การพัฒนาตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

โครงการวิจัย

ของ

กรกนก โอภาสดระกูล

ชวิกานต์ ทับบุญ

พรรณวดี อุปนันท์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย ได้พิจารณาโครงการวิจัยของนางสาวกรกนก โอภาสตระกูล นายชวิกานต์ ทับบุญ และนางสาวพรรณวดี อุปนันท์ แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิตของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

..... ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร)

..... กรรมการ

(ผศ.ดร. เมธิน ผดุงกิจ)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ)

คณะเภสัชศาสตร์อนุมัติให้รับโครงการวิจัยฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิตของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....

(ผศ.ดร.จันทร์ทิพย์ กาญจนศิลป์)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

Mahasarakham University

โครงการวิจัยฉบับนี้ ได้รับทุนการศึกษาจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผศ.ดร. เมธิน ผดุงกิจ อาจารย์ ดร.พรพรรณ เหลาวชิระสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยและ อาจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร ประธานกรรมการการสอบโครงการวิจัยที่ได้กรุณาแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนสามัญสนุนให้กำลังใจอย่างดียิ่งมาโดยตลอด ผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ในคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่กรุณา ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และให้ความช่วยเหลือตลอดมา ขอขอบพระคุณ คุณสุรพงศ์ รัตนะที่ให้ คำแนะนำต่างๆในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายที่สุดนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ คุณพ่อ ผู้เป็นที่รักและเคารพมากที่สุดในชีวิต ที่คอยเป็นกำลังใจพร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือผู้วิจัยทุกๆด้านจนสำเร็จการศึกษา ไว้ ณ ที่นี้

กรกนก โอกาสตระกูล

ชวิกานต์ พับบุญ

พรรณวดี อุปนันท์

Mahasarakham University

ชื่อเรื่อง การพัฒนาตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

ผู้วิจัย กรกนก โอภาสตระกูล ชวิกานต์ พับบุญ และพรรณวดี อุปนันท์

กรรมการควบคุม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนธิน ผดุงกิจ และ อ.ดร.พรพรรณ เหล่าวชิระสุวรรณ

ปริญญา เภสัชศาสตรบัณฑิต (บริบาลเภสัชกรรม)

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2557

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันคนส่วนใหญ่หันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้น และสนใจการใช้สมุนไพรทั้งเพื่อบำรุงร่างกายและเพื่อความงาม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการบำรุงร่างกายในรูปแบบของตำรับยาน้ำ โดยประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกทิ้งถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth. เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.) ต้นเถาวัลย์เปรียง (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson.) หัวแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) เนื้อในเมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.) และผลพริกไทย (*Piper nigrum* L.) โดยศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) และ FRAP assay (Ferric reducing antioxidant power assay) รวมทั้งศึกษาด้านกายภาพและเคมีของตำรับ คือ ลักษณะสี กลิ่น ตะกอน รสชาติ และความเป็นกรดด่าง รวมถึงการศึกษาด้านจุลชีววิทยา

จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายในแต่ละตำรับทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยความสามารถของฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D ไม่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้ ความคงตัวทางด้านกายภาพและเคมี พบว่าตำรับ C มีความเหมาะสมมากที่สุด ทั้งด้านสี กลิ่น และความเป็นกรดด่าง รวมทั้งการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria ที่ไม่เกิน 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยสรุปยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย สูตรตำรับ C จึงมีความเหมาะสมที่สุดที่ควรจะศึกษาและพัฒนาต่อไป

คำสำคัญ ตำรับยาน้ำสมุนไพร, บำรุงร่างกาย, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

Mahasarakham University

TITLE Development of a herbal mixtures for body tonic

AUTHORS Kornkanok Opastrakool, Chavikan tubboon and Punnawadee Upanan

ADVISORS Assist. Prof. Dr. Methin Phadungkit and Dr. Pompun Laovachirasuwan

DEGREE Doctor of Pharmacy

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2014

Abstract

Nowadays, people are more attentive to their health. Herbal medicines are getting significant attention in body tonic and beauty. The study aimed to investigate and compare the antioxidant activities of the formulated herbal mixtures for body tonic and to study their stability. The formulated mixtures were comprised of six herbs including *Albizia procera* (Roxb.) Benth., *Diospyros rhodocalyx* Kurz., *Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson., *Cyperus rotundus* L., *Streblus asper* Lour. and *Piper nigrum* L. The antioxidant activity assays were performed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay). The physical and chemical stability were tested including color, odor, sedimentation, taste and pH. The microbiological limit test was conducted using the total aerobic bacteria with pour plate technique.

The result revealed that there is no significant difference between the four formulated mixtures (A, B, C, D) of both assays whereas the formulated mixtures showed significantly higher antioxidant activities when compared to the control formulas ($p<0.05$). Total aerobic bacteria in all formulas were less than $5x10^5$ CFU/ml. which reached the standard criterion. In conclusion, formula C of the herbal mixture was selected for further study in development as herbal tonic preparation.

Keywords: Mixtures, Body tonic, Antioxidant

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
	1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
	1.5 กรอบแนวคิด	4
	1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
	1.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย	5
	1.8 สถานที่ทำการวิจัย	5
	1.9 นิยามศัพท์เฉพาะ	5
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
	2.1 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ	7
	2.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร	19
	2.3 สารต้านออกซิเดชั่น	22
	2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย	22
	2.5 ข้อมูลชนิด คุณภาพ ปริมาณ ของสารกันเสีย	25
	2.6 ข้อกำหนดของสารกันเสียที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ตามกฎหมาย	27
	2.7 การทดสอบและประเมินคุณภาพ	28
	2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28
3	วิธีดำเนินการวิจัย	36
	3.1 แผนการวิจัย	36
	3.2 พืชสมุนไพร สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	36

Mahasarakham University

3.3 วิธีดำเนินการศึกษา 38
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล 42
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ 42

4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 44
4.1 การเตรียมสารสกัดสารสำคัญจากสูตรตำรับ 44
4.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 45
4.3 การควบคุมคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพร 48

5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 52
5.1 สรุปผลการวิจัย 52
5.2 อภิปรายผลการวิจัย 53
5.3 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ 57

บรรณานุกรม 59

ภาคผนวก 59
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐาน ascorbic acid ใน DPPH assay 65
ตารางแสดงค่า absorbance และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid 66
ภาคผนวก ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance (นาโนเมตร) และความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารมาตรฐาน ascorbic acid 67

ประวัติย่อของนักวิจัย 68

Mahasarakham University

บัญชีตาราง

ตาราง หน้า

1 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย 5
2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้พืชแห้ง 20
3 ส่วนประกอบในแต่ละสูตรตำรับ 40
4 ลักษณะและน้ำหนักของสารสกัดจากสูตรตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย 44
5 แบบเก็บข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพในแต่ละสูตรตำรับ 47
6 ความเป็นกรดด่างในแต่ละสูตรตำรับ 48
7 ค่า sedimentation volume (F) ในแต่ละสูตรตำรับ 48
8 ผลการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria 48
9 ค่า absorbance และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid 66

Mahasarakham University

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ หน้า

1 ลักษณะดอก ใบ และรูปแบบแห้งของพิ้งถ่อน 7

2 เปลือกตะโกนารูปแบบแห้ง และผลของตะโกนา 9

3 ลำต้นแห้งและสดของบอระเพ็ด 10

4 ส่วนหัวและส่วนต้นของแห้วหมู 12

5 ใบและเมล็ดข่อย 13

6 ผลสดและแห้งของพริกไทย 15

7 ชะเอมเทศในรูปแบบสมุนไพรแห้ง 16

8 ใบเตยหอม 17

9 มะตูมในรูปแบบสมุนไพรแห้ง 18

10 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH 23

11 ปฏิกิริยาของ FRAP assay 24

12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบกลุ่มพาราเบน (para-hydroxybenzoate) 25

13 โครงสร้างทางเคมีของ methylparaben 25

14 โครงสร้างทางเคมีของ propylparaben 26

15 แผนภูมิแสดงค่า 50% effective concentration (กรัม/1,000 มิลลิลิตร) ของสารสกัดสาระสำคัญในสูตรตำรับ 44

16 แผนภูมิแสดงค่า FRAP value เทียบเท่ากับสารมาตรฐานวิตามินซี (ascorbic acid equivalent : มิลลิโมล ascorbic acid/มิลลิกรัมสารสกัด) ของสารสกัดสารสำคัญในสูตรตำรับ (n 5) 46

Mahasarakham University

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันสมุนไพรคือเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติที่ถูกนำมาใช้กันแพร่หลาย ทั้งในด้านการบำบัดรักษาโรค การบำรุงร่างกาย เครื่องสำอาง รวมทั้งผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ซึ่งถือเป็นการนำเอาภูมิปัญญาดั้งเดิมของบรรพบุรุษที่สืบทอดต่อกันมา มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ อีกทั้งในปัจจุบันนี้ทั่วโลกให้ความสนใจกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพโดยสัมพันธ์กับความคิดที่จะกลับคืนสู่ธรรมชาติ (back to nature) ซึ่งผลิตภัณฑ์ส่วนมากได้จากสารสกัดที่มาจากธรรมชาติ (นพมาศ, 2551) และที่สำคัญประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะพืชที่มีอยู่หลากหลายชนิด และได้นำมาใช้เป็นสมุนไพรจำนวนมาก โดยมีการลองผิดลองถูก และสั่งสอนสืบทอดความรู้กันมายาวนาน ทำให้สมุนไพรไทยมีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำไปสู่การศึกษาหาข้อมูลถึงประโยชน์ โทษ หรือว่าพิษที่จะเกิดขึ้นกับมนุษย์ เพื่อที่จะได้นำมาพัฒนาการใช้สมุนไพรให้เกิดประโยชน์ และมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด (หนึ่งฤทัย, 2554)

สมุนไพรบำรุงร่างกาย มีคุณสมบัติในการบำรุงร่างกาย โดยออกฤทธิ์ต่อร่างกายในหลายด้าน สามารถรักษาสมดุลของร่างกายให้ปกติ โดยการไปเพิ่มการไหลเวียนเลือดในร่างกาย สามารถให้พลังงานแก่ร่างกาย เพิ่มการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารเป็นปกติ ระบายได้ดี นอกจากนี้สมุนไพรยังมีสารต้านออกซิเดชั่น โดยจะปกป้องร่างกายจากการทำลายของสารออกซิเดชั่น (Mathew and Kuttan, 1999) ที่อาจเกิดมาจากมลภาวะที่อยู่รอบตัวเรา โรคอ้วน ความเครียด และการมีภูมิคุ้มกันที่ลดลง ปัจจุบันคนเราให้ความสำคัญกับการออกกำลังกาย ดูแลสุขภาพ และรับประทานอาหารที่มีประโยชน์มากขึ้น รวมทั้งสมุนไพรด้วย ผลิตภัณฑ์สมุนไพรในรูปแบบของยาน้ำหมักในท้องตลาดมากขึ้น ซึ่งการเตรียมในลักษณะยาน้ำสมุนไพรนั้นจะมีข้อดีในการนำไปใช้ คือ ตำรับสามารถเตรียมขึ้นมาได้ง่าย สามารถรับประทานได้สะดวกและมีรสชาติที่ดี นอกจากนั้นยาน้ำสมุนไพรยังสามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว ถึงแม้ว่าสมุนไพรบางตัวมีรสชาติที่ไม่ดีนัก แต่ในการเตรียมในลักษณะน้ำสมุนไพรก็สามารถแต่งรสชาติของสมุนไพรให้น่าพึงพอใจได้

Mahasarakham University

จากการศึกษาข้อมูลสมุนไพรไทยหลายชนิดพบว่า สมุนไพรแต่ละชนิดมีสารสำคัญ ประโยชน์และการออกฤทธิ์ต่อร่างกายที่แตกต่างกัน โดยสมุนไพรในตำรับยาสมุนไพรบำรุงร่างกายนี้ มีทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบด้วย ทิ้งถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.)Benth.) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และลดความเสี่ยงของโรคเรื้อรังต่างๆ เช่น เบาหวาน โรคหัวใจ และมะเร็ง (ธนดร และคณะ, 2552) ตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.) มีฤทธิ์ฟื้นฟู และบำรุงระบบประสาท (Ingkaninan *et al.*, 2003) บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson.) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (Amom *et al.*, 2009) แห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Jazirí *et al.*, 2009) ช่อย (*Streblus asper* Lour.) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านการแพ้ (Rastog *et al.*, 2006) พริกไทย (*Piper nigrum* L.) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Pathak and Khandelwal, 2009)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า สมุนไพรในตำรับนั้นมีประโยชน์ต่อร่างกายหลากหลาย อีกทั้งในปัจจุบันนี้มีงานวิจัยที่สนับสนุนในการออกฤทธิ์ที่ช่วยในการบำรุงร่างกายหลายงานวิจัย ทั้งงานวิจัยภายในประเทศ และงานวิจัยต่างประเทศหลายๆงานอีกด้วย ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นอย่างมาก ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาตำรับยาน้ำจากสมุนไพรข้างต้น เพื่อให้ได้ยาแผนไทยที่มีฤทธิ์บำรุงร่างกายที่มีคุณภาพสูง และมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อพัฒนาตำรับยาน้ำสมุนไพรที่มีฤทธิ์บำรุงร่างกาย

1.2.2 วัตถุประสงค์เฉพาะ

1.2.2.1 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรทั้ง 4 ตำรับ โดยวิธี DPPH และ FRAP assay

1.2.2.2 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความคงตัวทางกายภาพ เคมี และคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตำรับทั้ง 4 ตำรับในวันที่เก้าสิบ

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรทั้ง 4 ตำรับ โดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay มีฤทธิ์แตกต่างกัน

1.3.2 ความคงตัวทางกายภาพ เคมี และคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของตำรับทั้ง 4 ตำรับ ในวันที่เก้าสิบเมื่อความแตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ตัวอย่างที่ใช้ในตำรับยาน้ำสมุนไพรครั้งนี้ได้แก่ พืชสมุนไพรตัวยาสำคัญ 6 ชนิด เปลือกทิ้งถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.)Benth.) เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.) ต้นบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson.) หัวแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.) ผลพริกไทย (*Piper nigrum* L.) ได้จากร้านขายยาทองอินทร์เภสัช อ. เมือง จ. มหาสารคาม ในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ.2555

1.4.2 ตัวแปร

1.4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรทั้ง 4 ตำรับ โดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay

1.4.2.1.1 ตัวแปรต้น มี 1 ตัวแปร คือสูตรตำรับทั้ง 4 ตำรับ เปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นกับสารมาตรฐาน 1 ชนิด คือ ascorbic acid

1.4.2.1.2 ตัวแปรตาม มี 1 ตัวแปร คือฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่น ซึ่งแสดงในค่า EC_{50} (DPPH assay) และ FRAP value (FRAP assay)

