดสละ (*Salacca edulis* Reinw) อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอล 433.29 มิลลิกรัม GAE ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ฟลาโวนอยด์ 66.4 มิลลิกรัม CE ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และแทนนิน 838.98 มิลลิกรัม TAE ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง โดยมีศักยภาพเป็นสารมูลค่าเพิ่มในเครื่องดื่มได้

Kubola และ Siriamornpun (2011) ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมทานอลในเมล็ดผักข่าไทย (*Momordica cochinchinensis* Spreng) ที่สุกปานกลาง ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC เท่ากับ 1.63 ± 0.22 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC เท่ากับ 1.57 ± 0.09 มิลลิกรัม RE ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) FRAP (36.31 ± 3.42 mol FeSO₄ ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) และ DPPH (IC₅₀ = 6.66 ± 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดผักข่าไทยที่สุกแก่เต็มที่ มีสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น TPC (2.39 ± 0.26 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง), TFC (1.88 ± 0.10 มิลลิกรัม RE ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง), FRAP (46.49 ± 1.59 โมล FeSO₄ ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) และ DPPH (IC₅₀ = 4.20 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากผลไม้จำเป็นต้องมีข้อมูลตัวทำลายสกัดสารที่เหมาะสม Deva และคณะ (2015) รายงานการสกัดน้อยหน่าของอินโดนีเซีย (*Annona squamosa* L.) ด้วยตัวทำลายต่างๆ พบว่าตัวทำลายที่สกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเมล็ดน้อยหน่าที่ดีที่สุดคือเอทานอล จากเปลือกน้อยหน่าคืออะซิโตน และจากเนื้อของผลน้อยหน่าคือ



อะซิโตน David และคณะ (2021) ศึกษาการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกนอก เปลือกใน เนื้อ และเมล็ดแตงโม (*Citrullus lanatus*) พบว่าเปลือกชั้นในของแตงโมมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ABTS ขณะที่เปลือกนอกมีศักยภาพจัด DPPH ดีที่สุด รองลงมาคือ เมล็ด เยื่อกระดาษและเปลือกชั้นใน (55.75 ± 2.44 , 41.10 ± 5.28 , 34.48 ± 1.63 และ $33.05 \pm 4.47\%$ มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) เปลือกนอกมีปริมาณฟีนอลสูงที่สุดตามด้วยเมล็ด เนื้อและเปลือกชั้นใน (0.087 ± 0.002 , 0.042 ± 0.003 , 0.026 ± 0.006 , 0.010 ± 0.001 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)

ความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากธรรมชาติมักถูกนำไปเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานและที่สังเคราะห์ขึ้น (Ahmed et al., 2021) เช่นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS ของสารสกัดจากเมล็ดลูกหว้า ($IC_{50} = 3.80 \pm 0.02$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) มีค่าสูงกว่ากรดแอสคอร์บิก ($IC_{50} = 10.23 \pm 0.06$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และบิฟิเลตไฮดรอกซีโทลูอิน (BHT) ($IC_{50} = 10.23 \pm 0.06$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ขณะที่ Mahindrakar และคณะ (2020) รายงานการสกัดเมล็ดลูกพลัม (*Syzygium cumini* L. Skeels) หาโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงพบค่าฟีนอลรวม (100.07 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ฟลาโวนอยด์รวม (10.11 มิลลิกรัม CE ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ซึ่งสูงกว่าสาร catechin (2.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และกรดแกลลิก (54.5 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ช่วยลดเวลาลดปริมาณสารสกัดได้

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบจากฟลาวของเมล็ดผลไม้ แบบ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric-reducing antioxidant potential (FRAP) และ 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) รวบรวมข้อมูลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เมล็ดผลไม้และการเตรียมแป้ง

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อเมล็ดผลไม้ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เมล็ดผลไม้ถูกทำความสะอาด แยกเปลือกที่ติดมาของเมล็ดผลไม้แต่ละชนิดออก หั่นเป็นชิ้นเล็ก อบจนแห้งที่ 80°C แล้วบดเป็นผงแป้งฟลาวเก็บในถุงโพลีโพรพิลีนที่ -20°C

ตารางที่ 1 ผลไม้ที่นำเมล็ดมาใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้

หมายเลข	ชื่อภาษาไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อภาษาอังกฤษ
1	สละ	<i>Salacca edulis</i> Reinw	Salacca
2	น้อยหน่า	<i>Annona squamosa</i> L.	Sugar Apple
3	น้อยโหน่ง	<i>Annona reticulata</i> L.	Custard apple
4	เงาะ	<i>Nephelium lappaceum</i> Linn.	Rambutan
5	ทับทิม	<i>Punica granatum</i> L.	Pomegranate
6	มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarind
7	มะขามเทศ	<i>Pithecellobium dulce</i> , Roxb. Benth	Manila tamarind
8	ขนุน	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Jackfruit
9	เสาวรส	<i>Passiflora edulis</i>	Passion fruit
10	ลำไย	<i>Dimocarpus longan</i>	Longan



3.2 การสกัดและการเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างแบ่งของเมล็ดผลไม้แต่ละเมล็ด 20 กรัม นำมาสกัดด้วยสารสกัด (สารละลายของเอทานอล: น้ำ: กรดอะซิติก อัตราส่วน 80:19:1 โดยปริมาตร) 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงแยกส่วน สารละลายออกโดยกระดาษกรอง (Whatman No. 4) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6000 x g เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียสใน เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich Mikro220R, Tuttlingen, ประเทศเยอรมัน) และเก็บรักษาสารละลายที่ได้ในขวดพลาสติกใส ฤงพลาสติกลึบ ปิดคลุมป้องกันแสง จัดเก็บที่ -20°C เพื่อนำไปใช้หาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3.3 การหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจสอบทั้งหมดในงานวิจัยนี้ทำในสภาพหลุมชนิด 96 หลุมและวัดโดยเครื่องอ่านค่าจากถาดหลุม (Tecan, ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์) ดำเนินการสามซ้ำและคำนวณผลเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.1 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC)

ใช้วิธีที่อธิบายไว้โดย Abu-Bakar และคณะ (2009) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างจะทำปฏิกิริยากับ phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid ใน Folin-Ciocalteu เพื่อผลิตสารเชิงซ้อนสีน้ำเงิน สารสกัดตัวอย่าง ของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารละลาย 20% NaCO₃ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ Folin-Ciocalteu รีเอเจนต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร คำนวณค่า TPC โดยใช้ สมการ

$$\text{ปริมาณ TPC (มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง, DS)} = C_p \times [(D \times V) / (1000 \times W)]$$

โดยที่ C_p = ปริมาณฟีนอลิกคำนวณโดยใช้เส้นกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (0 - 500 มิลลิกรัมต่อลิตร), D = ค่าการเจือจางของสารละลายตัวอย่าง, V = ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร), W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) แสดงผลเป็นมิลลิกรัม เทียบเท่ากรดแกลลิก (GAE) ใน 1 กรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (DS)

3.3.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC)

ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการ NaNO₂ - AlCl₃ - NaOH assay (Abu-Bakar et al., 2009) ตัวอย่างปริมาตร 30 ไมโครลิตรถูกผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 120 ไมโครลิตรและสารละลาย 5% NaNO₂ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 10% AlCl₃ .6H₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มให้เกิดปฏิกิริยา 6 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 60 ไมโครลิตรและน้ำปริมาตร 70 ไมโครลิตร บ่ม 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ 510 นาโนเมตร คำนวณหา ปริมาณ TFC โดยใช้สมการ

$$\text{ปริมาณ TFC (มิลลิกรัม CE ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)} = C_f \times [(D \times V) / (1000 \times W)]$$

โดยที่ C_f = ปริมาณฟลาโวนอยด์คำนวณโดยใช้เส้นกราฟมาตรฐานของสารคาเทชิน (Catechin 0 - 500 มิลลิกรัม ต่อลิตร), D = ค่าการเจือจางของสารละลายตัวอย่าง, V = ปริมาณตัวอย่าง (มิลลิลิตร), W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) รายงานผล TFC เทียบเท่าสาร catechin เป็นมิลลิกรัมใน 1 กรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (มิลลิกรัม CE ต่อกรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

3.3.3 กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (free radical scavenging activity)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดำเนินตามวิธีของ Du และคณะ (2014) สารสกัดตัวอย่างจะให้อิเล็กทรอนิกส์ยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH ทำให้เปลี่ยนสีม่วงเป็นสีเหลือง วิธีวิเคราะห์ทำโดยนำตัวอย่างสารสกัด 1 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 250 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 12 ไมโครลิตร ปิดด้วยแผ่นฟอยล์อะลูมิเนียม บ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโน เมตร คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการ

$$\text{ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c \times 100]$$



โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนโดยไม่ใช่ตัวอย่างสารสกัด (แบลนด์) As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่า IC_{50} หมายถึงปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการลดความเข้มข้นของ DPPH ลง 50 เปอร์เซ็นต์ซึ่งพิจารณาได้จากกราฟที่สร้างขึ้นจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสาร DPPH ที่วิเคราะห์ได้เทียบกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ

3.3.4 การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

การทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ABTS) นี้ดัดแปลงมาจากวิธี Re และคณะ (1999) สารทดสอบ ABTS (7 มิลลิโมลาร์) ถูกเตรียม (โดยการผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (.245 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน :1 0.5 และทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วถูกเจือจางด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 7.0-2.0 ทดสอบที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร) เมื่อได้แล้วนำตัวอย่างสารสกัดที่หยาบ (1 ไมโครลิตร) ผสมกับ ABTS 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร พบว่าสารละลายมีสีฟ้าเข้มของ ABTS จะลดลงเมื่อเกิดการต้านอนุมูลอิสระ คำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS จากสมการ

$$\text{ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS} = [(Ac - As)/Ac]$$

โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนโดยไม่ใช่ตัวอย่างสารสกัด (แบลนด์) As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด รายงานผลค่า ABTS เป็นปริมาณกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging activity) เทียบเท่ากับกรดแอสคอร์บิกเป็นมิลลิกรัมใน 1 กรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (มิลลิกรัม AC ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง)

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (FRAP assay)

วิธีการ FRAP assay (ferric reducing/antioxidant power assay) เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Fe^{+3} ไปเป็น Fe^{2+}) ตามวิธีการของ Hefied และคณะ (2020) เริ่มจากการเตรียมสารทดสอบ FRAP reagent [โดยการผสม 10 ml ของอะซิเตทบัฟเฟอร์ (0.3 M Acetate buffer, pH 3.6), TPTZ (10 mM 2,4,6-tripyridyl-2-triazine) ใน 40 mM HCl และ 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ในอัตราส่วน 10:1:1] การทดสอบทำโดยเติมตัวอย่างสารสกัด 50 ไมโครลิตรผสมกับ FRAP reagent 1 มล. บ่มในอ่างน้ำอุ่นที่ 37°C นาน 20 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 596 นาโนเมตร (ชุดควบคุมเตรียมโดยใช้ตัวทำละลายแทนสารตัวอย่าง) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) รายงานผลเป็นไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} ต่อ 1 กรัมตัวอย่างน้ำหนักแห้ง ($\mu\text{mol Fe (II)/g DS}$)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

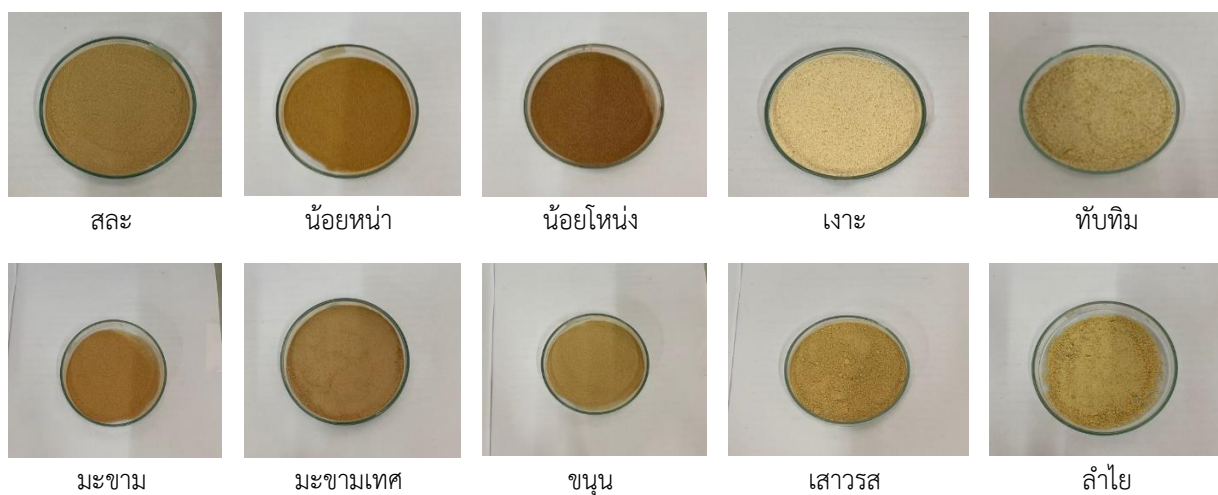
ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างแบ่งฟลาวจากเมล็ดผลไม้ทั้งหมดที่ใช้ในงานนี้ จากนั้นแบ่งฟลาวทั้งหมดถูกสกัดด้วยสารละลายผสมเอทานอล (น้ำ: เอทานอล 70%: กรดอะซิติก) กรองและจัดเก็บที่ -20°C ใส่ถุงพลาสติกสีดำน็อกแสง จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์หาสารฤทธิ์ทางชีวภาพและการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ผลจะได้อธิบายแยกดังต่อไปนี้

4.1 ผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างแบ่งฟลาวส้จากเมล็ดผลไม้

วิธีการวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระโดย Folin-Ciocalteu assay เป็นวิธีที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ในการหาปริมาณฟีนอลในอาหาร (Prior et al., 2005) ตารางที่ 1 แสดงผลของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) สารสกัดเอทานอลจากแบ่งเมล็ดผลไม้ โดยตัวอย่างที่มีค่า TPC สูงได้แก่สารสกัดจากแบ่งเมล็ดทับทิม (112.43 ± 1.1 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) ตามด้วยเมล็ดเสาวรส มะขาม เาะ มะขามเทศ น้อยโหน่ง ขนุน น้อยหน่าและลำไยตามลำดับ โดยสารประกอบฟีนอลิก



มีพบทั่วไปได้มากในพืชและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านและกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งอาจมีผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ (Govindarajan et al., 2007)



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแบ่งจากเมล็ดผลไม้ที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 1 ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (TFC) สารสกัดจากแบ่งฟลาวด์เมล็ดผลไม้

สารสกัดจาก เมล็ดผลไม้	ชื่อวิทยาศาสตร์ ของเมล็ดจากผลไม้	TPC (มิลลิกรัม GAE ต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)	TFC (มิลลิกรัม CE ต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)
สละ	<i>Salacca edulis</i> Reinw	108.67 ± 5.2 ^a	75.82 ± 1.4 ^c
น้อยหน่า	<i>Annona squamosa</i> L.	104.62 ± 3.0 ^c	69.24 ± 1.2 ^c
น้อยโหน่ง	<i>Annona reticulata</i> L.	100.84 ± 2.9 ^c	74.51 ± 2.3 ^a
เงาะ	<i>Nephelium lappaceum</i> Linn.	62.07 ± 2.2 ^d	40.62 ± 2.1 ^a
ทับทิม	<i>Punica granatum</i> L.	112.43 ± 1.1 ^c	53.55 ± 1.6 ^b
มะขาม	<i>Tamarindus indica</i> L.	108.23 ± 1.2 ^c	61.60 ± 2.7 ^a
มะขามเทศ	<i>Pithecellobium dulce</i> , Roxb. Benth	104.05 ± 1.6 ^c	48.25 ± 1.5 ^b
ขนุน	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	58.07 ± 2.2 ^d	64.23 ± 1.3 ^c
เสาวรส	<i>Passiflora edulis</i>	104.41 ± 1.8 ^c	98.45 ± 1.4 ^c
ลำไย	<i>Dimocarpus longan</i>	102.36 ± 2.9 ^c	60.07 ± 1.1 ^c

ผลลัพธ์ที่ได้คือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) โดยมีข้อมูลต่างกันระบุถึงความแตกต่างทางสถิติ (p < 0.05)

โครงสร้างของสารฟีนอลิกเป็นวงแหวนที่สามารถกำจัดปฏิกิริยาออกซิเดชันจุดเริ่มต้นของการเกิดอนุมูลอิสระอันตราย ได้ทั้งที่ทดสอบในหลอดทดลองและ/หรือในร่างกาย (Barreira et al., 2008) Abu-Bakar และคณะ (2009) รายงานว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีความสัมพันธ์อย่างมากกับการทดสอบโดยวิธี FRAP โดย Rice-Evans และคณะ (1997) รายงานว่าสารประกอบฟีนอลมีความสัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระโดยวัดจากวิธี DPPH และ ABTS ด้วย



4.2 ผลการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดแบ่งจากเมล็ดผลไม้

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) แสดงในตารางที่ 1 โดยสารสกัดจากแบ่งเมล็ดเสาวรสให้ค่า TPC สูงที่สุด (98.45 ± 1.4 มิลลิกรัม CE ต่อกรัมน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) สารฟลาโวนอยด์มีความสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์และจัดเป็นสารฟีนอลิกประเภทหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสามารถขบอนุมูลอิสระช่วยการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและฤทธิ์ต้านมะเร็ง ในขณะที่ฟลาโวนอยด์บางชนิดมีศักยภาพในการต่อต้านไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่องของมนุษย์ (Yao et al., 2004) Abu-Bakar และคณะ (2009) รายงานว่ากิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH มีความสัมพันธ์อย่างมากกับปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วย

4.3 ผลการทดสอบกิจกรรมกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

วิธีนี้ถูกใช้มากในการประเมินกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยหลักการที่สารต้านอนุมูลอิสระให้ห่อต้มไฮโดรเจนในการลดอนุมูล DPPH ลง (Alkasim et al., 2018) กิจกรรมการกำจัด DPPH ของสารสกัดจากพลามเมล็ดผลไม้รายงานค่าการยับยั้งเป็นค่าIC₅₀ ซึ่งหมายถึงผลการยับยั้งอนุมูลอิสระปริมาณแบ่งเมล็ดผลไม้ที่จำเป็นสำหรับการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH, ABTS และ FRAP ของสารสกัดหยาบเอทานอลจากเมล็ดผลไม้

ตัวอย่างที่	เมล็ดผลไม้	IC ₅₀ ของ DPPH (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ABTS (มิลลิกรัม AC ต่อมิลลิลิตร)	FRAP value (มิลลิโมลาร์ Fe ²⁺ ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)
1	สละ	9.03 ± 0.52 ^c	0.45 ± 0.11 ^c	7.1 ± 0.27 ^c
2	น้อยหน่า	5.00 ± 0.94 ^a	0.67 ± 0.12 ^b	4.8 ± 0.18 ^d
3	น้อยโหน่ง	5.82 ± 0.41 ^a	0.31 ± 0.27 ^c	7.8 ± 0.26 ^d
4	เงาะ	8.38 ± 0.75 ^b	0.87 ± 0.02 ^b	3.8 ± 0.27 ^d
5	ทับทิม	4.61 ± 0.74 ^a	1.17 ± 0.15 ^a	18.5 ± 0.35 ^a
6	มะขาม	5.75 ± 1.28 ^a	1.21 ± 0.16 ^a	11.7 ± 0.42 ^b
7	มะขามเทศ	5.48 ± 0.52 ^a	1.19 ± 0.11 ^a	10.9 ± 0.44 ^a
8	ขนุน	5.67 ± 1.37 ^c	0.44 ± 0.15 ^c	5.1 ± 0.41 ^d
9	เสาวรส	5.67 ± 1.23 ^a	1.07 ± 0.12 ^a	11.1 ± 0.22 ^b
10	ลำไย	5.18 ± 1.36 ^a	0.72 ± 0.12 ^b	6.5 ± 0.23 ^c
	กรดแอสคอบิก	2.64 ± 1.23 ^b	12.70 ± 0.02 ^b	23.56 ± 1.23 ^a
	BHT	3.32 ± 0.56 ^b	-	20.04 ± 0.56 ^b
	α-Tocopherol	-	11.50 ± 0.48 ^b	31.55 ± 1.30 ^b

ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) โดยมีข้อมูลต่างกันระบุถึงความแตกต่างทางสถิติ (p < 0.05)

จากผลในตารางที่ 2 สารสกัดจากผลาวของเมล็ดผลไม้ส่วนมากให้ค่า IC_{50} ต่ำแสดงให้เห็นว่ามีค่าการต้านอนุมูลอิสระได้ดี พบในสารสกัดจากแป้งเมล็ดทับทิม (4.61 ± 0.74 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ซึ่งให้อะตอมไฮโดรเจนในการจับอนุมูลอิสระและช่วยทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระได้ดี (Lim et al., 2007) แนวโน้มของสารสกัดจากแป้งเมล็ดผลไม้ที่มีพีนอลิกสูงจะพบว่ามีความ IC_{50} ต่ำเช่นกัน โดย Butsat และ Siriamornpun (2010) ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดที่มีปริมาณพีนอลิกสูงมักสามารถออกซิไดซ์ได้สูงซึ่งจะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีด้วยทำให้ค่า IC_{50} น้อยลง ยังมีรายงานว่าการศึกษาที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่สูงช่วยลดอนุมูล DPPH หรืออนุมูล ABTS ได้ (Wang et al., 2017) สารสกัดจากเมล็ดน้อยหน่า *Annona cinerea* ที่ปลูกใน



ประเทศไนจีเรียแสดง DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติและสารต้านจุลชีพได้ดี (Ololad & Anuoluwa, 2020)

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS

การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระนี้ถือเป็นหนึ่งในเทคนิคที่ละเอียดอ่อนที่สุดกว่าการทดสอบอื่นเนื่องจาก ABTS เป็นสารอนุมูลอิสระที่สลายตัวเป็นอนุมูลอิสระได้ (Alkasim et al., 2018) สารต้านอนุมูลอิสระยับยั้งของอนุมูลเปอร์ออกซิของ ABTS ผลการทดสอบ ABTS ในสารสกัดจากแป้งเมล็ดผลไม้แสดงไว้ในตารางที่ 2 พบว่าค่า ABTS สูงในสารสกัดเอทานอลในแป้งของเมล็ดมะขาม ทับทิม มะขามเทศ และเสาวรส (1.31 ± 0.16 , 1.19 ± 0.11 , 1.17 ± 0.15 และ 1.07 ± 0.12 มิลลิกรัม AC ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามค่าที่ได้ยังคงต่ำกว่าสารที่ใช้เป็นตัวเทียบ (α -tocopherol) อย่างไรก็ตาม การทดสอบ ABTS มีความสัมพันธ์ทางเดียวกับผลที่ได้จากสารประกอบฟีนอลิกและการต้านอนุมูลอิสระรูปแบบอื่นทั้งแบบ DPPH และวิธี FRAB

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (FRAP assay)

การทดสอบ FRAP ช่วยวัดศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง โดยสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างให้อิเล็กตรอนเดี่ยวออกมารีดิวซ์เปลี่ยนธาตุเหล็กเฟอริก (Fe^{3+}) เป็นเฟอรัส (Fe^{2+}) ค่า FRAP ที่สูงแสดงว่ากำลังสูง ในขณะที่ DPPH และ ABTS วัดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระไปยังอนุมูลอิสระ (Li et al., 2006) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างมักถูกเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกซึ่งก็คือวิตามินซีที่ปกติเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี (Du et al., 2014) ค่า FRAP ของสารสกัดจากแป้งจากเมล็ดผลไม้แสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยค่า FRAP สูงสุดพบในสารสกัดหยาบที่ได้จากแป้งเมล็ดทับทิม มะขาม และมะขามเทศ (18.5 ± 0.05 , 11.7 ± 0.02 , และ 10.9 ± 0.04 มิลลิโมลาร์ Fe^{2+} ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ตามลำดับ) และมีรายงานว่า สารสกัดให้ค่า FRAP สูงมักจะสัมพันธ์กับค่า TPC ที่สูงขึ้น (Butsat & Siriamornpun, 2010)

เมล็ดผลไม้ทั้งหมดในการทดลองนี้มีสารฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถต้านอนุมูลอิสระ แต่ค่าการต้านอนุมูลอิสระที่พบจะยังต่ำกว่าสารที่ใช้เป็นตัวเทียบได้แก่ กรดแอสคอร์บิก, BNT และ α -tocopherol ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลที่ได้ต่ำนี้อาจเนื่องจากสารสกัดที่ใช้เป็นสารสกัดสด ไม่ได้ผ่านการทำให้เข้มข้น ทั้งยังอาจมีสารอื่นในเมล็ดผลไม้ปะปนอยู่อาจส่งผลหรือรบกวนการวิเคราะห์ได้

5. สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากแป้งฟลาวด์ของเมล็ดผลไม้ทั้ง 10 ชนิดที่เป็นที่รู้จักทั่วไปมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารสกัดจากแป้งเมล็ดทับทิมที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ มีปริมาณสารฟีนอลิกรวม (112.43 ± 1.1 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (53.55 ± 1.6 มิลลิกรัม CE ต่อกรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) โดยมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (1.17 ± 0.15 มิลลิกรัม AC ต่อกรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) วิธี FRAP (18.5 ± 0.35 มิลลิโมลาร์ของเหล็กเฟอรัส, Fe^{2+} ต่อกรัม น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง) และค่าการขจัด DPPH จากค่า IC_{50} ที่ต่ำ (4.61 ± 0.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับเมล็ดผลไม้ที่ทดสอบอื่น จึงยังมีสารสกัดหยาบจากแป้งเมล็ดผลไม้อื่นที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและอนุมูลอิสระที่น่าสนใจอีกด้วยเช่น สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะขาม เสาวรสและมะขามเทศ ดังนั้นสารสกัดจากฟลาวด์เมล็ดผลไม้ที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ีอาจจะเป็นทางเลือกแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์อื่นที่อาจนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ อาหารเสริม เครื่องสำอางหรือยา จัดเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่เมล็ดผลไม้แทนที่จะทิ้งไว้ประโยชน์ อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประเมินการนำไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์ที่ด้านผลกระทบและความปลอดภัยเป็นสิ่งสำคัญก่อนการใช้ประโยชน์ต่อไป



6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (Silpakorn University Research, Innovation and Creative Fund) และผู้เขียนขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้สนับสนุนการทำงานในครั้งนี้

7. การอ้างอิง

- Abu-Bakar, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A., & Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of Bambang (*Mangifera pajang*) and Tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113, 479-483.
- Ahmed, S., Jubair, A., Hossain, M. A., Hossain, M. M., Azam, M. S., & Biswas, M. (2021). Free radical-scavenging capacity and HPLC-DAD screening of phenolic compounds from pulp and seed of *Syzygium aviflorum* fruit. *Journal of Agriculture and Food Research*, 6, 100203.
- Ahmed, Z. B., Hefied, F., Yousfi, M., Demeyer, K., & Heyden, Y. V. (2022). Study of the antioxidant activity of *Pistacia Atlantica* Desf. Gall extracts and evaluation of the responsible compounds. *Biochemical Systematics and Ecology*, 100, 104358.
- Alkasim, K, Nura, A., Abdulrashid, R., Abdulaziz, R., & Munir, A. (2018). DPPH radical scavenging activity and total phenolic content of rambutan (*Nephelium lappaceum*) peel and seed. *Annals Food Science and Technology*, 19, 774-778.
- Ayu, L., Khrisnashanti, N., & Susila, E. (2017). Salacca coffee made of snake fruit seed waste from paradise island. *Food Science and Technology*, 91, 147-158.
- Barreira, C. M. J., Ferreira, C. F. R. I., Beatriz, M., Oliveira, P. P. J., & Pereira, A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from the chestnut flower, leaf, skins, and fruit. *Food Chemistry*, 107, 1106-1113.
- Butsat, S., & Siriamornpun, S. (2010). Antioxidant capacities and phenolic compounds of the husk, bran, and endosperm of Thai rice. *Food Chemistry*, 119, 606-613.
- David N., Clement O., Edward K., Nii K., Adjoa A., Gaston H., ... Waikhom, S. (2021). Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp, and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *Scientific African*, 11, e00582.
- Deva, K., Setyadjit, K., Seno D. S. H., & Sukasih, E. (2015). Total phenol and antioxidant from seed and peel of ripe and unripe of Indonesian sugar apple (*Annona squamosa* L.) extracted with various solvents. *IOSR Journal of Pharmacy*, 5 (10), 20-25.
- Du, L., Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2014). Antioxidant-rich phytochemicals to miracle berry (*Synsepalum dulcificum*) and an antioxidant activity of its extracts. *Food Chemistry*, 153, 279-284.
- Govindarajan, R., Singh, D., & Rawat A. K. S. (2007). High-performance liquid chromatographic method for the quantification of phenolics in 'Chyavanprash' a potent ayurvedic drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 527-532.
- Hefied, F., Ahmed Z. B., & Yousfi. M. (2020). *In vitro* antioxidant and α -amylase inhibitory potential of methanolic and lipid fractions from *Pistacia atlantica* Desf. Galls. *Journal of Food Process Preservation*, 44(12), 149-156.



- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril, and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127, 1138-1145.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48, 182-188.
- Lim, Y., Lim, T., & Tee, J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103, 1003-1008.
- Liu, C, Zhao, Y., Li, X., Jia, J., Chen, Y., & Hua, Z. (2014). Antioxidant capacities and main reducing substance contents in 110 fruits and vegetables Eaten in China. *Food and Nutrition Sciences*, 5(4), 293-307.
- Mahmood, K., Fazilah, A., Yang, T.A., Sulaiman, S., & Kamilah, H. (2018). Valorization of rambutan (*Nephelium lappaceum*) by-products: Food and non-food perspectives. *International Food Research Journal*, 25(3), 890-902.
- Ololade, Z. S., & Anuoluwa, I. A. (2020). Compositional analysis, antioxidant and antimicrobial potential of the seed extract of *Annona cinerea* Dunal grew in Nigeria. *Global Journal of Medical Research: Microbiology and Pathology*, 20(3), 17-25.
- Pramitkumar, P., Jignesh, P., & Ramchandra, S. (2019). Effect of various physicochemical treatments on seed germination of *Annona squamosa* L. *Asian Journal of Applied Sciences*, 12(3), 128-132.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rakariyatham, K, Dayong, Z., Nuansri, R., & Fereidoon, S. (2020). Sapindaceae (*Dimocarpus longan* and *Nephelium lappaceum*) seed and peel byproducts: Potential sources for phenolic compounds and used as functional ingredients in food and health applications. *Journal of Functional Foods*, 67, 103846.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. T., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 4, 304-309.
- Ugwuona, F. U., & Onweluzo, J. C. (2013). Assessment of antioxidant properties of tamarind fruit pulp and its effect on the storage stability of African breadfruit seed dhal and flour. *Official Journal of Nigerian Institute of Food Science and Technology Nigerian Food Journal*, 31(2), 41-47.
- Wang, M., Sun, X., Luo, W., Božović, S., Gong, C., & Ren, J. (2021). Characterization and analysis of the antioxidant activity of walnut-derived pentapeptide PW5 via nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Food Chemistry*, 339, 128-147.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-baeberan, F. A., Datta, N., & Singanusong, R. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122.



การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม

Studies on antioxidant, antiglycation, and cytoprotective activities of kratom

(Mitragyna speciosa) aqueous leaf extractธัญพัชร บุญสุทธิ¹ จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล² เจริญวงศ์ เปรมประเสริฐ² นฤมล เส่งนนท์² และ สุพัตรา ลิ้มสุวรรณโชติ^{1,*}Tanyapat Boonsut¹, Juraithip Wungsintaweekul², Charoenwong Premprasert², Narumon Sengnon²,
and Supattra Limsuwanchothe^{1,*}¹ภาควิชาเภสัชวิทยา สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา²สาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา¹Department of Pharmacology, Division of Health and Applied Sciences, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla²Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla

*Corresponding author, E-mail: supattra.l@psu.ac.th

บทคัดย่อ

อนุมูลอิสระและผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาไกลเคชั่น (advanced glycation end products, AGEs) มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคและภาวะแทรกซ้อนของโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคตับ เป็นต้น ตามภูมิปัญญาการแพทย์พื้นบ้านทางภาคใต้ นอกจากจะมีการใช้ใบกระท่อมเพื่อรักษาอาการท้องเสียและอาการปวด ใบกระท่อมยังถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของใบกระท่อมที่สกัดด้วยน้ำ (kratom aqueous leaf extract) ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) โดยการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS การยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น (antiglycation) ด้วยวิธี bovine serum albumin-glucose (BSA-glucose) assay และการป้องกันการตายของเซลล์ตับ HepG2 จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้วิธี MTT assay ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดน้ำจากใบกระท่อม มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า % ABTS scavenging ในช่วง 2-88% ตามความเข้มข้นที่ทดสอบ (5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เท่ากับ 0.318 มิลลิโมลต่อกรัม สารสกัดน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกิด AGEs ได้ 95% นอกจากนี้ สารสกัดน้ำความเข้มข้น 12.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังสามารถช่วยลดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ HepG2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่น และมีฤทธิ์ช่วยปกป้องเซลล์ตับจากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งอาจมีส่วนช่วยในรักษาหรือลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานได้

คำสำคัญ: ใบกระท่อม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่น ฤทธิ์ปกป้องเซลล์

Abstract

Free radicals and advanced glycation end products (AGEs) play an important role in the development of and complications associated with chronic diseases such as diabetes, cardiovascular diseases and liver diseases. In Southern Thai folk medicine, kratom leaves have been frequently used as anti-diarrhea and analgesic. And besides, it has been used for treatment of diabetes. This study aimed to investigate the effect of kratom aqueous leaf extract on antioxidant, antiglycation and protective properties. Kratom aqueous leaf extract was evaluated for the abilities to scavenge 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radicals and to inhibit glycation of bovine serum albumin (BSA) by glucose (BSA-glucose assay) in vitro. The cytoprotective effect was performed against hydrogen peroxide-induced toxicity in HepG2 cells using MTT assay. The results showed that the kratom aqueous leaf extract (5-500 µg/mL) exhibited % ABTS scavenging activity in range of 2-88% in dose dependent manner (5-500 µg/mL µg/mL) and the trolox equivalent



antioxidant capacity (TEAC) was 0.318 mmol/g. Kratom aqueous leaf extract at a concentration of 100 µg/mL was able to inhibit AGE formation by 95%. In addition, kratom aqueous leaf extract (12.5-500 µg/mL) could significantly attenuate hydrogen peroxide-induced cytotoxicity ($P \leq 0.05$).

These findings indicated that kratom leaves have antioxidant, antiglycation and cytoprotective effect on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells and may be relevant for diabetic treatment or delaying its complications.

Keywords: Kratom leaves, Antioxidant activity, Antiglycation activity, Cytoprotective effect

1. บทนำ

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติที่เกิดจากการหลั่งอินซูลินบกพร่องหรือการดื้อต่ออินซูลินหรืออาจเกิดจากทั้งสองอย่าง นำไปสู่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และภาวะแทรกซ้อน เช่น เบาหวานขึ้นจอประสาทตาและต้อกระจก (retinopathy cataracts) ผนังหลอดเลือดแดงแข็งตัว (atherosclerosis) ความผิดปกติของเส้นประสาท (neuropathy) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เสียชีวิตหรือทุพพลภาพ (Kaewnarin, Niamsup, Shank, & Rakariyatham, 2014) ความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคเบาหวาน และภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน (Forman & Zhang, 2021) ขณะเดียวกันการมีน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ทั้งสองปัจจัยนี้ส่งเสริมให้เกิดการสร้าง advanced glycation end-products (AGEs) (Goldin, Beckman, Schmidt, & Creager, 2006; Moldogazieva, Mokhosoev, Mel'nikova, Porozov, & Terentiev, 2019) AGEs เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลเคชันหรือปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนและน้ำตาลกลูโคส เกิดการสร้างสารมัธยันตร์ (reactive intermediate) กลุ่ม α -dicarbonyls เช่น methylglyoxal (MGO) ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและไขมัน จนกระทั่งได้สาร AGEs ที่มีความเสถียร ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของเซลล์และการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคมากขึ้น (Goldin et al., 2006) มีการศึกษารายงานว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งไกลเคชัน อาจช่วยสามารถยับยั้งกระบวนการที่กล่าวมาข้างต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารหลายชนิดรวมถึง aminoguanidine มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง AGEs และทำให้ภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวานดีขึ้น แต่ก็อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรง (Dzib-Guerra et al., 2016) สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมักมีสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) โดยเฉพาะกรดฟีนอลิก (phenolic acids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะไปมีผลป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดการชะลอการสร้าง AGEs และนำไปสู่การป้องกันภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคอ้วน โรคหลอดเลือดหัวใจ และยังช่วยลดความเสี่ยงของโรคเบาหวานอีกด้วย (Ramkissoon, Mahomoodally, Ahmed, & Subratty, 2013)

Mitragyna speciosa (Korth.) Havil. หรือ พืชกระท่อม จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นต้นไม้พื้นเมืองพบมากทางภาคใต้ของประเทศไทย นิยมนำไปสดมาเคี้ยวเพื่อลดความเหนื่อยล้าจากการทำงานหนักและทนทานต่อแสงแดดมากขึ้น นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคที่ไม่รุนแรง ได้แก่ แก้วปวด ลดไข้ รักษาท้องร่วงและโรคเบาหวานได้ ใบกระท่อมมีสารประกอบหลักคือ ไมทราไจนีน (mitragynine) และอัลคาลอยด์อื่น ๆ นอกจากนี้ยังประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซาโปนิน (saponins) โพลีฟีนอล (polyphenols) และไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (Meireles et al., 2019) มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเบาหวานและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบกระท่อม พบว่า สารสกัดน้ำจาก

ใบกระท่อมสามารถออกฤทธิ์คล้ายกับอินซูลินในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ L8 ได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังเพิ่มปริมาณโปรตีน GLUT1 ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลในระยะยาว (Purintrapiban et al., 2011) และสารสกัดน้ำ สารสกัดเมทานอลและอัลคาลอยด์ของใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay โดยฤทธิ์ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ total phenolic (Parthasarathy et al., 2009) รวมทั้งยังพบว่าสารสกัดน้ำมีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione transferase (GST) ในหนูขาว ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Azizi et al., 2010) จากฤทธิ์ที่กล่าวมาข้างต้นใบกระท่อมจึงอาจมีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง AGEs และนำไปสู่การป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม และฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ตับ (HepG2) เพื่อให้เกิดความรู้ทางด้านเภสัชวิทยาที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม
- 2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ตับ (HepG2)

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ microplate reader (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Germany) และ fluorescence reader (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode microplate reader, US) สารเคมี ได้แก่ fetal bovine serum (FBS) (Gibco, UK), trypan blue solution 0.4% w/v (Gibco, USA), 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA), dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, France), MTT (Thermo Fisher Scientific, US), hydrogen peroxide 35% SOL (Vidhyasom, Thailand), bovine serum albumin (BSA), (Sigma, USA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma, Canada), potassium persulphate (PanReac AppliChem, Spain), (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid (Sigma, Switzerland), D-(+)-glucose (Sigma, Germany), aminoguanidine hydrochloride (Sigma, USA), trichloroacetic acid (Sigma, USA), sodium phosphate (Dibasic, Anhydrous) (Biotech, Canada), methanol AR (RCI Labscan, Thailand) และ ethanol AR (RCI Labscan, Thailand) อุปกรณ์ ได้แก่ 10 mL (1/10) serological pipet (SPL life sciences, Korea), flask 75 cm² Nunclon Della Surface (Thermo Fisher Scientific, USA), Nunc 96-well plate (Thermo Fisher Scientific, USA) และ Nunc 96-black well plate (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม

ใบกระท่อมเก็บจากแหล่งธรรมชาติในอำเภอบ้านนาสาร จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้รับการตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์โดย รศ.ดร.ภญ.จุไรทิพย์ หวังสันทวีกุล และจัดเก็บ voucher specimen ที่พิพิธภัณฑ์พืชแห่งมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (PSU Herbarium) (Wungsintaweekul, J. N6/006 (PSU)) ล้างใบกระท่อม ผึ่งให้แห้ง และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสและบดเป็นผง สกัดผงใบกระท่อมด้วยน้ำ โดยนำผงใบกระท่อม 400 กรัม ต้มในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 60 นาที กรองผ่านผ้า



ขาวบาง สกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization เก็บสารสกัดน้ำที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกระพ้อม ด้วยวิธี ABTS assay

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกระพ้อมดำเนินการโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Manok และ Limcharoen (2015) โดยเตรียมสารละลาย ABTS^{•+} โดยเติมสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 7.35 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ตั้งส่วนผสมทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้งาน เจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ด้วยเอทานอลและตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ค่าที่ได้ควรอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.02 ทำการทดสอบใน 96-well plate โดยเติมสารละลาย ABTS^{•+} 190 ไมโครลิตร และสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน trolox 10 ไมโครลิตร ผสมสารละลายเข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร (SPECTROstar Nano microplate reader) ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} แสดงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (% ABTS scavenging activity) และแสดงผลเป็นสารมาตรฐาน trolox ในหน่วยของ มิลลิโมล ต่อสารสกัดตัวอย่าง 1 กรัม

$$\% \text{ABTS radical scavenging activity} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น } (A_0) - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง } (A_1)) \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น } (A_0)}$$

3.2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นของสารสกัดน้ำจากใบกระพ้อม ด้วยวิธี bovine serum albumin-glucose (BSA-glucose)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นดัดแปลงวิธีการจาก Yagi และคณะ (2013) โดยผสมสารตัวอย่าง (1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารมาตรฐาน aminoguanidine (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับสารละลายกลูโคส 800 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย BSA 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเติม 100% trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว $13000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม สารละลาย 5% TCA นำ pellets ที่มี AGEs-BSA มาละลายด้วย 10 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer saline (pH 10) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร วัดความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่นของการกระตุ้น (excitation wavelength) 370 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการคายแสง (emission wavelength) 440 นาโนเมตร (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode) โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการสร้าง AGEs ดังนี้

$$\% \text{การสร้าง AGEs} = \frac{\text{การเรืองแสงของตัวอย่างทดสอบ} \times 100}{\text{การเรืองแสงของกลุ่มควบคุม}}$$

3.2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ตับ (HepG2) (ATCC® HB-8065™) ในฟลาสก์เลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ในอาหารเพาะเลี้ยงชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (low glucose) ที่มี fetal bovine serum (FBS) 10% และบ่มในตู้บ่มเพาะเซลล์ (CO₂ incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO₂ 5% เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน เพาะเลี้ยงเซลล์จนมีปริมาณ 80-90% (80-90% confluence) ทำการ subculture และนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป



3.2.5 การศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจากวิธีของ Kong และคณะ (2016) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตับ (HepG2) ใน 96-well plate (2×10^4 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเพาะเลี้ยง low glucose DMEM ที่มี FBS 10% และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ CO₂ 5% จนเซลล์มีจำนวน 80% confluence แล้วบ่มเซลล์ด้วยสารตัวอย่าง (12.5- 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ที่มีสารสกัดร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (1.5 มิลลิโมลาร์) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ปราศจากซีรั่ม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร อีก 6 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย 10 mM phosphate-buffered saline (pH 7.4) 1 ครั้ง และเติมสารละลาย MTT (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูสารละลาย MTT ออกและเติม dimethylsulfoxide (DMSO) 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วย (SPECTROstar Nano microplate reader) คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์โดยใช้สูตร

$$\% \text{ ความมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของหลุมที่ทดสอบด้วยสารสกัด} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของหลุมที่ไม่มีสารสกัด}}$$

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

ข้อมูลของการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error, SEM) โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละผลลัพธ์มาจาก 3 การทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน (n=3) และทำสามซ้ำในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23 ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) และทดสอบหลังการวิเคราะห์ (post hoc test) โดยใช้วิธี least-significant different (LSD) ผลลัพธ์ที่มีค่า $p \leq 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

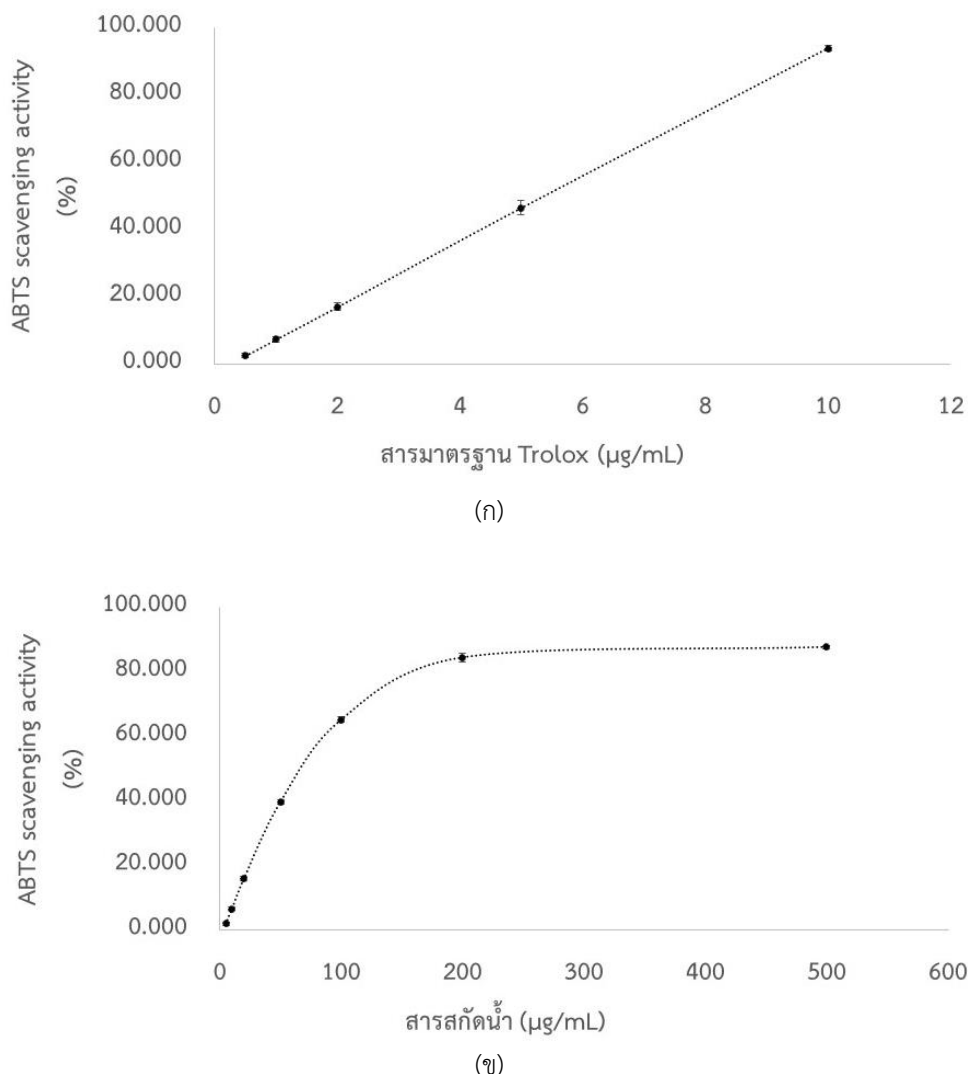
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดน้ำจากใบกระเทียม

การสกัดผงใบกระเทียม 400 กรัม ด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization ได้น้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 68.55 กรัม คิดเป็นร้อยละ 17.14 และทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก แทนนิน ฟลาโวนอยด์และสารไมทราเจนีนก่อนการทดสอบเรียบร้อยแล้ว (ไม่แสดงข้อมูล)

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบกระเทียม ด้วยวิธี ABTS assay

การทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} รายงานผลด้วยค่า % ABTS scavenging activity และค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากผลการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัดน้ำจากใบกระเทียม (5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) มีค่า % ABTS scavenging activity ในช่วง 2-88% ขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน trolox (0.5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) มีค่า % ABTS scavenging activity ในช่วง 2-94% (ภาพที่ 1) และมีค่า TEAC เท่ากับ 0.318 มิลลิโมลต่อกรัม



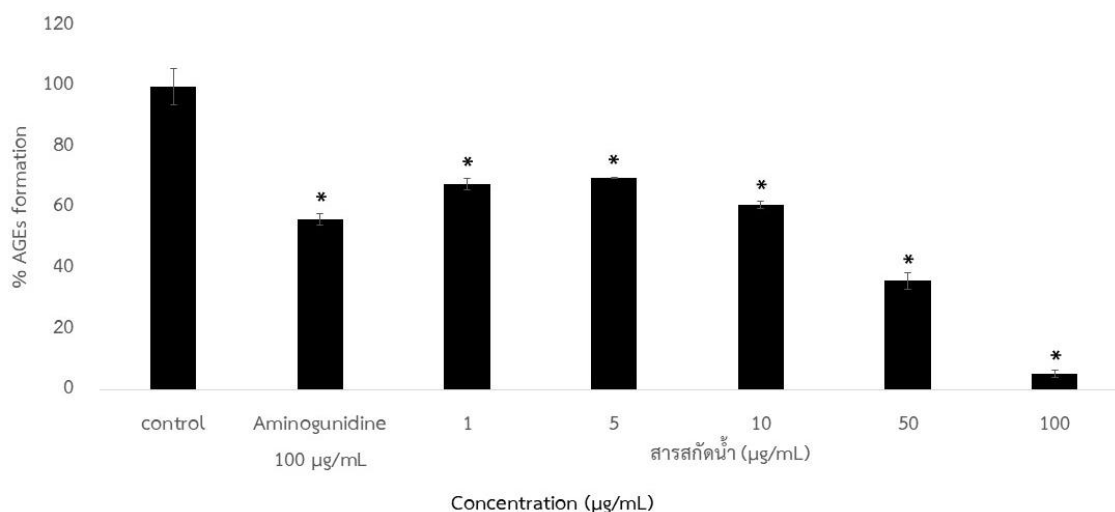
ภาพที่ 1 ผลของ ABTS scavenging activity ของ (ก) สารมาตรฐาน trolox และ (ข) สารสกัดน้ำจากใบกระท่อม ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SEM (n = 3)

4.3 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไกลเคชั่นของสารสกัดน้ำจากใบกระท่อม ด้วยวิธี BSA-glucose assay

AGEs เกิดจากปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนและกลูโคส ซึ่งอนุมูลอิสระมีส่วนทำให้เกิด AGEs ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงสามารถยับยั้งปฏิกิริยาไกลเคชั่นและการก่อตัวของ AGEs ได้ การทดสอบโดยใช้วิธี BSA-glucose assay การทดสอบวิธีนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไกลเคชั่นในขั้นตอน late stage จะให้ AGEs ซึ่งเป็นสารเรืองแสงมีสีเหลืองน้ำตาล ไม่ละลายน้ำและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (Singh, Bali, Singh, & Jaggi, 2014) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดน้ำสามารถยับยั้งการเกิด AGEs โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็นไปตามความเข้มข้นที่ทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการสร้าง AGEs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ถึง 95% ขณะที่ aminoguanidine 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ได้ 44% (ภาพที่ 2) การศึกษาปัจจุบันพบว่าสารจากธรรมชาติหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ เทอร์พีนอยด์ และอัลคาลอยด์ มีฤทธิ์ยับยั้งการก่อตัวของ AGEs ผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระ การจับกับสาร dicarbonyls และการลดระดับน้ำตาลในเลือด (Ramkissoon et al., 2013; Song, Liu, Dong, Wang, &



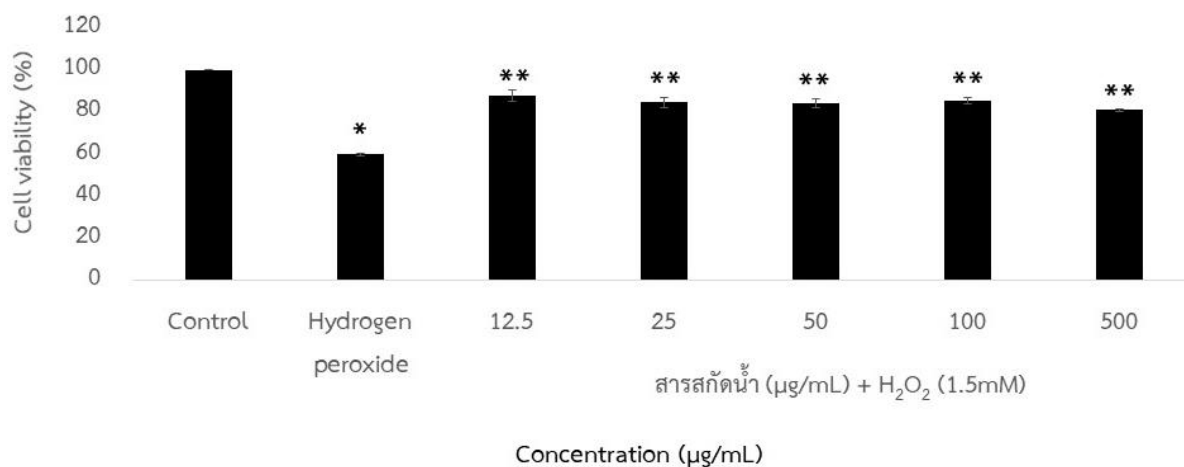
Zhang, 2021) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนินและไมทราเจนินในสารสกัดน้ำพบว่ามีการประกอบเหล่านี้อยู่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดน้ำจากใบพืชกระท่อมประกอบด้วยสารฟีนอลิก (66.00 ± 1.23 มิลลิกรัมต่อกรัม) และฟลาโวนอยด์ (28.19 ± 2.28 มิลลิกรัมต่อกรัม) และมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (Parthasarathy et al., 2009)



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดน้ำ (1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ aminoguanidine 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการสร้าง AGEs ทดสอบโดยวิธี BSA-glucose assay ข้อมูลแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SEM (n = 3) โดย *P<0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control)

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การศึกษาผลการป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ตับ (HepG2) ด้วยสารสกัดน้ำที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (12.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay เซลล์ที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดเท่ากับ 60% ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) ขณะที่เซลล์ที่ได้รับการบ่มด้วยสารสกัดน้ำก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถป้องกันการตายของเซลล์ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ เพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 21-28% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว (P<0.05) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ตับ (HepG2) ของสารสกัดขึ้นน้ำ (12.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) ในการป้องกันเซลล์จากการตายของเซลล์ที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทดสอบโดยใช้วิธี MTT assay แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SEM (n = 3) โดย *P<0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control), **P<0.05 มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว

5. สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถยับยั้งการเกิด AGEs และป้องกันการตายของเซลล์ตับ (HepG2) จากการเหนี่ยวนำภาวะ oxidative stress ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่สามารถนำใบกระท่อมมาใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวานได้ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดน้ำเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาและพัฒนาใบกระท่อมในทางการแพทย์ต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2563 และทุนอุดหนุนจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบพระคุณสาขาวิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

- Azizi, J., Ismail, S., Mordi, M., Ramanathan, S., Said, M., & Mansor, S. (2010). In vitro and in vivo effects of three different *Mitragyna speciosa* Korth leaf extracts on phase II drug metabolizing enzymes-glutathione transferases (GSTs). *Molecules*, 15(1), 432-441. doi: 10.3390/molecules15010432
- Dzib-Guerra, W. D., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Derbré, S., Blanchard, P., Richomme, P., & Peña-Rodríguez, L. M. (2016). Anti-advanced glycation end-product and free radical scavenging activity of plants from the Yucatecan flora. *Pharmacognosy Research*, 8(4), 276-280. doi: 10.4103/0974-8490.188883
- Forman, H., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(1), 689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1



- Goldin, A., Beckman, J. A., Schmidt, A., & Creager, M. A. (2006). Advanced glycation end products sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, 114(6), 597-605. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854
- Kaewnarin, K., Niamsup, H., Shank, L., & Rakariyatham, N. (2014). Antioxidant and antiglycation activities of some edible and medicinal plants. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(1), 105-116.
- Kong, K. W., Mat-Junit, S., Aminudin, N., Hassan, F. A., Ismail, A., & Abdul Aziz, A. (2016). Protective effects of the extracts of *Barringtonia racemosa* shoots against oxidative damage in HepG2 cells. *PeerJ*, 4, e1628. doi: 10.7717/peerj.1628.
- Manok, S., & Limcharoen, P. (2015). Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-Hom Thepphachit. *Advanced Science*, 15(1), 106-117.
- Meireles, V., Rosado, T., Barroso, M., Soares, S., Gonçalves, J., Luís, A., ... Gallardo, E. (2019). *Mitragyna speciosa*: Clinical, toxicological aspects and analysis in biological and non-biological samples. *Medicines*, 6(1), 35. doi: 10.3390/medicines6010035
- Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-14. doi: 10.1155/2019/3085756
- Parthasarathy, S., Bin Azizi, J., Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Said, M., & Mansor, S. M. (2009). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae family) leaves. *Molecules*, 14(10), 3964-3974. doi: 10.3390/molecules14103964
- Purintrapiban, J., Keawpradub, N., Kansanalak, S., Chittrakarn, S., Janchawee, B., & Sawangjaroen, K. (2011). Study on glucose transport in muscle cells by extracts from *Mitragyna speciosa* (Korth) and mitragynine. *Natural Product Research*, 25(15), 1379-1387. doi: 10.1080/14786410802267627
- Ramkissoon, J. S., Mahomoodally, M. F., Ahmed, N., & Subratty, A. H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(7), 561-569.
- Singh, V., Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 18(1), 1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1
- Song, O., Liu, J., Dong, L., Wang, X., & Zhang, X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140(1), 111750. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111750
- Yagi, S., Drouart, N., Bourgaud, F., Henry, M., Chapleur, Y., & Laurain-Mattar, D. (2012). Antioxidant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots. *South African Journal of Botany*, 84(1), 124-127.



ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์มของโสมต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส

Antibacterial activity and antibiofilm activity of *Sesbania javanica* Miq. against opportunistic bacteria

วิสาตรี คงเจริญสุนทร* และ พรพิมล บุตะเขียว

Wisatre Kongcharoensuntorn* and Pondpimon Butakheiw

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

*Corresponding author, E-mail: wisatre@go.buu.ac.th

บทคัดย่อ

โสม (*Sesbania javanica* Miq.) เป็นผักพื้นบ้านที่นิยมนำดอกมาใช้รับประทานกันทั่วไป และดอกโสมมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของส่วนสกัดเอทานอลจากดอกโสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสบางชนิดและการสร้างไบโอฟิล์ม ผลของการศึกษาพบว่าดอกและใบโสมสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 10-80 mg/mL ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย พบว่าส่วนสกัดจากดอกโสมสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในช่วงเวลาตั้งแต่ 4-24 ชั่วโมง และดอกโสมสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ดีที่สุดในช่วงเวลาที่ 12 และประสิทธิภาพของการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เท่ากับ 69.60 % ดังนั้นโสมจึงมีศักยภาพที่อาจจะพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ: โสม ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

Abstract

Sesbania javanica Miq. is a medicinal plant of which edible flowers have antibacterial activities against several bacteria. This research was aimed to study the antibiofilm activity of ethanol extract from *S. javanica* against some opportunistic bacteria. The result of antibacterial activity revealed that both leaves and flowers of *S. javanica* extract showed antibacterial activities against some opportunistic bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, as shown MICs were between 10-80 mg/mL. As a result of antibiofilm activity, flower extract from *S. javanica* was been able to inhibit biofilm formation of *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 at the times of 4-24 hours after inoculum. In addition, flower extract from *S. javanica* indicated the best antibiofilm activity against *E. coli* ATCC 25922 at 12 hours after inoculum, and %inhibition was 69.6 %. Thus, *S. javanica* could be potentially developed as a therapeutical antibiotic.

Keywords: *Sesbania javanica* Miq., Antibacterial activity, Antibiofilm activity

1. บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในโรงพยาบาล โดยทั่วไปสามารถพบอุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสในหลายระบบของร่างกาย เช่น ระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ และแผลผ่าตัด เป็นต้น ซึ่งเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* (Reygaert, 2018) เชื้อกลุ่มนี้มีการพัฒนาการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา และเริ่ม



พบการแพร่กระจายของเชื้อเพิ่มมากขึ้นทั้งในโรงพยาบาลและในสิ่งแวดล้อม (Gupta & Birdi, 2017) ทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อดื้อยา เนื่องจากมีการนำยาปฏิชีวนะมาใช้ในการผสมแทนสารกันบูดในอาหารของมนุษย์ หรืออาหารสัตว์ ทำให้การควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยาในสิ่งแวดล้อมและในโรงพยาบาลเป็นไปได้ยาก ซึ่งส่งผลเสียต่อผู้ป่วยที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสเพิ่มมากขึ้น (Gupta & Birdi, 2017) ผลกระทบดังกล่าว ก่อให้เกิดความยากลำบากในการเลือกใชยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม จึงต้องเลือกใชยาปฏิชีวนะอนุพันธ์ที่สูงขึ้น ซึ่งอาจเกิดภาวะแทรกซ้อน หรือต้องใชยาปฏิชีวนะปริมาณที่มากขึ้นในการรักษาโรคติดเชื้อดื้อยาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ดังนั้นนักวิจัยจึงต้องหายาปฏิชีวนะชนิดใหม่มาทดแทนยาชนิดเดิมที่รักษาไม่ได้ผล แต่การคิดค้นยาปฏิชีวนะต้องใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายในการวิจัยค่อนข้างสูง ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการลดการเกิดอุบัติการณ์การดื้อยา คือการหาพืชสมุนไพรมาใช้เป็นทางเลือกเพื่อมาทดแทนยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสมุนไพรมีการใช้อย่างยาวนาน มีแนวโน้มปลอดภัย และพบสารสกัดที่หลากหลาย ที่อาจจะสามารถเสริมฤทธิ์กันเพื่อยับยั้งการเจริญ และฆ่าเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส ดังนั้นการใช้สมุนไพรจึงอาจจะสามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคติดเชื้อ เพื่อใช้ในทางการแพทย์ในอนาคต (Lee et al., 2014; Subramani et al., 2017; Reygaert, 2018)

โสน เป็นไม้ล้มลุก มีลักษณะเป็นพุ่ม ขึ้นตามหนองน้ำ และออกดอกในช่วงปลายฤดูฝนประมาณเดือนกันยายนตุลาคม (สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2557) โสนสามารถหาได้ง่าย ราคาถูก และมีคุณค่าทางโภชนาการ เป็นที่นิยมในการรับประทาน มีฤทธิ์ต่อต้านการกลายพันธุ์ของเซลล์ที่อาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ป้องกันโรคหลอดเลือดและหัวใจขาดเลือด หรือผนังหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของโสน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ (Tangvarasittichai et al., 2005) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lee et al., 2014) สารสำคัญที่พบในโสน ได้แก่ genistein, prunetin, 4-hydroxycinnamic acid และ quercetin 3-(2(G)-rhamnosyl-rutinoside สารดังกล่าว เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เช่น *B. subtilis*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* และ *S. Aureus* (Tangvarasittichai et al., 2005) อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย แนวทางหนึ่งในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสคือลดโอกาสการเกาะติดผิวของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ โดยการลดการสร้างไบโอฟิล์มเคลือบผิวที่แบคทีเรียสัมผัส เช่น วัสดุและอุปกรณ์ทางการแพทย์

การสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) คือการรวมกลุ่มกันของเชื้อแบคทีเรียที่เกาะติดบนพื้นผิวที่มีความชื้นสูง โดยการผลิตพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นเมทริกซ์ ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เพื่อป้องกันกันภัยทำให้กำจัดแบคทีเรียได้ยากยิ่งขึ้น (Rabin et al., 2015) ปัจจุบันพบรายงานการวิจัยของสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากสมุนไพร ที่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียมากมาย เช่น ทรานส์-ซินนามาลดีไฮด์ จากเปลือกของต้นอบเชย เทอร์พีน น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และกานพลู สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม เป็นต้น (Gupta et al., 2017; Silva et al., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส และกลไกการยับยั้งการเกาะติดผิวของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นด่านแรกที่จะช่วยลดอัตราการติดเชื้อจากแบคทีเรียฉวยโอกาส

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อสำรวจฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ฉวยโอกาส (antibacterial activity) ของโสน
- 2.2 เพื่อศึกษาการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (antibiofilm activity) ต่อเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสของโสน

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ rotary evaporator (Buchi, Switzerland), UV-Visible spectrophotometer (PerkinElmer, USA), microplate reader (VersaMax, U.S.A.) สารเคมี ได้แก่ 0.01% crystal violet (Panreac, E.U.), 100% ethanol (technical



grade), phosphate-buffered saline (PBS) (VWR Chemicals, France) และ dimethyl sulfoxide (DMSO) (Vivantis Technologies, Malaysia) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียได้แก่ nutrient agar (NA) (Merck, Germany), Mueller-Hinton Broth (MHB) (Becton Dickinson and Company, USA) ยาปฏิชีวนะออกซีเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลิน (Sigma-Aldrich, Germany)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บและการเตรียมสมุนไพร

เก็บตัวอย่างโสมจากใบและดอกโสม จากตำบลดงพระอาจารย์ อำเภอดงคราย จังหวัดนครนายก ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง ตุลาคม 2560 และได้รับการพิสูจน์โดยนักพฤกษศาสตร์ ดร. เบญจวรรณ ชีวปรีชา รหัสพรรณไม้อ้างอิงคือ ScBu-MS01 (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2557) นำมาหั่นเป็นเส้นและบดให้ละเอียด ทำความสะอาดและนำไปตากแดดก่อนทำการสกัด

3.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลายและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำใบและดอกโสมจำนวนอย่างละ 2 กิโลกรัม มาสกัดด้วย เอทานอล:น้ำ อัตราส่วน (80:20) ปริมาตร 1500 mL ทิ้งไว้ 3 วัน ให้ตกตะกอน นำส่วนที่ละลายไปทำให้แห้งโดยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้จำนวน (crude extract) ของใบและดอกโสม 18.14% และ 10.28% ตามลำดับ

หาองค์ประกอบของฟีนอลิก (phenolic content) ด้วยวิธีของ Misbah, Abdul และ Aminudin (2013) โดยผสม Folin-Ciocalteu reagent 0.1 mL กับสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วเติม Na_2CO_3 solution 0.3 mL แล้วนำไปบ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดความขุ่นที่ O.D 765 nm ใช้ UV-spectrophotometer

หาองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธีของ Srisawat และคณะ (2010) โดยนำสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 500 μL มาผสมกับ NaNO_2 0.3 mL แล้วเติม AlCl_3 0.03 mL บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากบ่มแล้ว ให้นำไปวัดความขุ่นที่ O.D. 510 nm ด้วย UV spectrophotometer

หาองค์ประกอบทางเคมีเชิงคุณภาพของใบและดอกโสม โดยการหาสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) โดยนำส่วนสกัดจากโสม แด้ม (spotting) ลงบนแผ่น TLC ซึ่งมีตัวทำละลายชนิดต่างๆ เช่น chloroform: ethyl acetate (3:2), chloroform: ethyl acetate: acetone 5:1:4 เป็นต้น แล้วนำไปส่องด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 256 nm จากนั้นเตรียมส่วนสกัดของใบและดอกโสม ความเข้มข้น 80 mg/mL โดยละลายด้วย 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อไป

3.2.3 แบคทีเรียที่นำมาศึกษา

เชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาสได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จังหวัดชลบุรี ได้แก่ *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* และ *S. aureus* ATCC 25923 และยืนยันโดยการตรวจสอบด้วยวิธีการย้อมแกรมและทดสอบทางชีวเคมีด้วย API 20 NE system จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหาร MHB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.4 สารวจฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ใช้วิธี broth microdilution assay (CLSI, 2017) โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงใน MHB มาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 ให้มีปริมาณ 1×10^8 CFU/mL จากนั้นเตรียมส่วนสกัดโสม 80 mg/mL ปริมาตร 100 μL มาเจือจางด้วย MHB 100 μL เพื่อให้มีความเข้มข้นลดลงทีละสองเท่า (0.625-80 mg/mL) แล้วจึงนำสารที่เจือจางปริมาตร 100 μL มาผสมกับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (ปริมาณ 1×10^8 CFU/mL) ปริมาตร 100 μL จากนั้นนำส่วนสกัดโสมในแต่ละ treatment ไปบ่มที่อุณหภูมิ



37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และ ทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ โดยเทียบกับยาแอมพิซิลลิน และออกซีเตตราซัยคลิน จากนั้นวัดความขุ่นของเชื้อแบคทีเรียที่ O.D. 610 ด้วย microplate reader (VersaMax, U.S.A.) บันทึกผล เพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)

3.2.5 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย

เป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Awolola และคณะ (2014) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปปรับความขุ่นโดยเทียบกับมาตรฐาน MacFaland 0.5 (1.5×10^8 CFU/mL) จากนั้นแบ่งหลอดทดลอง เป็น 3 หลอด ได้แก่ ชุดทดลอง (sample) ที่ส่วนสกัดจากโสม ความเข้มข้นเท่ากับ 1XMIC และ 2XMIC ปริมาตร 500 μ L แล้วเติมแบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5×10^8 CFU/mL ปริมาตร 500 μ L NB 1000 μ L และเติม PBS 500 μ L ชุดควบคุม (negative control) เติมเซลล์แบคทีเรีย ความเข้มข้น 1.5×10^8 CFU/mL ปริมาตร 500 μ L เติม nutrient broth (NB) 1,000 μ L และ phosphate-buffered saline (PBS) 500 μ L ลงในหลอดทดลอง ชุด blank ที่ใส่น้ำกลั่น ปริมาตร 500 μ L, nutrient broth (NB) 1,000 μ L และ phosphate-buffered saline (PBS) 500 μ L นำชุดทดสอบ ทั้งหมดไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง (แต่ละชุดทดสอบจะทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และนำไปเปรียบเทียบกับชุด positive control คือ ยาออกซีเตตราซัยคลิน 80 mg/mL) เมื่อครบเวลาบ่ม นำแบคทีเรียทุกชุดการทดสอบที่มีเชื้อแบคทีเรียสร้างไบโอฟิล์ม มาล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ได้เกาะติดผิว (non-adherent cells) ออกไป 2 ครั้ง ด้วย PBS 1,000 μ L จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียไป fix ด้วย methanol ปริมาตร 200 μ L เพื่อให้โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียตรึงอยู่บนผิวแก้วของหลอดทดลอง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ตรึงไว้บนผิวแก้ว (แผ่นไบโอฟิล์ม) มาย้อมสีแบคทีเรีย ด้วย 0.01% crystal violet ปริมาตร 40 μ L ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วใส่ 33 % glacial acetic acid ปริมาตร 40 μ L เพื่อหยุดปฏิกิริยาและฆ่าเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (O.D. 600) บันทึกค่า O.D. ที่ 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำค่า O.D. มาคำนวณค่าการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (% inhibition) ดังสมการ

$$(\%) \text{ inhibition} = (\text{OD}_{\text{negative control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / (\text{OD}_{\text{negative control}}) \times 100$$

O.D. Sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ

O.D. Negative Control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

3.2.6 การทดสอบทางสถิติ

สำหรับการทดลองทั้งหมดจะทำสามซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของการทดลอง ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (two-way ANOVA) ของข้อมูลทั้งหมด และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การยับยั้งการเกาะติดผิว (biofilm) กับเวลา โดยใช้โปรแกรม Minitab version 17 ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโสม

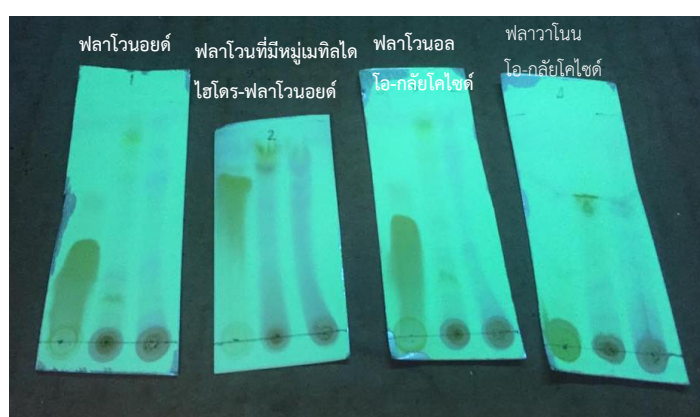
ผลการวิเคราะห์โพลีฟีนอลชนิดต่างๆของส่วนสกัดจากใบและดอกโสม โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) ด้วยการใช้แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ เป็นตัวกลาง ซึ่งมีตัวทำละลายอยู่ 4 ชนิด พบว่าส่วนสกัดรวมใบและดอกโสม พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนที่มีหมู่เมทิลไดไฮโดรฟลาโวนอยด์ ฟลาโวนอล ไอกลัยโคไซด์ และฟลาโวนไอกลัยโคไซด์

ผลการวัดปริมาณฟีนอลิกรวม พบว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสมมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 35.93 ± 0.0004 และ 34.81 ± 0.0008 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลกติกต่อกรัมของส่วนสกัด ตามลำดับ และส่วนสกัดจากใบและดอกโสมมีปริมาณฟีนอลิก



ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ของส่วนสกัดจากใบและดอกโสน พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 24.11 ± 0.002 และ 23.90 ± 0.004 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์เซตินต่อกรัมของส่วนสกัดตามลำดับ และมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในส่วนสกัดจากใบและดอกโสน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของโสน แสดงให้เห็นว่า พบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ในใบและดอกโสน มีปริมาณสัดส่วนที่พอ ๆ กัน และพบสารกลุ่ม flavonol glycoside เช่นเดียวกับรายงานของ Tangvarasittichai และคณะ (2005) ที่พบสารกลุ่มฟีนอลิกในดอกโสน ได้แก่ β -sitosterol, prunetin, genistein, 4-hydroxycinnamic acid, sitosterol-3-O-D-glucopyranoside, flavonol glycoside และ quercetin rhamnosylrutinoside



ภาพที่ 1 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในใบและดอกโสน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

4.2 สำนวจฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสของโสน

ผลการสำวจฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียฉวยโอกาสของใบและดอกโสน แสดงดังตารางที่ 1 โดยพบว่าส่วนสกัดจากใบและดอกโสนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ที่นำมาทดสอบยกเว้น *K. pneumoniae* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. baumannii*, *B. subtilis*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 10-80 mg/mL อย่างไรก็ตามส่วนสกัดของดอกและใบโสนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่าออกซิเตตราซัยคลินและแอมพิซิลลิน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกดอกโสนเพื่อไปทดสอบหากลไกการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มต่อไป เนื่องจากคนนิยมบริโภคดอกโสนมากกว่าใบ

สารสกัดที่ได้จากดอกและใบของโสนจะประกอบด้วยสารบริสุทธิ์หลายประเภทที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ flavonoid, flavonol glycoside และ quercetin 3-2(G)-rhamnosylrutinoside ซึ่งสารกลุ่มนี้ มีรายงานพบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ดังนั้นส่วนสกัดจากดอกและใบของโสนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ (Tangvarasittichai et al., 2015) กลไกของสารกลุ่ม phenolic และ flavonoid ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย อาจจะเกิดจากสารบางกลุ่มในใบและดอกโสนไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูรั่ว หรือสารเหล่านี้ไปส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย จึงอาจจะช่วยส่งเสริมให้ยาปฏิชีวนะเข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น (Gupta & Birdi, 2017; Silva et al., 2019)



ตารางที่ 1 ผลการสำรวจฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากใบและดอกโสนด้วยวิธี broth microdilution assay

แบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/mL)			
	ใบ	ดอก	เตตราซัยคลิน	แอมพิซิลลิน
<i>B. subtilis</i>	20	20	0.001	0.020
<i>S. aureus</i> ATCC 25922	40	40	0.001	0.001
<i>A. baumannii</i>	10	40	20	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	40	40	0.01	0.08
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	20	0.31
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	40	10	1.25	2.5
<i>P. aeruginosa</i>	80	80	40	-

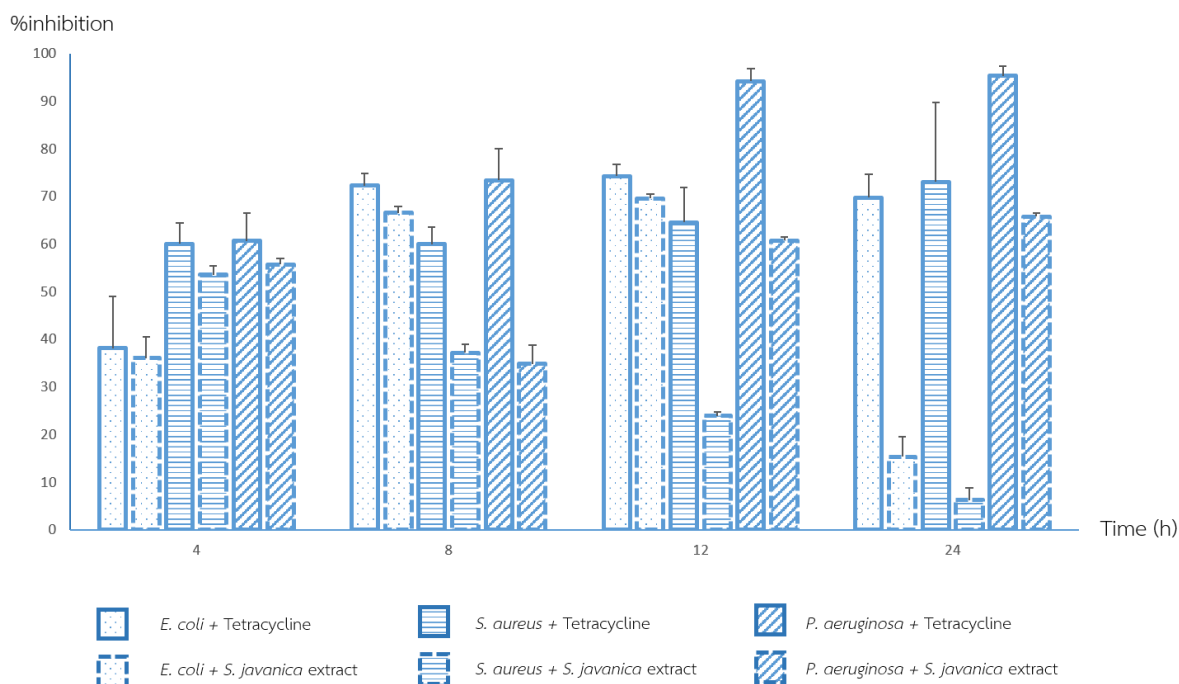
หมายเหตุ - หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

4.3 ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของโสน

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของดอกโสนแสดงผลดังภาพที่ 2 จากกราฟแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากดอกโสนสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยส่วนสกัดจากดอกโสน สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ดี ในช่วงเวลา 4- 24 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีค่า (%inhibition) เท่ากับ 74.25 ± 2.42 ในชั่วโมงที่ 4 รองลงมา คือ *P. aeruginosa* ATCC 27853 (73.42 ± 6.60 % ในชั่วโมงที่ 8) และ *S. aureus* ATCC 25923 (53.51 ± 1.98 ในชั่วโมงที่ 4) ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของส่วนสกัดจากดอกโสนกับยาปฏิชีวนะ พบว่ายาออกซีเตตราซัยคลิน สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าส่วนสกัดจากดอกโสน และมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ในชั่วโมงที่ 12 (94.15 ± 2.65 %) และในชั่วโมงที่ 24 (95.26 ± 2.06 %)

ดอกโสนมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้เช่นเดียวกับดอกแค ซึ่งพบรายงานการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. aureus* ซึ่งอาจเกิดจากการสารถรรณของโสน โพลีฟีนอล สารฟลาโวนอยด์ สารซาโปนิน และสเตียรอยด์ มีผลทำให้แบคทีเรียผลิตโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่จำเป็นต่อการสร้างไบโอฟิล์มลดลง จึงส่งผลไปลดการสร้างเมทริกซ์ของชั้นไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย (Gandhi et al., 2017) และสารที่พบมากในโสน คือ ฟลาโวนอยด์ ซึ่งอาจจะส่งผลไปช่วยยับยั้งการเกาะติดผิวของเซลล์ที่ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือเข้าจับกับกรดนิวคลีอิกของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถจำลองดีเอ็นเอ หรือไปรบกวนและทำลายการซึมผ่านของอิลีคโตรไลต์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียจึงไปลดการสร้างไบโอฟิล์ม (Gupta & Birdi, 2017) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาของการใช้ crude extract เบื้องต้นเท่านั้น จึงต้องนำสารสกัดจากโสนไปวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์และนำไปทดสอบหาฤทธิ์การสร้างไบโอฟิล์มในลำดับต่อไป

ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของโสน อาจเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่จะช่วยลดอัตราการเข้าสู่เซลล์มนุษย์ จึงอาจช่วย ไปช่วยลดผลอุปถัมภ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส อย่างไรก็ตามแม้ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายาออกซีเตตราซัยคลิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้กันในปัจจุบันก็ตาม แต่ถ้าถ้านำมาผสมกับยาปฏิชีวนะก็อาจจะช่วยลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น ลดความเป็นพิษต่อตับและไตของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น การศึกษานี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ได้ เช่น สามารถนำผลการศึกษาที่ได้นี้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพิจารณานำใบและดอกโสน มาเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา แต่ควรมีการทดสอบความเป็นพิษและความปลอดภัยของสารสกัดก่อนนำมาใช้ในการรักษาจริง



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของดอกโสน (80 mg/mL) และยาออกซีเตตราซัยคลิน (80 mg/mL) ต่อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923

5. สรุปผลการวิจัย

ส่วนสกัดจากใบและดอกโสนที่สกัดด้วยเอทานอล พบสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ 4 กลุ่ม ส่วนสกัดใบและดอกโสนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียฉวยโอกาสหลายชนิด และส่วนสกัดจากดอกโสนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 25923 ดังนั้นโสนจึงมีศักยภาพเพื่อใช้เสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะ หรือใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะเพื่อลดผลข้างเคียงของยาปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามควรนำโสนไปทดสอบความเป็นพิษก่อนใช้งานจริง

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ให้การสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ทำวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์จัดหาเชื้อแบคทีเรีย

7. เอกสารอ้างอิง

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กรมป่าไม้. (2557). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์*. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557.

กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

Awolola G. V., Koorbanally N. A., Chenia H., Shode F. O., & Baijnath H. (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* Warb. subsp. *sansibarica* (Moraceae) extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative medicines*, 11(3), 124-131.



- CLSI. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Gandhi, A. D., Vizhi D. K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Rajeswari, V. D., & Babujanathanam, R. (2017). In vitro anti-biofilm and anti-bacterial activity of *Sesbania grandiflora* extract against *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry and Biophysics Report*, 12, 193-197.
- Gupta, P., D., & Birdi, T. J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 8(4), 266-275.
- Lee, J. H., Cho, S., Paik, H. D., Choi, C. W., Nam, K. T., Hwang, S. G., & Kim, S. K. (2014). Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some Thai edible plants as an alternative for antibiotics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(10), 1461-1468.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.
- Misbah, H., Abdul, A. A., & Aminudin, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 118. doi: 10.1186/1472-6882-13-118
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 26(3), 482-501.
- Silva, G. N. S. D., Primon-Barros, M., Macedo, A. J., & Gnoatto, S. C. B. (2019). Triterpene derivatives as a relevant scaffold for new antibiofilm drugs. *Biomolecules*, 9, 58. doi: 10.3390/biom9020058
- Srisawat, U., Panunto, W., Kaendee, N., Tanuchit, S., Itharat, A., Lerdvuthisophon, N., & Hansakul P. (2010). Determination of phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activities in water extracts of Thai red and white rice cultivars. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 93(7), S83-S91.
- Subramani, R., Narayanasamy, M., & Feussner, K. D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech*, 7(3), 172. doi: 10.1007/s13205-017-0848-9
- Tangvarasittichai, S., Sriprang, N., Harnroongroj, T., & Changbumrung, S. (2005). Antimutagenic activity of *Sesbania javanica* Miq. flower DMSO extract and its major flavonoid glycoside. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 36(6), 1543-1551.



ประสิทธิผลของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกัน ต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus*

Efficacy of cannabis hemorrhoid and skin disease in different types of dosage form against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*

ชพาฟา กุญชรินทร์¹ นันทพงศ์ ขำทอง² ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา² และ วาลูกา พลายงาม^{2,*}

Chalala Kuncharin¹, Nanthaphong Khamthong², Prasan Tangyuenyongwatana², and Waluga Plaingam^{2,*}

¹นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

¹Graduate student in Master of Science in Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

²Lecturer in Master of Science in Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: waluga.p@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในการยับยั้งด้านเชื้อรา *C. albicans* และเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* การ โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบประกอบด้วย น้ำมัน สารสกัดด้วย ethanol 95% และครีม จากตำรับยา มาทดสอบทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (inhibition zone) จากการวิจัยพบว่า ตำรับยามีฤทธิ์ต่อเชื้อ *C. albicans* โดยได้ค่า inhibition zone ดังนี้ สารสกัด ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.33 mm ครีมจาก สารสกัด ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.33 mm น้ำมันจากตำรับยา ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10 mm ครีมจากน้ำมัน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 mm ตามลำดับ ส่วน ผลต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารสกัดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.33 mm ครีมจากสารสกัด ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm น้ำมันจากตำรับยา ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.67 mm ครีมจากน้ำมัน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm จากนั้นหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution และทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration หรือ MBC) ด้วยวิธี drop plate ผลจากการหาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus* พบว่าสารสกัดมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 mg/mL MBC เท่ากับ 62.50 mg/mL ส่วนน้ำมันจากตำรับยาและตำรับครีมพบว่ามีค่า MIC และ MBC มากกว่า 500 mg/mL ต่อเชื้อทั้งสอง ซึ่งถือว่ามีฤทธิ์อ่อนถึงไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ ผลจากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ตำรับ ตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาต่อโรคติดเชื้อที่ผิวหนังและช่องคลอดต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชา ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* *Staphylococcus aureus*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of Cannabis hemorrhoid and skin disease in different types of dosage forms including oil, the 95% ethanol extract and cream against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. Agar well diffusion evaluated by inhibition zone was used to screen the antimicrobial activity of samples. The study showed that all of the samples demonstrated antimicrobial activity on *C. albicans*, the inhibition zone diameter (16.33 mm, 9.33 mm, 10 mm and 10.67 mm) followed by the 95% ethanol extract, cream from the extract, oil and cream from oil. For *S. aureus* show (25.33 mm, 10.33 mm, 9.67 mm and 10.33 mm) followed by the 95% ethanol extract, cream from the extract, oil and cream from oil. Then the samples were investigated for the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by using broth micro-dilution and drop plate methods. We found that only 95% ethanol extracts provided MIC values at 31.25 mg/mL and MBC



values at 62.50 mg/mL in both pathogens. While MIC and MBC values of oil and cream were presented at more than 500 mg/mL. This research will be the guide for the application of cannabis hemorrhoids and dermatitis formulations for skin and vaginal infections in the future.