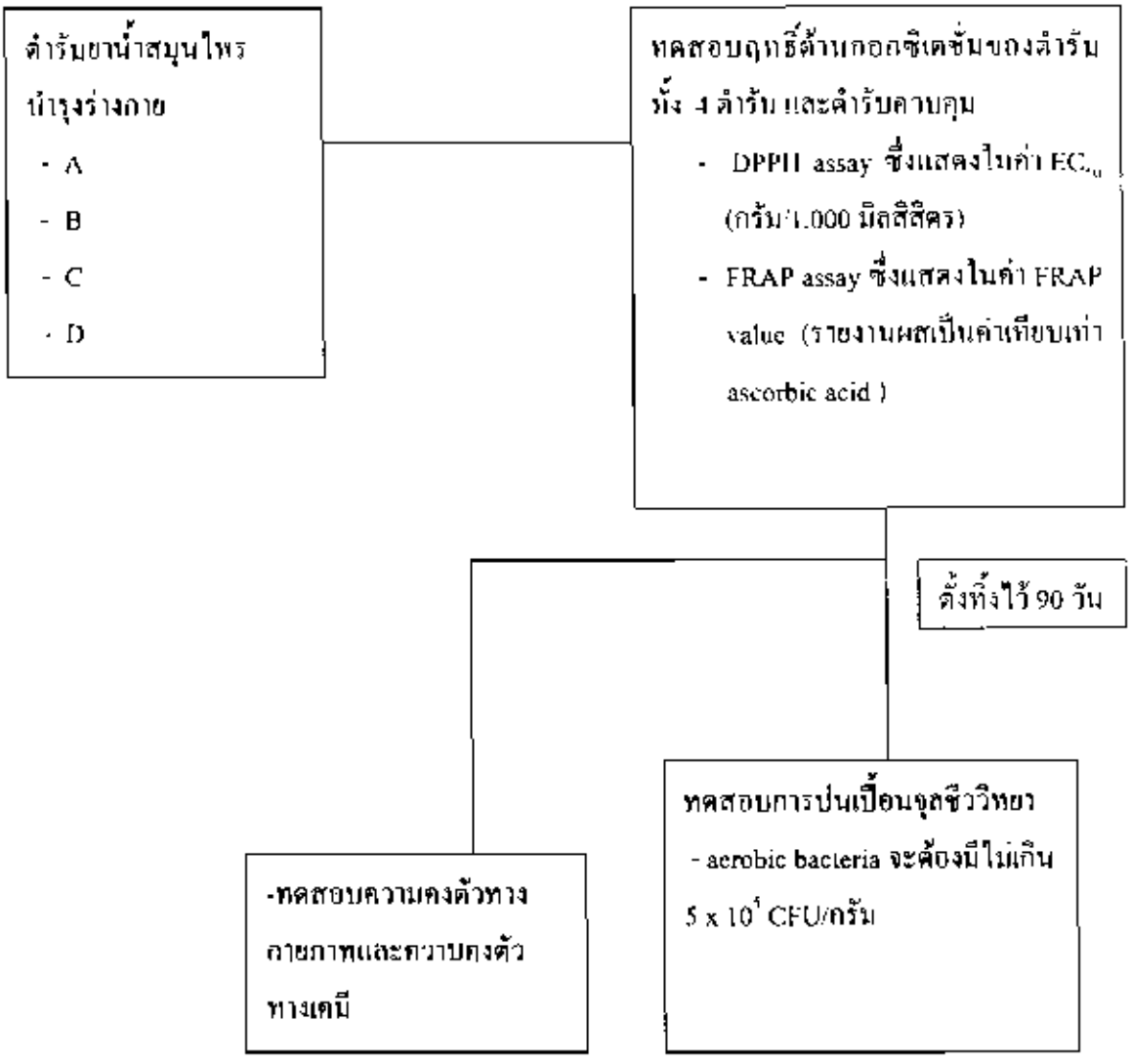
1.4.2.2 ทดสอบการปนเปื้อนทางจุลชีววิทยา

1.4.2.2.1 ตัวแปรต้นมี 1 ตัวแปร คือสูตรตำรับทั้ง 4 ตำรับ

1.4.2.2.2 ตัวแปรตาม มี 1 ตัวแปร คือ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ aerobic bacteria (จะต้องมีไม่เกิน 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร)

Mahasarakham University

1.5 กรอบแนวคิด



1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น มีความคงตัวทางกายภาพ ทั้งด้าน สี กลิ่น รสชาติ ของตำรับ ความคงตัวทางเคมี คือ ค่าความเป็นกรดด่างของตำรับ และมีความคงตัวทางชีวภาพ คือ ผ่านมาตรฐานเมื่อทดสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา

1.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง 1 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

กิจกรรม	2555				2556	
	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.
1. ตั้งตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย	←	→				
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดย DPPH assay และ FRAP assay ที่วันที่ศูนย์ ทั้ง 4 ตำรับ		←	→			
3. ตั้งทิ้งไว้เพื่อรอเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ เคมี และคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา		←	→	←	→	
4. ทดสอบลักษณะทางกายภาพ เคมี และคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา เมื่อครบ 90 วัน					←	→
5. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง					←	→

1.8 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ทางเภสัชศาสตร์ ชั้น 2 อาคารเภสัชศาสตร์สิรินธร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.9 นิยามศัพท์เฉพาะ

ตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายคือ ตำรับยาน้ำสมุนไพรสำหรับบำรุงร่างกาย โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จากตำรับยาแผนไทย ประกอบด้วย ทิ้งถ่อน ตะโกนา บอระเพ็ด พริกไทย เห้าหมู และข่อย

อนุมูลอิสระ (free radical) คืออะตอม หรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron)

Mahasarakham University

อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นได้สูงมาก

สารต้านออกซิเดชั่น (antioxidation) คือสารที่มีหน้าที่ยับยั้ง หรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นคือ ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ หรือการทำให้อนุมูลอิสระกลายเป็นโมเลกุลที่เสถียร ใน DPPH assay รายงานเป็นค่า EC_{50} ใน FRAP assay รายงานเป็นค่า FRAP value

ค่า EC_{50} คือ 50 % effective concentration ค่าความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชั่นที่ทำให้อนุมูลอิสระลดลง 50% โดยค่า EC_{50} น้อยจะมีฤทธิ์ดีกว่า

FRAP value หมายถึง การเปรียบเทียบค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากทำปฏิกิริยา 10 นาที โดยค่า FRAP value มากจะมีฤทธิ์ดีกว่า

Mahasarakham University

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ผู้วิจัยได้เรียงลำดับตามหัวข้อดังนี้

2.1 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ

2.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

2.3 สารต้านออกซิเดชั่น

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

2.5 ข้อมูลชนิด คุณภาพ ปริมาณ ของสารกันเสีย

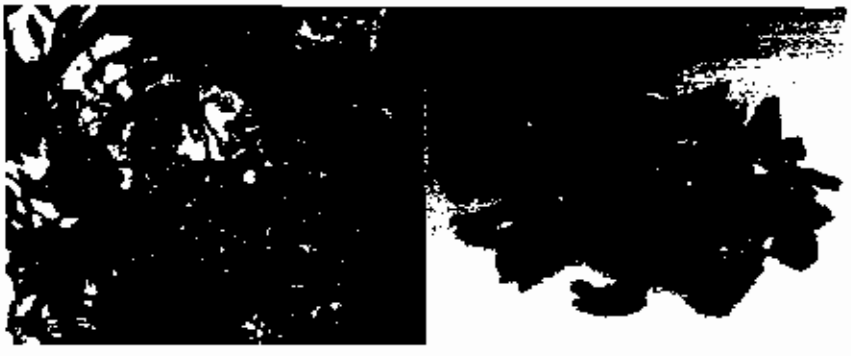
2.6 ข้อกำหนดของสารกันเสียที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ตามกฎหมาย

2.7 การทดสอบและประเมินคุณภาพ

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ

2.1.1 ทิ้งถ่อน (นันทวัน และอรนุช, 2542)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะดอกใบ และรูปแบบแห้งของทิ้งถ่อน

Mahasarakham University

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Albizia procera* (Roxb.) Benth.

วงศ์ : MIMOSOIDEAE

ชื่อสามัญ : White siris

ชื่ออื่น : ทิ้งถ่อน (กลาง) ส่าม (เชียงใหม่) เขาะบ้อง (กาญจนบุรี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : ไม้ยืนต้น สูง 20 เมตร กิ่งอ่อนมีขาเปกคลุมเล็กน้อย ต้นแก่สีเทา-น้ำตาล เปลือกมีรอยด่างสีน้ำตาลกระจาย

ใบ : ใบประกอบแบบขนนก 2 ชั้น เรียงตัวแบบสลับ ก้านใบรวม ยาว 20-40 เซนติเมตร เหนือโคนก้านมีต่อมรูปร่างกลมนูน ก้านใบมีขนปกคลุมเล็กน้อย ใบย่อยจำนวน 5-12 คู่ ก้านใบย่อย ยาว 0.5-1 มิลลิเมตร ใบย่อยรูปไข่กลับ รูปขอบขนาน หรือรูปรี ฐานใบมน หรือเอียง ปลายใบมน หรือเว้าเข้าเล็กน้อย ผิวหลังใบเรียบ ท้องใบมีขนสั้นๆปกคลุม ขอบใบเรียบ ใบกว้าง 1.0-2.0 เซนติเมตร ยาว 1.5-3.5 เซนติเมตร

ดอก : ดอกช่อ กระจุกแน่นทรงกลม เกิดที่ซอกใบใกล้ๆปลายกิ่ง หรือปลายกิ่ง ก้านช่อรวม ยาว 20-30 เซนติเมตร ก้านมีขนปกคลุมเล็กน้อย ช่อดอกเกิดเป็นกลุ่มบนก้านช่อรวม กลุ่มละ 2-5 ช่อ ก้านช่อ ยาว 1-2 เซนติเมตร แต่ละช่อมีดอกย่อยจำนวน 15-25 ดอก ดอกย่อยไม่มีก้านดอกย่อย หรือมีสั้นมาก กลีบเลี้ยง 5 กลีบติดกันเป็นรูปถ้วยยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สีเขียวผิวเรียบ ขอบถ้วยแยกเป็น 5 แฉก รูปสามเหลี่ยมยาวประมาณ 0.8-1 มิลลิเมตร กลีบดอก 5 กลีบ สีขาวแกมเหลืองอ่อน ติดกันเป็นหลอดยาวประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ผิวเรียบ ปลายแยกเป็น 5 แฉก รูปไข่ปลายแหลม ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร ปลายกลีบมีขนเล็กๆ เกสรเพศผู้จำนวนมาก โคนก้านชูอับเรณูเชื่อมติดกันเป็นหลอดล้อมรอบเกสรเพศเมีย หลอดยาว 2-3 มิลลิเมตร ก้านชูอับเรณูสีเหลืองอ่อนปลายก้านสีเขียวอ่อน ยาว 1-1.5 เซนติเมตร อับเรณูสีขาว

ผล : ผลแห้งแบบสีน้ำตาล ลักษณะแบน เมล็ดแบนสีน้ำตาล รูปรี กว้าง 4 มิลลิเมตร ยาว 6-7 มิลลิเมตร

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

เปลือก : รสร้อนสุขุม เป็นยาอายุวัฒนะ แก้หืด แก้ไอ แก้ท้องร่วง เจริญอาหาร แก้โรคผิวหนัง

ผล : เป็นยาขับลม แก้ท้องอืด บำรุงธาตุ

ราก : รสขมร้อนเล็กน้อย แก้ปวดเอว แก้ปวดหลัง แก้เส้นตึง

Mahasarakham University

2.1.2 ตะโกนา (เต็ม, 2544)

ภาพประกอบ 2 เปลือกตะโกนารูปแบบแห้ง และผลของตะโกนา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diospyros rhodocalyx* Kurz.

วงศ์ : EBENACEAE

ชื่อสามัญ : Ebony

ชื่ออื่น : โก (อีสาน) ตองโก (เขมร) พญาช้างดำ มะโก (เหนือ) มะถ่านไฟผี (เชียงใหม่)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : ไม้ต้นไม่ผลัดใบ สูงได้ถึง 15 เมตร ตรงบริเวณลำต้น และกิ่งมีหนามแข็ง แหลมยาว เรือนยอดเป็นพุ่มกลมทึบ เปลือกต้นหนา แตกเป็นร่องลึกตามยาวสีดำ เปลือกในสีแดงอิฐ กระพี้สีเหลือง

ใบ : ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่กลับ หรือรูปไข่กลับแกมรูปรี กว้าง 1-5 เซนติเมตร ยาว 12-17 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนมน หรือเว้าคล้ายรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ผิวใบทั้งสองด้านมีขนนุ่มประปราย ใบแห้งสีเหลือง

ดอก : แยกเพศอยู่คนละต้น ดอกเพศผู้ เป็นดอกแบบช่อกระจุกออกที่ง่ามใบ มีกลีบเลี้ยงสีเขียว 4 กลีบเชื่อมติดกันเป็นหลอดรูปถ้วย ปลายแยกเป็น 4 แฉก กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบเชื่อม

Mahasarakham University

ติดกันเป็นรูปลอนโค้ง ปลายแยก 4 กลีบ ผลสดรูปไข่ 1.5-4.0 ซม. ผิวเกลี้ยง มีจุดประสีเหลือง เมื่อสุกสีแดง เนื้อนิ่มเหนียว เมล็ดมีลักษณะขรุขระ

ผล : ผลสด ทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-3 เซนติเมตร มีก้านยาวประมาณ 1-2 ซม. ผิวมีสีเหลือง กลายเป็นสีแดงเมื่อสุก

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

ผล : รสฝาดเมาเบื่อ แก้ไข้เรื้อรัง แก้ลมสันนิบาต แก้ปวดเมื่อย ขับเหงื่อ แก้กระษัย เจริญอาหาร และแก้ผื่นคันเนื่องจากพิษไข้

เปลือกต้นและเนื้อไม้ : รสเฝื่อนเมาเบื่อ เป็นยาบำรุงธาตุ ช่วยย่อยของเหลว แก้ระดูขาว แก้หืดไอ ขับเสมหะ ขับลม ขับปัสสาวะ แก้ปวดฟัน และเป็นยาอายุวัฒนะ

2.1.3 บอระเพ็ด (ศรุณ และคณะ, 2541)

ภาพประกอบ 3 ลำต้นแห้งและสดของบอระเพ็ด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tinospora crispa* (L.) Miers ex Hook.f. & Thomson.

วงศ์ : MENISPERMACEAE

ชื่อสามัญ : Heart-leaved moonsee

ชื่ออื่น : เครือเขาฮ่อ (หนองคาย) จุ่งจริงตัวเมียและจุ่งจิง (เหนือ) เจ็ดบันย่าน เจ็ดบันหนาม และเจ็ดหมุนปลูก (ภาคใต้) ตัวเจ็ดบันย่าน และเถาหัวด้วน (สระบุรี)

Mahasarakham University

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : บอระเพ็ดเป็นพันธุ์ไม้เถาเลื้อยเนื้ออ่อน แต่ถ้าอายุมากเนื้อของลำต้นภายในแข็งได้ เถาอ่อนผิวเรียบเสี้ยนเขียว เถาแก่สีน้ำตาลอมเขียว ผิวขรุขระ เป็นปุ่มๆ เถาคลบโตขนาดนิ้วมือ ประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร ยางมีรสขมจัด ขึ้นเกาะต้นไม้อื่นมักจะมีรากอากาศสีน้ำตาลเชื่อกเส้นเล็กๆ ห้อยลงมาเป็นสาย

ใบ : เป็นใบเดี่ยวแบบสลับใบเป็นรูปไข่ป้อม โคนใบหยักเว้าเล็กเป็นรูปหัวใจ โดยปกติปลายใบจะแหลม (แบบ acuminate) มีเส้น nerve 5-7 เส้นที่เกิดจากฐานใบขอบทั้งหมด ขอบใบเรียบ ขนาดกว้าง 3.5-10 เซนติเมตร ยาว 6-13 เซนติเมตร แยกต้นตัวผู้ เมียออกดอกเป็นช่อตามกิ่งแก่ ตรงบริเวณซอกใบ หรือปลายกิ่ง

ดอก : ขนาดเล็กสีเหลืองถนเขียว แดงอมชมพู เขียวอ่อน เหลืองอ่อน ช่อดอกแบบ raceme หรือ fasicle เดี่ยว ยาว 5-20 เซนติเมตรประกอบด้วยกลีบดอก กลีบแยกอย่างละ 6 stamen 6 รูปใบลีเหลืองถึงแดง ขนาด 2-3 เซนติเมตร

สารสำคัญ : N-cisferuloytyramine, phytosterol, methylpentose, picroretine, berberine, colonbin,tinotuberide, N-trans-feruloyltyramine, N-cisferuloytyramine, phytosterol, methylpentose

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

ส่วนของลำต้น (stem) (เถา หรือลำต้นสด) : ในตำราไทยใช้ส่วนของลำต้นซึ่งมีรสขมจัด แก้ไข้ เจริญอาหาร แก้เบาหวาน แก้กระหายน้ำ ขับเหงื่อ แก้ร้อนใน

เถา : มีรสขม นำมาปรุงเป็นยารับประทาน แก้ไข้ ขับเหงื่อ ทำให้เลือดสบเย็น ลดความอ้วน แก้กระหายน้ำ แก้ร้อนในได้ดีนาก ช่วยให้เจริญอาหาร ผสมกับน้ำมันมะพร้าวรักษารูมาติซึม บำรุงสุขภาพ และช่วยให้อายุยืน

ใบ : ใช้พอกปิดฝี และใช้แก้ฟกบวม แก้ปวดแสบปวดร้อน เป็นยารักษาพยาธิในฟัน และในท้อง ทำให้อายุยืน มีเสียงหวาน ลดอาการปวด และอาการบวมจากฝี รักษาโรคผิวหนัง แก้อาการคันจากผื่น ขับพยาธิ ช่วยให้ลดไข้ รักษาไข้มาลาเรีย

รากและเถา : นำมาต้มผสมกับมะขามเปียกและเกลือ หรือใส่ในยาดองเหล้า โดยจะกินครั้งละ 1 ช้อนชา ซึ่งจะช่วยลดไข้ ช่วยให้เจริญอาหาร รักษาไข้มาลาเรียขึ้นสมอง ปัจจุบันองค์การเภสัชกรรม ได้ผลิตทิงเจอร์บอระเพ็ด เพื่อใช้แทนทิงเจอร์เจนเซียด ซึ่งเป็นส่วนผสมของยาธาตุที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และจากการทดลองในสัตว์พบว่าน้ำที่สกัดจากเถาใช้ลดไข้ได้

รายงานการศึกษาพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ antioxidant (Cavin, *et al.*, 1998) ของบอระเพ็ดพบว่าสารสกัด 3 ชนิด ได้แก่ N-trans-feruloyltyramine, N-cis-feruloyltyramine,

Mahasarakham University

secoisolariciresinol มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่า BHT ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนั้นยังพบว่า สารสำคัญในบอระเพ็ดยังมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (antidiabetic) โดยมีกลไกกระตุ้นการหลั่ง insulin ที่เบต้าเซลล์ ส่วนในตำราไทยนั้นใช้ส่วนของลำต้น หรือเถาซึ่งมีรสชาติขม ใช้แก้ไข้ เจริญอาหาร แก้เบาหวาน แก้กระหายน้ำ ขับเหงื่อ แก้ร้อนใน ช่วยให้เจริญอาหาร บำรุงกำลัง บำรุงสุขภาพ และช่วยให้อายุยืน (ภูมิพิชญ์. 2536)

2.1.4 เห้วหมู (ภูมิพิชญ์. 2536)

ภาพประกอบ 4 ส่วนหัวและส่วนต้นของเห้วหมู

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Cyperus rotundus* L.
วงศ์ : CYPERACEAE
ชื่อสามัญ : Nut grass
ชื่ออื่น : หญ้าขนหมู (แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกศาสตร์

ลำต้น : ไม้ล้มลุก อายุหลายปี ลำต้นเป็นหัวอยู่ใต้ดิน กาบใบห่อรวมกันเป็นลำต้นเทียม รูปสามเหลี่ยม ลำต้นขึ้นเป็นกลุ่มโดยแตกไหลออกทางด้านข้างเพื่อสร้างต้นใหม่

ใบ : ใบเดี่ยว ออกมาจากหัวใต้ดิน ใบรูปแถบ กว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาวถึง 60 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม กาบใบสีน้ำตาลอ่อน

Mahasarakham University

ดอก : เป็นดอกช่อ ออกรวมเป็นช่อแยกแขนงที่ปลายยอด มีใบประดับ 9 ใบ หรือมากกว่า รูปไข่ หรือรูปไข่แกมรี ส่วนปลายมน มีติ่งเหลมโค้งเล็กน้อย สีแดง หรือม่วงแกมม่วง

ผล : รูปทรงกระบอกถึงรูปไข่แกมไข่กลับ กึ่งทรงกระบอกมีสามมุม

สารสำคัญ : cadinene, cineole-pinene, cyperol, caryophyllene

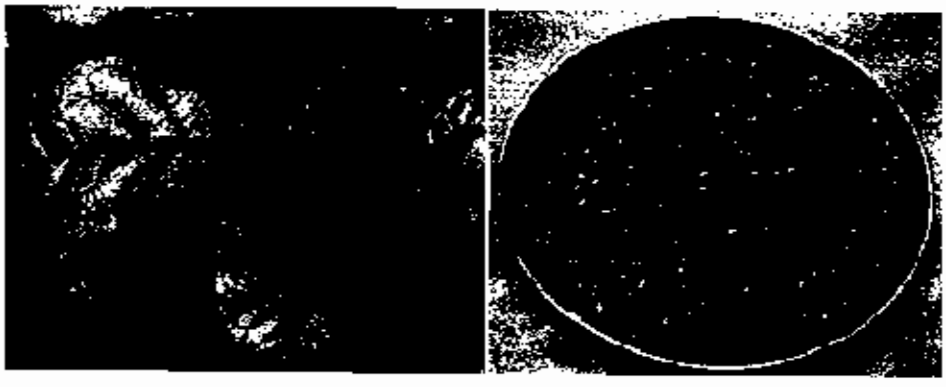
ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

หัว : รสเผ็ดหอมปร่าบำรุงกำลัง บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงครรภ์ แก้ธาตุพิการ ช่วยให้เจริญอาหาร ทำให้น้ำนมมาก ขับพยาธิไส้เดือน ขับลม ช่วยย่อยอาหาร แก้ไข้ ขับเหงื่อ แก้บิด ขับปัสสาวะ ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ทอกคูดพิษ ทาแก้แมลงกัด แก้กษัย

ใบ : ห้ามเลือด

รายงานการศึกษาพบฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยพบฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบจากส่วนหัวของแห้วหมู สารสกัดคลอโรฟอร์มจากหัวมีฤทธิ์แรงในการยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดอาการปวด ต่อมาพบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ คือ a-cyperone (Zhang, 2005)

2.1.5 ข่อย (มูลนิธิบหาวิทยาลัยมหิดล, 2542)



ภาพประกอบ 5 ใบและเมล็ดข่อย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Streblus asper* Lour.

ชื่อสามัญ : Siamese rough bush, Tooth brush tree

Mahasarakham University

วงศ์ : MORACEAE

ชื่ออื่น : ตองขะแหน่ (กาญจนบุรี) ถักไม้ฝอย (ภาคเหนือ) ส้มพอ (เลย)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น : แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มทึบ กิ่งก้านคดงอ เปลือกต้นบาง ขรุขระเล็กน้อย สีเทาอมเขียว มียางสีขาว

ใบ : ใบเดี่ยวออกเรียงเวียน รูปรี กว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 4-8 เซนติเมตร โคนใบเสอบ ปลายใบแหลม ขอบใบพับ แผ่นใบสีเขียว สากมือ เนื้อใบหนากรอบ

ดอก : ออกเป็นช่อสั้นตามซอกใบ ดอกย่อยเล็กมาก ดอกแยกเพศ ดอกเพศผู้รวมกันเป็นช่อกลม ก้านดอกสั้น ดอกเพศเมียช่อหนึ่งมีดอกย่อย 2 ดอก ก้านดอกยาว

ผล : ผลสดรูปทรงกลม มีเนื้อ ผนังผลชั้นในแข็ง เมื่ออ่อนสีเขียว สุกเป็นสีเหลืองใส เมล็ดเดี่ยว แข็ง กลม

สารสำคัญ : ส่วนผลจะมีน้ำมันระเหย 1-1.4% ไขมัน 26% และในน้ำมันนี้จะประกอบด้วยสารกลุ่ม terpenes อยู่หลายชนิด geranilo camphor ฯลฯ และนอกจากนี้ยังมี sucrose fructose และ glucose ทั้งต้นมีสาร linalool nonanal decanal และวิตามินซี และส่วนของเมล็ด จะมีสารประกอบพวกไนโตรเจน 13-15% สารอนินทรีย์ 7% และน้ำมันระเหย 1% ซึ่งมีสารส่วนใหญ่ในน้ำมันระเหยนั้นเป็น *d*-linalool ประมาณ 70%

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

กิ่งสด : ทำให้ฟันแข็งแรงไม่ปวดฟัน ฟันไม่ผุ

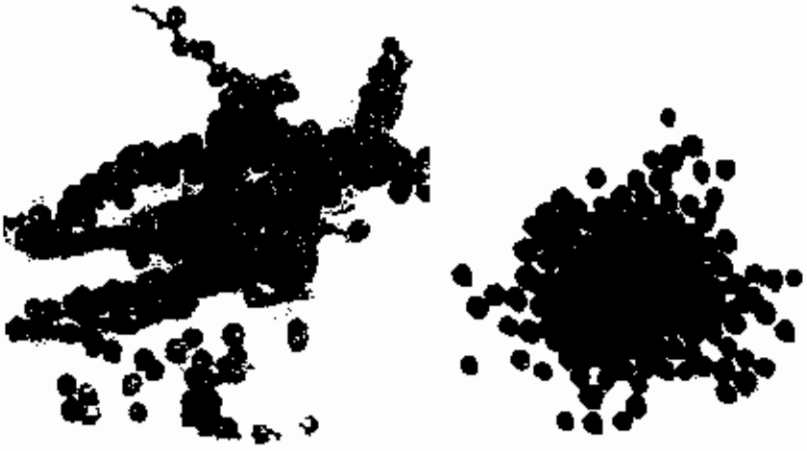
เปลือก : แก้บิด แก้ท้องเสีย แก้ไข้ ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แก้ริดสีดวงจมูก

เมล็ด : ฆ่าเชื้อในช่องปาก และทางเดินอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ บำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้

เปลือกราก : เป็นยาบำรุงหัวใจ

2.1.6 พริกไทย (ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ และ ศูนย์สมุนไพรทักษิณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2551

Mahasarakham University



ภาพประกอบ 6 ผลสดและแห้งของพริกไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Piper nigrum* L.

วงศ์ : PIPERACEAE

ชื่อสามัญ : Black Pepper, Pepper

ชื่ออื่น : กะเจียน (ชลบุรี) ค่าสามชิก (เชียงใหม่) แคหาง (ราชบุรี) ทรายเด่น (ขอนแก่น) โมลลง (ระยอง) ไม้เหลือง (ลำปาง) สะบ้างาฟ้า (ภาคเหนือ) เส่โพลสำ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : เป็นไม้เถาเนื้อแข็ง มีรากสำหรับยึดเกาะ ข้อปล้องโปร่งนูนระหว่างข้ออยู่ห่างกัน ชอบขึ้นเกาะกับไม้ต้นชนิดอื่น หรือหลักยึด

ใบ: เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับตามข้อ ใบรูปไข่ โคนใบมน ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบหนาเป็นมัน ในตัวแผ่นใบมีจุดต่อมน้ำมัน

ดอก : ออกเป็นช่อตามซอกใบ ดอกย่อยไม่มีกลีบดอก และกลีบเลี้ยง เกสรสีขาวแกมเขียว

ผล : ผลสด ทรงกลมเรียงอัดกับแน่นบนก้านช่อดอก ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกมีสีแดง รสเผ็ดร้อน

สารสำคัญ : piperidine, piperitine, peperyline, piperolein A, piperolein B, chromium

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

Mahasarakham University

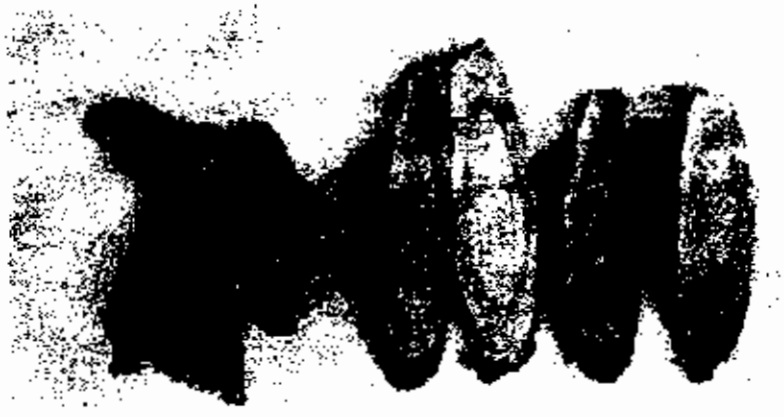
ผล : มีสรรพคุณใช้เป็นยาช่วยย่อยอาหาร ย่อยพิบดกล้างที่ไม่สามารถย่อยได้ ขับเสมหะ บำรุงธาตุ แก้ท้องอืด แก้ปวดท้อง ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ แก้ลกขาว แก้ลมอัมพฤกษ์ ในเมล็ดพริกไทย มีสาร piperidine piperitine peperyline piperolein A และ B ซึ่งเป็นสารต้านเอนุมูลอิสระ มีสรรพคุณช่วยป้องกันมะเร็ง และมีฤทธิ์กระตุ้นประสาท

ใบ : มีสรรพคุณใช้แก้ลมจุกเสียด แก้ปวดมวนท้อง

เถา : ใช้ขับเสมหะ

ราก : ใช้ขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง แก้ลมวิงเวียน และช่วยย่อยอาหาร น้ำมันช่วยลดน้ำหนัก และสามารถใช้นวดส่วนที่ต้องการลดได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสำคัญในพริกไทยสามารถใช้แก้โรคลมชัก หรือลบบ้าหมู (epileptic) ได้ อนุพันธุ์ของสารนี้ชื่อ antiepilepsirine ใช้แก้อาการชัก และมีผลข้างเคียงน้อย

2.1.7 ชะเอมเทศ (นิจศิริ, 2547)



ภาพประกอบ 7 ชะเอมเทศในรูปแบบสมุนไพรแห้ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Glycyrrhiza glabra* L.

ชื่อวงศ์ : FABACEAE

ชื่อสามัญ : Licorice

ชื่ออื่น : กำเฉ้า กำเฉ่า (จีน-แต้จิ๋ว) ชะเอมจีน

Mahasarakham University

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น : มีความยาวประมาณ 1-2 เมตร

ราก : ขนาดใหญ่จำนวนมาก ลำต้นมีขนสั้นๆ ปลายมีต่อมเหนียว ใบประกอบมีลักษณะเป็นรูปขนนก ออกสลับกัน รูปกลมรี ปลายแหลมโค้งมน มีขนสั้นๆ

ใบ : ใบย่อยประมาณ 9-17 ใบ ส่วนก้านใบย่อยนั้นสั้นมาก จะเป็นใบสีเขียวอมเหลือง ดอกช่อรูปเกียวทิ้งออกตามง่ามใบ

ดอก : ดอกย่อยติดกันกันแน่นมีขนปกคลุม

เมล็ด : เมล็ดรูปไต 2-8 เมล็ด สีกลมดำเป็นมัน

สารออกฤทธิ์สำคัญ : พบประมาณ 1-24% ในลำต้นใต้ดินและราก ได้แก่ glycyrrhizin ซึ่งเป็น triterpene glycocide ชนิดหนึ่ง นอกจากนั้นเป็นสารอื่นๆ เช่น flavonoid sterol แป้ง น้ำตาล lignin และน้ำมันระเหยหอม glycyrrhizin มีความหวานมากกว่าน้ำตาลถึง 50 เท่า

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

เปลือกราก : มีรสหวานใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ทำให้คลื่นไส้อาเจียน

ใบ : ทำให้เสมหะแห้งและเป็นยารักษาดีพิการ

ดอก : ใช้รักษาอาการหัดและรักษาพิษฝีคาย

ผล : จะมีรสหวาน ใช้เป็นยาบำรุงกำลัง และอาการคอแห้ง ทำให้ชุ่มชื้น

ราก : จะมีรสชุ่ม ใช้เป็นยาบำรุงปอด ขับเสลดที่เน่าในท้อง รักษาพิษยา หรือพืชพิษต่าง ๆ ชนิดคั่วแล้วรักษาอาการเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ตรากตรำทำงานหนัก ปวดท้อง ไอเป็นไข้ สงบประสาท บำรุงปอด ใช้รากสดรักษาอาการเจ็บคอ เป็นแผลเรื้อรัง ระบบการย่อยอาหารไม่ดี หรืออาหารเป็นพิษ และรักษากำเดาให้เป็นปกติ

ลำต้น : แก้ไอ ทำให้ชุ่มคอ แก้น้ำลายเหนียว แก้ลม บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง และกล้ามเนื้อ

2.1.8 เตยหอม (นิจศิริ, 2547)

Mahasarakham University

ภาพประกอบ 8 ใบเตยหอม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pandanus amaryllifolius* Roxb.

ชื่อวงศ์ : PANDANACEAE

ชื่อสามัญ : Pandanus palm

ชื่ออื่น : เตยหอม หวานข้าวไหม้ ทังสั้ง (จีน) เปาะเม๊ะออริง (ปักษ์ใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น : มีลำต้นอยู่ใต้ดิน ส่วนที่โผล่ขึ้นมาอยู่เหนือดินเป็นเพียงก้าน และใบ

ใบ : คล้ายกับใบของสับปะรด สีเขียวปัน และมีกลิ่นหอมเหมือนดอกขจร ใบยาวประมาณ 8- 10 นิ้ว ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบ ภายในใบจะมีสารสีเขียวซึ่งนำมาผสมอาหารได้อย่างปลอดภัย

ดอก : เป็นดอกช่อแบบ spadix ดอกย่อยแยกเพศ และแยกต้น ไม่มีกลีบเลี้ยง และกลีบดอก

ฝัก/ผล : ผลขนาดเล็ก ส่วนใหญ่ไม่เกิดดอก และผล เป็นเตยเพศผู้

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

ใบ : มีรสเย็นสบาย เป็นยาช่วยบำรุงหัวใจให้ชุ่มชื่น ให้สีเขียว ใช้ผสมอาหาร และมีกลิ่นหอม

Mahasarakham University

ต้นและราก : ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ และถ้านำมาต้มกับเนื้อไม่สัก หรือใบไม้สักแล้วกิน น้ำมันจะช่วยแก้โรคเบาหวาน

2.1.9 มะตูม (มิ่งศิริ, 2547)

ภาพประกอบ 9 มะตูมในรูปแบบสมุนไพรแห้ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aegel marmelos* Corr.
ชื่อวงศ์ : RUTACEAE
ชื่อสามัญ : Bengal Quince , Bilak ,Bael, Bael fruit
ชื่ออื่น : มะปีน (ภาคเหนือ) ตูม ตุ่มตัง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น : เป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลักษณะลำต้น และกิ่งก้านจะมีหนามแหลมคม

ใบ : ใบเป็นใบประกอบ มีใบย่อยประมาณ 3 ใบ ลักษณะของใบย่อยเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลม พื้นผิวใบเรียบเกลี้ยงเป็นมัน

ผล : ผลมีลักษณะเป็นรูปรีกลม

ส่วนที่ใช้และสรรพคุณ

Mahasarakham University

ผงโตเต็มที่ : ฝานเป็นชิ้นบางๆ ตากแห้งคั่วให้เหลือง ชงรับประทานแก้ท้องเดิน ท้องเสีย ท้องร่วง และโรคลำไส้เรื้อรัง

ผงแก่จัดแต่ยังไม่สุก : นำมาเชื่อมรับประทานเป็นขนมหวาน จะมีกลิ่นหอม และรสชาติอร่อย บำรุงกำลัง รักษาธาตุ และขับลม

ผลสุก : เป็นยาระบายท้อง และยาประจำธาตุของผู้สูงอายุที่ท้องผูกเป็นประจำ

ราก : แก้หืด หอบ แก้ไอ แก้ไข้ และขับลม

2.2 การเตรียมสารสกัดจากสมุนไพร

2.2.1 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร (สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน, 2533)

ก่อนนำตัวอย่างพืชมาสกัดสารทุติยภูมิ ต้องนำส่วนต่างๆ ของพืชมาแปรสภาพขั้นต้น โดยใช้วิธีทำให้แห้งจะได้สารที่มีคุณภาพคงที่มากกว่าการใช้พืชสด อุณหภูมิที่ใช้ทำให้แห้งโดยทั่วไป คือ 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้สามารถระงับบทบาทของเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืช และไม่ทำให้สารสำคัญในพืชสลายตัวไป อุณหภูมิที่แนะนำในการอบแห้งส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้พืชแห้ง ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้พืชแห้ง (สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน 2533)

ส่วนของพืช	อุณหภูมิที่ทำให้แห้ง (°C)
ดอก ใบ ทั้งต้น	20-30
ราก กิ่งราก ผิว	30-65
ผล	70-90
สมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหย	25-30
สมุนไพรที่มีไกลโคไซด์และอัลคาลอยด์	50-60

Mahasarakham University

ก่อนทำการสกัดจะต้องมีการย่อยขนาดของพืชให้เล็กลง (comminution หรือ pulverization) เพื่อให้การสกัดสารสำคัญจากพืชได้ผลดียิ่งขึ้น เนื่องจากองค์ประกอบสำคัญจะอยู่ในเซลล์ การย่อยขนาดจึงเป็นการทำลายผนังเซลล์ และเพิ่มพื้นที่ผิวของพืชที่จะสัมผัสกับตัวทำละลายให้มากขึ้น การย่อยขนาดให้เล็กลงทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสม เช่น วิธีการตัด (cutting) บด (grinding) หั่น (slicing) และใช้เครื่องปั่น (waring blender) เป็นต้น (รัตนา, 2547)

2.2.2 วิธีการสกัดสารจากสมุนไพร (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2546)

การสกัดแยกสาร (separation technique) เป็นเทคนิคการดึงเอาสารที่ต้องการในสถานะต่างๆ ออกจากส่วนผสมที่มีสารเป้าหมายเจือปนอยู่ สารเป้าหมายแบ่งเป็น 3 ประเภทหลักคือ ของแข็ง (solid mixture) ของเหลว (liquid mixture) และก๊าซ (gas mixture) ซึ่งมีวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชไว้หลายวิธี ได้แก่

2.2.2.1 การหมัก (maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยนำพืชมาหมักแช่ในตัวทำละลายในภาชนะปิด หมักไว้ในระยะเวลาที่กำหนด และในระหว่างการหมักอาจมีการคนด้วย เมื่อครบกำหนดจึงบีบเอาสารละลายออกจากกาก

2.2.2.2 การแช่ (infusion) เป็นกระบวนการสกัดสาร โดยแช่พืชในน้ำร้อนเป็นเวลา 5 นาทีถึง 2 ชั่วโมง ไม่นิยมการบีบกาก อุณหภูมิ และระยะเวลาขึ้นอยู่กับพืช

2.2.2.3 การชง (percolation) เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยบรรจุพืชลงใน percolator แล้วเติมตัวทำละลายทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงไขแยกเอาสารละลายออก

2.2.2.4 การต้ม (decoction) โดยต้มพืชกับน้ำเดือดนาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมากรองและบีบกากเบาๆ

2.2.2.5 การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) ได้แก่ การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ใช้กับพืชสดโดยผ่านไอน้ำไปบนพืชสด ซึ่งบรรจุใน flask พร้อมกับน้ำ ไอน้ำจะพาน้ำมันหอมระเหยไปยัง condenser และกลั่นตัวเป็นหยดน้ำ เมื่อตั้งทิ้งไว้น้ำมันจะแยกตัวกับน้ำ การกลั่นน้ำมันหอมระเหย (water distillation) เป็นวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชแห้งที่สารสำคัญไม่สลายตัวเมื่อถูกความร้อน ทำโดยต้มกับน้ำ เมื่อน้ำและน้ำมันหอมระเหยลอยไปถึง condenser จะกลั่นตัวแล้วจึงแยกชั้นกับน้ำ

การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องสกัดสาร เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุพืชไว้ เมื่อสารทำละลายใน extraction chamber สูงถึงระดับจึงเกิด siphon ทำให้สารละลายไหลกลับลงมาใน flask วนเวียนจนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจากพืชมีหลายชนิด การเลือกใช้จะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติของ

Mahasarakham University

ตัวทำละลายเป็นสำคัญ ตัวทำละลายควรมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดีพอสำหรับสารที่ต้องการสกัด โดยอาศัยหลักเกณฑ์ที่ว่าสารจะละลายในตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกัน (like dissolve like) และสามารถละลายสารที่ต้องการออกมามากที่สุด ในขณะเดียวกันควรละลายสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข, 2546)

2.2.2 วิธีการต้มยาสมุนไพร (ทวีศักดิ์, 2536)

2.2.2.1 การเตรียมสมุนไพรที่จะต้ม ถ้าสมุนไพรที่นำมาต้มมีขนาดใหญ่ ให้หั่นหรือสับให้มีขนาดเล็กลง แต่อย่าหั่นหรือสับสมุนไพรจนเล็กเป็นฝอยเพราะจะทำให้ลำบากเวลาจะแยกกากสมุนไพรออกจากน้ำสมุนไพรที่ต้มได้ หากเป็นสมุนไพรแห้งก่อนต้มให้แช่น้ำทิ้งไว้ชั่ก 20-30 นาที แต่ถ้าเป็นสมุนไพรสดให้ต้มได้เลยไม่ต้องแช่น้ำ

2.2.3.2 ความแรงของไฟ ที่ใช้ต้มยาสมุนไพร ให้ใช้ไฟปานกลางเมื่อต้มยาจนเดือดแล้ว ค่อยๆลดไฟลงให้เป็นไฟอ่อน และขณะต้มยาสมุนไพรต้องคอยคนยาที่ต้มตลอดเวลา ต้มยาสมุนไพรด้วยไฟอ่อนอีก 10-20 นาทีก็ใช้ได้แล้ว การต้มยาสมุนไพรตามสูตรตำรับไทยที่ใช้กัน มักต้มโดยใส่น้ำลงไป 3 ส่วนแล้วต้มจนน้ำเหลือ 1 ส่วน (ต้ม 3 เอา 1) ยาสมุนไพรที่ได้จากการต้มให้กินวันละ 3 ครั้งและควรกินยาสมุนไพรที่ต้มได้ในวันนั้นให้หมดแบบวันต่อวัน

2.2.3.3 ข้อดีของการต้ม วิธีการต้มยาสมุนไพรเป็นหนึ่งในวิธีแปรรูปสมุนไพรที่สามารถสกัดตัวยาที่อยู่ในสมุนไพรให้ออกมาได้ดีกว่าวิธีอื่นๆเพราะต้องใช้ความร้อนมาก และเวลาการต้มที่นานกว่า โดยมีน้ำเป็นตัวละลายยาที่อยู่ในต้นพืชสมุนไพร การต้มยาสมุนไพรไม่จำกัดว่าจะเป็นสมุนไพรแห้งหรือสมุนไพรสด โดยมากจะเป็นพืชสมุนไพรจำพวกเปลือกไม้ รากไม้ เมล็ดหรือผลของพืชสมุนไพร ซึ่งทำง่ายและสะดวก

2.3 สารต้านออกซิเดชั่น

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่ออร์บิทัล (orbital) นอกสุดของการจัดเรียงตัวอิเล็กตรอนเป็นอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpair electron) ทำให้เกิดความไม่เสถียร และพยายามที่จะเกิดการจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น โดยจะมีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยาอันอาจนำไปสู่การจับกับคู่อิเล็กตรอนจากโมเลกุลในร่างกายได้ เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอนเอ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวทำให้คุณสมบัติ และการทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไป เกิดความบกพร่องหรืออาจถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่างๆที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (สุพัตรา และวงศ์วิวัฒน์, 2547)

ตามปกติอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งภายนอก และภายในร่างกายจากปฏิกิริยาชีวเคมี โดยจะเป็นผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น แม้ว่าร่างกายอาจจะมีการสร้างอนุมูลอิสระ

Mahasarakham University

อยู่ตลอดเวลา แต่ก็ไม่ใช่ว่าจะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ตลอดเวลาเพราะร่างกายจะมีระบบป้องกันตัวเอง ในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณสมดุล (Willcox *et al.*, 2004) โดยกลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมให้มีความสมดุลได้แก่

2.3.1 เอนไซม์ ถือว่าเป็นกลไกสำคัญขั้นตอนแรกในการควบคุมโดยเอนไซม์ที่สำคัญ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) เป็นต้น

2.3.2 สารต้านออกซิเดชั่น เป็นสารที่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อทำให้อนุมูลอิสระหมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป สารเหล่านั้นเช่น ascorbic acid, vitamin, glutathione betacarotene เป็นต้น

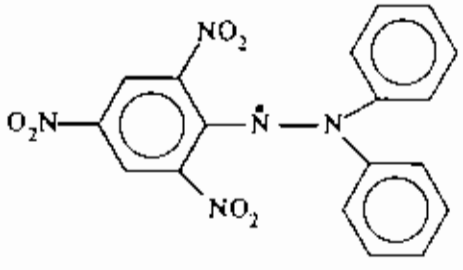
2.3.3 สารคีเลทโลหะ (Metal chelators) ซึ่งโดยปกติโลหะทรานซิชั่น เช่น เหล็ก ทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระโดยสารที่ทำหน้าที่สารคีเลทโลหะ ส่วนใหญ่จะเป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องเข้ามารวบไว้ให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ โปรตีนเหล่านั้น เช่น transferrin, ferritin, albumin และ lactoferrin เป็นต้น (โอกา, 2549)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำอมุนไพรบำรุงร่างกาย

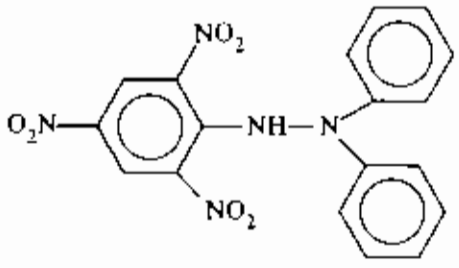
การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นสามารถทำได้หลายวิธี แต่ในที่นี้จะขอกล่าวถึง 2 วิธี คือ DPPH assay และ FRAP assay

2.4.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPPH $^{\cdot}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีความคงตัว การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถการรีดิวซ์ โดยใช้เครื่องวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชั่นลงไป การวัดวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



(1)



(2)

Mahasarakham University

ภาพประกอบ 10 โครงสร้างทางเคมีของ DPPH

Diphenylpicrylhydrazyl free radical (1) และ Diphenylpicrylhydrazine nonradical (2)

สามารถแสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง DPPH ($Z^{\cdot}$) และสาร antioxidant (AH) ดังสมการต่อไปนี้

$$Z^{\cdot} + AH \longrightarrow ZH + A^{\cdot}$$

โดยหากตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ซึ่งจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชั่นที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH เหลือคงอยู่ 50% ในการรายงานค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นของสารตัวอย่างเป็น EC_{50} ทำได้โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %radical scavenging กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานหรือตัวอย่าง โดยคำนวณ %radical scavenging ได้จาก (Molyneux, 2004)

$$\%\text{radical scavenging} = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}}$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึง ค่า absorbance ของ control

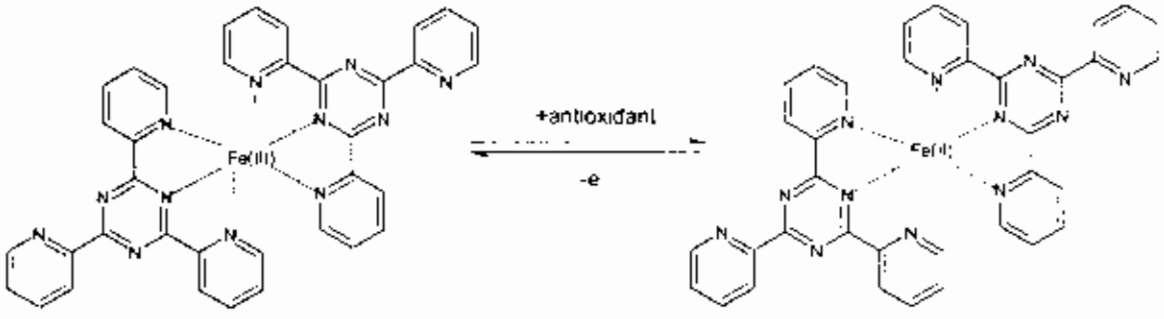
A_{sample} หมายถึง ค่า absorbance ของสารสกัดสมุนไพร

ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน จึงนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบ ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล DPPH $^{\cdot}$ มีความไม่ไวเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นจึงไม่สามารถจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ และโครงสร้างของ DPPH $^{\cdot}$ ตรงอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรเจน ทำให้บางครั้งหากสารต้านอนุมูลอิสระมีโครงสร้างที่ใหญ่อาจไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ หรืออาจเข้าทำช้ากว่าปกติทำให้ผลการวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้ (โอภา, 2549)

Mahasarakham University

2.4.2 Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) (โอกา, 2549)

วิธีนี้จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}- TPTZ) เป็นสารในการทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยเลือดหรือสารต้านออกซิเดชั่น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ซึ่งมีสีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังสมการ



(1) (2)

ภาพประกอบ 11 ปฏิกิริยาของ FRAP assay

Ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} - TPTZ) (1) และ ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} - TPTZ) (2)

ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน แต่กลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่ค่อยสอดคล้องกับปฏิกิริยาที่เกิดภายในร่างกาย

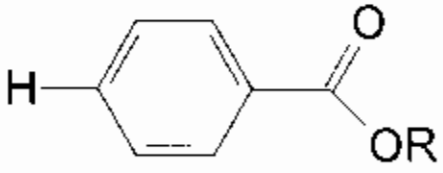
2.5 ข้อมูลชนิด คุณภาพ ปริมาณ ของสารกันเสีย

2.5.1 สารกลุ่มพาราเบน (Wade and Weller, 1994)

เอสเทอร์ของพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิด หรือในอีกชื่อหนึ่งว่า พาราเบน (para - bens) เป็นวัตถุกันเสียที่รู้จักและใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์ประเภทยาและเครื่องสำอาง ซึ่งเป็นวัตถุกันเสียที่ค่อนข้างมีความคงตัวดีมาก ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างในช่วงที่กว้างมาก พาราเบนใช้เป็นสารถนอมอาหารพวกผลิตภัณฑ์ขนมอบต่าง ๆ เครื่องดื่ม ทั้งชนิดอัดคาร์บอนไดออกไซด์และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำมัน

Mahasarakham University

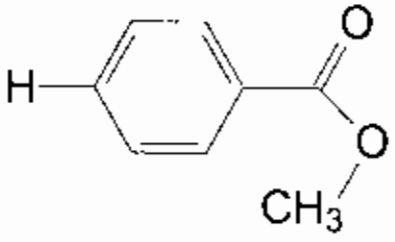
มะกอก ของหมักดอง แยม เยลลี่ และน้ำเชื่อม มีผลต่อกลิ่นรสน้อยมาก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ ปริมาณที่ใช้คือ ร้อยละ 0.03-0.06 โดยน้ำหนักของอาหาร (ศิวาพร, 2546)