Keywords: Cannabis hemorrhoid and skin disease formulation, Antimicrobial, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*

1. บทนำ

เนื่องจากกระแสความนิยมของสมุนไพรไทยในปัจจุบันกำลังเป็นที่จับตามองมากขึ้น โดยเฉพาะตำรับยาสมุนไพรที่มีใบกัญชาปรุงผสม ซึ่งได้มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดตำรับยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ให้เสพเพื่อรักษาโรคหรือการศึกษาวิจัยได้ พ.ศ. 2564 ปลดตำรับยา กัญชาแผนไทย 5 ตำรับที่มีส่วนประกอบของใบ กิ่งก้านกัญชาจากบัญชีตำรับยาเสพติดให้โทษ ได้แก่ ยาสุขไสยาสน์ ยาแก่นอนไม่หลับ ยาแก้ไข้ผอมเหลือง ยาแก้ลมแก้เส้น ยาหาริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนัง และยาแก้โรคจิต และได้มีกำหนดใช้ตั้งแต่วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2564 เป็นต้นไป (อนุทิน ชาญวีรกูล, 2564)

โรคช่องคลอดอักเสบ เป็นภาวะที่พบได้บ่อยในผู้หญิง โดยพบว่า มีผู้ที่มีภาวะการติดเชื้อในช่องคลอดที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียประมาณ 21 ล้านคนในสหรัฐอเมริกา (Koumans et al., 2007) และสาเหตุจากการติดเชื้อราประมาณ 138 ล้านคนทั่วโลกต่อปี (Sobel et al., 1998) จากข้อมูลของหน่วยโรคติดเชื้อทางนรีเวช และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์สตรีโรงพยาบาลศิริราชพบว่า มีสตรีที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์จำนวน 1,647 ราย (เจนจิต ฉายะจินดา, 2561) โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคทางช่องคลอด คือ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถเกิดขึ้นได้แม้ผู้ป่วยจะสุขภาพดี อันเนื่องมาจากการติดเชื้อผ่านการใส่ผ้าอนามัยแบบสอด หรือแบบถ้วย โดยมีการศึกษาการวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* ในผ้าอนามัยแบบสอดจากกลุ่มสตรีที่มีสุขภาพแข็งแรง 737 คน พบว่า ผ้าอนามัยแบบสอดทั้งหมด 233 ชิ้น มีการก่อตัวของเชื้อ *S. aureus* 74 ชิ้น (32%) (Chiaruzzi et al., 2020) และสาเหตุสำคัญของโรคเชื้อราในช่องคลอด คือ *Candida albicans* ซึ่งจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เกิดขึ้นได้เมื่อร่างกายอ่อนแอ และยังสามารถพบได้ตามธรรมชาติในช่องคลอด เยื่อบุลำไส้ เยื่อบุกระพุ้งแก้ม และผิวหนัง (Sobel et al., 1998)

เคยมีรายงานอุบัติการณ์ดื้อต่อยารักษาอาการเชื้อราในช่องคลอด พบว่า มีค่า MIC ที่ดื้อต่อยา Clotrimazole คิดเป็น 77.38% และยา Itraconazole คิดเป็น 80.95% (เกรียงศักดิ์ จิตวัชรนนท์, 2550) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาแบบใหม่ที่สามารถยับยั้งการเกิดเชื้อราได้ เช่น ยากลุ่ม azole แต่ยาเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อไต และตับ (Crowley & Gallagher, 2014) ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกพัฒนาตำรับยาหาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง ที่ประกอบไปด้วย ขมิ้นชัน ใบกัญชา และน้ำมันเมล็ดฝ้าย จากตำราอายุรเวทศึกษา เล่ม 2 หน้า 276 (ขุนนิเทศสุขกิจ, 2496) ที่เป็นหนึ่งในตำรับยาที่สามารถนำมาศึกษาวิจัยได้อย่างถูกกฎหมาย โดยในปัจจุบันยังไม่เคยมีผู้ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคช่องคลอดอักเสบ และพัฒนาในรูปแบบของยาครีมมาก่อน จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาประสิทธิภาพของตำรับยาหาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากกัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งอาจเป็นแนวทางการส่งเสริมการรักษาทางแพทย์แผนไทยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาหาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังในการยับยั้งการต้านเชื้อรา *Candida albicans* และเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

2.2 เพื่อพัฒนายาครีมจากตำรับยาหาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังสำหรับผู้ที่ติดเชื้อรา *Candida albicans* และเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ขมิ้นชันสด (เสริมพิสิทธิ์, นนทบุรี), ใบกัญชาสด (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาลัยเฉลิมพระเกียรติ, สกลนคร), น้ำมันเมล็ดฝ้าย (Statfold Seed Oils, USA), ketoconazole (Nizoral, Thailand), amoxicillin (Amoxil, USA), ethanol 95% (Numsiang, Thailand), normal saline solution (ANB, Thailand), distilled water (RCI Labscan, Thailand), Sterile water (ไทยโอซูก้า, ไทย), Eumulgin SG (Myskinrecipes, Thailand), stearic acid (Chemipan, Thailand), bee wax (กรุงเทพเคมี, ไทย), cetyl alcohol (Chemipan, Thailand), stearyl alcohol (Chemipan, Thailand), jojoba oil (กรุงเทพเคมี, ไทย), coconut oil (กรุงเทพเคมี, ไทย), propylene glycol (Chemipan, Thailand), xanthan gum (Chemipan, Thailand), EDTA (Chemipan, Thailand), tocopherol (Namsiang, Thailand), phenoxyethanol, Mueller Hinton agar (HiMedia, USA), potato dextrose broth (Diffco, USA), tryptic soy broth (Diffco, USA), dimethylsulphoxide (V.S. Chem House, Thailand)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 นำขมิ้นชันสด และใบกัญชาสด นำมาผสมกันในปริมาณอย่างละ 40 กรัม คลุกให้เข้ากัน ผสมกับ ethanol 95% ปริมาณ 500 mL ในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด และหมักทิ้งไว้ 3 วัน แล้วจึงนำมารองเอาแต่น้ำสกัด จากนั้นทำการแยกสารสกัดที่ได้โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ในอุณหภูมิ 45-48 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปแยกสารสกัดต่อบน water bath อีกครั้ง ในอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักสารสกัดจะคงที่ และจึงนำเอาสารสกัดที่ได้เก็บใส่ไว้ในขวดที่มีฝาปิดมิดชิด

3.2.2 นำขมิ้นชันสด และใบกัญชาสด อย่างละ 400 กรัม มาเคี้ยวในน้ำมันเมล็ดฝ้าย 800 กรัม โดยใช้เข็มนำร่องหม้อต้มไว้ เพื่อไม่ให้ขมิ้นชันสด และใบกัญชาสดไหม้ เคี้ยวไปเรื่อย ๆ จนสีเข้มได้ที่ แล้วจึงนำมารองเอาแต่น้ำมัน เก็บใส่ไว้ในขวดที่มีฝาปิดมิดชิด

3.2.3 การเตรียมเชื้อทดสอบ

การเตรียมเชื้อ *C. albicans* และเชื้อ *S. aureus* โดยเชื้อที่ต้องการทดสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) และ tryptic soy broth (TSB) ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^8 colony forming unit (CFU)/mL โดยการเทียบความขุ่นของสารละลายจากเครื่อง McFarland standard No.0.5 ด้วย 0.85% sterile sodium chloride ซึ่งเท่ากับจำนวนเซลล์ 1.5×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเจือจางเชื้อด้วยอาหารเหลว PDB หรือ TSB ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ก่อนนำมาใช้

3.2.4 การเตรียมกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control)

สำหรับเชื้อ *C. albicans* ใช้กลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ ketoconazole ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *S. aureus* ใช้กลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่ความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยน้ำ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ระหว่าง 1-64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration, MIC)

1) วิธี agar well diffusion

1.1) เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงด้วยน้ำ และเตรียมน้ำมันจากตำรายาหาแก๊รดิสตังทวารหนักและโรคผิวหนัง ให้มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางด้วย DMSO

1.2) ปิเปตเชื้อที่ต้องการจะทดสอบ โดยปรับความเข้มข้นจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) และ Tryptic soy agar (TSA) และใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วด้วย ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที

1.3) เจาะหลุมในลงบนผิวหน้าอาหาร MHA และ TSA อย่างละ 1 หลุม โดยระยะห่างให้อยู่ตรงกลางของจานอาหาร และปิเปตสารสกัด และน้ำมันจำนวนอย่างละ 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลุม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

1.4) อ่าน และบันทึกผลโดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier calipers) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส หรือบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) รอบหลุม และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2) วิธี broth micro-dilution (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009)

2.1) เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 500-7.8125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า ด้วยน้ำ และเตรียมน้ำมันจากตำรายาทาแก๊ริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง

2.2) ปิเปตเชื้อที่ต้องการจะทดสอบ จำนวน 80 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate

2.3) เติมน้ำมันในหลุมที่ความเข้มข้น 500-7.8125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนอย่างละ 20 ไมโครลิตร เติมน้ำมันจากตำรายาทาแก๊ริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังลงในหลุมที่ปริมาณ 20, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเติมกลุ่มควบคุมแบบบวก จำนวนอย่างละ 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.4) เมื่อครบเวลาให้ใส่สารละลาย resazurin 0.04% น้ำหนักโดยปริมาตรจำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมทุกหลุม และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง

2.5) อ่านผล และบันทึกผล ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ resazurin ซึ่งมีสีน้ำเงิน หากมีการเจริญของเชื้อสีของ resazurin จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

3.2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี drop plate (ดัดแปลง จาก CLSI, 2009)

1) เลือกหลุมอาหารที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC มาทาาลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA หรือ TSA โดยใช้ลูปเชี่ยเชื้อปลายกลม และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง และนำเชื้อไปเข้าตุ้มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2) สังเกตผล และบันทึกผล ค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัด และน้ำมันที่ไม่มีโคโลนีของเชื้อบนอาหาร ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล

3.2.7 การเตรียมยาครีม จะพัฒนาทั้งหมด 2 สูตร ได้แก่สูตรที่ให้ตำรายาน้ำมัน และสูตรสารสกัด โดยแต่ละสูตรจะเตรียม phase A และ B ดังนี้

1) การเตรียมครีมสูตรสารสกัด

1.1) สูตรสารสกัด phase A

ส่วนประกอบ: Eumulgin SG 0.5 g, stearic acid 2 g, bee wax 3 g, cetyl alcohol 2 g, stearyl alcohol 2 g, jojoba oil 8 g และ coconut oil 8 g

วิธีเตรียม phase A: ชั่งสารทุกตัวรวมใน 100 mL-beaker แล้วนำไปอุ่นบน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส



1.2) สูตรสารสกัด phase B

ส่วนประกอบ: propylene glycol 3 g, xanthan gum 0.5 g และ EDTA 0.1 g

วิธีเตรียม phase B

1) ชั่ง propylene glycol ใน 250 mL-beaker

2) ชั่ง xanthan gum บนกระดาษชั่ง และค่อยๆ โปรงลงใน ข้อ 1) ใช้แท่งแก้วคนให้กระจายตัว และจึงเติม EDTA ลงไป และคนให้เข้ากัน

3) เติม distilled water 70 mL และนำไปอุ่นบน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 73-78 องศาเซลเซียส

ผสม A กับ B เมื่ออุณหภูมิของ B $\geq$ A ไม่เกิน 3 องศาเซลเซียส โดยเติม A ลงไปใน B พร้อมคนติดต่อกันตลอดเวลา โดยคนในทิศเดียวกันตลอดจนกระทั่งอิมัลชันเริ่มอุ่น (40-45 องศาเซลเซียส) นำ tocopherol 0.1 g, phenoxyethanol 0.8 g เติมลงไปนในครีม และคนให้เข้ากัน แล้วจึงนำสารสกัด 2.5 g ผสม propylene glycol 3 g คนให้ละลายเข้ากัน และเติมลงไปนในครีม คนส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากันจนเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปบรรจุภัณฑ์ที่มีฝาปิดมิดชิด

2) การเตรียมครีมสูตรน้ำมัน

2.1) สูตรตำรับยาน้ำมัน phase A

ส่วนประกอบ: Eumulgin SG 0.5 g, stearic acid 2 g, bee wax 3 g, cetyl alcohol 2 g, stearyl alcohol 2 g และน้ำมันจากตำรับยาทวารหนักและโรคผิวหนัง 16 g

วิธีเตรียม phase A: ชั่งสารทุกตัวรวมใน 100 mL-beaker แล้วนำไปอุ่นบน water bath ในได้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส

2.2) สูตรตำรับน้ำมัน phase B

ส่วนประกอบ: propylene glycol 3 g, xanthan gum 0.5 g และ EDTA 0.1 g

วิธีเตรียม phase B

1) ชั่ง propylene glycol ใน 250 mL-beaker

2) ชั่ง xanthan gum บนกระดาษชั่ง และค่อยๆ โปรงลงใน ข้อ 1) ใช้แท่งแก้วคนให้กระจายตัว และจึงเติม EDTA ลงไป และคนให้เข้ากัน

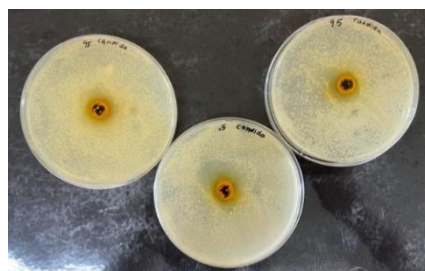
3) เติม distilled water 70 mL และนำไปอุ่นบน water bath ให้ได้อุณหภูมิ 73-78 องศาเซลเซียส

ผสม A กับ B เมื่ออุณหภูมิของ B $\geq$ A ไม่เกิน 3 องศาเซลเซียส โดยเติม A ลงไปใน B พร้อมคนติดต่อกันตลอดเวลา โดยคนในทิศเดียวกันตลอดจนกระทั่งอิมัลชันเริ่มอุ่น (40-45 องศาเซลเซียส) แล้วจึงเติม tocopherol 0.1 g และ phenoxyethanol 0.8 g คนส่วนผสมทุกอย่างให้เข้ากันจนเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปบรรจุภัณฑ์ที่มีฝาปิดมิดชิด

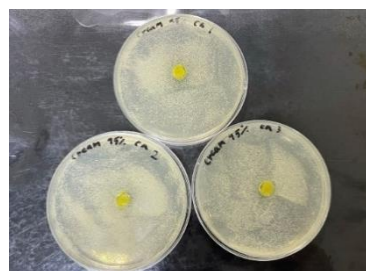
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *C. albicans*

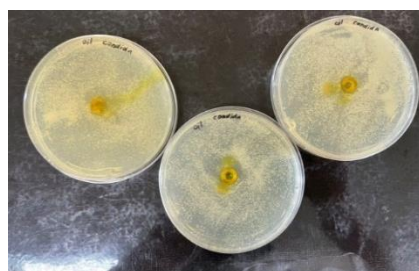
จากทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *C. albicans* ด้วยสารสกัดโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 18, 16 และ 15 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.33 mm และครีมสารสกัด เท่ากับ 9, 10 และ 9 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.33 mm ตามลำดับ ส่วนน้ำมันจากตำรับยาทวารหนักและโรคผิวหนัง วัดค่า inhibition zone เท่ากับ 11, 10 และ 9 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10 mm และครีมน้ำมัน เท่ากับ 12, 10 และ 10 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 mm ตามลำดับ ส่วน ketoconazole วัดค่า inhibition zone เท่ากับ 45 mm ดังแสดงในภาพที่ 1



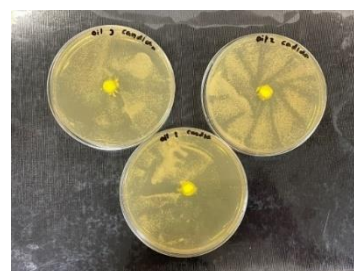
(ผลการทดสอบด้วยสารสกัด)



(ผลการทดสอบด้วยครีมสารสกัด)



(ผลการทดสอบด้วยน้ำมันจากตำรับ)



(ผลการทดสอบด้วยครีมน้ำมันจากตำรับ)



(ผลการทดสอบด้วยยากลุ่มควบคุม)

ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *C. albicans*

4.2 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *S. aureus*

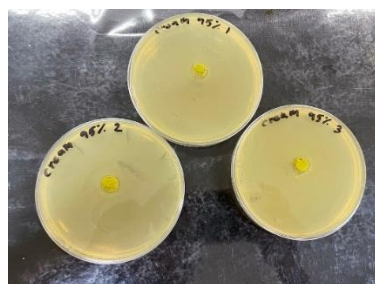
จากทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี Agar well diffusion ของเชื้อ *S. aureus* ด้วยสารสกัด โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ 32, 24 และ 20 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.33 mm และครีมสารสกัด เท่ากับ 10, 9 และ 12 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm ส่วนน้ำมันจากตำรับยาทาแก้ริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนัง วัดค่า inhibition zone เท่ากับ 10, 10 และ 9 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.97 mm และครีมน้ำมัน เท่ากับ 9, 10 และ 12 mm ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm ตามลำดับ ส่วน amoxicillin วัดค่า inhibition zone เท่ากับ 50 mm (ภาพที่ 2)

4.3 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธีวิธี broth micro-dilution ของเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus*

จากทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution ของเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus* โดยใช้สารสกัดความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันจากตำรับยาทาแก้ริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง ไม่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง (ภาพที่ 2)



(ผลการทดสอบด้วยสารสกัด)



(ผลการทดสอบด้วยครีมสารสกัด)



(ผลการทำสอบด้วยน้ำมันจากตำรับ)

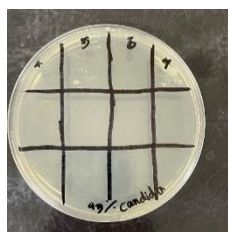


(ผลการทำสอบด้วยครีมน้ำมันจากตำรับ)

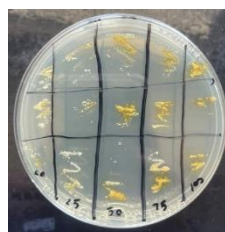


(ผลการทดสอบด้วยยากลุ่มควบคุม)

ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *S. aureus*



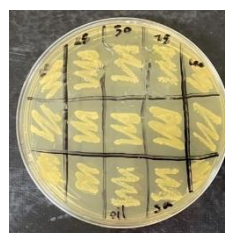
(การทดสอบค่า MIC และ MBC ของสารสกัด)



(การทดสอบค่า MIC และ MBC ของตำรับน้ำมัน)



(การทดสอบค่า MIC และ MBC ของสารสกัด)



(การทดสอบค่า MIC และ MBC ของตำรับน้ำมัน)

ภาพที่ 3 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธีวิธี วิธี broth micro-dilution ของเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus*

4.4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี drop plate ของเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus*

พบว่า การใช้สารสกัดเท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ ส่วนน้ำมันจากตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อได้

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Murugesu และคณะ (2019) การประเมินประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *C. albicans* ของ *Curcuma longa* L. ที่มีความเข้มข้นต่างกันในหลอดทดลอง พบว่า มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครลิตร

5. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิผลของตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังในการยับยั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย และเพื่อพัฒนาครีม โดยการนำสารสกัด และน้ำมันจากตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังมาทดสอบทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี agar well diffusion โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (inhibition zone) จากการวิจัยพบว่า ผลค่าเฉลี่ยฤทธิ์ของตำรับยาต่อเชื้อ *C. albicans* มีดังนี้ สารสกัดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.33 mm ครีมจากสารสกัด ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.33 mm น้ำมันจากตำรับยา ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10 mm ครีมจากน้ำมัน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.67 mm ตามลำดับ ส่วนผลค่าเฉลี่ยต่อเชื้อ *S. aureus* พบว่า สารสกัดค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.33 mm ครีมจากสารสกัด ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm น้ำมันจากตำรับยา ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.67 mm ครีมจากน้ำมัน ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.33 mm ตามลำดับ และผลจากการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution และผลทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration หรือ MBC) ด้วยวิธี drop plate ต่อเชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus* พบว่า สารสกัดมีค่า MIC เท่ากับ 31.25 mg/mL และค่า MBC เท่ากับ 62.50 mg/mL ส่วนน้ำมันจากตำรับยาและตำรับครีมพบว่ามีค่า MIC และ MBC มากกว่า 500 mg/mL ต่อเชื้อทั้งสอง ซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์อ่อนถึงไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ

จากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังสามารถฆ่าเชื้อเชื้อรา *C. albicans* และเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ได้ แต่ไม่เทียบเท่ากลุ่มควบคุม ส่วนตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังสามารถยับยั้งรวมถึงยาครีมทั้ง 2 สูตร ยังมีฤทธิ์อ่อน และไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อทั้งสอง จึงอาจมีการวิจัยเรื่องการพัฒนาในรูปแบบครีม หรือรูปแบบอื่นให้มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการใช้งาน

6. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาประสิทธิผลของตำรับยาทาแกักริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังจากัญชาในรูปแบบที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Staphylococcus aureus* ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือของผู้มีพระคุณคือ อาจารย์ วาสุภา พรายงาม และอาจารย์ นันทพงศ์ ขำทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งเป็นผู้สอนเทคนิคการปฏิบัติการในห้องทดลอง ตลอดจนการเขียนรายงาน และการทำวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ รวมถึง อาจารย์ ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา ผู้ให้ความรู้เกี่ยวกับหัวข้อ และการหาแหล่งอ้างอิงที่น่าเชื่อถือเพื่อการทำวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ผู้ทำวิจัยจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้



7. เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ จิตวัชรนันท์. (2550). การศึกษาภาวะการติดเชื้อราในช่องคลอดของสตรีที่มาใช้บริการตรวจคัดกรองโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่ศูนย์กามโรค และโรคเอดส์เขต 10 เชียงใหม่. *วารสารสาธารณสุขล้านนา*, 3(1), 102-116.
- เจนจิต ฉายะจินดา, มานพชัย ธรรมคันโธ, อัมพันธ์ เฉลิมโชค เจริญกิจ, ชานนท์ เนืองตัน, และ วิลาวัณย์ ทิพย์มนตรี. (2561). ลักษณะของผู้ป่วยที่มาใช้บริการที่คลินิกหน่วยตรวจโรคติดต่อทางนรีเวช และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์สตรีโรงพยาบาลศิริราช ในช่วง พ.ศ.2554 - พ.ศ.2558. *เวชบันทึกศิริราช*, 11(3), 104-111.
- เพ็ญศรี เพ็ญประไพ, สุภามาส อินทฤทธิ์, และ ชุติมา จันทรัตน์. (2561). การพัฒนาน้ำมันมะพร้าวที่มีสารสกัดจากว่านชักมดลูกเป็นครีมสำหรับผิวหน้า. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย. เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2564 จาก <https://riss.rmuts.ac.th/upload/doc/201910/DhnCaAd3P2vxw168zSgl/DhnCaAd3P2vxw168zSgl.pdf>
- Anderson, M. R., Klink, K., & Cohrsen, A. (2004). Evaluation of vaginal complaints. *Journal of the American Medical Association*, 291(11), 1368-1379. doi: 10.1001/jama.291.11.1368
- Auger, P., & Joly, J. (1980). Microbial flora associated with *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstetrics and Gynecology*, 55(3), 397-401. doi: 10.1097/00006250-198003000-00029
- Bendas, E. R., & Basalious, E. B. (2016). Rapidly disintegrating vagina retentive cream suppositories of progesterone: development, patient satisfaction and in vitro/in vivo studies. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(3), 288-295. doi: 10.3109/10837450.2014.999784
- Chaim, W., Foxman, B., & Sobel, J. D. (1997). Association of recurrent vaginal candidiasis and secretory ABO and Lewis phenotype. *Journal of Infectious Diseases*, 176(3), 828-830. doi: 10.1086/517314
- Chiaruzzi, M., Barbry, A., Muggeo, A., Tristan, A., Jacquemond, I., Badiou, C., ... Lina, G. (2020). Vaginal tampon colonization by *Staphylococcus aureus* in healthy women. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18), e01249-20. doi: 10.1128/AEM.01249-20
- Crowley, P. D., & Gallagher, H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of applied microbiology*, 117(3) 611-617. doi: 10.1111/jam.12554
- Kim, K. J., Yu, H. H., Cha, J. D., Seo, S. J., Choi, N. Y., & You, Y. O. (2005). Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 19(7), 599-604. doi: 10.1002/PTR.1660
- Koumans, E. H., Sternberg, M., Bruce, C., McQuillan, G., Kendrick, J., Sutton, M., & Markowitz, L. E. (2007). The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sexually Transmitted Diseases*, 34(11), 864-869. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565
- Teow, S. Y., Liew, K., Ali, S. A., Khoo, A. S. B., & Peh, S. C. (2016). Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: A brief review. *Journal of Tropical Medicine, Journal of Tropical Medicine*, 2016, 2853045. doi: 10.1155/2016/2853045
- Sobel, J. D. (1993). Candidal vulvovaginitis. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 36(1), 153-165. doi: 10.1097/00003081-199303000-00021



การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง ที่มีใบกัญชาประกอบอยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกัน

A study of antimicrobial activity of hemorrhoid and skin disease preparation including cannabis leaves in different types of dosage form against *Staphylococcus epidermidis*

พริม รัตนพล¹ นันทพงศ์ ขำทอง² ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา² และ วาลูกา พลายงาม^{2,*}

Prim Rattanaphon¹, Nanthaphong Khamthong², Prasan Tangyuenyongwatana², and Waluga Plaingam^{2,*}

¹นักศึกษาลัทธิศาสตร์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

¹Graduate student in Master of Science in Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

² Lecturer in Master of Science in Oriental Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, waluga.p@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

สิว เกิดความผิดปกติจากการหลุดลอกของเซลล์ในรูขุมขน จึงทำให้เกิดไขมันอุดตัน หากมีการสะสมของแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus epidermidis* บริเวณนั้น มักจะสร้างเอนไซม์ ทำให้เกิดอาการ บวม แดง และอักเสบเป็นหนอง เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ และภาวะดื้อยา การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนังในการยับยั้งการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และนำมาพัฒนาในรูปแบบเจล ในการทดสอบโดยใช้ยาจากตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนัก และโรคผิวหนัง ในรูปแบบน้ำมัน สารสกัด เจลน้ำมัน และเจลสารสกัด เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้น โดยใช้วิธี agar well diffusion โดยเรียงลำดับเส้นผ่านศูนย์กลางที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดไปจนถึงน้อยที่สุด ยา amoxicillin มีค่าเฉลี่ย 47.00 มิลลิเมตร สารสกัดจากตำรับมีค่าเฉลี่ย 25.67 มิลลิเมตร เจลจากน้ำมันมีค่าเฉลี่ย 14.67 มิลลิเมตร เจลสารสกัดมีค่าเฉลี่ย 13.67 มิลลิเมตร น้ำมันมีค่าเฉลี่ย 10.00 มิลลิเมตร ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution พบว่าผลการทดสอบเจลงาน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และผลการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี drop plate พบว่าผลการทดสอบสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จากผลการวิจัยครั้งนี้เป็นแนวทางประยุกต์ และพัฒนาการใช้ยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ตำรับยาทาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนัง สิว *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

Acne is caused by the shedding of cells in hair follicles, resulting in fat clogging. In that area, an accumulation of the acne bacterium *Staphylococcus epidermidis* will then produce enzymes causing swelling, redness, and purulent inflammation. To reduce the use of antibiotics and drug resistance, this research was thus aimed at evaluating the antibacterial efficacy of the topical herbal remedy for hemorrhoids and skin against *S. epidermidis* and formulating the remedy into a topical gel. The remedy was investigated for its antibacterial activity in 4 different forms, including oil, extract, gel from the oil, and gel from the extract. The four forms were screened for antibacterial activity using an agar well diffusion method. It was found that the oil, the extract, the gel from the oil, and the gel from the extract exhibited inhibition zones of 10.00, 25.67, 14.67, and 13.67, respectively. The extract was mildly active against *S. epidermidis*, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 micrograms per milliliter in a broth micro-dilution method and a



minimum bactericidal concentration (MBC) of 250 micrograms per milliliter in a drop plate method. We can apply and develop methods to use the topical herbal medicine for hemorrhoids and skin in the future based on the result of this research.