ภาพประกอบ 12 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบกลุ่มพาราเบน (para-hydroxybenzoate)

2.5.2.1 methylparaben

ชื่อเคมี : methyl-4-hydroxybenzoate
สูตรโมเลกุล : $C_8H_8O_3$
สูตรโครงสร้าง :



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างทางเคมีของ methylparaben

ส่วนประกอบ : C 63.15 % H 5.30% O 31.55 %
น้ำหนักโมเลกุล : 152.15

Mahasarakham University

ลักษณะทางกายภาพ : ผลึกรูปเข็มไม่มีสีหรือมีสีขาว ไม่มีกลิ่น มีรสเผ็ดร้อนเล็กน้อย

คุณสมบัติทางกายภาพ : จุดหลอมเหลว 131 °C จุดเดือด 270-280 °C

คุณสมบัติ antimicrobial : ระหว่างช่วง pH 4-8 ประสิทธิภาพในการเป็นสารกันเสียจะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น

ค่าการละลาย : 1 กรัมในน้ำ 400 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 °C 1 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 °C 1 กรัมในน้ำ 30 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 °C 1 กรัมใน propylene glycol 5 มิลลิลิตร 1 กรัมใน ethanol (50%) 6 มิลลิลิตร 1 กรัมใน ether 60 มิลลิลิตร ไม่ละลายใน minerol oil

ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ใช้เป็นสารกันเสียที่ R คือ CH_3 สูตรสารเคมี (C_6H_4 (OH) COO) ซึ่งเป็นเมทิลเอสเตอร์ของกรด *p*-hydroxybenzoic และสามารถฆ่าเชื้อรา มักใช้ในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ดูแลร่างกายอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ methylparaben ยังใช้กันทั่วไปเป็นสารเคมีในอาหาร ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในการชะลออัตราการเจริญเติบโตในเชื้อราและแบคทีเรีย และถูกดูดซึมได้อย่างง่ายในระบบทางเดินอาหารหรือผ่านทางผิวหนัง สามารถถูกย่อยในร่างกายให้เป็นกรด *p* - hydroxybenzoic และขับออกมาอย่างรวดเร็วโดยไม่มีการสะสมในร่างกาย

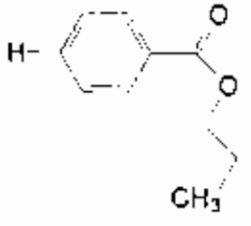
จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันแสดงให้เห็นว่า methylparaben ไม่ก่อให้เกิดพิษโดยทั้งการรับประทานและการให้ทางหลอดเลือด

2.5.2.2 propylparaben

ชื่อเคมี : propyl-4-hydroxybenzoate

สูตรโมเลกุล : $C_{10}H_{12}O_3$

สูตรโครงสร้าง :



ภาพประกอบ 14 โครงสร้างทางเคมีของ propylparaben

Mahasarakham University

ส่วนประกอบ : C 66.65 % H 6.71 % O 26.64 %

น้ำหนักโมเลกุล : 180.20

ลักษณะทางกายภาพ : เป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส

คุณสมบัติทางกายภาพ : จุดหลอมเหลว 96-97 C จุดเดือด 295 C

คุณสมบัติ antimicrobial : ระหว่างช่วง pH 4-8 ประสิทธิภาพในการเป็นสารกันเสียจะลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น

ค่าการละลาย : ละลาย 1 : 2000 ในน้ำ ละลายได้ดีใน alcohol และ ether

ประโยชน์ทางเภสัชกรรม ใช้เป็นสารกันเสียในรูปแบบยาเตรียม propylparaben เป็น ester ของกรด *p*-hydroxybenzoic เกิดขึ้นเป็นสารธรรมชาติที่พบในพืชหลายชนิดและแมลงบางชนิด แม้ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเพื่อเป็นสารกันบูดที่ใช้ในยา อาหาร และเป็นสารกันบูดในเครื่องสำอาง ที่พบโดยทั่วไปที่ใช้น้ำเป็นส่วนประกอบ เช่น ครีม โลชั่น แชมพู และผลิตภัณฑ์อาหารน้ำ

2.6 ข้อกำหนดของสารกันเสียที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ตามกฎหมาย (กฎกระทรวง, 2537)

ข้อกำหนดของสารกันเสียที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ตามกฎกระทรวงในตำรับยาน้ำ ได้แก่

2.6.1 โซเดียมเบนโซเอท (sodium benzoate) หรือกรดเบนโซอิค (benzoic acid) ให้ใช้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1 และใช้ได้กับยาน้ำที่มี pH ไม่เกิน 5

2.6.2 โซเดียมเมทิลพาราเบน (sodium methylparaben) ให้ใช้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1 และใช้ได้กับยาน้ำที่มี pH สูงกว่า 5

2.6.3 โซเดียมโพรพิลพาราเบน (sodium propylparaben) ให้ใช้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1 และใช้ได้กับยาน้ำที่มี pH สูงกว่า 5

2.6.4 โซเดียมเมทิลพาราเบน (sodium methylparaben) ให้ใช้ร่วมกันกับโซเดียมโพรพิลพาราเบน (sodium propylparaben) ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1 และ 0.02 ตามลำดับ

2.6.5 เมทิลพาราเบน (methylparaben) ให้ใช้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1

2.6.6 โพรพิลพาราเบน (propylparaben) ให้ใช้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1

2.6.7 เมทิลพาราเบน (methylparaben) ให้ใช้ร่วมกันกับโพรพิลพาราเบน (propylparaben) ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 0.1 และ 0.02 ตามลำดับ

Mahasarakham University

2.7 การทดสอบและประเมินคุณภาพ

การประเมินคุณภาพรูปแบบยาน้ำ ได้แก่

2.7.1 คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมี เช่น การสังเกตลักษณะภายนอก (สี กลิ่น รสชาติ) การวัดอัตราเร็วในการตกตะกอน ความหนืด และคุณสมบัติการไหล ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาค การบีบเบ็ดหยาบเล็กๆในตำรับ สภาพความเป็นกรด–ด่าง (pH)

2.7.2 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร คือ aerobic bacteria จะต้องมีไม่เกิน 5×10^3 CFU/มิลลิลิตร fungi enterobacteria และ gram-negative bacteria อื่นๆ ไม่เกิน 5×10^3 รวมถึงไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้ *Staphylococcus aureus* ต่อยา 1 กรัมหรือ 1 มิลลิลิตร *Clostridium spp.* ต่อยา 10 กรัมหรือ 10 มิลลิลิตร และ *Salmonella spp.* ต่อยา 10 กรัมหรือ 10 มิลลิลิตร (นันทนา, 2547)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของยุทธนา และคณะ (2552) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากสมุนไพรแต่ละชนิด ประกอบไปด้วย ทิ้งถ่อน ตะไคนา แห้วหมู และข่อย พบว่าสารสกัดจากเปลือกทิ้งถ่อนมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงที่สุด (EC_{50}= 2.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดสมุนไพรอื่นๆ มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยให้ค่า EC_{50} ช่วงระหว่าง 9.7- 49.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดจากเมล็ดข่อย (EC_{50}>120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ทิ้งถ่อน ตะไคนา และแห้วหมู สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี

จากการศึกษาของสิริเพ็ญ และสิริรัตน์ (2551) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะที่ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกทิ้งถ่อน เปลือกตะไคนา บอระเพ็ด แห้วหมู เมล็ดข่อย และผลพริกไทย โดยการสกัดด้วย 95% Ethanol ด้วยวิธี DPPH assay เปรียบเทียบกับ ascorbic acid และ vitamin E ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบจากค่า EC_{50} โดยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดจากเปลือกทิ้งถ่อนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นมากที่สุด รองลงมาคือ แห้วหมู พริกไทย เปลือกตะไคนา บอระเพ็ด เมล็ดข่อย โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 44.34 187.62 235.91 1111.39 1285.09 1324.25 8603.57 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับ ascorbic acid มีค่า EC_{50} 17.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ vitamin E ค่า IC_{50} 22.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อีกทั้งการศึกษานี้ยังมีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดจากตำรับอายุวัฒนะ ทิ้งถ่อนและแห้วหมูมีสารกลุ่ม phenolic compound, tannin และ flavonoid สารสกัดจากพริกไทย ตะไคนา และข่อย มีสารกลุ่ม

Mahasarakham University

phenolic compound และ flavonoid ส่วนสารสกัดจากบอระเพ็ดมีสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งทั้ง tannin และ flavonoid ก็เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม phenolic compound

จากการศึกษาของ Dang *et al.* (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบของ *Phyllanthus emblica* (มะขามป้อม) *Plumbago zeylanica* (เจตมูลเพลิงขาว) และ *Cyperus rotundus* (แห้วหมู) โดยใช้การศึกษาแบบ experimental study แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ โดยการทดลองแรกใช้ carrageenan ชักนำการบวมของอุ้งเท้าหนู พบว่า *P. emblica, P. zeylanica* และ *C. rotundus* มีแนวโน้มที่จะลดการบวมในหนูทดลอง การทดลองที่ 2 ใช้กรดอะซิติกในการชักนำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุช่องท้องจาก พบว่า *P.emblica, P. zeylanic* และ *C. rotundus* แสดงให้เห็นการลดลงของการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

จากการศึกษาของ Kilani *et al.* (2008) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของ *Cyperus rotundus* (แห้วหมู) กับเซลล์ towards K562 erythroleukemia โดยใช้ oligomers flavonoids (TOFs) และ ethyl acetate ซึ่งเป็นสารสกัดของ *C. rotundus* ในหลอดทดลองสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยใช้ H_2O_2 UV- photolysis ในการชักนำให้เกิดสาร xanthine oxidase (XO) และ lipid peroxidation ผลการทดลองพบว่า TOF และสารสกัด ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง xanthine oxidase และ superoxide anion รวมถึงลดการสร้าง thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และป้องกัน H_2O_2/UV-photolysis ที่ชักนำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA อีกทั้ง TOF ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ K562 โดยการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม TOF ยังสามารถแยกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็น 3 ส่วนประกอบคือ catechin afzelechin และ galloyl quinic acid รวมถึง ethyl acetate extract ยังสามารถแยกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็น 5 ส่วนประกอบ คือ luteolin ferulic acid, quercetin 3-hydroxy 4-methoxy-benzoic acid และ 6 7-dimethoxycoumarin ซึ่งได้มีการเปรียบเทียบวิเคราะห์โครงสร้างเหล่านี้ พบว่า luteolin มีฤทธิ์มากที่สุดในการลดสารที่สร้างมาจาก TBARS การยับยั้งกระบวนการ proliferation ของเซลล์ K562 และต้าน H_2O_2/UV-photolysis ที่ชักนำให้เกิดความเสียหายของ DNA อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งโดยสรุปแล้วการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *C. rotundus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง xanthine oxidase lipid peroxidation และ apoptotic effect

จากการศึกษาของ Kilani *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ของสารสกัด *Cyperus rotundus* (แห้วหมู) ในหลอดทดลอง จากผลการทดลองพบว่า oligomers flavonoids (TOFs) และสารสกัด ethyl acetate สามารถต้านเชื้อ *Salmonella enteritidis, Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus faecalis* เหนี่ยวนำให้เกิดการตายในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวมากผิดปกติ เช่น

Mahasarakham University

ในกระบานการสร้างเซลล์มะเร็ง ซึ่งสังเสดจาก TOF และสารสกัด ethyl acetate จะไปลด การเจริญเพิ่มโตและการแบ่งตัวของเซลล์ L1210s ที่ได้จาก murine lymphoblastic leukemia สามารถ นำไปใช้ในการรักษาเซลล์ที่ DNA มีการแตกหักที่เกิดจากการเกิดพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) โดยใช้ กระบวนการ apoptosis การศึกษานี้สามารถยืนยันได้ว่า TOF และสารสกัด ethyl acetate ของ *C. rotundas* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านออกซิเดชั่น และต้านการแตกหักของ DNA

จากการศึกษาของ Jin *et al.* (2011) ได้แยกสารประกอบที่มีอยู่ในสารสกัด *Cyperus rotundus* (แห้วหมู) ที่สกัดด้วย 70% เอทานอล ซึ่งมีหลายองค์ประกอบรวมทั้งอนุพันธ์ของ sesquiterpene (valencene nootkatone และ caryophyllene alpha-oxide), monoterpenes (beta-pinene, 1,8-cineole และ limonene) และ 4-cymene ถูกแยกออกเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านการแพ้ใน *in vitro* และ *in vivo* ในเซลล์ basophilic leukemia (RBL)-1ของหนู พบว่า sesquiterpene สามารถยับยั้ง 5-lipoxygenase ในการสร้าง leukotriene ได้ นอกจากนี้สารพวกนี้ยังสามารถยับยั้งการหลั่ง beta-hexosaminidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาเมื่อเกิดการกระตุ้นให้เกิดการแพ้ของเซลล์ RBL-2H3 ซึ่งสารสกัดจาก *C. rotundus* จะยับยั้งการผลิต leukotriene และการหลั่ง beta- hexosaminidase ที่ขนาด 300 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ซึ่งเกิดจาก sesquiterpene (valencene) มากที่สุด และ *C. rotundus* จะยับยั้ง beta-hexosaminidase โดยยับยั้งปฏิกิริยา Lyn phosphorylation ใน IgE ที่กระตุ้นเซลล์ RBL-2H3 นอกจากนี้องค์ประกอบของ *C. rotundus*, valencene และ nootkatone สามารถยับยั้งปฏิกิริยาภูมิไว (hypersensitivity) ชนิด delayed-type hypersensitivity reaction ในหนู เมื่อให้ในขนาด 50 - 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมในรูปแบบรับประทาน สรุปได้ว่า *C. rotundus* และ องค์ประกอบของ *C. rotundus*, valencene, nootkatone และ caryophyllene alpha-oxide สามารถ ต้านภูมิแพ้ (anti-allergic) ใน *in vitro* และ *in vivo*

จากการศึกษาของ Tsoyi *et al.* (2011) ได้ศึกษาการเหนี่ยวนำ heme oxygenase (HO)-1 ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการต้านการอักเสบของสารสกัดจากเหง้า *Cyperus rotundus* โดยทำการศึกษา การเหนี่ยวนำของ HO-1 และยับยั้งการเหนี่ยวนำของ nitric oxide synthase (iNOS)-NO ที่เกิดจาก สารสกัด *C. rotundus* องค์ประกอบ 12 ชนิดของ *C. rotundus* ประกอบด้วย monoterpenes 3 ชนิด sesqniterpenes 5 ชนิด และ aromatic compounds 4 ชนิด โดยนำมาทดสอบโดยใช้เซลล์ RAW 264.7 (mouse leukaemic monocyte macrophage cell line) แบบ *in vitro* ผลการทดสองพบว่า *C. rotundus* จะไปเพิ่มการแสดงออกของ HO-1 โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ *C. rotundus* ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ การยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และการผลิต NO ที่เกิดจาก LPS ในเซลล์ RAW 264.7 โดยไม่ ส่วนประกอบที่แยกได้จาก *C. rotundus* 12 ชนิด sesquiterpenes จะเป็นองค์ประกอบหลักที่เหนี่ยวนำ HO-1 expression ในเซลล์ macrophage ซึ่ง nootkatone และ valencene (sesquiterpenes) จะสามารถ

Mahasarakham University

ยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และการผลิต NO อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง high mobility group box-1 (HMGB1) และสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตหลังจากชักนำให้หนูเกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง โดยใช้เทคนิค Cecal ligation and puncture (CLP) สรุปได้ว่ากลไกต้านการอักเสบอาจจะเกิดจากสารสกัดของ *C. rotundus* โดยอย่างน้อยที่สุดเกิดจากกลไกการเหนี่ยวนำ HO-1 ใน sesquiterpene เช่น nootkatone และ valencene ซึ่งมีบทบาทสำคัญ

จากการศึกษาของ Kumar และ Khanum (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัด *Cyperus rotundus* โดยใช้ H_2O_2 เป็นตัวชักนำให้เกิดพิษ ซึ่งศึกษาโดยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] และ LDH assay (lactate dehydrogenase assay) พบว่า *C. rotundus* มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชั่นโดยสามารถควบคุมระดับเอนไซม์ ผลการทดลองพบการซ่อมแซมความเสียหายของ cellular nuclear และ mitochondrial ที่ถูกชักนำโดย H_2O_2 รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ Brain derived nerve growth factor (BDNF) ซึ่งประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชั่นและการต้านการตายของเซลล์ของสารสกัดจากพืชนี้จะขึ้นกับความเข้มข้นของ phenolics flavonoid