Keywords: Cannabis hemorrhoid and skin disease, Acne, *Staphylococcus epidermidis*

1. บทนำ

เนื่องจากปัจจุบันตำรับยาสมุนไพรไทยได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย อีกทั้งยังมีการนำสมุนไพรไทยมาศึกษาวิจัยเพื่อยืนยันผลของสมุนไพรไทยในการใช้รักษาโรค โดยอย่างยิ่งในส่วนของผู้ผลิตสมุนไพร ตำรับยาสมุนไพรที่มีส่วนของกัญชาเป็นส่วนประกอบ ซึ่งได้มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดตำรับยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่มีกัญชาปรุงผสมอยู่ให้เสพติดให้โทษเพื่อรักษาโรคหรือการศึกษาวิจัยได้ พ.ศ. 2564 ปลดตำรับยากัญชาแผนไทย 5 ตำรับที่มีส่วนประกอบของใบ กิ่งก้านกัญชาจากบัญชีตำรับยาเสพติดให้โทษ ได้มีกำหนดใช้ตั้งแต่วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2564 เป็นต้นไป (อนุทิน ชาญวีรกูล, 2564)

สิวเป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในช่วงของวัยรุ่น สิวเป็นโรคผิวหนังที่ไม่มีอาการรุนแรง แต่ในบางรายสิวกัทำให้เกิดเป็นโรคผิวหนังเรื้อรัง มักพบได้บ่อยบริเวณใบหน้า และส่วนบนลำตัว (Hsieh & Chen, 2011) หลังการรักษา มักเกิดรอยแผลเป็น หลุมสิวจากการเกิดสิว มีผลต่อการดำรงชีวิต เนื่องจากทำให้สูญเสียความมั่นใจ มีความวิตกกังวล (Dave & Choksi, 2010) สิวเกิดจากความผิดปกติของ pilosebaceous units โดยมีต่อมไขมัน เส้นขน และ infundibulum สาเหตุหลักที่เกิสิว คือความผิดปกติจากการหลุดลอกของเซลล์ในรูขุมขน จึงทำให้เกิดไขมันอุดตัน หากมีการสะสมของแบคทีเรีย เช่น *S. epidermidis* บริเวณนั้น มักจะสร้างเอนไซม์ ทำให้เกิดอาการ บวม แดง และอักเสบเป็นหนอง (ประวิตร พิศาลบุตร, 2551) การรักษาสิวมักรักษาได้โดยการรับประทานยาปฏิชีวนะ การทายากลุ่มวิตามินเอ และในทางกายภาพ สามารถทำได้โดยการใช้เครื่องมือกดหัวสิว การผ่าตัด หรือการทำเลเซอร์ (Zaenglein & Thiboutot, 2012) ในปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคสิวที่ไม่ถูกต้อง หรือการใช้ยาปฏิชีวนะรักษาต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจส่งผลข้างเคียงกับผู้ป่วย และมีอาการดื้อยาส่งผลต่อการรักษาที่ยากขึ้น การใช้สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว โรคทางผิวหนัง และระบบอื่นๆในร่างกาย จากการศึกษาพบว่าสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ จึงมีการนำมาใช้ในการรักษาแทนยาแผนปัจจุบัน เนื่องจากยาสมุนไพรไม่ใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยไม่มีอาการดื้อยา ปลอดภัยจากสารเคมี และลดอาการข้างเคียงจากการใช้ยาแผนปัจจุบัน

ตำรับยาทาดีตวงทวารและโรคผิวหนัง มีส่วนประกอบของสมุนไพร 3 ชนิด ดังนี้ ขมิ้นชัน กัญชา และน้ำมันเมล็ดฝ้าย จากงานวิจัยที่มีในปัจจุบัน ขมิ้นชัน เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่คนไทยใช้กันมาช้านาน มักจะใช้ในส่วนของการนำมาปรุงอาหาร นำมาทำสีย้อมผ้า และนำมาทำยาสมุนไพรรักษาโรค ยกตัวอย่างในปัจจุบันมีการนำขมิ้นชันมาทำยาจะมีรูปแบบของ ขมิ้นชันแห้ง ใช้สำหรับการทำยาต้ม ขมิ้นชันบดผง ใช้สำหรับการทำยาแคปซูล เพื่อรักษาโรคทางเดินอาหาร และขมิ้นชันสดใช้สำหรับทำยาในรูปแบบบาล์ม หรือน้ำมัน ขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ และฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งและต้านมะเร็ง (ฉัตรชัย สวัสดิไชย และ สุรศักดิ์ อิ่มเอี่ยม, 2559) มีผลงานวิจัยพบว่าขมิ้นชันมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่ออาการเกิดโรค โดยการนำขมิ้นชันมาสกัดจากเอทานอลพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ถึง 13 ชนิด เช่น *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (พรชัย สีนเจริญโกโคย และคณะ, 2552) กัญชา จากงานวิจัยมีการตรวจสอบในปี ค.ศ. 1950 พบว่ากัญชาสามารถออกฤทธิ์ได้สูงในช่องปาก และผิวหนัง สารแคนนาบินอยด์ (CBD) ในกัญชามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น เชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (Appendino, 2008) น้ำมันเมล็ดฝ้าย ถูกใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเคมี โดยน้ำมันเมล็ดฝ้ายมีวิตามินอีสูง (Riaz et al., 2021) พบว่าระดับวิตามินอีในซีรัมลดลงในผู้ป่วยที่เป็นโรคต่าง ๆ โรคสะเก็ดเงิน โรคผิวหนังภูมิแพ้ และสิว (Liu et al., 2021)



ดังนั้นเพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้ป่วย ลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วย ลดภาวะการแพ้ยา ลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ และส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทย ผู้ทำวิจัยจึงเลือกยาดำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนัง ซึ่งเป็นยาในตำราอายุรเวทศึกษา เล่ม 2 หน้า 276 (ขุนนิเทศสุขกิจ, 2496) มีข้อบ่งใช้ยาทาแก้โรคผิวหนังและโรคผิวหนัง เช่น เรื้อน กวาง เรื้อนมูลนก โดยการนำตำรับยานี้มาพัฒนาต่อในรูปแบบของเจลรักษาผิวที่ติดเชื้อจากแบคทีเรีย *S. epidermidis* ซึ่งอาจเป็นแนวทางให้กับผู้ที่สนใจการแพทย์แผนไทย และพัฒนายาสมุนไพรไทยไปสู่ระดับสากล

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนังในการยับยั้งการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

2.2 เพื่อพัฒนายาเจลจากตำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนังสำหรับผู้ที่เป็นสิ่วจากเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

ขมิ้นชันสด (ร้านสมุนไพร, ปทุมธานี), ใบกัญชาสด (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาลัยเฉลิมพระเกียรติ, สกลนคร), น้ำมันเมล็ดฝ้าย (Statfold Seed Oils, USA), amoxicillin (Amoxil, USA), ethanol 95% (Numsiang, Thailand), normal saline solution (ANB, Thailand), distilled water (RCI Labscan, Thailand), tryptic soy broth (Diffco, USA), plate, water bath, กระดาษกรอง No. 1 (Whatman, USA), เครื่องชั่ง (Sartorius, Germany), micropipette 500, 1,000 mL (Accumax, India), pipette tips 200, 1,000 mL (Accumax, India), rotary evaporator, beaker ขนาด 10, 20, 50, 100, 250, 500 และ 1,000 mL (Pyrex-Corning International K.K., Japan), test tube (Pyrex-Corning International K.K., Japan), cylinder (Pyrex-Corning International K.K., Japan), volumetric flask ขนาด 10, 25 และ 100 mL (Pyrex-Corning International K.K., Japan), bottle ขนาด 1,000 mL (Pyrex-Corning International K.K., Japan), syringe (Hamilton, Switzerland), stirring rod (Pyrex-Corning International K.K., Japan), parafilm tape (AYO Technologies, USA), glycerine (Krungthepchemi, Thailand), Carbopol ultrez 21 polymer (Namsiang, Thailand), triethanolamine (Phitsanuchemicals, Thailand), aerosil (USA)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control)

เชื้อ *S. epidermidis* ใช้กลุ่มควบคุมเชิงบวกคือ ยาปฏิชีวนะ amoxicillin ที่ความเข้มข้น 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางแบบ two fold ด้วย sterile water ลงจำนวน 5 หลอด และนำหลอดที่ 5 มาใช้ทดสอบกับเชื้อที่เตรียมไว้

3.2.2 การเตรียมการตำรับยาทาโรคผิวหนังและโรคผิวหนัง

เตรียมใบกัญชา และขมิ้นชันแล้วนำมาบด ใช้ปริมาตรอย่างละ 400 กรัม เตรียมน้ำมันเมล็ดฝ้าย 800 กรัม หลังจากนั้นนำใบกัญชา และขมิ้นชันที่บดแล้วมาเคี่ยวในน้ำมันเมล็ดฝ้าย โดยการนำหม้อใบใหญ่ใส่น้ำธรรมดา และนำหม้อใบเล็กใส่ลงในหม้อใบใหญ่เพื่อใช้ความร้อนจากน้ำในการเคี่ยวน้ำมันเมล็ดฝ้าย ใบกัญชาบด ขมิ้นชันบด เพื่อไม่ให้สมุนไพรไหม้ เคี่ยวจนสีเข้มตามที่ต้องการ แล้วนำมากรองเอาแต่น้ำมันใสในภาชนะที่ปิดมิดชิด

เตรียมใบกัญชา และขมิ้นชันแล้วนำมาบด มาผสมกันในปริมาตรอย่างละ 40 กรัม คลุกเคล้าใบกัญชาบดและขมิ้นชันบดให้เข้ากัน นำสมุนไพรที่ 2 ชนิด มาผสมกับ ethanol 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่ปิดได้มิดชิด และหมักไว้ 3 คืน หลังจากนั้นนำมากรองกับกระดาษกรองเอาแต่น้ำมัน แล้วนำมาแยกสารสกัดโดยใช้เครื่อง rotary evaporator



ในอุณหภูมิ 45-48 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปแยกสารต่อบน water bath ในอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนกว่า น้ำหนักของสารสกัดคงที่ เมื่อเสร็จแล้วนำสารสกัดที่ได้ใส่ในภาชนะที่ปิดมิดชิด

3.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration: MIC)

วิธี agar well diffusion เตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบน้ำมันปริมาตรความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบสารสกัดโดยใช้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ นำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ทดสอบมาปิเปตลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแข็ง tryptic soy agar (TSA) ในปริมาตรความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วอาหารแข็ง โดยทำซ้ำทำทั้งหมด 6 plate โดยแบ่งทดสอบน้ำมัน 3 plate และสารสกัด 3 plate จากนั้นเจาะหลุมตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแข็ง tryptic soy agar (TSA) โดยเจาะ plate ละ 1 หลุม และปิเปตน้ำมันลงในหลุมในปริมาตร 100 ไมโครลิตรทั้ง 3 plate และสารสกัดลงในหลุมในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทั้ง 3 plate หลังจากนั้นทั้ง 6 plate ใส่ลงใน anaerobic jar และใส่ anaerocult ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบหลังจากบ่มครบ 24 ชั่วโมง โดยการใช้ Vernier calipers วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย รอบหลุมที่เจาะใส่ยา และคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธี broth micro-dilution (ดัดแปลงจาก CLSI, 2009) เตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบน้ำมันปริมาตรความเข้มข้น 500-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย DMSO และเตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบสารสกัดโดยใช้ความเข้มข้น 500-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางแบบ two 2 fold ปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ทดสอบ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate เตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบน้ำมันลงในหลุม 96 well plate ปริมาตร 20, 25, 50, 75, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เตรียมยาตำรับยาทวาริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังแบบสารสกัดที่ความเข้มข้น 500-62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร และเตรียมยาปฏิชีวนะ amoxicillin ปริมาตรหลุมละ 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตสาร resazurin 0.04% ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงทุกหลุม นำไปบ่มอีกครั้งอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบผลโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของ resazurin ซึ่งหากไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ resazurin จะเป็นสีน้ำเงิน หากมีการเจริญเติบโตของเชื้อ resazurin จะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู

3.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี drop plate (ดัดแปลง จาก CLSI, 2009)

เริ่มจากใช้ loop ตตะเชื้อที่อยู่ใน 96 well plate ที่ละหลุมมา Streak เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) และลั่นไฟฟ้าเชื้อหลังเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้ง ทำซ้ำจนครบทุกหลุมที่มีเชื้อ จากนั้นนำ plate ใส่ลงใน anaerobic jar และใส่ anaerocult ปิดฝาให้สนิทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาบ่ม 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดสอบ และบันทึกผลหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมัน สารสกัด และยาปฏิชีวนะที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.5 การเตรียมยาในรูปแปบเจล (gel) สูตรน้ำมัน และสูตรสารสกัด

เตรียมตำรับยาทวาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังสูตรน้ำมัน เทลงในบีกเกอร์ในปริมาตร 150 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำมัน aerosil ที่ละน้อยๆ ให้ได้ปริมาตร 8.5 กรัม คนผสมให้เข้ากันจนกลายเป็นลักษณะเนื้อเจล

เตรียมตำรับยาทวาริดสีดวงทวารหนักและโรคผิวหนังสูตรสารสกัด ใส่ น้ำกลั่นในบีกเกอร์ ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมน้ำมัน Carbopol Ultrez 21 polymer ที่ละน้อยๆ ให้ได้ปริมาตร 1 กรัม คนผสมให้เข้ากันดี เติมน้ำมัน glycerine (food grade) 1 กรัม คนส่วนผสมให้เข้ากัน เมื่อเข้ากันดีแล้วหยด triethanolamine จำนวน 3 หยด คนส่วนผสมจนกลายเป็นลักษณะเนื้อเจล จากนั้นนำยาสารสกัดปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสม propylene glycol 3 กรัม แล้วเทลงบนเนื้อเจลคนส่วนผสมให้เข้ากัน



4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การทดสอบการยับยั้งเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion ของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้ยาตำรับยาทาแก้ริดสีดวงทวารและโรคผิวหนังสูตรน้ำมัน สูตรสารสกัด และยาปฏิชีวนะ amoxicillin



(ผลการทดสอบน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย)



(ผลการทดสอบเจลน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย)

ภาพที่ 1 ผลการทดสอบยาตำรับสูตรน้ำมันและเจลน้ำมันทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*



(ผลการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรีย)



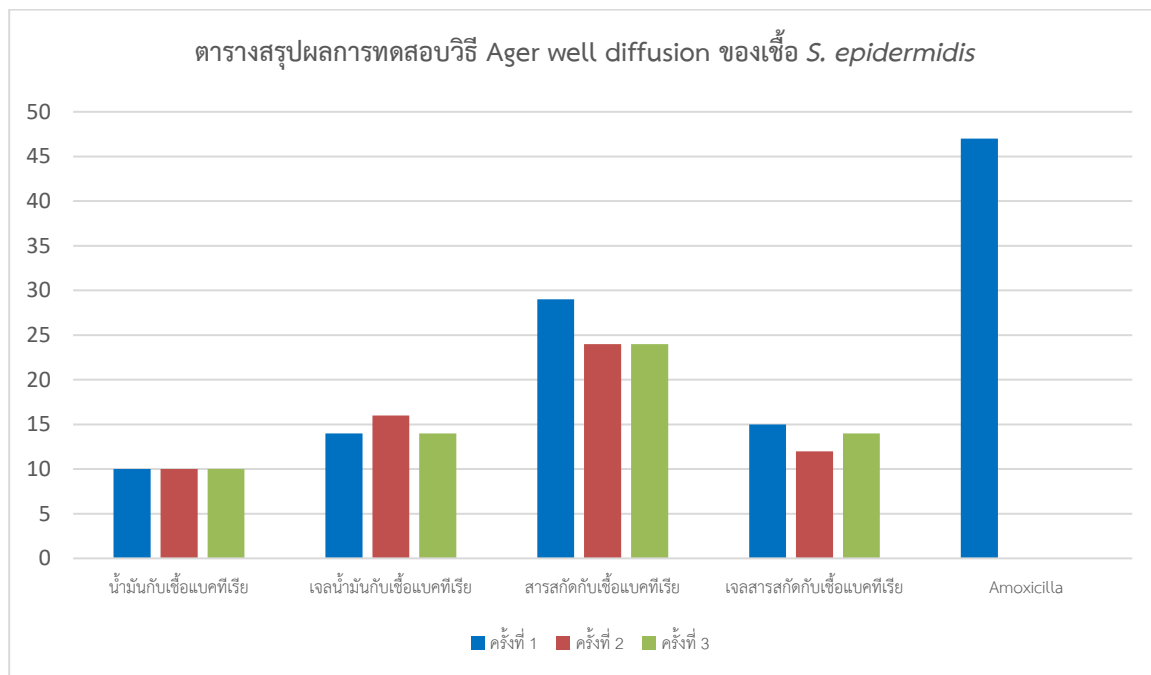
(ผลการทดสอบเจลน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย)

ภาพที่ 2 ผลการทดสอบยาตำรับสูตรสารสกัด และเจลสารสกัดทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบยาปฏิชีวนะ amoxicillin ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis*

จากแผนภูมิในภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่ายา amoxicillin มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 47.00 มิลลิเมตร เป็นค่าที่สูงที่สุดแสดงถึงการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25.67 มิลลิตรเมตร เจลน้ำมันมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 14.67 มิลลิเมตร เจลสารสกัดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13.67 มิลลิตรเมตร และน้ำมันมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10.00 มิลลิตรเมตร



ภาพที่ 4 แผนภูมิสรุปผลการทดสอบวิธี ager well diffusion ของเชื้อ *S. epidermidis*

4.2 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution ของเชื้อ *S. epidermidis* โดยใช้ยาตำรับยาพาริตีสดวงทวารและโรคผิวหนังสูตรน้ำมัน และสูตรสารสกัด



(ผลการทดสอบน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย)

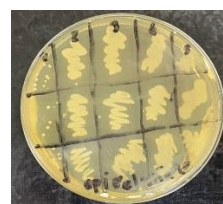


(ผลการทดสอบเจลน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย)

ภาพที่ 5 ผลการทดสอบหาค่า MIC กับเชื้อ *S. epidermidis* ของยาตำรับสูตรน้ำมัน และเจลน้ำมัน



(ผลการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรีย)



(ผลการทดสอบเจลสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรีย)

ภาพที่ 6 ผลการทดสอบหาค่า MIC กับเชื้อ *S. epidermidis* ของยาตำรับสูตรสารสกัดและเจลสารสกัด

จากผลการทดลองความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธีวิธี วิธี broth micro-dilution ของเชื้อ *S. epidermidis* พบว่า ผลการทดสอบเจลน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และผลการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ผล



การทดสอบน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย และผลการทดสอบเจลสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียไม่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

4.3 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี drop plate ของเชื้อ *S. epidermidis*

จากการทดสอบพบว่ายาทาแกโรคริดีสตางวารและโรคผิวหนังสูตรน้ำมันไม่ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ ส่วนสูตรสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดสอบเจลน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรีย และผลการทดสอบเจลสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียไม่มีความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

5. สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเจลจากตำรับยาทาริดีสตางวารหนักและโรคผิวหนังเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตำรับยาทาริดีสตางวารหนักและโรคผิวหนังในการยับยั้งการดำเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* โดยเตรียมยาตำรับนี้ทั้งหมด 2 สูตร 4 รูปแบบ คือ น้ำมัน เจลน้ำมัน สารสกัด และเจลสารสกัด จากผลการทดสอบยับยั้งเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธี agar well diffusion โดยเรียงลำดับเส้นผ่านศูนย์กลางที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุดไปจนถึงน้อยที่สุด ยา amoxicillin มีค่าเฉลี่ย 47.00 มิลลิเมตร สารสกัดจากตำรับมีค่าเฉลี่ย 25.67 มิลลิเมตร เจลจากน้ำมันมีค่าเฉลี่ย 14.67 มิลลิเมตร เจลสารสกัดมีค่าเฉลี่ย 13.67 มิลลิเมตร น้ำมันมีค่าเฉลี่ย 10.00 มิลลิเมตร การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ด้วยวิธี broth micro-dilution พบว่าผลการทดสอบเจลงน้ำมันกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการทดสอบสารสกัดกับเชื้อแบคทีเรียมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (minimum bactericidal concentration: MBC) ด้วยวิธี drop plate พบว่าผลการทดสอบสารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวิจัยครั้งนี้ตำรับยาทาริดีสตางวารหนักและโรคผิวหนังสูตรสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ในระดับหนึ่ง แต่ประสิทธิภาพยังไม่เทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะ ลักษณะของเจลตำรับนี้ซึมเข้าสู่ผิวได้ดีสีของเจลค่อนข้างเหลืองติดผิวหนังอย่างเห็นได้ชัด จึงควรมีงานวิจัยเรื่องการพัฒนาเจลให้สีของขมิ้นจางลง หรือพัฒนาในรูปแบบอื่นๆในมีประสิทธิภาพในสูงขึ้นเพื่อใช้สำหรับการรักษาสิว และเหมาะกับทุกสภาพผิว

6. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก อาจารย์ วาลูกา พรายงาม และและอาจารย์ นันทพงศ์ ขำทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ค่อยแนะนำ และแก้ไขข้อผิดพลาดในส่วนต่างๆด้วยความเอาใจใส่ ตลอดจนทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ อาจารย์ประสาน ตั้งยีนยวัฒนา เป็นผู้สนับสนุนแรกในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และคอยช่วยเหลือให้ข้อมูล และการแก้ไขข้อผิดพลาดฉบับนี้จนสมบูรณ์แบบ ผู้ทำวิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์ทั้ง 3 ท่านเป็นอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้ทำวิจัยของน้อมรำลึกถึงพระคุณบิดามารดา ที่คอยส่งเสริมสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่เต็มใจตลอด และขอขอบคุณนางสาว ขพาพา กุญชรินทร์ และนางสาวภัทริตา รัตนพล ผู้คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่องตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

7. เอกสารอ้างอิง

ฉัตรชัย สวัสดิไชย, และ สุศักดิ์ อิ่มเอี่ยม. (2559). ทบทวนงานวิจัยสมุนไพร การแพทย์แผนไทยและสมุนไพรไทย. *วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า*, 33(3), 265-270.



- ประวิตร พิศาลบุตร. (มกราคม 2551). โรคสิวในเวชปฏิบัติ (Acne in Clinical Practice). *หมอชาวบ้าน*, 277. สืบค้นจาก <http://www.doctor.or.th/node/6867>.
- พรชัย สินเจริญโกไคย, งามอาจ เลหาวินิจ, และพัชรี สุนทรนันท์. (2552). ผลการยับยั้งของสารสกัดขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดในคนและสัตว์บางชนิด. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์* (น. 244-253). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., ... Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure–activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427-1430. doi: 10.1021/NP8002673
- Dave K, & Choksi V. (2010). Factors aggravating or precipitating acne. *National journal of Community Medicine*, 1(1), 44-46.
- Hsieh, M. F., & Chen, C. H. (2011). Review: Delivery of pharmaceutical agents to treat acne vulgaris: Current status and perspectives. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 32(4), 215-224.
- Liu, X., Yang, G., Luo, M., Lan, Q., Shi, X., Deng, H., ... Zhang, C. (2021). Serum vitamin E levels and chronic inflammatory skin diseases: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 16(12) doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0261259
- Riaz, T., Iqbal, M. W., Mahmood, S., Yasmin, I., Leghari, A. A., Rehman, A., ... Bilal, M. (2021). Cottonseed oil: A review of extraction techniques, physicochemical, functional, and nutritional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408398.2021.1963206
- Zaenglein, A. L., & Thiboutot, D. M. (2010). Fitzpatrick's dermatology in general medicine: Acne vulgaris and acneiform eruptions (8th ed., pp. 897-917). New York: McGraw-Hill.



การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan

Determination of total phenolic contents of Jin Gui Shen Qi Wan formula

พรประภา สัตยานันทาภิบาล^{1,*} และ สันหจุทา พวงมาลา²Pornprapa Sattayanantapibal^{1,*} and Sanhajutha Puangmala²¹สาขาการแพทย์แผนจีน วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี²สาขาการแพทย์แผนไทย วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี¹Department of Traditional Chinese Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani²Department of Traditional Thai Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

*Corresponding author, E-mail: choccopie_11@hotmail.com

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระทำให้ลดปริมาณอิสระและส่งผลต่อการลดการทำลายเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้น การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจึงจัดเป็นฤทธิ์สำคัญอย่างหนึ่งในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระที่มาจากพืชในธรรมชาติ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ของตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan และสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 8 ชนิด โดยการทดสอบจากค่าการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร แล้วคำนวณเทียบกับค่ามาตรฐาน gallic acid equivalent (GAE) พบว่า ตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 309.84 ± 1.74 มิลลิกรัมสมมูล gallic acid ต่อกรัม extract สมุนไพรเดี่ยวในตำรับที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ *Paenonia syffruticosa* Andr. มีค่าเท่ากับ 776.65 ± 2.25 มิลลิกรัมสมมูล gallic acid ต่อกรัม extract และสมุนไพรเดี่ยวที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมน้อยที่สุด คือ *Dioscoea opposita* Thunb. มีค่าเท่ากับ 61.17 ± 0.58 มิลลิกรัมสมมูล gallic acid ต่อกรัม extract

คำสำคัญ: Jin Gui Shen Qi Wan สารประกอบฟีนอลิกรวม ตำรับและสมุนไพรเดี่ยว

Abstract

This research aimed to determine total phenolic contents from Jin Gui Shen Qi Wan formula and a single herb in this formula, which is a substance in the flavonoid group that can bind to free radicals. Therefore, the quantification of total phenolic compounds is considered to be an important activity in the natural plant-derived antioxidant test. In this study are used the Folin-Ciocalteu colorimetric method for determining from Jin Gui Shen Qi Wan formula and the 8 single herbs. By testing the absorbance value at a wavelength of 765 nm and calculated against with standard value of Gallic acid equivalent (GAE), showed that the Jin Gui Shen Qi Wan formula had total phenolic contents of 309.84 ± 1.74 mg of gallic acid equivalent (GAE)/g extract. The extract of a single herb in the formula with the highest total phenolic compounds is *Paenonia syffruticosa* Andr, which showed at 776.65 ± 2.25 mg of gallic acid equivalent (GAE)/g extract. And the lowest total phenolic content is *Dioscoea opposita* Thunb., which showed at 61.17 ± 0.58 mg of gallic acid equivalent (GAE)/g extract.