จากการศึกษาของ Tunsaringkarn *et al.* (2012) กล่าวว่าสารเคมีจะเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระที่มากขึ้นทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (oxidative hemolysis) ซึ่งสัมพันธ์กับการก่อตัวของ heinz body (เกิดจากการตกตะกอนของ hemogobin) ที่ไม่ละลาย และตกตะกอนในเม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นการทำลายออกซิเดชั่นของ hemoglobin โดยได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยการเหนี่ยวนำ heinz body โดยใช้วิธี *in vitro* มีการเปรียบเทียบสารสกัดจากพืชในพืชวงศ์ mimosaceae 21 ชนิด โดยสกัดด้วยเอทานอล พบว่าร้อยละของการยับยั้ง heinz body สูงสุดคือเปลือกของ *Xylia xylocarpa*, *P. speciosa* และ *Entada rheedii* มีค่า 25% inhibition concentration (IC_{25}) เท่ากับ 2.68 15.71 และ 28.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และยังมีค่าแทนนินมากที่สุด ซึ่งบ่งชี้ความสัมพันธ์กันกับการยับยั้ง heinz body ในสกัดจากพืชทั้งหมด 21 ชนิด ความทั้ง *Albizia procera* (Roxb.) Benth. (ทิ้งถ่อน) อีกด้วย

จากการศึกษาของ Ramli *et al.* (2008) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นใน 20 สปีชีส์ จากพืชวงศ์ mimosaceae โดยสารสกัดเอทานอลจากส่วนของเมล็ด ใบและเปลือกต้น โดยทำปฏิกิริยากับ DPPH free radical และใช้ buthylated hydroxyl toluene (BHT) และ quercetin เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ซึ่งสารมาตรฐานมีค่า EC_{50} 3.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน *Albizia procera* (Roxb.) Benth. (ทิ้งถ่อน) มีค่า EC_{50} เท่ากับ 9.67 ไมโครกรัม มิลลิลิตร

จากการศึกษาของ Noor และ Ashcroft (1998) ศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (anti-hyperglycemic) ในสารสกัด *Tinospora crispa* (บอระเพ็ด) โดยการศึกษาผลการดูดซึมของ

Mahasarakham University

กลูโคสที่ลำไส้และเซลล์ไขมัน(adipocytes) กลไกของ *T. crispa* จะกระตุ้นการหลั่ง insulin โดยได้ทำการศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดจากการทำงานของ cAMP (cyclic adenosine mono phosphate) แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งผลที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากการรบกวนการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสที่ลำไส้หรือดูดซึมเข้าสู่เซลล์ แต่อาจเป็นเพราะ *T. crispa* กระตุ้นการปล่อยอินซูลินจาก beta-cell Ca^{2+} โดยฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินของ *T. crispa* มาจากส่วนประกอบของสารสกัดซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้

จากการศึกษาของ Praman *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์และกลไกการทำงานของสารสกัดจากลำต้น *Tinospora crispa* (บอระเพ็ด) ซึ่งมีผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูถมยาสลบ สารสกัดได้จากการนำลำต้นแห้งสกัดด้วยน้ำและตามด้วยชั้นของ chloroform, ethyl acetate และ *n*-butanol เป็นลำดับสุดท้าย จากนั้นทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ได้ผงแห้งหยาบของ *T. crispa* จากการศึกษาพบว่า สารสกัด *T. crispa* (1-100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ) ทำให้เกิดการลดลงของความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP) โดยจะมีผลลดความดันโลหิต ตามด้วยการเพิ่มความดันโลหิตอีกเล็กน้อย (dual effect) ส่วนในอัตราการเต้นของหัวใจในหนูปกติ จะลดลงเล็กน้อยชั่วคราวแล้วเพิ่มขึ้นในภายหลัง (dual effect)

จากการศึกษาของ Amom *et al.* (2009) ศึกษาเพื่อประเมินส่วนประกอบทางโภชนาการและส่วนประกอบของแร่ธาตุ การต้านออกซิเดชั่นของ flavonoid และ phenolic จากสารสกัดด้วยน้ำของ *Tinospora crispa* (บอระเพ็ด) ผลจากการศึกษาพบว่า *T. crispa* มีปริมาณความชื้น (77.9%) ตามด้วย คาร์โบไฮเดรต (19.4%) โปรตีน ไขมันและเส้นใยพบได้น้อย ส่วนในด้านของแร่ธาตุพบว่าแคลเซียมและโพแทสเซียมพบในปริมาณที่มากสุด ส่วนแร่ธาตุอื่น เช่น แมกนีเซียม ซิลิคอน ฟอสฟอรัส และซลอรีนพบในปริมาณที่ต่ำมาก และในด้านของความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดที่วิเคราะห์จากวิธี DPPH, TBA และ FRAP assay พบว่า *T. crispa* มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชั่นสูงเทียบได้กับสารมาตรฐาน เช่น BHT และวิตามินซี ซึ่ง flavonoid ที่ตรวจพบประกอบไปด้วย catechin (1.58 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) luteolin (0.85 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) morin (1.44 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) และ rutin (1.38 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ซึ่งกาจมีส่วนในการต้านออกซิเดชั่นได้สูง ผลการวิจัยจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า *T. crispa* มีคุณค่าทางสารอาหาร และมีสารต้านออกซิเดชั่น

จากการศึกษาของ Bac *et al.* (2010) ได้ทดสอบฤทธิ์ของ piperine โดยที่ lipopolysaccharide (LPS) จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองการอักเสบ การให้ piperine จะไปยับยั้ง LPS ที่จะเหนี่ยวนำพิษแล้วทำให้เกิดการช็อก การสะสมของเม็ดเลือดขาว และการก่อตัวของ tumor necrosis factor alpha แต่ไม่ได้เกี่ยวกับ interleukin (IL)-1beta และ IL-6 ผลการศึกษาพบว่า piperine จะยับยั้ง LPS/poly (I:C)/CpG-ODN ที่เหนี่ยวนำทำให้เกิดการผลิต TNF-alpha และยังไปยับยั้ง LPS

Mahasarakham University

ที่เหนี่ยวนำพิบแล้วทำให้เกิดการชื่อกในหนู โดยที่การชื่อกจะถูกกำหนดโดย type 1 interferon (IFN) mRNA expression ซึ่ง piperine จะยับยั้งที่ type 1 IFN mRNA

จากการศึกษาของ Kim *et al.* (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ piperine ในการยับยั้ง phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2) โดยวิเคราะห์ในเซลล์ RAW 264.7 (เซลล์ macrophage ของหนู) ซึ่งฤทธิ์ของ piperine ขึ้นอยู่กับขนาดที่ได้รับ (dose-dependent) โดยจะไปลดการแสดงออกของ COX-2 และการผลิต PGE_2 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำ PMA รวมทั้งลด COX-2 ที่ถูกควบคุมโดย luciferase การค้นพบนี้แสดงว่า piperine ลดการเกิดCOX-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และทำให้ความเข้าใจเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอักเสบของ piperine

จากการศึกษาของ Bae *et al.* (2012) ได้ตรวจสอบฤทธิ์ของ piperine ที่เกี่ยวกับ lipopolysaccharide (LPS) ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบใน bone-marrow-derived dendritic cells (BMDCs) การศึกษาพบว่า piperine สามารถยับยั้งการแสดงของ major histocompatibility complex (MHC) class II CD40 และ CD86 ใน BMDCs โดยขึ้นกับ dose-dependent อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การใช้ piperine จะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ fluorescein-isothiocyanate dextran ในการทดสอบกับ LPS ของเซลล์ dendritic และยับยั้งการผลิต tumour necrosis factor alpha และ interleukin (IL) -12c แต่ไม่เกี่ยวกับ IL-6 ฤทธิ์การยับยั้งของ piperine เกิดโดยการไปลด extracellular signal-regulated kinases และการทำงานของ c-Jun N-terminal kinase การค้นพบนี้ทำให้เข้าใจถึงบทบาทของฤทธิ์ทางภูมิคุ้นกันเชิงเทสัชวิทยาของ piperine

จากการศึกษาของ Hwang *et al.* (2011) ได้ตรวจสอบฤทธิ์ของ piperine ในการยับยั้งการลุกลามของเนื้องอก (tumor invasion) และการย้ายที่ (migration) และกลไกที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ fibrosarcoma HT-1080 ในมนุษย์ พบว่า piperine สามารถยับยั้งการแสดงออกของ phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ในการเพิ่ม matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ในโปรตีน mRNA และระดับของการถอดรหัสผ่านการยับยั้งของ NF-KB และ AP-1 ในการทำงานโดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงลำดับของการยับยั้ง metalloproteinase (TIMP) -1

จากการศึกษาของ Pathak และ Khandelwal (2009) ได้ศึกษาบทบาทการกระตุ้นระบบภูมิคุ้นกันของ piperine โดยใช้ cadmium ชักนำให้เกิดการฝ่อของต่อมไทมัส (thymic atrophy) และม้ามโตผิดปกติ (splenomegaly)ในหนูทดลอง ซึ่ง cadmium จะชักนำให้เกิดการตายของเซลล์และกดภูมิคุ้มกัน โดย *Piper longum* Linn. (ชะพลู) และ *Piper nigrum* Linn. (พริกไทย) จะแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านการตายของเซลล์ (anti-apoptotic) ใน *in vitro* ส่วนใน *in vivo* จะใช้ piperine ในรูปแบบรับประทานในขนาด 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ระยะเวลา 7 วัน ในการรักษาหนูทดลองที่ได้รับ

Mahasarakham University

$CdCl_2$ (1.8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้องวันละครั้ง 4 วัน) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระและการตายของเซลล์ สามารถควบคุมได้โดยสารอัลคาลอยด์ชนิดนี้ รวมไปถึงการยับยั้งการแบ่งตัวของ T-cell และ B-cell และการหลั่ง cytokine ซึ่งจะชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบต่อไป

การศึกษาของ Sunila และ Kuttan (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและฤทธิ์ต้านมะเร็งของ *Piper longum* Linn. ซึ่งในการศึกษาใช้แอลกอฮอล์ในการสกัดผลของ *Piper longum* และได้เป็นส่วนประกอบของ piperine มาใช้ศึกษาในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และฤทธิ์ต้านมะเร็ง จากการศึกษาพบว่าสารสกัดในแอลกอฮอล์ 100% เกิดพิษกับเซลล์มะเร็ง dalton's lymphoma ascites (DLA) ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับเซลล์ ehrlich ascites carcinoma (EAC)

จากการศึกษาของ Kumar *et al.* (2012) เพื่อประเมินการรักษาเบาหวาน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัด *Streblus asper* (ข่อย) ในหนู โดยชักนำให้หนูเป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin เข้าช่องท้อง (STZ, 65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) หลังจากนั้น 3 วันหนูให้การรักษาโดย *S. asper* 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในรูปแบบรับประทานวันละครั้งเป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบกับ glibenclamide 0.25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในรูปแบบรับประทาน โดยมีการวัดระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารทุก 5 วันในระหว่างช่วงการรักษา มีการวัดค่าทางชีวเคมีในเลือด เช่น serum glutamate, pyruvate transaminase, serum glutamate, oxaloacetate transaminase, serum alkaline phosphatase, total cholesterol, total protein และ serum triglycerides โดยที่คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่นจะถูกประเมินจากตับ และ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ที่ได glutathione และ catalase ที่ลดลง ผลการทดลองพบว่าในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย STZ จนเกิดเป็นเบาหวานที่ได้รับ *S. asper* ขนาด 200-400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ค่าพารามิเตอร์ของระดับสารต้านออกซิเดชั่นอยู่ในระดับที่ปกติ เมื่อนำไปเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัด *S. asper* ด้วย methanol มีความโดดเด่นในการต้านเบาหวานในหนูที่เป็นเบาหวาน และประสิทธิภาพในการต้านเบาหวานเป็นผลมาจากบทบาทของสารต้านออกซิเดชั่น

จากการศึกษาของ Sripanidkulchai *et al.* (2009) ได้ตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของ *Streblus asper* (ข่อย) ที่สกัดด้วยเอทานอลโดยการนำ carrageenan ไปกระตุ้นให้เท้าหนูเกิดการบวมแล้วให้ *S. asper* ในขนาด 125 250 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางช่องท้อง จากนั้นใช้วิธี reverse transcriptive polymerase chain reaction (RT-PCR) ตรวจสอบผลของ *S. asper* กับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 (macrophage) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) จากผลการทดลองพบว่า การยับยั้งการบวมของ *S. asper* ขึ้นอยู่กับปริมาณ

Mahasarakham University

ที่ได้รับ (dose-dependent) ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังขึ้นกับปริมาณ LPS ที่ชักนำให้เกิด cyclooxygenase (COX)-2 และการแสดงออกของยีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งเป็น mRNA ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ได้รับสารสกัด *S. asper* โดยผลของการศึกษาครั้งนี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ครั้งแรกเกี่ยวกับผลของโบเลกุลของ *S. asper* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบ สนับสนุนข้อเท็จจริงที่ว่า *S. asper* เป็นยาแผนโบราณที่สามารถต้านการอักเสบได้

จากการศึกษาของ Rastogi *et al.* (2006) โดยการทบทวนเอกสารงานวิจัยพบว่าคุณสมบัติทางเคมี เภสัชวิทยา และบานุพยวิทยาการแพทย์ของ *Streblus asper* Lour. (Shakhotaka) ซึ่งเป็นสายพันธ์ที่พบในประเทศไทยโดยได้แยกความแตกต่างทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการรักษาโรคเท้าช้าง เรื้อน อาการปวดฟัน ท้องเสีย บิด และมะเร็งได้

จากการศึกษาของ Ingkaninan *et al.* (2003) ได้ศึกษาการยับยั้ง acetylcholinesterase (AChE) ในสมุนไพรไทย 32 ชนิด ในการฟื้นฟูและบำรุงระบบประสาท (neurotonic) โดยสกัดด้วยเมทานอล แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง AChE โดยใช้วิธี ellman's colorimetric ใน microplate ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดด้วย เมทานอลจาก *Diospyros rhodocalyx* Kurz. (ตะโกนา) สามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ได้ 15.52%

จากการทบทวนวรรณกรรมแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรที่ใช้ในตำรับ มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายอย่าง เช่น แห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) มีฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ข่อย (*Streblus asper* Lour.) มีฤทธิ์ในการรักษาอาการท้องเสีย ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์รักษาเบาหวาน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น พริกไทย (*Piper nigrum* L.) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทิ้งถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth.) มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น เถาวัลย์เปรียง (*Tinospora crispa* (L.) Miere ex Hook.f.) มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต ตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.) มีฤทธิ์ฟื้นฟูและบำรุงระบบประสาท (neurotonic) แต่อย่างไรก็ตามในส่วนของการศึกษาในด้านของประสิทธิภาพของสูตรตำรับยังมีอยู่น้อย จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาประสิทธิภาพของสูตรตำรับและพัฒนาสูตรตำรับนี้ต่อไป

Mahasarakham University

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

ซึ่งได้แบ่งหัวข้อย่อยในการศึกษาดังนี้

3.1 แผนการวิจัย

3.2 พืชสมุนไพร สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.3 วิธีการดำเนินการศึกษา

3.3.1 สูตรตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.3.2 วิธีการทำยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.3.3 การทำแห้งยาน้ำสมุนไพร โดยวิธี freeze dry

3.3.4 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยวิธี DPPH assay

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยวิธี FRAP assay

3.3.7 การควบคุมคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

3.1 แผนการวิจัย

การศึกษาพัฒนาตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย เป็นการศึกษาแบบเชิงทดลอง (experimental design) โดยศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่มีในตำรับ การควบคุมคุณภาพการผลิต โดยการตรวจสอบความคงตัวทางด้านกายภาพ เคมี และคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยาของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.2 พืชสมุนไพร สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1 พืชสมุนไพร

Mahasarakham University

3.2.1.1 พืชสมุนไพรตัวยาสำคัญ 6 ชนิด ได้แก่

3.2.1.1 เปลือกทิ้งถ่อน (*Albizia procera* (Roxb.) Benth)

3.2.1.2 เปลือกตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx* Kurz.)

3.2.1.3 ลำต้นบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Miere ex Hook.f.)

3.2.1.4 หัวแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.)

3.2.1.5 เมล็ดข่อย (*Streblus asper* Lour.)

3.2.1.6 ผลพริกไทย (*Piper nigrum* L.)

3.2.1.2 พืชสมุนไพรแต่งกลิ่น รส 3 ชนิด ได้แก่

3.2.1.1 ลำต้นชะเอม (*Glycyrrhiza glabra* L.)

3.2.1.2 ผลมะตูม (*Aegle marmelos* (L.) Corr. Serr.)

3.2.1.3 ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb)

จากร้านทองอินทร์เภสัช อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม ในระหว่างเดือน กันยายน ปี 2555

3.2.1.3 สารให้ความหวาน ได้แก่ น้ำผึ้ง

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 ตัวทำละลาย

- น้ำกลั่น
- 95% ethanol (SCVV company limited, ประเทศไทย)

3.3.2.2 วัดถุกันเสีย

- propyl paraben (ซงฮวด, ประเทศไทย)
- methyl paraben (ซงฮวด, ประเทศไทย)

3.2.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- soybean casein medium agar (Himedia laboratories PVT. India)
- DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Fluka, Switzerland)
- ascorbic acid (Sigma Chemical company, U.S.A)
- TPTZ (2,4,6-tripyridyl-striazine) (Fluka, Switzerland)
- $FeCl_3$ (Ferric Chloride) (Sigma Chemical company, U.S.A)

3.2.4 เครื่องมือ

- Micropipette	(Glassco, United Kingdom)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	(Sartorius AG GOTTINGEN LEZ2445, Germany)
- เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	(Sartorius AG GOTTINGEN CP 3202S 17111995, Germany)
- Autocave	(Sanyo MSL-3780, Japan)
- Hotair oven	(Contherm Thermotec 2000, Australia)
- หม้อนึ่งไอน้ำ (Auto clave)	(Sanyo MSL-3780, Japan)
- เครื่อง Lyophylizer	(Scanvac H 0412009, Denmark)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)	(Contherm Incubator 1300, Australia)
- เครื่อง UV- spectrophoto meter	(Jasco SSE-343, U.S.A)
- Shaking water bath	(Memmert WB-7, Germany)

3.2.5 อุปกรณ์

- บีกเกอร์	- กระบอกตวง
- ขวดรูปชมพู่	- แท่งแก้วคนสาร
- จานเพาะเชื้อ	- หลอดทดลอง

3.3 วิธีดำเนินการศึกษา

การดำเนินงานแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

3.3.1 สูตรตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

สูตรตำรับ ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ดังตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนประกอบในแต่ละสูตรตำรับ

ส่วนประกอบ	สูตร A น้ำหนัก (กรัม)	สูตร B น้ำหนัก (กรัม)	สูตร C น้ำหนัก (กรัม)	สูตร D น้ำหนัก (กรัม)
ทิ้งถ่อน	25	25	25	25
คะโกนา	25	25	25	25
บอระเพ็ด	6.25	6.25	6.25	6.25
แห้วหมู	25	25	25	25
ข่อย	25	25	25	25
พริกไทย	25	25	25	25
ชะเอม	12.5	12.5	12.5	12.5
ใบเตย	6.25	12.5	-	-
มะตูม	-	-	6.25	12.5
น้ำผึ้ง	50	50	50	50
methylparaben +propylparaben	0.1% : 0.02%	0.1% : 0.02%	0.1% : 0.02%	0.1% : 0.02%

3.3.2 วิธีการทำยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.3.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการตั้งตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย พืชสมุนไพรแห้ง ได้แก่ ทิ้งถ่อน คะโกนา บอระเพ็ด แห้วหมู ข่อย พริกไทย ชะเอม มะตูม และใบเตย

3.3.2.2 เตรียมน้ำกลั่นมาปริมาณตามสูตรตำรับ

3.3.2.3 ล้างสมุนไพรแห้งให้สะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำแล้วนำไปอบให้แห้ง

3.3.2.4 ชั่งสมุนไพรแต่ละชนิด ชะเอม น้ำผึ้ง และสารกันเสียชนิดต่างๆ ตามอัตราส่วนที่กำหนด

3.3.2.5 ทุบสมุนไพรแห้งให้เนื้อแตกเพียงเล็กน้อย

3.3.2.6 นำสมุนไพรที่เตรียมไว้ ห่อด้วยผ้าขาวบาง มัดให้แน่น

3.3.2.7 ต้มน้ำประมาณ 1200 มิลลิลิตรให้เดือด จากนั้นนำสมุนไพรที่ห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงไป นาน 30 นาที

Mahasarakham University

3.3.2.8 นำห่อผ้าขาวบางออก

3.3.2.9 รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำผึ้ง และสารกับเสียทางตามปริมาณที่ชั่งไว้

3.3.2.10 ปรับปริมาตรด้วยน้ำต้มสุกจนครบ 1,00 มิลลิลิตร

3.3.3 การทำแห้งยาน้ำสมุนไพร โดยวิธี freeze dry

3.3.3.1 นำตำรับยาน้ำสมุนไพรที่เตรียม ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ round button flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใส่ยาน้ำสมุนไพร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในแต่ละ flask

3.3.3.2 นำ round button flask ที่มียาน้ำสมุนไพรแล้ว ไปทำให้สารตัวอย่างกลายเป็นของแข็งโดยอ่าง cooling

3.3.3.3 นำ round button flask ที่ผ่านการ freeze แล้วมาเข้าเครื่อง freeze dryer ที่อุณหภูมิ -110 ^{0}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือ รอจนสารตัวอย่างแห้งดีจึงนำสารตัวอย่างออกจาก freeze dryer

3.3.4 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ (ทิวา, 2550)

3.3.4.1 บันทึกปริมาณของตะกอน และศึกษาค่า sedimentation volume (F) ของตำรับโดยบรรจุยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายในกระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร โดยให้มีความสูง 10 เซนติเมตร เขย่าให้กระจายตัวทั่วแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ แล้วอ่านปริมาณตะกอนในเวลาที่กำหนด คำนวณหาค่า F ดังสูตร

$$F = \frac{\text{ปริมาตรของตะกอนที่เวลา } t}{\text{ปริมาตรของยาน้ำแขวนตะกอนที่เวลาเริ่มต้น}}$$

ค่า F ที่ดีที่สุดจะเท่ากับ 1 แสดงว่าไม่มีการนอนก้นของตะกอนในเวลาที่กำหนด ค่ายิ่งน้อยแสดงว่ามีความคงตัวทางกายภาพลดลง

3.3.4.2 บันทึกสีและกลิ่นของตะกอน

3.3.4.3 ลักษณะสีโดยรวมของตำรับ

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี DPPH assay (พวงรัตน์ และคณะ, 2543)

3.3.5.1 เตรียมสารสกัดสมุนไพร ให้มีความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น (1.5-50 กรัม/1,000มิลลิลิตร) โดยละลายผงยาน้ำสมุนไพรที่ผ่านกระบวนการ Freeze dry ด้วย 95% ethanol ใน microplate

Mahasarakham University

3.3.5.2 เตรียม DPPH ความเข้มข้น 0.012 กรัม:200 มิลลิลิตร ด้วย 95% methanol

3.3.5.3 ผสมสารสกัดในข้อ 3.3.4.1 และ DPPH อย่างละ 100 ไมโครลิตร

3.3.5.4 ทิ้งไว้ที่บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ โดยหลอดที่เป็นสารมาตรฐานใช้ ascorbic acid วัดค่า absorbance ทุกหลอด รวมทั้ง control (DPPH และ 95% ethanol) แล้วหาค่า เปอร์เซ็นต์ radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ radical scavenging} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ หมายถึงค่า absorbance ของ control

A_{sample} หมายถึงค่า absorbance ของสารสกัดสมุนไพร

3.3.5.5 พล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร กับเปอร์เซ็นต์ radical scavenging แล้วหาค่า EC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลาย DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี FRAP assay (สุรพงศ์. 2555)

3.3.6.1 เตรียมสารสกัดสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม:มิลลิลิตร

3.3.6.2 เตรียม FRAP reagent โดยมีส่วนประกอบของ acetate buffer:TPTZ (2,4,6-tripyridyl-striazine):$FeCl_3$ (Ferric chloride) ในอัตราส่วน 30:1:1

3.3.6.3 นำสารสกัดในข้อ 3.3.5.1 จำนวน 100 ไมโครลิตร และ FRAP reagent ข้อที่ 3.3.5.2 จำนวน 3,000 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาใน microplate หลุมเดียวกัน

3.3.6.4 นำสารสะลายที่ได้จาก ข้อที่ 3.3.5.3 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที นำค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid รายงานผลเป็นค่าเทียบเท่า ascorbic acid ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.3.6.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน ascorbic acid โดยเตรียม ascorbic acid 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0.1 0.25 0.5 1 2.5 และ 5 มิลลิโมล จำนวนหลอดละ 100 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent จำนวน 3000 ไมโครลิตร วัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยหลอดที่เป็นสารมาตรฐานใช้ ascorbic acid จากนั้นนำไปสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ascorbic acid กับค่าการดูดกลืนแสง

Mahasarakham University

3.3.7 การควบคุมคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพร

3.3.7.1 คุณสมบัติทางเคมี

- ความเป็นกรด-ด่าง ของตำรับวัดค่าโดยใช้เครื่อง pH meter

3.3.7.2 คุณสมบัติทางกายภาพ

- ลักษณะตะกอน บันทึกค่าโดยผู้วิจัย ซึ่งใช้การเขียนบรรยายลักษณะตะกอนที่เกิดขึ้น รวมทั้งลักษณะสีและปริมาณตะกอน

- ลักษณะสีของตำรับ บันทึกค่าโดยผู้วิจัย ซึ่งใช้การเขียนบรรยายลักษณะสี ความใส ความขุ่นของตำรับที่เกิดขึ้น

- ลักษณะกลิ่นของตำรับ บันทึกค่าโดยการเขียนบรรยายลักษณะของกลิ่นของตำรับ

3.3.7.3 การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา

(ก) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) ชั่ง soybean casein digest agar (tryptone soya agar) 40 กรัม

2) ละลายใน purified water 1,000 มิลลิลิตร ต้มบน hotplate จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด

3) นำไป sterilize โดยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

(ข) นับจุลินทรีย์ด้วยวิธี pour plate (Maturin and Peeler, 2001)

1) ดูดยาน้ำสมุนไพรจากขวดที่เจือจางเป็น $1:10^3$ $1:10^4$ และ $1:10^5$ ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว จานละ 1 มิลลิลิตร 3 จานต่อ 1 dilution โดยใช้ปิเปต

2) นำอาหารวุ้นที่เตรียมไว้บ่มเทลงในจานทุกจานปริมาณ 21 มิลลิลิตร โดยขณะที่เทใช้ฝาจานปิดป้องกันส่วนผสมข้างในมิให้เชื้อจากอากาศตกลงไป

3) หมุนจานไปมาให้ส่วนผสมเข้ากันดีกับอาหาร ระวังอย่าให้กระเด็นไปติดฝาจาน

4) ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วจึงกลับจานเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่ติดบนฝาจานหยดลงมาบนวุ้น

5) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปนับจำนวนโคโลนี

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 บันทึกข้อมูลลักษณะทางกายภาพคือ ลักษณะ ปริมาณ และสีของตะกอน รวมทั้งลักษณะกลิ่นและรสชาติของแต่ละสูตรตำรับหลังจากตั้งทิ้งไว้ 90 วัน

3.4.2 บันทึกค่าการดูดกลืนคลื่นแสง นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านออกซิเดชั่น และหาค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.3 บันทึกจำนวนโคโลนีที่ขึ้นใน plate ในแต่ละตัวอย่าง หลังจากบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อ

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.2 สถิติทดสอบข้อตกลงเบื้องต้น การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) โดยทดสอบความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวนของประชากร (homogeneity of variance) โดยใช้สถิติ 1-sample K-S และการแจกแจงเป็นโค้งปกติของประชากร (normality) โดยสถิติ Run-test พบว่า มีความเป็นเอกพันธ์ของประชากร และการแจกแจงของประชากรเป็นโค้งปกติ จึงนำไปวิเคราะห์เพื่อทดสอบสมมติฐานต่อไป

3.5.3 สถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐาน ของการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของยาน้ำสมุนไพรบำรุงกำลัง ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ ตามวิธีของ Duncan และคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0

Mahasarakham University

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาผลการวิเคราะห์ข้อมูลผู้วิจัยได้แบ่งหัวข้อดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดสารสำคัญจากสูตรตำรับ
2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ
   - 2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี DPPH assay
   - 2.2 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี FRAP assay
3. การตั้งตำรับและควบคุมคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพร
   - 3.1 การทดสอบทางกายภาพและเคมี
   - 3.2 การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. การเตรียมสารสกัดสารสำคัญจากสูตรตำรับ

น้ำหนักสมุนไพรตามแต่ละสูตรตำรับ ระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้สารสกัดหยาบ (crude extract) นำมาคำนวณหา % yield ผลการดำเนินงาน ดังแสดงในตาราง 4

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารหลังระเหยแห้งด้วยเครื่อง freeze dry} \times 100}{\text{น้ำหนักของส่วนประกอบในตำรับ}}$$

ตาราง 4 ลักษณะและน้ำหนักของสารสกัดจากสูตรตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

สารสกัดในตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	% yield
ตำรับ A	สารสีเหลืองเข้ม ใส	58.56	37.47
ตำรับ B	สารสีเหลืองเข้ม ใส	58.82	36.20
ตำรับ C	สารสีน้ำตาลอ่อน ใส	57.05	36.51

Mahasarakham University

ตาราง 4 (ต่อ)

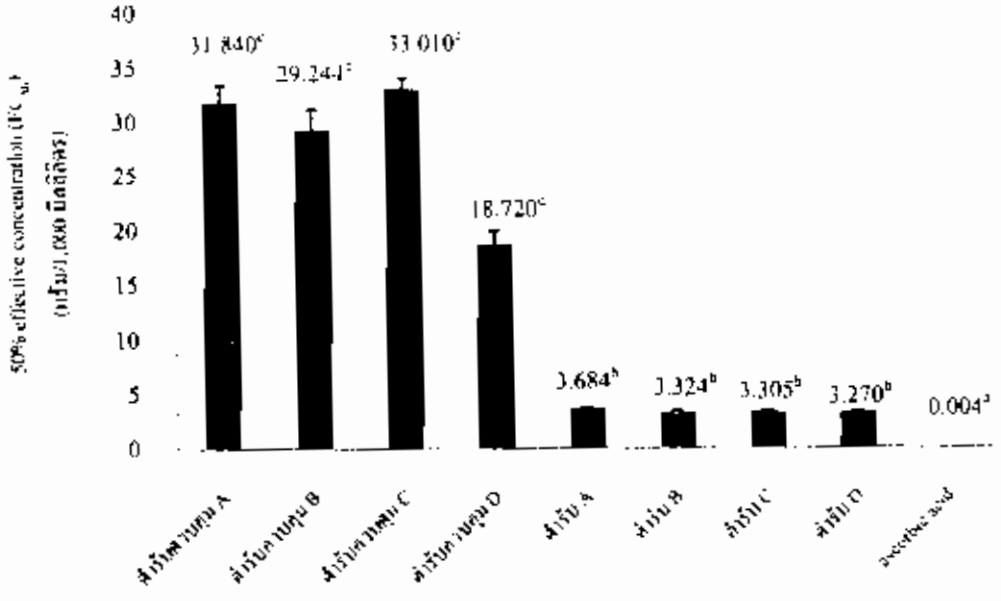
สารสกัดในตัวทำละลาย	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	% yield
ตำรับ D	สารสีน้ำตาลอ่อน ใส	58.47	35.98
ตำรับควบคุม A	สารสีเหลืองอ่อน ใส	51.85	27.65
ตำรับควบคุม B	สารสีเหลืองอ่อน ใส	56.57	22.63
ตำรับควบคุม C	สารสีเหลืองอ่อน ใส	53.39	28.47
ตำรับควบคุม D	สารสีเหลืองอ่อน ใส	50.02	20.01

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดจากยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย จำนวน 8 ตำรับ ได้แก่ ตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C ตำรับ D ตำรับควบคุม A ตำรับควบคุม B ตำรับควบคุม C ตำรับ D และสารต้านออกซิเดชั่นมาตรฐาน ascorbic acid โดยใช้อนุมูลอิสระที่เสถียร คือ DPPH· ซึ่งรายงานเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) จากการทดสอบพบว่า ascorbic acid มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ตำรับ D ตำรับ C ตำรับ B ตำรับ A ตำรับควบคุม D ตำรับควบคุม B ตำรับควบคุม A และตำรับควบคุม C ตามลำดับ โดยค่า EC_{50} คือ 0.004, 3.270, 3.305, 3.324, 3.684, 18.720, 29.244, 31.840 และ 33.010 กรัม/1,000 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดสอบความแตกต่างจากสถิติพบว่า ascorbic acid สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากันคือ ตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D รองลงมาคือ ตำรับควบคุม D ตำรับควบคุม B ตามลำดับ ส่วน ตำรับควบคุมA และตำรับควบคุม C ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยที่สุด ดังแสดงในภาพประกอบ 15