Keywords: Jin Gui Shen Qi Wan formula, Total phenolic contents, Formula and single herb



1. บทนำ

ตำรับยา Jin Gui Shen Qi Wan มีที่มาจากคัมภีร์ Jin Gui Yao Lue ถูกบันทึกไว้โดย จางจิ้งจิง ในสมัยราชวงศ์ฮั่นตะวันออก ถือเป็นคัมภีร์การแพทย์แผนจีนเล่มแรกที่มีการบันทึกวิธีการและการรักษารวมถึงตำรับยาที่ใช้รักษาโรคที่มีความซับซ้อน Jin Gui Shen Qi Wan ประกอบไปด้วยตัวยา 8 ชนิด ได้แก่ เิงตี๋หวง ซานเย่า ซานจูหยี เจ้อเซี่ย ผูลิง หมูตันผิ กุ้ยจื่อ และฝูจื่อ มีสรรพคุณบำรุงธาตุหยางของไต ช่วยชะลอความเสื่อมของร่างกาย ใช้ในแบบยาลูกกลอน มีการศึกษาฤทธิ์ตำรับยา Jin Gui Shen Qi Wan ที่สกัดด้วยน้ำพบว่า ตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ ลดระดับ MDA ลดอัตราการตายของเซลล์ (Wang, Li, & Hou, 2000)

ตั๋หวง (Di Huang) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rehmannia glutinosa* Libosch. วงศ์ Orobanchaceae ส่วนที่นำมาใช้คือรากแห้ง รสหวาน ขม มีฤทธิ์เย็นจัด กระทำต่อเส้นลมปราณหัวใจ ตับและไต มีสรรพคุณลดความร้อนระดับเลือดและบำรุงธาตุหยิน เพิ่มสารน้ำจากการศึกษาทางพิษเคมีพบว่า ตั๋หวงอุดมไปด้วยสารประเภทอิริไดอยด์ (iridoids) โมโนเทอร์พีน (monoterpenes) และไกลโคไซด์ (glycosides) ได้แก่ dihydrocatapol, danmelittodide, acetylcatapol, rehmaglutin A, B, C, D, daucosterol, 1-ethyl- β -D-galactoside, acteoside, 3,4-dihydroxy-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside, 3,4-dihydroxy- β -phenethyl-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside (Oshio & Inouyea, 1982; Shoyama, Matsumoto, & Nishioka, 1986; Wu, Xu, & Li, 1984) นอกจากกลุ่มสารที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในรากหวงตั๋หวงยังพบสารในกลุ่ม saccharides ประเภทโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ glucose, galactose และ fructose นอกจากนี้ยังพบว่ามี oligosaccharides จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ sucrose, raffinose, mannotriose, stachyose และ verbascose (Kitagawa, Nishimura, Furubayashi, & Yosioka, 1971) อีกทั้งในรากตั๋หวงยังอุดมไปด้วยกรดอะมิโนชนิด alanine ในปริมาณสูงอีกด้วย จากการศึกษาฤทธิ์พบว่า catalpol ซึ่งเป็นกลุ่มสารประเภท iridoids, monosaccharide, glycoside ที่พบมากในตั๋หวง มีฤทธิ์ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ขับปัสสาวะและช่วยระบาย นอกจากนี้จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่า สารสกัดจากรากตั๋หวง ยังสามารถยับยั้งการอักเสบของตับ (Liu, Du, & Liang, 1992) อีกทั้งมีรายงานจากการศึกษาพบว่า สารสกัดรากตั๋หวงที่สกัดด้วย เอทานอล 50% (JR-ext, 200 mg/kg, p.o.) สามารถเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือด ป้องกันการเกิดระบบไหลเวียนโลหิตส่วนปลายอุดตัน อันมีสาเหตุมาจากโรคเรื้อรังหลายชนิด (Kubo, Asano, Shiimoto, & Matsuda, 1994) จากการศึกษาฤทธิ์ของรากตั๋หวงในหนูทดลอง พบว่า สาร polysaccharide ที่อยู่ในรากหวงตั๋หวงมีความสามารถกระตุ้นการทำงานของขบวนการสร้างเลือด (Liu, et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ของกระบวนการสร้างเม็ดเลือดในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโลหิตจางด้วยการกระตุ้นต่อมไทรอยด์และการให้ยาริเซอ์พีน (reserpine) ทางปากและด้วยการฉีด ไซโคลฟอสฟาไมด์ (cyclophosphamide) เข้าทางหน้าท้องพบว่า glycoside D ที่แยกได้จากสารสกัดของรากหวงตั๋หวง มีผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดเลือดขาว (leucocyte) เกล็ดเลือดและการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดแดง (reticulocyte) (Yu, Wang, Li, & Wang, 2001)

ซานเย่า (Shan Yao) หรือ Chinese Yam ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dioscorea opposita* Thunb. วงศ์ Dioscorea ส่วนที่ใช้คือราก รสหวาน สุขุม ตามตำรายาสมุนไพรจีนเป็นยาบำรุงเสริมธาตุหยิน บำรุงม้าม ปอดและไต กักเก็บสารจิงและหยุดอาการตกขาว กระทำต่อเส้นลมปราณม้าม ปอดและไต (Min, 2007) จากการศึกษาฤทธิ์ทางพิษเคมีพบว่าสารสกัดซานเย่าอุดมไปด้วยแป้ง นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของพิวรีน (purine) ฟีนแอนทรีน (phenanthrenes) สารธรรมชาติ stilbenes ซาโปนิน (saponin) และซาโปจินิน (sapoginins) นอกจากนี้จากการศึกษาสารสกัดซานเย่าที่แยกด้วยสารละลาย chloroform พบซานเย่า ประกอบไปด้วยสารทางพิษเคมี ได้แก่ 3,5-dihydroxy-4-methoxybibenzyl, 3,3',5-trihydroxy-2'-methoxybibenzyl และ dibenzoxepins ได้แก่ 10,11-dihydro-dibenz[b,f]oxepin-2-4-diol และ 10,11-dihydro-4-methoxy-dibenz[b,f]oxepin-2-ol จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ทดสอบด้วย DPPH พบว่าสารสกัดในซานเย่าสามารถยับยั้ง



ยับยั้งการทำงานของ COX-2 โดย 3,3',5-trihydroxy-2'-methoxybibenzyl (Zhi et al., 2019) มีการศึกษาฤทธิ์การต้านการติดเชื้อในลำไส้ในโรคท้องร่วงจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (AAD) ในหนูทดลอง พบว่าสาร alantoin และ polysaccharides ในขานเฝ้าสามารถเร่งอัตราการหายจากอาการท้องเสียเฉียบพลัน อีกทั้งยังสามารถเพิ่มน้ำหนักของหนูทดลองจาก AAD หลังจากรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้สารสกัดของขานเฝ้าในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูงสามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของลำไส้ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งอัตราการเกิดพยาธิสภาพจาก *Enterococcus* และ *Clostridium perfringens* (Zhang et al., 2019)

ขานจูหยี่ (Shan Zhu Yu) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. วงศ์ Cornaceae ส่วนที่ใช้คือ เนื้อของผลสุก รสเปรี้ยวฝาด ฤทธิ์เย็น กระทำต่อเส้นลมปราณตับและไต มีสรรพคุณช่วยในเรื่องการบำรุงตับและไต จากการศึกษาฤทธิ์ทางพิษวิทยาเคมีพบว่า ขานจูหยี่ มีองค์ประกอบสารเคมีสำคัญ ได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloids) อิริดอยด์ (iridoids) ได้แก่ morroniside, cornuside, loniceriside, 7- α -morroniside ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จากผล ได้แก่ kampferol, quercetin, kamferol-3-O- β -D-glucoside, naringenin, quereetin-3-O- β -D-glucuronide methyl ester พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ได้แก่ FCAP1, tachioside, (-)-isolarieiresinol-9'- β -glucocyanoside และ (1'S,2'R)-guaiacylglycerol-3'-O- β -D-glucocyanoside กรดอินทรีย์ ได้แก่ methyl quinate, 1,2-benzenedicarboxylic acid, pamaric acid, gallic acid และน้ำมันหอมระเหย มีการศึกษาฤทธิ์การต้านเบาหวาน พบว่า สารสกัดขานจูหยี่ ที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ สามารถเพิ่ม GLUT4 mRNA ในหนูทดลอง NIDDM และยังสามารถเพิ่มอัตราการเผาผลาญของน้ำตาล glucose (Qian, Zhu, & Zhu, 2001) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบประสาทและระบบประสาทหลังจากเกิดภาวะโรคสมองขาดเลือด (ischemic stroke) พบว่า สารสกัด Cornel iridoid glycoside ของขานจูหยี่ สามารถเพิ่มจำนวน bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cell และ nestin-positive cell ใน subventricular zone ของหนูทดลองที่เกิดโรคภาวะสมองขาดเลือด (Yao, Zhang, Wang, & Li, 2009) การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดขานจูหยี่ ที่สกัดด้วยน้ำ มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับชั้นปฐมภูมิชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) และมะเร็งเม็ดเลือดขาวผ่านกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระ (Chang, 2004)

ฝูหลิง (Fu Ling) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Poria cocos* (Schw.) Wolf วงศ์ Polyporaceae จัดอยู่ในอาณาจักร Fungi มักใช้เป็นส่วนราที่อยู่ในรากพืชตระกูลสน รสหวาน จืด รสสุขุม กระทำต่อเส้นลมปราณหัวใจ ม้ามและไต สรรพคุณขับน้ำ ลดอาการบวม น้ำ เสริมการทำงานของอวัยวะม้ามและสงบจิตประสาท จากการศึกษาฤทธิ์ทางพิษวิทยาเคมีพบว่า สารสกัดฝูหลิง ประกอบไปด้วย lanostane-type triterpene, 6 α -hydroxy-dyhydrotumulosic acid, oleanane triterpene, ursane triterpene และ N-glycoside (Yang et al., 2019) จากการศึกษาฤทธิ์การต้านโรคมะเร็งและการกดภูมิคุ้มกันในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยวิธี tail suspension test (TST), forced swimming test (FST) และ chronic unpredictable mild stress (CUMS) พบว่าสาร polysaccharides จากสารสกัดฝูหลิง PCWPW สามารถยับยั้งอาการซึมเศร้าและยังสามารถยับยั้งการกระตุ้น ConA หยุดยั้งการสร้าง T-cell นอกจากนี้ PCWPS ยังสามารถป้องกันเซลล์ PC12 ที่ถูกทำลายจาก H₂O₂ และยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ B-cell จากการเหนี่ยวนำ LPS (Zhang, Chen, Li, Zhao, & Duan, 2018) และยังมีงานวิจัยพบว่าสารสกัดน้ำมีฤทธิ์สงบประสาทในหนูถีบจักร คลายกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้กระต่าย 5 ผงยาเมื่อให้ทางปากหนูถีบจักรในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีผลยับยั้งอาการผิวหนังอักเสบ สารสกัดน้ำตาลเชิงซ้อนเมื่อให้ทางปากหนูถีบจักรในขนาด 250, 500, 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 7 วัน มีฤทธิ์เสริมม้ามให้แข็งแรง และสารสกัด 70% แอลกอฮอล์ เมื่อฉีดเข้าช่องท้องกระต่ายในขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัม วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 5 วัน มีฤทธิ์ขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดยาเตรียมเข้าใต้ผิวหนังหนูขาวในขนาดเทียบเท่าผงยา 1.4 กรัม/กิโลกรัม วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 8 วัน มีผลปกป้องตับได้ (Hu, 1999)

หมูตันผี (Mu Dan Pi) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Paeonia suffruticosa* Andr. วงศ์ Paeoniaceae ส่วนที่ใช้คือเปลือกราก รสขม เผ็ด ฤทธิ์หนาวเล็กน้อย กระทำต่อเส้นลมปราณหัวใจ ตับและไต ตามตำรายาสมุนไพรจีนมีสรรพคุณลดความร้อนในระดับเลือด สลาย



เลือดคั่ง จากงานวิจัยหัวข้อเรื่อง Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paenonia suffruticosa*. ซึ่งได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่แยกออกมาได้จากรากของหนุ่ตันผิ 6 ชนิด และสารจำนวน 6 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ออกมาจากเห็ด และทำการแยกสารทั้ง 6 ชนิดนี้โดยการแยกแบบเอทานอล ได้สารสกัดออกมาได้แก่ kaempferol, quercetin, mudanpioside B, benzoyloxypaeoniflorin, mudanpioside H และ pentagalloyl- β -(D)-glucose (Ding, H. Y., Lin, H. C., & Chang, T. S. (2009).

เจ้อเซี่ย (Zhe Xie) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep. วงศ์ Alismataceae ส่วนที่ใช้คือเหง้า รสหวาน ฤทธิ์เย็นจัด กระทำต่อเส้นลมปราณไตและกระเพาะปัสสาวะ มีสรรพคุณขับน้ำ ลดอาการบวมและระบายความร้อน องค์ประกอบทางเคมีของเจ้อเซี่ย ในกลุ่มจำพวก alisol A 24-acetate, alisol B 23-acetate, alisol F และ alismol มีด้านต่อ NAFLD และ ภาวะอ้วนลงพุง (metabolic syndrome) เจ้อเซี่ยยังมีสรรพคุณป้องกันการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมในตับ โดยการยับยั้ง de novo lipogenesis และเพิ่มการจัดไขมันนอกจากนี้ยังควบคุม oxidative stress markers, lipopapoptosis, การถูกทำลายของ liver panels และ ภาวะการอักเสบของเซลล์ตับ ดังนั้นจึงสามารถใช้ในภาวะโรคอ้วน ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และการลดความอยากอาหาร ซึ่งเจ้อเซี่ยอาจช่วยกระตุ้น adiponectin หรือมีบทบาทเป็นโดยตรงกับ farnesoid X receptor agonist (Choi, Jang, & Lee, 2019)

ก้วยจือ (Gui Zhi) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum cassia* Preal วงศ์ Lauraceae ส่วนที่นำมาใช้คือกิ่งอ่อน รสเผ็ด หวาน ฤทธิ์อุ่น กระทำต่อเส้นลมปราณหัวใจ ปอดและกระเพาะปัสสาวะ สรรพคุณขับเหงื่อ อุณหภูมิเส้นลมปราณ และแปรเปลี่ยนพลังหยาง ข้อมูลทางเภสัชวิทยาพบว่า เปลือกต้นอบเชยจีนพบน้ำมันระเหยประมาณ 1-2% ในน้ำมันระเหยพบสารหลายชนิด เช่น cinnamic aldehyde, cinnamyl acetate, phenyl-propyl acetate, tannin, latak และยาง เป็นต้น (จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, 2013) ในน้ำมันหอมระเหยสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ cinnamic aldehyde ประมาณ 51-76% และพบ eugenol เล็กน้อย ประมาณ 5-18% สารสกัดน้ำมันมีฤทธิ์ลดไข้และระบายความร้อนอย่างอ่อน ๆ ในหนูถีบจักรและกระต่าย เมื่อใช้ร่วมกับมหาหงาจะเพิ่มฤทธิ์ขับเหงื่อของมหาหงาให้แรงขึ้นในหนูขาว สารสกัดขนาดเทียบเท่าผงยา 0.01-0.2 กรัม มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง สารสกัดน้ำยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสบางชนิด (Bensky & Gamble, 1993) การศึกษาพิษเฉียบพลันโดยฉีดสารสกัดน้ำที่มีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยเข้าช่องท้องหนูถีบจักร พบว่าขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูถีบจักรตายหมด ตายร้อยละ 50 (LD₅₀) และไม่มีตัวใดตาย เมื่อให้สารสกัดในเวลากลางวัน มีค่าเท่ากับ 1,400, 624.7 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แต่เมื่อให้สารสกัดในเวลากลางคืนมีค่าเท่ากับ 1,600, 773.6 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าช่วงเวลาของวันมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัด (Ma, 1999)

ฝูจื่อ (Fu Zi) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aconitum carmichaeli* Debx. วงศ์ Ranunculaceae ส่วนที่ใช้คือรากแขนงที่ผ่านการฆ่าฤทธิ์ รสเผ็ด หวาน ฤทธิ์ร้อนจัด สรรพคุณดึงหยางกลับ บำรุงธาตุไฟส่งเสริมธาตุหยาง กระจายความหนาวระงับอาการปวด จากการศึกษาฤทธิ์ทางพิษเคมีพบว่าฝูจื่อมีองค์ประกอบของสารในกลุ่ม aconitine-type alkaloid, mesaconitine (Yue, 2009) ฝูจื่อ มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในสุนัข ด้านอวัยวะในหนูถีบจักร และหนูขาว 7 ระบุปวดในหนูถีบจักร และเสริมภูมิคุ้มกันต้านทานในหนูขาว มีสรรพคุณรักษาโรคหัวใจ และมีพิษมาก ความเป็นพิษแตกต่างกันมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับแหล่งปลูก อายุเก็บเกี่ยว วิธีฆ่าฤทธิ์ของยา และระยะเวลาในการต้ม มีรายงานว่าโหราเดียวไคจากแหล่งต่าง ๆ มีความเป็นพิษแตกต่างกันถึง 8 เท่า เมื่อฆ่าฤทธิ์ของยาแล้วจะสามารถลดพิษได้มากถึง 81% โดยทั่วไปขนาดของยาที่ทำให้เป็นพิษจะสูงกว่าขนาดรับประทานมาก 3 การศึกษาพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร โดยฉีดสารสกัดน้ำเข้าหลอดเลือดดำพบว่า ขนาดสารสกัดเทียบเท่าผงยาที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD₅₀) มีค่าเท่ากับ 13.75 กรัม/กิโลกรัม และขนาดของสารสกัดต่ำสุดที่ทำให้หนูขาวตายเทียบเท่าผงยา 23.40 กรัม/กิโลกรัม (Qu, 1999)



2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ ได้แก่ micro centrifuge 200R (HETTICH, Germany), vortex mixer รุ่น ZX4 (Germany), micro pipet 10-100 μ L (Labnet), micro pipet 100-1000 μ L (Labnet), pipette tip size 200 μ L (Hycon), pipette tip size 100-1000 μ L (Quality Science Plastic, China), microcentrifuge tube size 15 mL (Hycon plastic), microplate reader (Biotek), 96-well plate (Thermo Scientific, China) สารเคมี ได้แก่ Folin-Ciocalteu's reagent (LOBA CHEMIE), gallic acid (Fluka, Germany), sodium carbonate anhydrous (New Zealand), distilled water, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (CH_3OH)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัด

นำสมุนไพรทั้งตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan ที่ประกอบไปด้วย ตั๊กหวง ชานเย่า ชานจูหยี เจ้อเซี่ย ผู่หลิง หมู่ตันผิ กุ้ยจื่อ และผู่จื่อ ซึ่งในอัตราส่วน 8:4:4:3:3:3:1:1 บดรวมเป็นผงหยาบใส่ขวดกันกลม ใช้วิธีการกลั่นแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) โดยใช้ 95% ethanol (อัตราส่วน 1:3 %w/v) เป็นตัวทำละลาย โดยสมุนไพรตำรับน้ำหนักรวม 810 กรัม เติมตัวทำละลาย 95 % ethanol ปริมาตร 2.43 ลิตร รีฟลักซ์เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้ว จึงนำมารองด้วย filter crucible จากนั้นจึงเติมตัวทำละลาย 95% ethanol (อัตราส่วน 1:1 %w/v) น้ำหนักสมุนไพรต่อปริมาตรตัวทำละลายเป็น 810 กรัม ต่อตัวทำละลาย 810 mL ครั้งที่ 2 รีฟลักซ์ด้วยการให้ความร้อนเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงนำสารสกัดของตำรับยาที่ได้มารองด้วย filter crucible จากนั้นนำสารสกัดที่ได้รวมกับสารสกัดที่กรองได้ในครั้งที่ 1 นำสารสกัดที่ได้จากการกรองมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดตำรับยาสมุนไพรเข้มข้น แต่อย่าให้สารสกัดเข้มข้นจนหนืด เพราะจะทำให้เหวี่ยงสารสกัดออกได้ยาก จากนั้นจึงนำสารสกัดตำรับยาสมุนไพรที่ได้จากการ rotary evaporator มาระเหยเอา 95% ethanol ออกจนหมด บน water bath และได้ยาสมุนไพรเดี่ยวในตำรับทั้ง 8 ชนิด ชนิดละ 200 กรัม บดเป็นผงหยาบ แยกใส่ขวดกันกลมอย่างละชนิด ใช้ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย (อัตราส่วน 1:3 %w/v) น้ำหนักสมุนไพร 200 กรัมต่อปริมาตรตัวทำละลาย 600 mL รีฟลักซ์ด้วยการให้ความร้อนเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วนำสมุนไพรแต่ละชนิดมารองด้วย filter crucible จากนั้นเติมตัวทำละลาย (อัตราส่วน 1:1 %w/v) ลงในสมุนไพรเดี่ยวบดหยาบแต่ละชนิดปริมาตร 200 mL รีฟลักซ์เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ครั้งที่ 2 แล้วจึงนำสารสกัดของยาสมุนไพรเดี่ยวในตำรับแต่ละชนิดมารองด้วย filter crucible นำสารสกัดของสมุนไพรเดี่ยวที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง รวมกันแล้วนำมาให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator จนได้สารสกัดสมุนไพรเดี่ยวเข้มข้น จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้มาทำการระเหย 95% ethanol ออกจนหมดบน water bath

3.2.2 การหาปริมาณสารประกอบรวมฟีนอลิกรวม (total phenolic contents)

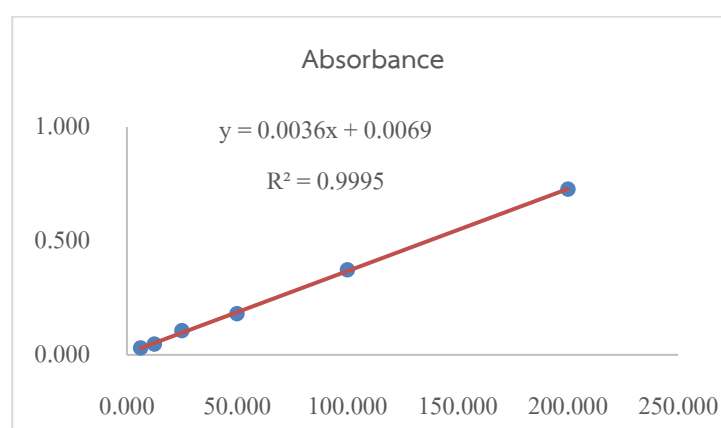
เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยชั่ง gallic acid 1 mg ละลายในเมทานอลโดยปริมาตร 1 mL เก็บไว้เป็น initial standard solution ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (Initial standard solution) เจือจางด้วยวิธี 2 fold dilution ให้ได้ 6 ความเข้มข้น เท่ากับ 3.125-100 $\mu\text{g/mL}$ หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วยเมทานอล เตรียม stock solution สารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและสารสกัดตำรับสมุนไพร โดยเตรียม stock solution ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 2 mg/mL ใน DMSO และเจือจางด้วยวิธี 2 fold dilution ให้ได้ 6 ความเข้มข้น (สาร A) เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent โดยการปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu จำนวน 5 mL เติมน้ำกลั่น 45 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL (สาร B) เตรียมสารละลาย 0.70 mol/L



sodium carbonate anhydrous (Na_2CO_3 , MW 105.99) โดยซึ่ Na_2CO_3 จำนวน 3.709 g ลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน (สาร C) ปิเปต (สาร A) จำนวน 100 μL ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1,500 mL จากนั้นเติม (สาร B) จำนวน 200 μL และนำไปบ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที เติม (สาร C) จำนวน 800 μL ผสมให้สารละลายเข้ากันด้วย vortex mixer และนำไปบ่มไว้ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายบ่มได้ที่แต่ละความเข้มข้นเร่งการตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง จำนวน 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้น จำนวน 200 μL ลงใน 96-well plate จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader บันทึกค่าดูดกลืนแสงของสาร (Absorbance: Abs)

4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดตำรับสมุนไพร Jin Gui Shen Qi Wan และสมุนไพรเดี่ยวในตำรับโดยเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 6.250-200.00 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานเส้นตรง ซึ่งมีค่าสหสัมพันธ์ (R^2) 0.9995 สมการเส้นตรง $y = 0.0072x + 0.0069$



ภาพที่ 1 กราฟแสดงค่าสารละลายมาตรฐานเส้นตรง

จากผลการศึกษาสารสกัดตำรับสมุนไพร Jin Gui Shen Qi Wan และสมุนไพรเดี่ยวในตำรับมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าตำรับสมุนไพร Jin Gui Shen Qi Wan มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 309.84 ± 1.74 มิลลิกรัม สมมูล gallic acid ต่อกรัม extract เมื่อทำการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสมุนไพรเดี่ยวทั้ง 8 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบภายในตำรับ พบว่า Mu Dan Pi มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 776.65 ± 2.25 มิลลิกรัม สมมูล gallic acid ต่อกรัม extract รองลงมา คือ Mu Dan Pi, Gui Zhi, Shan Zhu Yu, Fu Zi, Di Huang, Zhe xie, Fu Ling และ Shan Yao ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของตำรับและสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan

ชื่อตำรับ/สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)
Jin Gui Shen Qi Wan	-	309.84±1.74
Di Huang	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	120.891±1.87
Shan Zhu Yu	<i>Cornus officinalis</i> Sieb.et Zucc	247.09±1.25
Mu Dan Pi	<i>Paenonia syffruticosa</i> Andr.	776.65±2.25
San Yao	<i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	61.17±0.58
Fu Ling	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	101.521±7.802
Zhe Xie	<i>Alisma orientalis</i> (Sam.) Juzep.	115.19±16.83
Gui Zhi	<i>Cinamomum cassia</i> Preal	283.83±3.06
Fu Zi	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.	154.89±1.40

5. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic contents) ของสารสกัดตำรับและสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan พบว่า ตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan มีสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 309.84±1.74 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกรวมของสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ Jin Gui Shen Qi Wan ทั้ง 8 ชนิด พบว่า สมุนไพร Mu Dan Pi มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 776.65±2.25 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด รองลงมาได้แก่ สมุนไพร Gui Zhi มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 283.83±3.06 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สารสกัดสมุนไพร Shan Zhu Yu มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 247.09±1.25 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สมุนไพร Fu Zi มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 154.89±1.40 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สมุนไพร Di Huang มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 120.89±1.87 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สมุนไพร Zhe Xie มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 115.19±16.83 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สมุนไพร Fu Ling มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 101.52±7.80 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด สมุนไพร Shan Yao มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 61.17±0.58 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิตทุกท่าน ที่ได้สละเวลาให้คำปรึกษา แนะนำปรับปรุงแก้ไขในทุกด้าน ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างสูงทุกท่านที่ช่วยเหลือและเป็นที่กำลังใจในงานวิจัยครั้งนี้จนประสบผลสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

7. เอกสารอ้างอิง

Bensky, D., & Gamble, A. (1993). *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica* (Revised ed.). Seattle, WA: Eastland.

Chang, J. C. (2004). Chemoprevention against hepatocellular carcinoma of *Cornus officinalis* in vitro. *The American Journal of Chinese medicine*, 32(5), 717-725.



- Choi, E., Jang, E., & Lee, J. H. (2019). Pharmacological activities of *Alisma orientale* against nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: Literature review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 2943162. doi: 10.1155/2019/2943162
- หนังสือสมุนไพรลดไขมัน ในเลือด 140 ชนิด. (เภสัชกรหญิง จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก). “อบเชย” หน้า 207-209.
- Hu, R. J. (1999). Fu Ling. *Modern study of phamacology in traditional Chinese medicine* (2nd ed.). Tianjin: Tianjin Science & Technology.
- Ding, H. Y., Lin, H. C., & Chang, T. S. (2009). Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa*. *Journal of cosmetic science*, 60(3), 347–352.
- Kitagawa, I., Nishimura, T., Furubayashi, A., & Yosioka, I. (1971). On the constituents of rhizome of *Rehmannia glutinosa* Libosch. forma *hueichingensis* Hsiao. *Yakugaku Zasshi*, 91(5), 593-596.
- Kubo, M., Asano, T., Shiimoto, H., & Matsuda, H. (1994). Studies on *Rehmanniae radix*. I. Effect of 50% ethanolic extract from steamed and dried *rehmanniae radix* on hemorheology in arthritic and thrombotic rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17(9), 1282-1286.
- Liu, F. J., Cheng, J. P., Zhao, X. N., Tang, J. F., Ru, X. B., Feng, X. W., & Gu, G. M. (1996). Effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on hematopoietic stem cells, hematopoietic progenitor cells and peripheral blood in mice. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 12, 12-20.
- Liu, G. C., Du, H.Q., & Liang, L. (1992). Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* by HPLC. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 23, 71-73.
- Ma, J. K. (1999). *Ramalus Chinnamomi*: Gui Zhi. In: Wang, B. X., Ma, J. K., Zheng, W. L., Qu, S. Y., Li, R., Li, Y. K. (eds.). *Modern study of phamacology in traditional Chinese medicine* (2nd ed.). Tianjin: Tianjin Science & Technology.
- Yue, H. (2009). Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum Carmichaeli* Debx. by HPLC/ESIMS/MSn. *ScienceDirect*, 1800-1807.
- Min, G.-X. (2007). *Traditional Cinease Herbs drug*. Beijing: Traditional Chinese Medicine.
- Oshio, H., & Inouyea, H. (1982). Iridoid glycosides of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry*, 21(1), 133-138.
- Qian, D. S., Zhu, Y. F., & Zhu, Q. (2001). Effect of alcohol extract of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc on GLUT4 expression in skeletal muscle in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic mellitus rats. *Zhong Yao Za Zhi*, 26(12), 859-862.
- Qu, S. Y. (1999). *Radix Aconiti preparata: fu zi*. *Modern study of phamacology in traditional Chinese medicine* (2nd ed.). Tianjin: Tianjin Science & Technology.
- Shoyama, Y., Matsumoto, M., & Nishioka, I. (1986). Four caffeoyl glycosides from callus tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry*, 25(7), 1633-1636.
- Wang, X.-L., Li, Y.-C., & Hou, Y.-C. (2000). Jinguishenqi pill has anti-aging effect. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2000(10), 1209-1211.
- Wu, S. J., Xu, S. M., & Li, Y. C. (1984). Study of chemical constituents from *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 15, 6-8.



- Yang, P.-F., Hua, T., Wang, D., Zhao, Z.-W., Xi, G.-L., & Chen, Z.-F. (2019). Phytochemical and chemotaxonomic study of *Poria cocos* (Schw.) Wolf. *Biochemical Systematics and Ecology*, 83, 54-56.
- Yao, R. Q., Zhang, L., Wang, W., & Li, L. (2009). Cornel iridoid glycoside promotes neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Research Bulletin*, 79(1), 69-76.
- Yu, Z., Wang, J., Li, G.S., Wang, Y.S. (2001). Experimental study on rehmaionoside D in the action of nourishing yin, enriching the blood and reducing the blood sugar. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2001(4), 240-242.
- Zhang, N., Liang, T., Jin, Q., Shen, C., Zhang, Y., & Jing, P. (2019). Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) alleviates antibiotic-associated diarrhea, modifies intestinal microbiota, and increases the level of short-chain fatty acids in mice. *Food Research International*, 122, 191-198.
- Zhang, W., Chen, L., Li, P., Zhao, J., & Duan, J. (2018). Antidepressant and immunosuppressive activities of two polysaccharides from *Poria cocos* (Schw.) Wolf. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(Pt B), 1696-1704.
- Zhi, F., Yang, T. L., Wang, Q., Jiang, B., Wang, Z. P., Zhang, J., & Chen, Y. Z. (2019). Isolation, structure and activity of a novel water-soluble polysaccharide from *Dioscorea opposita* Thunb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 1201-1209.

การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเครื่องยาสมุนไพรในตำรับยาจตุผลาธิกะ ที่จำหน่ายในแขวงจักรวรรดิ กรุงเทพมหานคร

Quality control in physical characteristics properties of “Jatu Pala Thika” formula in Bangkok

ปิยะพงษ์ ชูชนะ^{1,*} ยูปา เตังวัฒนโชติ¹ วลัยลักษณ์ พรผล¹ รัชนี หมื่นรัก² และ นาซีน บาการะต๊ะ²

Piyapong Choochana¹, Yupa Tengwattanachoti¹, Walailak Pornphol¹, Ratchanee Muenrak², and Nazneen Bakasatae²

¹อาจารย์หลักสูตรการแพทย์แผนไทยบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี

²อาจารย์สาขาการแพทย์แผนไทย คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเฉลิมกาญจนา ศรีสะเกษ

¹Lecturer in Thai Traditional Medicine, College of Oriental Medicine, Rangsit University, Pathum Thani

²Lecturer in Thai Traditional Medicine, Faculty of Public Health, Chalermkarnchana University, Si Sa Ket

*Corresponding author, E-mail: piyapong.c@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

ปัจจุบันประชาชนเกิดความเจ็บป่วยด้วยโรคระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากการใช้ชีวิตที่เปลี่ยนไป การรับวัฒนธรรมจากตะวันตก ทำให้ระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่ายผิดปกติ เนื่องจากรับประทานอาหารที่มีกากใยน้อย ไม่ได้ออกกำลังกาย ภาวะความเครียด การทำงาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษากิจการจตุผลาธิกะ มีสรรพคุณ ถ่ายใช้ ถ่ายลม บำรุงธาตุ รู้ถ่ายรู้ปัด ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ สมอพิเภก สมอไทย สมอเทศ และมะขามป้อม อย่างละเสมอภาค ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาคุณภาพของตำรับยาดังกล่าว โดยศึกษาจากร้านขายยาสมุนไพรในแขวงจักรวรรดิ กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ร้าน โดยศึกษาด้านสิ่งแปลกปลอมของสมุนไพร ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้ารวม ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณสารสกัดที่ละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น 95% เอทานอล 70% เอทานอล และน้ำ ผลการศึกษาไม่พบปริมาณสิ่งแปลกปลอมของสมอพิเภก สมอไทย และสมอเทศ แต่มะขามป้อมพบไม่เกิน 0.17 %w/w สมอพิเภกจากทุกร้านมีปริมาณความชื้น น้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐาน THP มะขามป้อมจากร้าน E มีปริมาณความชื้นน้อยที่สุด เท่ากับ 8.23 %w/w สมอไทยจากร้าน A มีปริมาณเถ้ารวมน้อยที่สุด เท่ากับ 2.50 %w/w สมอเทศจากร้าน A มีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดน้อยที่สุด เท่ากับ 0.21 %w/w ปริมาณสารสกัดมะขามป้อมที่ละลายใน 95% เอทานอลจากร้านมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 17.61-19.42 ซึ่งสูงกว่าตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) สำหรับปริมาณสารสกัดจาก 70% เอทานอลของสมอพิเภกและสมอไทยจากร้าน อยู่ในช่วงระหว่าง 30.19-33.08 และ 25.21-31.42 %w/w ตามลำดับ และปริมาณสารสกัดน้ำของสมอพิเภก และมะขามป้อมจากร้าน อยู่ในช่วงระหว่าง 24.02-27.44 และ 26.23-28.28 %w/w ตามลำดับ เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน THP

คำสำคัญ: ควบคุมคุณภาพ มาตรฐานสมุนไพร จตุผลาธิกะ

Abstract

Nowadays, people are more likely to experience illnesses associated with daily behaviors that were influenced by western culture that have some negative effects, especially on the digestive system which results from low-fiber diet consumption, lack of exercise, and stress. Therefore, we studied Thai traditional medicine textbooks and found that the “Jatu Pala Thika” recipe gives good medicinal properties including antipyretic, carminative, element tonic, and antidiarrheal. The recipe consists of 4 herbal plants including *Terminalia bellirica*, *Terminalia chebula*, *Terminalia arjuna*, and *Phyllanthus emblica*. Consequently, we were interested in the quality control of those 4 herbs in the “Jatu Pala Thika” recipe obtained from 5 different Thai herbal pharmacy shops in Chakkrawat subdistrict, Bangkok. The study was carried out to investigate physical properties, foreign matters, ethanol-soluble extractive, and water-soluble extractive. The results revealed that foreign matters of *T. bellirica*, *T. chebula*, and *T. arjuna* do not

have foreign matters while *P. emblica* foreign matters of less than 0.17% w/w. For the study of loss on drying, we found that contents of *T. bellirica* from 5 Thai herbal pharmacy shops but, *P. emblica* from shop E showed the lowest content value of 8.23 %w/w. Total ash of *T. chebula* from shop A showed the lowest content value of 2.50% w/w. Acid-insoluble ash content of *T. arjuna* from shop A showed the lowest content value of 0.21 %w/w. The quantitative determination of the 95% ethanol *P. emblica* extract from every shop revealed value in the range 17.61-19.42 that higher than Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 70% ethanol *T. bellirica* and *T. chebula* extract revealed value in the range 30.19-33.08 and 25.21-31.42 %w/w, respectively. The water *T. Bellirica* and *P. emblica* extract revealed values in the range 24.02-27.44 and 26.23-28.28 %w/w, respectively. Which was agreed by the Thai Herbal Pharmacopoeia.

Keywords: Quality Control, Herbal Standardization, Chatu Pala Thika

1. บทนำ

ปัจจุบันการใช้ชีวิต การรับประทานอาหาร และการทำงานที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้เกิดโรคร้ายต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร เช่น การขับถ่าย ท้องอืด ท้องเฟ้อ ซึ่งเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตในด้านสุขภาพ ทำให้เกิดลมในระบบทางเดินอาหาร ลมที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร และระบบย่อยอาหาร ได้แก่ ลมกุณฺธิสยาว่าตา (ลมพัดในท้องนอกลำไส้) มีหน้าที่ เคลื่อนไหว กระเพาะ ลำไส้โดยบีบอาหารลงสู่ทวารหนัก โกฏฐาสยาว่าตา (ลมพัดในลำไส้และกระเพาะอาหาร) เป็นลมที่อยู่ในทางเดินอาหาร มีหน้าที่ช่วยให้ระบบทางเดินอาหารเป็นไปตามปกติ (กองการประกอบโรคศิลปะ, 2541) พิกัดจตุผลาธิกะ มีสรรพคุณ ถ่ายไข้ ถ่ายลม บำรุงธาตุ ผายลม รู้ถ่ายรู้ปิด (กองการประกอบโรคศิลปะ, ม.ป.ป.) พิกัดจตุผลาธิกะประกอบด้วยสมุนไพรรวม 4 อย่าง คือ สมอไทย สมอพิเภก สมอเทศ และมะขามป้อม ซึ่งผลสมอไทยมีสรรพคุณในการแก้ บิด แก้อท้องขึ้นท้องอืดท้องเฟ้อ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2546) ภาวะสมองเสื่อม เบาหวาน และอาการท้องผูก (Jokar, Masoomi, Sadeghpour, Nassiri-Toosi, & Hamed, 2016) สมอไทยใช้ในการนำมาใช้ในตำรับยาต่าง ๆ เช่น ยาหมอนิหิตาพรหมภักตร์ ยาอัศฎาธิวรรค ยาอำมฤตย์ ยาประสะผลสมอไทย สมอพิเภก มีสรรพคุณ แก้บิด (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2546) ซึ่งนำมาใช้ในตำรับยาต่าง ๆ เช่น ยาพรหมภักตร์ ยาหมอนิหิตาพรหมภักตร์ ยาเทพประสิทธิ์ มะขามป้อม มีสรรพคุณ แก้ไข้ แก้ไอ ทำให้ชุ่มคอ แก้ไข้ ใช้ในตำรับยาต่าง ๆ เช่น ยาบำรุงหัวใจเทพประสิทธิ์ ยาตรีชาสังข์ ยาหมอนิหิตาธิใหญ่ ยาจิตรมหาราช เป็นต้น สมอเทศ มีสรรพคุณ เป็นยาระบาย ขับเสมหะ ระบายลม รู้ถ่ายรู้ปิด ทำให้ลมเดินสะดวก ใช้ในตำรับยา เช่น ยาอัศฎาธิวรรค ยาแก้มุตร ยาปโตพาทีคุณ ยาหมอนิหิตาธิใหญ่ยานิบาต ยาแก้มุตรพิการ ยาสังฆเภท เป็นต้น (ฝ่ายประมวลเอกสารและจดหมายเหตุ, 2551) ซึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณภาพด้านกายภาพของเครื่องยาสมุนไพรรวมในตำรับยาจตุผลาธิกะ ที่จำหน่ายในร้านขายยาสมุนไพรรวมในแขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ร้านเพื่อเป็นข้อมูลในการเลือกซื้อสมุนไพรรวมที่ได้มาตรฐานต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเครื่องยาสมุนไพรรวมในตำรับยาจตุผลาธิกะ
- 2.2 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของสมุนไพรรวมในตำรับยาจตุผลาธิกะที่จำหน่ายในร้านขายยา แขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น ED2245, ประเทศไทย), hot air oven (Mettler รุ่น UN110, Germany), muffle furnace (Nabertherm รุ่น B180, Germany), orbital shaker (IKA, Germany), aluminum can, desiccator, ashless filter paper (Whatman), chloroform (RCI Labscan), ethanol (J.T. Baker), hydrochloric acid (J.T. Baker) forcep, crucible tong แวนชยาย ถาดอลูมิเนียม และเครื่องแก้วต่างๆ

สมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สมอพิเภก (*Terminalia bellirica*) สมอไทย (*Terminalia chebula*) สมอเทศ (*Terminalia arjuna*) และมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) จากร้านขายยาสมุนไพร จำนวน 5 ร้าน ในแขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของสมุนไพรในตำรับจตุวาตะผล จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สมอพิเภก สมอไทย สมอเทศ และมะขามป้อม โดยสุ่มจากร้านขายยาสมุนไพรในแขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ร้าน โดยการวิธีการตรวจสอบสมุนไพรโดยอ้างอิงจากตำรายาสมุนไพรไทย (Department of Medical Science, 2021) โดยสมุนไพรแต่ละชนิดจะตรวจสอบ ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (foreign matter) การหาปริมาณเถ้ารวม (total ash) การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash) การหาปริมาณความชื้น (loss on drying) การหาปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (soluble extractive) เช่น น้ำ 95% เอทานอล และ 70% เอทานอล ดังนี้

3.2.1 ลักษณะทางมหภาค (macroscopic structure) เป็นการศึกษาลักษณะภายนอก ลักษณะรอยตัดขวาง รูปร่าง ขนาด น้ำหนัก สี กลิ่นและรส

3.2.2 การหาปริมาณสิ่งแปลกปลอม (foreign matter) เป็นการหาปริมาณสิ่งปลอมปนในสมุนไพร เป็นส่วนอื่น ๆ ของพืชที่ไม่ต้องการ เช่น ก้อนกรวด ทราย หิน ที่ปนเปื้อนมากับสมุนไพร โดยการชั่งสมุนไพร 100 กรัม แล้วเกลี่ยสมุนไพรในถาดอะลูมิเนียมเพื่อตรวจสอบปริมาณสิ่งปลอมปนด้วยตาเปล่าหรือแว่นขยาย นำสิ่งแปลกปลอมมาชั่งน้ำหนัก และนำมาคำนวณ %สิ่งแปลกปลอมในสมุนไพรได้จากสมการ

$$\% \text{สิ่งแปลกปลอม} = (\text{น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม} / \text{น้ำหนักสมุนไพรทั้งหมด}) \times 100$$

3.2.3 การหาปริมาณเถ้ารวม (total ash) เป็นการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสมุนไพรว่ามีกรปลอมปนหรือไม่ โดยการนำผงสมุนไพรไปเผาและดูปริมาณเถ้าหลังการเผาอุณหภูมิไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส ซึ่งปริมาณเถ้าทั้งหมดเกิดจากการเผาเนื้อเยื่อสมุนไพรและอาจเกิดจากสิ่งปลอมปนที่ติดมากับสมุนไพร เช่น ดิน ทราย เป็นต้น โดยการชั่งสมุนไพรใส่เบ้าเคลือบ (crucible) ที่ทราบน้ำหนักคงที่ นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเบ้าเคลือบตั้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่ง สามารถคำนวณ %ของปริมาณเถ้าในสมุนไพรได้จากสมการ

$$\% \text{ปริมาณเถ้ารวม} = (\text{น้ำหนักเถ้า} / \text{น้ำหนักสมุนไพร}) \times 100$$

3.2.4 การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash) เป็นการตรวจสอบอนินทรีย์ที่ติดมากับสมุนไพรที่ไม่เกิดการสลายเมื่อมีการเผาที่อุณหภูมิสูง โดยนำปริมาณเถ้ารวมไปต้มกับกรดเจือจาง แล้วล้างกรองตะกอนด้วยน้ำกลั่น ใส่ในเบ้าเคลือบที่ทราบน้ำหนักคงที่ นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเบ้าเคลือบตั้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่ง สามารถคำนวณ %ของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของสมุนไพรได้จากสมการ

$$\% \text{ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด} = (\text{น้ำหนักเถ้าที่ไม่ละลายในกรด} / \text{น้ำหนักสมุนไพร}) \times 100$$

3.2.5 การหาปริมาณความชื้น (loss on drying) เป็นการหาปริมาณน้ำและสารที่ระเหยได้ โดยการอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส โดยชั่งสมุนไพรใส่ในกระป๋องอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักคงที่ (aluminium can) นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำกระป๋องอะลูมิเนียมไปใส่ในโถดูดความชื้น 30 นาที และนำไปชั่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่สามารถคำนวณ %ความชื้นในสมุนไพรได้จากสมการ

$$\% \text{ความชื้น} = [100(W1-W2)] / (W1-W)$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (กรัม)

W1 คือ น้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดและสมุนไพรก่อนอบ (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักของกระป๋องอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดและสมุนไพรหลังอบ (กรัม)

3.2.6 การหาปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย (soluble extractive) เป็นการหาปริมาณสารสกัดที่ได้จากสมุนไพรด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ โดยการชั่งสมุนไพรจำนวน 5 กรัม ใส่ใน erlenmeyer flask

1) การหาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (water soluble extractive) เป็นการหาสารสกัดที่ละลายได้ในน้ำ ใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2.5:1,000

2) การหาปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอล (ethanol soluble extractive) เป็นการหาสารสกัดที่ละลายได้ในเอทานอล สามารถละลายสารที่มีขี้ผึ้งได้ปานกลางและขี้ผึ้งได้ดี โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย

3) การหาปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (70% ethanol soluble extractive) ใช้ 70% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย

โดยใส่ตัวทำละลายดังกล่าวปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงใน erlenmeyer flask ที่มีสมุนไพร นำไปเขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และดูดสารปริมาณ 20 มิลลิลิตร ใส่ในชามระเหย (evaporating dish) ที่ทราบน้ำหนักคงที่แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกบน water bath จนกระทั่งแห้งแล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นและนำไปชั่ง นำไปอบซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่สามารถคำนวณ %ของปริมาณสารสกัดของสมุนไพรได้จากสมการ

$$\% \text{ปริมาณสารสกัด} = (\text{น้ำหนักสารสกัด} / \text{น้ำหนักสมุนไพรเริ่มต้น}) \times 100$$

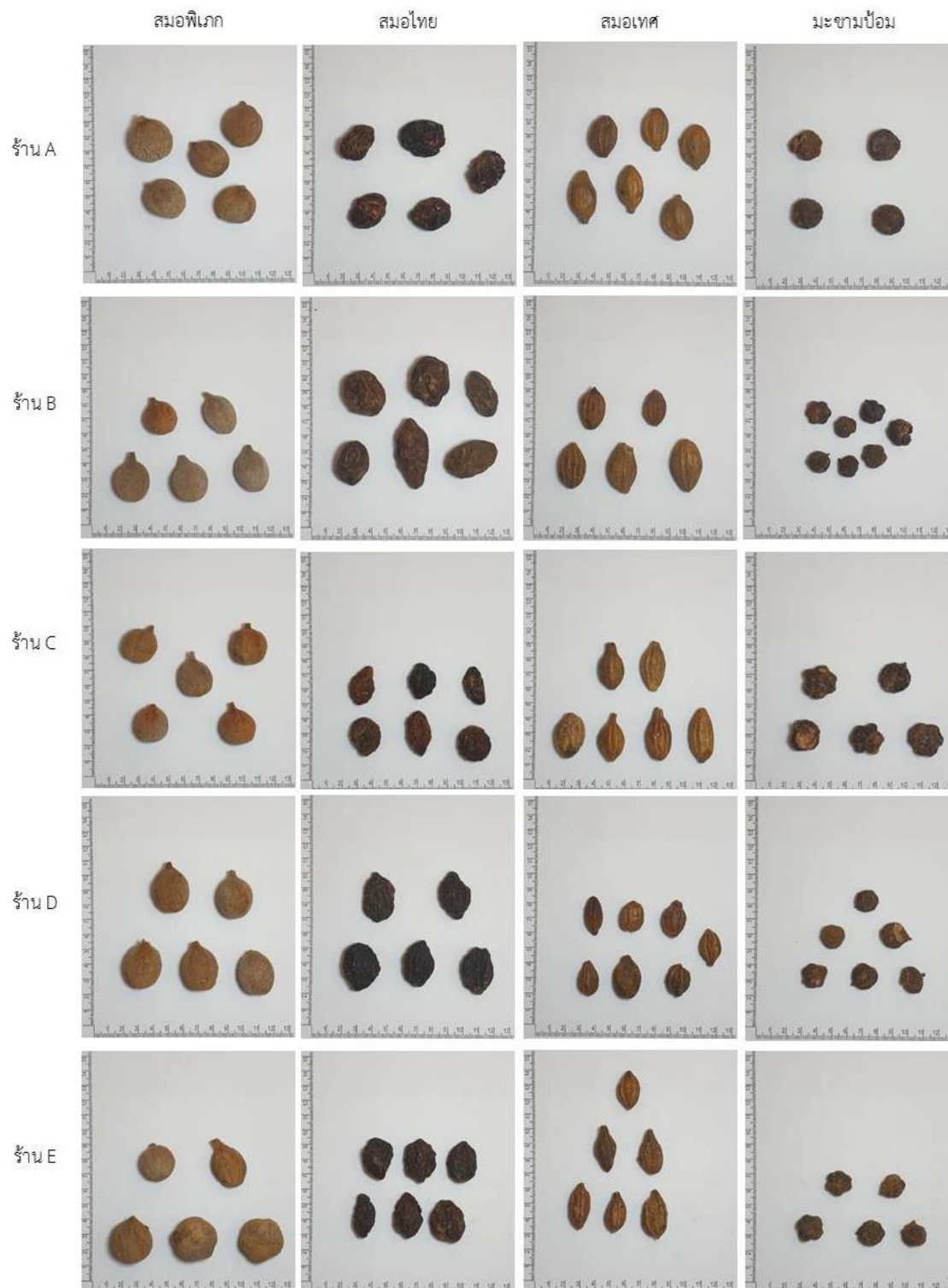
4. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาลักษณะทางมหภาคของสมุนไพรได้รับจัดผลลักษณะทั้ง 4 ชนิด พบว่า สมอพิเภก รสฝาด เป็นผลสีเหลืองออกน้ำตาล กลมแข็ง มีขนปกคลุมสีน้ำตาล ผลขนาด 2-3 เซนติเมตร สมอไทย รสฝาด เป็นผลสีดำ มีสันตามยาว 5 สัน รูปร่าง 2-2.5 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร สมอเทศ รสฝาด ผลยาวรี กว้างประมาณ 2.5-3.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มีสันนูน มะขามป้อม รสเปรี้ยวฝาดขม เนื้อผลภายนอกย่น สีน้ำตาลดำ ผลเป็นชิ้นๆ 3-4 ชิ้น เปลือกเมล็ดด้านในแข็ง ดังแสดงในภาพที่ 1 ผลการหาปริมาณสิ่งแปลกปลอมของสมุนไพร สมอพิเภก สมอไทย สมอเทศ จากทุกร้าน ไม่พบสิ่งแปลกปลอม มะขามป้อมจากร้าน A, B, C, D และ E พบปริมาณสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 0.09, 0.00, 0.09, 0.06 และ 0.17 %w/w ตามลำดับ

ปริมาณความชื้นของสมอพิเภกอยู่ในช่วงระหว่าง 8.20-9.59 %w/w โดยสมอพิเภกจากร้าน C มีปริมาณความชื้นน้อยที่สุดเท่ากับ 8.20 %w/w ซึ่งสมุนไพรจากทุกร้านมีปริมาณความชื้นน้อยกว่าที่กำหนดใน THP ที่กำหนดค่าไม่เกิน 11 %w/w สมอไทย มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 9.49-11.45 %w/w โดยสมอไทยจากร้าน E, C, A และ D มีปริมาณความชื้นเท่ากับ 9.49, 9.93, 10.49 และ 10.64 %w/w ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าที่กำหนดใน THP ที่กำหนดไม่เกิน 11 %w/w สมอเทศมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 9.26-11.30 %w/w โดยสมอเทศจากร้าน E มีปริมาณความชื้นน้อยที่สุด มะขามป้อมมีปริมาณความชื้นอยู่



ในช่วงระหว่าง 7.84-9.74 %w/w โดยมะขามป้อมจากร้าน A, E, C มีปริมาณความชื้นเท่ากับ 7.84, 8.23 และ 8.47 %w/w ซึ่งมีปริมาณความชื้นน้อยกว่าที่กำหนดใน THP ที่กำหนดไม่เกิน 9 %w/w สมุนไพรร้าน B, D มีปริมาณความชื้นเท่ากับ 9.74 และ 9.07 %w/w ซึ่งน้อยกว่าที่กำหนดในเภสัชตำรับของจีน (นพมาศและนงลักษณ์, 2551) ดังแสดงตารางที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะทางมหภาคของสมุนไพรในตำรับจตุผลาภิกะ



ตารางที่ 1 แสดงความบริสุทธิ์ของสมุนไพรในตำรับจตุผลลาภิกะ

สมุนไพร	ร้านสมุนไพร	Foreign matter (%w/w)	Loss on drying (%w/w)	Total ash (%w/w)	Acid insoluble ash (%w/w)
สมอพิเภก	A	0.00	10.35	4.79	0.60
	B	0.00	10.39	3.75	0.40
	C	0.00	9.25	4.16	0.59
	D	0.00	10.13	3.92	0.49
	E	0.00	9.96	3.76	0.53
สมอไทย	A	0.00	10.49	2.50	0.27
	B	0.00	11.45	3.83	0.55
	C	0.00	9.93	3.02	0.34
	D	0.00	10.64	3.44	0.41
	E	0.00	9.49	3.09	0.51
สมอเทศ	A	0.00	10.77	3.10	0.21
	B	0.00	11.30	4.86	0.37
	C	0.00	10.36	4.15	0.41
	D	0.00	10.26	5.05	0.46
	E	0.00	9.26	3.73	0.30
มะขามป้อม	A	0.09	7.84	2.81	0.35
	B	0.00	9.74	3.64	0.46
	C	0.09	8.84	3.14	0.68
	D	0.06	9.07	3.60	0.64
	E	0.17	8.23	4.17	0.74

การหาปริมาณเถ้าของสมอพิเภกพบว่าจากร้าน B มีปริมาณเถ้ารวมต่ำสุดเท่ากับ 3.75 %w/w ถัดมาคือจากร้าน E, D, C และ A โดยมีปริมาณเถ้าเท่ากับ 3.76, 3.92, 4.16 และ 4.79 %w/w ตามลำดับ ซึ่งสมุนไพรจากทุกร้านเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานตำรายาสมุนไพรไทยที่กำหนดปริมาณเถ้าของสมอพิเภกต้องไม่เกิน 5 %w/w (Department of Medical Science, 2021) การหาปริมาณเถ้าของสมอไทยพบว่าปริมาณเถ้าอยู่ในช่วง 2.50-3.83 %w/w พบว่าสมอไทยจากร้าน D, E, C และ A พบปริมาณเถ้าเท่ากับ 3.44, 3.09, 3.02 และ 2.50 %w/w ตามลำดับ มีปริมาณเถ้าเป็นไปตามเกณฑ์ของ THP ที่กำหนดปริมาณเถ้าของสมอไทย ไว้ไม่เกิน 3.5 %w/w การหาปริมาณเถ้าของสมอเทศมีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงระหว่าง 3.10-5.05 %w/w พบว่าสมุนไพรจากร้าน E, B, C, D, A มีปริมาณเถ้าเท่ากับ 5.05, 4.86, 4.15, 3.73 และ 3.10 %w/w ตามลำดับ การหาปริมาณเถ้าของมะขามป้อมอยู่ในช่วง 2.81-4.17 %w/w โดยมะขามป้อมจากร้าน B, D, C, A มีปริมาณเถ้าเท่ากับ 3.64, 3.60, 3.14 และ 2.81 %w/w ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ของ THP ดังแสดงในตารางที่ 1

การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของสมอพิเภกพบว่า อยู่ในช่วง 0.40-0.60 %w/w โดยสมอพิเภกจากทุกร้านมีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ซึ่งกำหนดปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดต้องไม่เกิน 0.60 %w/w (Department of medical science, 2021) ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของสมอไทยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.27-



0.55 %w/w โดยสมอไทยจากทุกร้านมีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ซึ่งกำหนดปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดต้องไม่เกิน 0.60 %w/w สมอเทศ มีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.21-0.46 %w/w มะขามป้อมมีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.35-0.74 %w/w ซึ่งมะขามป้อมจากทุกร้านมีปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ซึ่งกำหนดปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดต้องไม่เกิน 1.0 %w/w ดังแสดงในตารางที่ 1

จากการศึกษาปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของสมุนไพรแต่ละชนิด พบว่า สมอพิเภกจากร้าน A, B, C และ D มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 21.22, 20.99, 20.49 และ 18.08 %w/w ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานยาสมุนไพรไทยซึ่งกำหนดปริมาณสารสกัดของสมอพิเภกด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอลต้องไม่ต่ำกว่า 17 %w/w (Department of Medical Science, 2021) สมอไทยพบว่ามีปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอลอยู่ในช่วงระหว่าง 16.29-24.09 %w/w โดยสมอไทยจากร้าน B, C, A และ E มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 24.09, 23.43, 21.86 และ 20.49 %w/w ซึ่งสูงกว่า THP ที่กำหนดค่าปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของสมอไทยไม่ต่ำกว่า 20 %w/w (Department of Medical Science, 2021) สมอเทศจากร้าน B มีปริมาณสารสกัดสูงสุดเท่ากับ 20.44 %w/w รองลงมาคือสมอเทศ A, E, C, D โดยมีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 19.42, 19.42, 18.66 และ 16.35 %w/w ตามลำดับ มะขามป้อมจากร้าน A มีปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 19.69 %w/w รองลงมาคือ ร้าน B C E และ D มีปริมาณสารสกัดด้วยน้ำเท่ากับ 19.18, 18.41, 18.37 และ 17.61 %w/w ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า THP ที่กำหนดค่าปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของมะขามป้อมไม่ต่ำกว่า 16 %w/w

จากการศึกษาปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล พบว่า สมอพิเภกมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 30.19-33.08 %w/w โดยสมอพิเภกจากร้าน C มีปริมาณสารสกัดสูงสุด คือ เท่ากับ 33.08 %w/w รองลงมาคือสมอพิเภกจากร้าน B, E, A และ D เท่ากับ 32.26, 31.56, 30.24 และ 30.19 %w/w ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดใน THP ปริมาณสารสกัดของสมอไทย อยู่ในช่วงระหว่าง 25.21-31.42 %w/w ซึ่งสมุนไพรจากร้าน A, C, B, D มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 31.42, 30.00, 29.17 และ 28.59 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดใน THP สมอเทศมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 29.03-31.88 %w/w โดยสมุนไพรจากร้าน A มีปริมาณสารสกัดสูงสุดคือเท่ากับ 31.88 %w/w รองลงมาคือร้าน E A C และ D โดยมีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 31.80, 31.00, 30.12 และ 29.03 %w/w

ผลการศึกษาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ พบว่า สมอพิเภกมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 24.02-27.44 %w/w ทุกร้านมีปริมาณสารสกัดสูงกว่าเกณฑ์ตำรามาตรฐานใน THP ที่กำหนดปริมาณสารสกัดด้วยน้ำไม่ต่ำกว่า 24 %w/w สมอไทยมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 25.75-31.92 %w/w โดยสมอไทยจากร้าน B, E, A และ C มีปริมาณสารสกัดเท่ากับ 31.92, 29.22, 29.19 และ 28.84 %w/w ซึ่งมีปริมาณสารสกัดสูงกว่าที่กำหนดใน THP มะขามป้อม มีปริมาณสารสกัดอยู่ระหว่าง 26.23-28.28 %w/w โดยมะขามป้อมทุกร้านมีปริมาณสารสกัดสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดใน THP ซึ่งกำหนดไม่ต่ำกว่า 26%w/w (Department of Medical Science, 2021) สมอเทศมีปริมาณสารสกัดด้วยน้ำอยู่ในช่วงระหว่าง 25.21-26.08 %w/w ดังแสดงในตารางที่ 2



ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสารสกัดสมุนไพรในตำรับจตุผลาธิกะด้วยตัวทำละลายต่างๆ

สมุนไพร	ร้านสมุนไพร	Ethanol (%w/w)	70% Ethanol (%w/w)	Water (%w/w)
สมอพิเภก	A	21.22	30.24	27.44
	B	20.99	32.26	24.39
	C	20.49	33.08	24.02
	D	18.08	30.19	26.75
	E	16.29	31.56	26.06
สมอไทย	A	21.86	31.42	29.19
	B	24.09	29.17	31.92
	C	23.43	30.00	28.87
	D	19.87	28.59	28.84
	E	20.49	25.21	29.22
สมอเทศ	A	19.42	31.00	25.75
	B	20.44	31.88	25.22
	C	18.66	30.12	25.21
	D	16.35	29.03	25.37
	E	19.42	31.80	26.08
มะขามป้อม	A	19.69	NA	26.59
	B	19.18	NA	28.28
	C	18.41	NA	26.23
	D	17.61	NA	26.38
	E	18.37	NA	26.88

5. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาคุณภาพของภาพของสมุนไพรตำรับจตุผลาธิกะ ของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ สมอเทศ สมอไทย สมอเทศและมะขามป้อม จากร้านขายยาสมุนไพรทั้ง 5 ร้าน ในแขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร การหาปริมาณสิ่งแปลกปลอมของสมอพิเภก สมอไทย สมอเทศจากทุกร้านไม่พบปริมาณสิ่งแปลกปลอม การศึกษาความชื้นในสมุนไพรพบว่าสมอพิเภกมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 9.25-10.39 %w/w ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP สมอไทยมีปริมาณร้าน A, C, D, E มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 9.49-10.64 %w/w ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP สมอเทศจากร้าน A, C, D, E มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงระหว่าง 9.49-11.30 %w/w มะขามป้อมจากร้าน A, C, E มีปริมาณความชื้นอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP การศึกษาปริมาณเถ้าพบว่าสมอพิเภกมีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงระหว่าง 3.75-4.79 %w/w ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP สมอไทยจากร้าน A, C, D, E มีปริมาณเถ้าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP สมอเทศมีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วง 3.10-5.05 %w/w มะขามป้อมจากร้าน A, B, C, D มีปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงระหว่าง 2.81-3.64 %w/w ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP การหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของสมอพิเภก สมอไทย และมะขามป้อม อยู่ในช่วงระหว่าง 0.40-0.60, 0.27-0.55 และ 0.35-0.74 %w/w ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP สมอเทศอยู่ในช่วงระหว่าง 0.21-0.46 %w/w จากการศึกษาปริมาณสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของสมุนไพรพบว่า สมอพิเภกจากร้าน A, B, C, D มีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 18.08-21.22 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ THP กำหนด โดยต่ำกว่า



17 %w/w สมอไทยจากร้าน A, B, C, E อยู่ในช่วงระหว่าง 20.49-24.09 %w/w ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน THP กำหนด โดยไม่ต่ำกว่า 20 %w/w สมอเทศมีปริมาณสารสกัดอยู่ระหว่าง 16.35-20.44 %w/w มะขามป้อมมีปริมาณสารสกัดอยู่ระหว่าง 17.61-19.69 %w/w โดยสมุนไพรจากร้านมีปริมาณสารสกัดสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ THP กำหนด การหาปริมาณสารสกัดด้วย 70% เอทานอล พบว่าสมอพิเภกจากร้านมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 30.19-33.08 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่ THP กำหนด สมอไทยจากร้าน A, B, C, D มีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 28.59-31.42 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ของ THP ปริมาณสารสกัดของสมอเทศอยู่ในช่วงระหว่าง 29.03-31.88 %w/w การศึกษาปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ สมอพิเภกและสมอไทยจากร้านมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 24.02-27.44 และ 28.84-31.92 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน THP กำหนด สมอพิเภกมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วงระหว่าง 25.21-26.08 %w/w มะขามป้อมจากร้านมีปริมาณสารสกัดอยู่ในช่วง 26.23-28.28 %w/w ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน THP กำหนด โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณภาพและมาตรฐานของสมุนไพรที่ขายอยู่ในท้องตลาดเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกซื้อสมุนไพรในการพัฒนาและผลิตภัณฑ์สมุนไพรในการดูแลสุขภาพต่อไป

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภญ.รัตติยา ตั้งบูชาเกียรติ ที่คอยช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

- กองการประกอบโรคศิลปะ กรมสนับสนุนบริการสุขภาพ (ม.ป.ป.). ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรมไทย.
- กองการประกอบโรคศิลปะ กองการประกอบโรคศิลปะ (ม.ป.ป.). ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป เล่มที่ 1 สาขาเวชกรรมไทย.
- ฝ่ายประมวลผลเอกสารและจดหมายเหตุ. (2551). แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์: ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ สกสค. ลาดพร้าว.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และ นางลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). คุณภาพเครื่องยาไทยจากงานวิจัยสู่การพัฒนาย่างยั่งยืน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คอนเซ็ปต์เมดิคัล.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- Department of Medical Science, Ministry of Public health (2021). *Thai Herbal Pharmacopoeia*. Retrieved March 15, 2021, from <https://www.bdn.go.th/thp/ebook/>
- Jokar, A., Masoomi, F., Sadeghpour, O., Nassiri-Toosi, M., & Hamed, S. (2016). Potential therapeutic applications for *Terminalia chebula* in Iranian traditional medicine. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 36(2), 250-254.



ภาคผนวก



(สำเนา)

โครงการประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2564 วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

1. หลักการและเหตุผล

การสนับสนุนส่งเสริมให้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัย งานสร้างสรรค์ สิ่งประดิษฐ์ และข้อค้นพบใหม่ เป็นอีกบทบาทหนึ่งที่สำคัญของมหาวิทยาลัย ภายใต้ยุทธศาสตร์ด้านความเป็นเลิศทางงานวิจัยและนวัตกรรมของมหาวิทยาลัยรังสิต เพื่อเป็นการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพด้านวิชาการและการวิจัย รวมถึงการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและประสบการณ์เชิงวิชาการของอาจารย์ นักวิจัย นักศึกษา นิสิต ในระดับอุดมศึกษา ทั้งภาครัฐและเอกชน นอกจากนี้ยังเป็นโอกาสที่ได้ถ่ายทอดและนำออกเผยแพร่สู่สาธารณชน สามารถนำความรู้และเทคโนโลยีไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์ อันจะส่งผลดีต่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศต่อไป วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการดำเนินงานพัฒนางานวิจัย จึงได้จัดงานประชุมวิชาการระดับชาติ Oriental Medicine and Sciences Conference 2022 มีหลักการเพื่อสนับสนุนให้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยทางด้านการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนไทยประยุกต์ การแพทย์แผนจีน การแพทย์แผนตะวันออก และการแพทย์ทางเลือกอื่น ๆ เป็นอีกบทบาทที่สำคัญของมหาวิทยาลัย เพื่อเป็นการส่งเสริมและพัฒนาศักยภาพด้านวิชาการและการวิจัย รวมถึงเกิดการแลกเปลี่ยนความคิดเห็นและประสบการณ์เชิงวิชาการของอาจารย์ นิสิต ผู้ประกอบวิชาชีพด้านการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนจีน นักวิจัยที่ใช้หลักการทางวิทยาศาสตร์ในการค้นหา อธิบายกลไกการรักษา ตลอดจนการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต จึงได้ร่วมจัดงานฯ กับหลักสูตรการแพทย์แผนจีน หลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะกรรมการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ในการดำเนินการจัดงาน Oriental Medicine and Sciences Conference 2022 ซึ่งเป็นงานประชุมวิชาการระดับชาติ จะเป็นเวทีให้อาจารย์ นิสิต นักศึกษา ผู้สนใจในศาสตร์การแพทย์ทางเลือก ได้นำเสนอผลงานวิจัยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อวงการวิชาชีพทางการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนจีน การแพทย์แผนตะวันออก และการแพทย์ทางเลือกอื่น ๆ นอกจากนี้ทางผู้จัดงานยังเปิดเวทีให้กับงานในสาขาที่เกี่ยวข้อง เช่น วิทยาศาสตร์ สุขภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เป็นต้น ส่งงานวิจัยเข้าร่วมในงานครั้งนี้

2. วัตถุประสงค์

1) เพื่อกระตุ้นให้คณาจารย์ นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา และผู้เกี่ยวข้องได้แลกเปลี่ยนเรียนรู้ประสบการณ์ ตลอดจนข้อคิดเห็นในการพัฒนางานวิจัยให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และสร้าง



เครือข่ายในการพัฒนางานวิจัยให้เกิดขึ้นระหว่างนักวิจัย สถาบันการศึกษา ตลอดจนหน่วยงานภาครัฐและภาคเอกชน

2) เพื่อส่งเสริมให้คณาจารย์ นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยภาครัฐ และเอกชน และหน่วยงานต่าง ๆ ได้นำเสนอผลงานวิจัยและเผยแพร่ผลงานวิชาการสู่สาธารณชนและชุมชน

3) เพื่อให้เกิดความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัย หน่วยงานราชการ และหน่วยงานเอกชน ในการค้นคว้าและพัฒนางานวิจัยต่อไป

3. รูปแบบของการประชุมวิชาการ

การประชุมแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) การบรรยายพิเศษ การอภิปรายเสวนา จากวิทยากรผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย การแพทย์แผนจีน และนวัตกรรมวิทยาศาสตร์

2) การนำเสนอผลงานวิจัยเป็นภาคบรรยายและภาคโปสเตอร์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1) ภาคบรรยายในสาขาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนไทยประยุกต์ สาขาการแพทย์แผนจีน และสาขาการแพทย์แผนตะวันออกและวิทยาศาสตร์สุขภาพ

2.2) ภาคโปสเตอร์ในสาขาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์แผนไทยประยุกต์ สาขาการแพทย์แผนจีน และสาขาการแพทย์แผนตะวันออกและวิทยาศาสตร์สุขภาพ

4. หน่วยงานรับผิดชอบ

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ร่วมกับ 3 สถาบันการศึกษา ได้แก่ 1) หลักสูตรการแพทย์แผนจีน และหลักสูตรการแพทย์แผนไทยประยุกต์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 2) คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ 3) คณะการแพทย์แผนจีน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

5. ระยะเวลาและสถานที่จัดประชุมวิชาการ

วันเสาร์ที่ 26 มีนาคม 2565 รูปแบบออนไลน์ สถานที่ตั้งหลักคือ มหาวิทยาลัยรังสิต

6. ผู้เข้าร่วมประชุม

ประกอบด้วยคณาจารย์ นักวิจัย นักวิชาการ นิสิต นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัย และหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน และผู้สนใจทั่วไป จำนวน 100 คน



7. อัตราค่าลงทะเบียน

รายละเอียดการลงทะเบียน	ค่าสมัคร (บาท)
ผู้สมัครและนำเสนอผลงาน (Full Proceeding)	
- ตั้งแต่บัดนี้ถึง 15 มกราคม 2565	1,500
- ตั้งแต่ 15 มกราคม 2565 ถึง 10 มีนาคม 2565	2,000
ผู้สนใจเข้าร่วมงาน แต่ไม่นำเสนอผลงาน	500
บุคลากร คณาจารย์ และนักศึกษามหาวิทยาลัยรังสิต	ไม่เสียค่าใช้จ่าย

8. การรับสมัคร

ผู้สนใจนำเสนอผลงานและผู้เข้าร่วมประชุมวิชาการ สามารถศึกษารายละเอียดและสมัครได้ที่ <https://www.orientalmedicineconference.com> โดยดำเนินการ ดังนี้

- ผลงานที่ผ่านการนำเสนอในงานประชุมวิชาการครั้งนี้จะถูกเผยแพร่ในรูปแบบไฟล์ pdf ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดได้ที่ www.orientalmedicineconference.com หลังจากวันประชุม 45 วัน และทางผู้จัดจะส่งอีเมลแจ้งให้แก่ผู้นำเสนอทุกท่าน

- การชำระเงิน ให้ผู้สมัครโอนเงินเข้าบัญชีธนาคารกรุงเทพ สาขามหาวิทยาลัยรังสิต 2

ชื่อบัญชี : มหาวิทยาลัยรังสิต: วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

เลขที่บัญชี : 875-7-01076-7

- หลังจากชำระเงิน ท่านสามารถส่งไฟล์การโอนเงินแนบมาพร้อมกับใบสมัครและต้นฉบับเอกสารที่ E-mail: ormedconference@gmail.com ทางผู้ประสานงานจะทำการอัปเดตรายชื่อทุกวัน

9. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ทราบถึงความก้าวหน้าในการวิจัยในสาขาวิชาการต่าง ๆ ตลอดจนถึงปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข ตลอดจนการนำไปปรับใช้ประโยชน์และเกิดการพัฒนาทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และทางการแพทย์ทางเลือกของประเทศไทย

2) สามารถเสริมสร้างและพัฒนาคุณภาพของงานวิจัยและนักวิจัยของมหาวิทยาลัยและหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน

3) เกิดความร่วมมือทางวิชาการระหว่างมหาวิทยาลัย องค์กร และภาคเอกชนในการค้นคว้าและพัฒนา งานวิจัย

10. ติดต่อเพิ่มเติม

ติดต่อสอบถามรายละเอียดได้ที่ ผศ.ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต E-mail: ormedconference@gmail.com โทร 02-997-2220-30 ต่อ 5172, 5164, 5140 มือถือ 085-812-4285



(สำเนา)

คำสั่ง วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

ที่ 010/2564

เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการดำเนินการโครงการ Oriental Medicine and Sciences Conference

.....

ตามที่วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกได้จัดแผนการดำเนินงานโครงการ Oriental Medicine and Sciences Conference โดยในปีการศึกษา 2564 นี้ วิทยาลัยฯ ได้จัดโครงการต่อเนื่องในชื่องาน สัมมนาวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 Oriental Medicine and Sciences Conference 2022 ในรูปแบบ Online Conference ขึ้นนั้น เพื่อให้ดำเนินการจัดประชุมฯ ดังกล่าวเป็นไปอย่างเรียบร้อยและมีประสิทธิภาพ วิทยาลัยฯ จึงแต่งตั้งคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการฯ ประกอบด้วย

1. กรรมการกลาง

- | | |
|-------------------------------------|---------------------|
| 1) คณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก | ที่ปรึกษา |
| 2) ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา | ประธาน |
| 3) ดร.วาลูกา พลายงาม | กรรมการ |
| 4) ดร.นันทพงศ์ ขำทอง | กรรมการ |
| 5) ดร.ปิยะพงษ์ ชูชนะ | กรรมการ |
| 6) ผศ.นพ.ภาสกิจ วัณนาวิบูล | กรรมการ |
| 7) พจ.พรประภา สัตยานันทาภิบาล | กรรมการ |
| 8) พจ.กรรณิการ์ กำลังใจ | กรรมการ |
| 9) พท.สันหจุทา พวงมาลา | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดทำคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการในชุดต่าง ๆ
- 2) จัดทำกำหนดการของงาน ประสานงานหน่วยงานภายนอก
- 3) กำหนดหัวข้อและรูปแบบการจัดงานให้ตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการ
- 4) ให้คำปรึกษาและแนวทางในการดำเนินงานแก่คณะกรรมการฝ่ายต่าง ๆ เพื่อให้การจัดประชุมวิชาการครั้งนี้ดำเนินไปตามวัตถุประสงค์
- 5) เป็นผู้ดำเนินการหลัก ประสานงาน และให้คำตอบพร้อมแนวทางแก้ไขแก่ทุกฝ่ายในวันจัดงานสัมมนาฯ



2. กรรมการฝ่ายวิชาการ

- | | |
|-------------------------------------|---------------------|
| 1) คณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก | ที่ปรึกษา |
| 2) ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา | ประธาน |
| 3) ผศ.นพ.ภาสกิจ วัณนาวิบูล | กรรมการ |
| 4) รศ.ดร.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ | กรรมการ |
| 5) ดร.วาลูกา พลายงาม | กรรมการ |
| 6) ดร.ปิยะพงษ์ ชูชนะ | กรรมการ |
| 7) ดร.ภญ.ฉัตรวรรณ กิจประไพอำพล | กรรมการ |
| 8) ดร.นันทพงศ์ ขำทอง | กรรมการ |
| 9) พจ.พรประภา สัตยานันทาภิบาล | กรรมการ |
| 10) พจ.ณัฐวรินทร์ กฤตยาภิชาติกุล | กรรมการ |
| 11) พจ.พรพรรณ ทรัพย์เอี่ยม | กรรมการ |
| 12) อ.สมพร ผลกระโทก | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) แต่งตั้งคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อตรวจสอบคุณภาพของ abstract และ proceeding ที่ได้รับจากผู้เข้าร่วมประชุม
- 2) พิจารณา ทาบทามผู้ที่จะเป็นวิทยากร keynote speakers และ invited speakers ในแต่ละ session และทาบทามผู้ที่จะเป็น reviewer พร้อมจัดทำหนังสือเชิญ
- 3) พิจารณาคัดเลือกผลงานที่มีคุณภาพขั้นต้น เพื่อแนะนำให้จัดทำเป็นต้นฉบับเสนอให้พิจารณาตีพิมพ์/รับรางวัล และจัดทำใบ certificate
- 4) กำหนดหัวข้อ (topic) และผู้รับผิดชอบในแต่ละ session
- 5) ให้คำปรึกษาและแนวทางในการดำเนินงานให้แก่คณะกรรมการฝ่ายต่าง ๆ เพื่อให้การจัดประชุมวิชาการครั้งนี้ดำเนินไปตามวัตถุประสงค์
- 6) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

3. กรรมการฝ่ายดูแลเว็บไซต์/ไฟล์งาน/ลงทะเบียน (ระบบออนไลน์)

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1) ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา | ประธาน |
| 2) ม.ล.วิภาวดี จรุงโรจน์ | กรรมการ |
| 3) ดร.นันทพงศ์ ขำทอง | กรรมการ |
| 4) พท.สันหจุกา พวงมาลา | กรรมการ |
| 5) พท.วัลย์ลักษณ์ พรผล | กรรมการ |
| 6) คุณสิริธีร์ ลิ้มปณฺธุชฎี | กรรมการและเลขานุการ |



โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดทำ poster แผ่นประชาสัมพันธ์งานประชุมวิชาการฯ ให้กับฝ่ายที่เกี่ยวข้องเพื่อนำไปประชาสัมพันธ์ในเครือข่าย
- 2) จัดทำกำหนดการงานประชุมฯ และการลงทะเบียน ประชาสัมพันธ์ขึ้นเว็บไซต์ เช่น การลงทะเบียน การส่งผลงาน วันสุดท้ายการลงทะเบียน เป็นต้น
- 3) จัดทำ template ของ abstract/proceeding
- 4) จัดทำ ดูแล และปรับปรุงข้อมูลบนเว็บไซต์การประชุมให้ทันสมัยอยู่เสมอ
- 5) ประสานงานกับฝ่ายต่าง ๆ ในการชวนข้อมูล
- 6) ออกแบบและจัดทำต้นฉบับของแบบฟอร์มและวิธีการลงทะเบียน
- 7) ดูแล อำนวยความสะดวกในการลงไฟล์นำเสนอภายในงานประชุม และเตรียมสถานที่ประชุม ห้องใหญ่ ห้องย่อย โดยประสานงานร่วมกับแต่ละห้องบรรยาย
- 8) ดำเนินการส่งต่อข้อมูลให้กับแต่ละฝ่ายงานที่เกี่ยวข้อง
- 9) ประสานงานกับตัวแทนที่มีหน้าที่รับผิดชอบทางด้านการประชุมวิชาการกับคณะ/มหาวิทยาลัยทั้งในและต่างประเทศ รวมถึงเครือข่ายความร่วมมือต่าง ๆ โดยส่งหนังสือ และ E-mail เพื่อเชิญชวนนักวิชาการ นักศึกษาในสาขาที่เกี่ยวข้องให้เข้าร่วมประชุมฯ
- 10) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

4. กรรมการฝ่ายเตรียมงานร่วมกับ RSU Cyber University และการเตรียมงานที่ Studio ของ RSU Wisdom

- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| 1) ผศ.พท.อรชดา สิริพิตรหม | ประธาน |
| 2) พท.มณีกาญจน์ นภาแก้ว | กรรมการ |
| 3) พจ.สุวิภา ไกรวสิน | กรรมการ |
| 4) ญญ.รัตติยา ตั้งบูชาเกียรติ | กรรมการ |
| 5) พท.พอดุทัย สร้อยเพชร | กรรมการ |
| 6) พจ.นภาพรประไพ ทองพิทักษ์ | กรรมการ |
| 7) คุณจันทนา ชูช่วย | กรรมการ |
| 8) คุณเอก วาสิกศิริ | กรรมการ |
| 9) คุณพัฒนพงษ์ แก้วกัลยา | กรรมการ |
| 10) พท.นพพันธ์ ภารกิจบุญฤทธิ์ | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) ประสานงานร่วมกับทีม RSU Cyber University และ RSU Wisdom



- 2) จัดพื้นที่ของ Studio ที่ RSU wisdom ให้เหมาะสมกับงาน
- 3) ออกแบบและจัดทำป้ายเวที เพื่อเป็น background ในการถ่ายทอดสดระบบออนไลน์
- 4) จัดทำป้ายชื่อวิทยากร/ผู้เข้าร่วมประชุม/ทีมงาน
- 5) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

5. กรรมการฝ่ายพิธีการ/พิธีกร

- | | |
|----------------------------------|---------------------|
| 1) ดร.พท.ศุภกิตติ พิสิษฐ์ไพบูลย์ | ประธาน |
| 2) ผศ.พท.ยุพา เต็งวัฒนโชติ | พิธีกร |
| 3) พท.กชมน อินทร์บัว | กรรมการ |
| 4) พท.จิราลักษณ์ แก่นแท่น | กรรมการ |
| 5) พจ.ณัฐวรินทร์ กฤติยาภิชาติกุล | กรรมการ |
| 6) ดร.พท.ปิยะพงษ์ ชูชนะ | กรรมการ |
| 7) คุณกชพร ร่วมทรัพย์ | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดทำกำหนดการพิธีเปิด-ปิดงานประชุม โดยบรรจุช่วงเวลาในการประกาศผลรางวัล oral/poster ไว้ในกำหนดการ
- 2) เตรียมคำกล่าวรายงาน คำกล่าวเปิด คำกล่าวปิด ฯลฯ
- 3) ควบคุม และดำเนินการจัดพิธีเปิด-ปิดงานประชุม
- 4) กำหนดลำดับการดำเนินงาน การควบคุมเวลานำเสนอผลงาน รวบรวมคะแนนจากกรรมการ
- 5) ดูแลการดำเนินงานในห้องประชุมแต่ละห้องตามกำหนดการ
- 6) จัดทำหนังสือรับรองการเข้าร่วมประชุม (certificate) (กรณีมีผู้ร้องขอ)
- 7) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

6. กรรมการฝ่าย โสต/ เก็บภาพ

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| 1) อาจารย์ละลิตา จุลศิริ | ประธาน |
| 2) คุณสิริธีร์ ลิ้มปณฺธุฎ | กรรมการ |
| 3) ม.ล.วิภาวดี จรุงโรจน์ | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดเตรียมและจัดหาอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์ต่าง ๆ พร้อมประสานงานกับผู้ดูแลอุปกรณ์โสตทัศนูปกรณ์
- 2) ถ่ายภาพ บันทึกบรรยากาศโดยรวมของงานประชุมฯ
- 3) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ



7. กรรมการฝ่ายกรรมการดำเนินงานและประเมินผลงานภาคบรรยาย (ร่วมกับสถาบันอื่นห้องละ 2 ท่าน)

ห้องนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1) ผศ.พท.ยุพา เต็งวัฒนาโชติ | กรรมการผู้ร่วมประเมิน |
| 2) ดร.วาลูกา พลายงาม | กรรมการผู้ร่วมประเมินและเลขานุการ |

ห้องการแพทย์แผนไทย

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1) ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา | กรรมการผู้ร่วมประเมิน |
| 2) ดร.พท.ปิยะพงษ์ ชูชนะ | กรรมการผู้ร่วมประเมินและเลขานุการ |

ห้องการแพทย์แผนจีน

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| 1) ผศ.นพ. ภาสกิจ วัณนาวิบูล | กรรมการผู้ร่วมประเมิน |
| 2) พจ.พรประภา สัตยานันทาภิบาล | กรรมการผู้ร่วมประเมินและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) ดูแลการดำเนินงานในห้องประชุมแต่ละห้องตามกำหนดการ
- 2) จัดทำแบบฟอร์มกรรมการตัดสินให้รางวัล แยก oral พร้อมสรุปจำนวน
- 3) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

8. กรรมการดำเนินงานและประเมินผลงานภาคโปสเตอร์ (ร่วมกับสถาบันอื่น)

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1) ดร.นันทพงศ์ ขำทอง | กรรมการผู้ร่วมประเมิน |
| 2) ดร.ภญ.ฉิราวรรณ กิจประไพอำพล | กรรมการผู้ร่วมประเมิน |
| 3) ดร.ฐาปนาวรรณ นาสมนต์ | กรรมการผู้ร่วมประเมินและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดทำแบบฟอร์มกรรมการตัดสินให้รางวัล แยก poster พร้อมสรุปจำนวน
- 2) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

9. ฝ่ายตรวจเล่ม proceeding

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1) ผศ.ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา | ประธาน |
| 2) รศ.ดร.สุรพจน์ วงศ์ใหญ่ | กรรมการฝ่ายนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี |
| 3) ดร.ภญ.ฉิราวรรณ กิจประไพอำพล | กรรมการฝ่ายนวัตกรรมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี |
| 4) ผศ.พท.ยุพา เต็งวัฒนาโชติ | กรรมการฝ่ายการแพทย์แผนไทย |
| 5) พท.วัลย์ลักษณ์ พรผล | กรรมการฝ่ายการแพทย์แผนไทย |
| 6) ผศ.นพ.ภาสกิจ วัณนาวิบูล | กรรมการฝ่ายการแพทย์แผนจีน |
| 7) พจ.สุวิภา ไกรวสิน | กรรมการฝ่ายการแพทย์แผนจีน |
| 8) ดร.ฐาปนาวรรณ นาสมนต์ | กรรมการและเลขานุการ |

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) มีหน้าที่ตรวจสอบความเรียบร้อยของ abstract และ proceeding ที่ผ่านการประชุมลงเล็มสมบูรณ์
- 2) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

10. ฝ่ายกองอำนวยการ/การเงิน และการรวบรวมข้อมูลจัดทำ PDCA

- 1) พท.สัณห์จุฑา พวงมาลา ประธาน
- 2) พท.ภาวิณี เส็งสันต์ รองประธาน
- 3) พจ.พรประภา สัตยานันทาภิบาล กรรมการ
- 4) คุณดารณี อธิยาภรณ์ กรรมการ
- 5) คุณวัฒนา บุญพานิช กรรมการ
- 6) คุณนิภา วงษ์พัฒน์ กรรมการ
- 7) คุณอรพินท์ ศรีสกุล กรรมการและเลขานุการ

โดยให้คณะกรรมการชุดดังกล่าวมีหน้าที่ดังต่อไปนี้

- 1) จัดทำของที่ระลึกสำหรับ keynote speakers และ invited speakers และของที่ระลึกสำหรับแขกพิเศษในงาน จัดหารายได้และผู้สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการจัดงาน พร้อมประสานงานจัดแสดงสินค้าและนิทรรศการของผู้ให้การสนับสนุน
- 2) ทำหนังสือเชิญพร้อมให้การต้อนรับผู้ให้ทุนและสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการจัดงาน พร้อมมอบของที่ระลึกและส่งหนังสือขอบคุณผู้ให้ทุนและสนับสนุนค่าใช้จ่าย
- 3) จัดทำรายงานการประชุม สรุปประชุม (เฉพาะการประชุมรวมทุกฝ่าย) และติดตามงานจากฝ่ายต่าง ๆ
- 4) จัดทำโครงการพร้อมขออนุมัติโครงการ ขออนุมัติยืมเงิน/ใช้เงิน และจัดทำรายงานสรุปปิดโครงการ
- 5) รับเงินลงทะเบียน ยืนยันยอดจ่ายเงินของ sponsor จัดทำบัญชีสรุปรายรับ-รายจ่าย สรุปจำนวนผู้ลงทะเบียน และรายละเอียดที่เกี่ยวข้องส่งข้อมูลให้ฝ่ายวิชาการ
- 6) ดำเนินการรับลงทะเบียนล่วงหน้า และ ณ วันประชุม พร้อมแจกชุดเอกสาร ณ จุดลงทะเบียน
- 7) หน้าที่อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องตามที่คณะกรรมการในฝ่ายประชุมและเห็นชอบให้ดำเนินการ

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ 29 ตุลาคม 2564

(นายแพทย์วิชาญ เกิดวิชัย)

คณบดีวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก

วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต

ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก

โทร 02-997-2222 ต่อ 5164

Line: ormrso FB: orientalmedrsu

อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

โทรสาร 02-997-2222 ต่อ 5160

Website: www.rsu.ac.th/orientalmed