Mahasarakham University

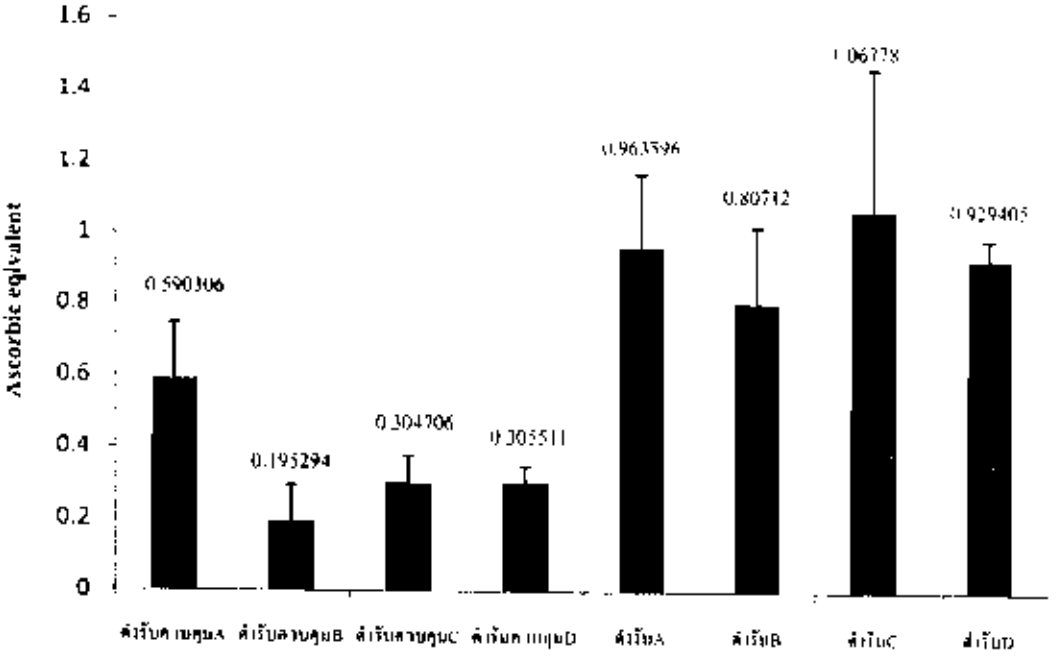


*ตัวอักษร ^{a,b,c,d,e} แสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ภาพประกอบ 15 แผนภูมิแสดงค่า 50% effective concentration (กรัม/1,000 มิลลิลิตร) ของสารสกัดสารสำคัญในสูตรตำรับ (n=5)

1.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่น โดยวิธี FRAP assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสูตรตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย ทั้ง 8 ตำรับ และสารต้านออกซิเดชั่นมาตรฐาน ascorbic acid ซึ่งรายงานผลการทดลองเป็นค่า FRAP value เทียบเท่ากับ ascorbic acid equivalent จากการทดสอบทางสถิติพบว่า สารสกัดในสูตรตำรับ C มีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นได้ดีที่สุด รองลงมา คือ ตำรับ A ตำรับ D ตำรับ B ตำรับควบคุม A ตำรับควบคุม D ตำรับควบคุม C ตำรับควบคุม B โดยมีค่าเทียบเท่ากับ 1.0678, 0.9632, 0.9294 0.8071, 0.5930, 0.3055, 0.3047 และ 0.1953 มิลลิโมล ascorbic acid/มิลลิกรัม สารสกัด ตามลำดับ จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และ ตำรับ D ต้านอนุมูลอิสระได้เท่ากัน ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) ดังภาพประกอบ 16



*ตัวอักษร a, b, c, d, e แสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแสดงค่า FRAP value เทียบเท่ากับสารมาตรฐานวิตามินซี (ascorbic acid equivalent : มิลลิโมล ascorbic acid/มิลลิกรัมสารสกัด) ของสารสกัดสารสำคัญในสูตรตำรับ (n=5)

3.การควบคุมคุณภาพตำรับยาน้ำฮมุนไพรบำรุงร่างกาย

3.1 การทดสอบทางกายภาพและเคมี

- คุณสมบัติทางกายภาพ

การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ จะมีการประเมินในด้านของตะกอน สีสัน กลิ่น รสชาติของตำรับ ซึ่งจะมีการเปรียบเทียบกันในตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D ที่บันทึกผลโดยผู้วิจัยเอง ผลการทดลองพบว่าบีความแตกต่างกันไปในแต่ละตำรับ ดังตาราง 5

Mahasarakham University

ตาราง 5 แบบเก็บข้อมูลสำหรับเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพในแต่ละสูตรตำรับ

คุณสมบัติของตำรับ	ตำรับ A	ตำรับ B	ตำรับ C	ตำรับ D
ลักษณะตะกอน	ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่แตกกระจาย ไม่มีกลิ่น	ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่แตกกระจาย ไม่มีกลิ่น	ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่แตกกระจาย ไม่มีกลิ่น	ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่แตกกระจาย มีกลิ่นฉุนเล็กน้อย
สีของตำรับ	สีเหลืองเข้ม ใส ไม่ขุ่น	สีเหลืองเข้ม ใส ไม่ขุ่น	สีน้ำตาลเข้ม ใส ไม่ขุ่น	สีน้ำตาลเข้ม ใส ไม่ขุ่น
กลิ่นของตำรับ	กลิ่นหอมเย็น หวาน	กลิ่นหอมเย็น	กลิ่นหอม ไม่เย็น ฉุนเล็กน้อย	กลิ่นฉุนแรง ขม
รสชาติของตำรับ	หวาน หอมเย็น	หอม มีกลิ่นตัวยาสำคัญชัดเจน	หอม ไม่หวาน ขมเล็กน้อย มีกลิ่นตัวยาสำคัญเล็กน้อย	ไม่หวาน ขม มีกลิ่นตัวยาสำคัญชัดเจน

- คุณสมบัติทางเคมี

ในการวิจัยนี้ เราศึกษาคุณสมบัติทางเคมี โดยจะวัดค่าความเป็นกรดด่างของตำรับ ซึ่งผลการทดลองจะมีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละตำรับ ดังตาราง 6

ตาราง 6 ความเป็นกรดด่างในแต่ละสูตรตำรับ

คุณสมบัติของตำรับ	ตำรับ A	ตำรับ B	ตำรับ C	ตำรับ D
ความเป็นกรดด่าง	4.546±0.111	4.57±0.115	4.68±0.129	3.87±0.172

Mahasarakham University

จากผลการทดลอง (ตาราง 6) พบว่าค่า pH ของแต่ละตำรับมีค่าใกล้เคียงกัน คือ pH อยู่ในช่วง 3.8 - 4.7

- ค่า sedimentation volume ของตะกอน

ในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทดสอบการกระจายตัวของตะกอนของตำรับ โดยแต่ละตำรับมีค่า sedimentation volume (F) แตกต่างกัน ดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่า sedimentation volume (F) ในแต่ละสูตรตำรับ

คุณสมบัติของตำรับ	ตำรับ A	ตำรับ B	ตำรับ C	ตำรับ D
ปริมาตรของตะกอน (มิลลิลิตร)	0.47±0.155	0.39±0.067	0.29±0.068	1.2±0.200
ค่า sedimentation volume	0.02	0.02	0.02	0.05

จากผลการทดลอง (ตาราง 7) พบว่า ค่า Sedimentation volume ของแต่ละตำรับมีค่าใกล้เคียงกัน คือ ค่า Sedimentation volume อยู่ในช่วง 0.02 0.05

3.2 การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา

การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา จะใช้วิธี pour plate technique โดยจะมีการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด anaerobic bacteria ที่มีการเจริญเติบโตหลังจากที่มีการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด acrobic bacteria ที่ไม่เกิน 5x 10^3 CFU/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ส่วนในตำรับควบคุม A ตำรับควบคุม B ตำรับควบคุม C และตำรับควบคุม D มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ดังแสดงในตาราง 8

Mahasarakham University

ตาราง 8 ผลการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria

สูตรตำรับยาน้ำสมุนไพร	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย			รายงานผล (CFU/มิลลิลิตร)
	10^{-1}	10^{-4}	10^{-5}	
ตำรับ A1	0	0	0	$< 1x10^{3}$
ตำรับ A2	0	0	0	
ตำรับ A3	0	0	0	
ตำรับ B1	0	0	0	$< 1x10^{3}$
ตำรับ B2	0	0	0	
ตำรับ B3	0	0	0	
ตำรับ C1	0	0	0	$< 1x10^{1}$
ตำรับ C2	0	0	0	
ตำรับ C3	0	0	0	
ตำรับ D1	0	0	0	$< 1x10^{3}$
ตำรับ D2	0	0	0	
ตำรับ D3	0	0	0	
ตำรับควบคุม A1	>300	125	13	$1.30x10^{6}$
ตำรับควบคุม A2	>300	150	16	
ตำรับควบคุม A3	>300	115	9	
ตำรับควบคุม B1	>300	134	13	$1.49x10^{6}$
ตำรับควบคุม B2	>300	163	14	
ตำรับควบคุม B3	>300	149	16	
ตำรับควบคุม C1	>300	122	13	$1.08x10^{6}$
ตำรับควบคุม C2	>300	94	11	
ตำรับควบคุม C3	>300	109	12	
ตำรับควบคุม D1	>300	84	9	$7.57x10^{5}$
ตำรับควบคุม D2	>300	56	7	
ตำรับควบคุม D3	>300	87	8	

Mahasarakham University

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษาผู้วิจัยได้แบ่งหัวข้อย่อยดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายในแต่ละตำรับ โดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay ของสารสกัดตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย 4 ตำรับ ซึ่งทั้ง 2 วิธี ให้ผลการทดลองของฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่สอดคล้องกัน โดยความสามารถของฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพพบว่า ลักษณะของตะกอนมีความคล้ายคลึงกันทั้ง 4 ตำรับ โดยพบตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่ผลกกระจาย และเมื่อเขย่าด้วยแรงปานกลางพบว่ามีการกระจายตัวสม่ำเสมอและสามารถเทออกจากขวดได้ง่าย ในส่วนของสีสันในทุกตำรับจะมีสีใสไม่ขุ่น แต่จะมีความแตกต่างกันที่ตำรับ A และ B จะมีสีเหลืองเข้ม ส่วนตำรับ C และ D จะมีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนในด้านของกลิ่น ตำรับ A และตำรับ B จะมีกลิ่นหอมเย็น ตำรับ C จะมีกลิ่นหอมฉุนเล็กน้อย ส่วนตำรับ D จะมีกลิ่นฉุนแรง และในด้านของรสชาติ จะมีความแตกต่างกันในทุกตำรับ โดยตำรับ A มีรสชาติ หวาน หอมเย็น ตำรับ B มีรสชาติหอม มีกลิ่นตัวยาสำคัญที่ชัดเจน ตำรับ C มีรสชาติหอม ไม่หวาน ขมเล็กน้อย มีกลิ่นตัวยาสำคัญเล็กน้อย ตำรับ D มีรสชาติไม่หวาน ขม มีกลิ่นตัวยาสำคัญชัดเจน และจากการศึกษาเปรียบเทียบค่า sedimentation volume ของยาน้ำสมุนไพรแต่ละตำรับ พบว่ามีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละตำรับ โดยตำรับ D เป็นตำรับที่มีค่า sedimentation volume ที่ดีสุด ส่วนในตำรับ C พบว่ามีค่าน้อยที่สุด ในส่วนของการทดสอบด้านคุณสมบัติทางเคมีโดยวัดความเป็นกรดด่างพบว่าตำรับ A ตำรับ B และตำรับ C มีความเป็นกรดที่ใกล้เคียงกัน ส่วนตำรับ D จะมีความเป็นกรดมากที่สุด โดยที่ค่าความเป็นกรดด่าง จะอยู่ระหว่าง 3.8- 4.7

Mahasarakham University

การทดสอบทางจุลชีววิทยาโดยใช้วิธี pour plate technique พบว่าตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria ที่ไม่เกิน 5×10^5 CFU/กรัม ซึ่งถือว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร (นันทนา, 2547) ส่วนในตำรับควบคุม A ควบคุม B ควบคุม C และควบคุม D มีการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิด aerobic bacteria ที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์สมุนไพร

2. อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นด้วย DPPH assay โดยที่ DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่มีความเสถียร การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถการรีดิวซ์โดยใช้เครื่องวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชั่นลงไป แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Molyneux, 2004) ในการศึกษาได้ใช้ ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์โดยวัดได้ 5.34±0.01 มิลลิกรัม/ลิตร และในส่วนของการพิจารณาสารสกัดในแต่ละตำรับที่ได้ในตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นที่ไม่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นที่ดีกว่าสารสกัดตำรับควบคุม โดยแสดงค่าในค่าของ EC_{50} ซึ่งค่าที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับผลการทดลองศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นด้วย FRAP assay โดยวิธีนี้จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+}- TPTZ) เป็นสารในการทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชั่น ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+}-TPTZ) ซึ่งมีสีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสง แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (โอภา, 2549) ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มสารสกัดในตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D มีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นไม่แตกต่างกัน และมีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นที่ดีกว่าสารสกัดตำรับควบคุม ซึ่งแสดงในค่าของค่า FRAP value ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับทั้ง 2 วิธี เป็นไปในทางเดียวกัน ถึงแม้ว่าเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ ascorbic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นของตำรับจะอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ดีเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบอื่นๆ ในตำรับเช่น น้ำผึ้ง ซึ่งใส่ในตำรับในปริมาณที่มาก โดยสังเกตได้จากน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ ในตำรับแตกต่างจากน้ำหนักของสารสกัดในตำรับควบคุมเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบของสารสกัดของตำรับส่วนใหญ่จะเป็นสารแต่งกลิ่นและแต่งรสของตำรับ ฉะนั้นจึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นของตำรับลดน้อยลงเป็นอย่างมาก

ผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของยุทธนา และคณะ (2552) ซึ่งได้ทำการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากสมุนไพรแต่ละชนิด ประกอบไปด้วย ทิ้งถ่อน ตะไคนา แห้วหมู และข่อย พบว่าสารสกัดจากเปลือกทิ้งถ่อนมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

Mahasarakham University

ได้สูงที่สุด (EC_{50}=2.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดสมุนไพรอื่นๆ มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี โดยให้ค่า EC_{50} ช่วงระหว่าง 9.7- 49.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดจากเมล็ดข่อย (EC_{50}>120 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า หิ้งถ่อน ตะไคนา และแห้วหมูสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี อีกทั้งยังทีความสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของสิริเพ็ญ และสิริรัตน์ (2551) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะที่ประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ เปลือกหิ้งถ่อน เปลือกตะไคนา บอระเพ็ด แห้วหมู เมล็ดข่อยและผลพริกไทย โดยการสกัดด้วย 95% Ethanol ด้วยวิธี DPPH assay เปรียบเทียบกับ ascorbic และ vitamin E ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบจากค่า EC_{50} โดยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดจากเปลือกหิ้งถ่อนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นมากที่สุด รองลงมาคือ แห้วหมู พริกไทย เปลือกตะไคนา บอระเพ็ด เมล็ดข่อย โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 44.34 187.62 235.91 1111.39 1285.09 1324.25 8603.57 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับ ascorbic acid มีค่า EC_{50} 17.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ vitamin E มีค่า EC_{50} 22.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อีกทั้งการศึกษานี้ยังมีการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่า สารสกัดจากตำรับอายุวัฒนะ หิ้งถ่อนและแห้วหมูมีสารกลุ่ม phenolic compound, tannin และ flavonoid สารสกัดจากพริกไทย ตะไคนา และข่อย มีสารกลุ่ม phenolic compound และ flavonoid ส่วนสารสกัดจากบอระเพ็ดมีสารกลุ่ม phenolic compound ซึ่งทั้ง tannin และ flavonoid ก็เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม phenolic compound จึงสามารถอธิบายความสัมพันธ์ของสารสำคัญเหล่านี้มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นจากโครงสร้างทางเคมีได้ โดยสารประกอบฟีนอลที่อยู่ในกลุ่ม phenolic compound จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และไอออนของโลหะที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน และไมเลกุลหื่นๆ ด้วยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระอย่างรวดเร็ว เมื่อสารประกอบฟีนอลให้อะตอมไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระไปแล้ว อนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลจะค่อนข้างมีที่จะมีความเสถียร ดังนั้นจึงไม่เกิดปฏิกิริยาต่อไป (Bors *et al.*, 1990) จึงทำให้สารในกลุ่ม phenolic compound มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ซึ่งสัมพันธ์กับการศึกษาของ Tunsaringkarn *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยการเหนี่ยวนำ Heinz body โดยใช้ *in vitro* model มีการเปรียบเทียบสารสกัดจากพืชเทียบกับความเข้มข้นของแทนนิน ในพืชวงศ์ Mimosaceae 21 ชนิด โดยสกัดด้วยเอทานอล พบว่าพืชที่มี tannin มากที่สุดซึ่งจะมีความสัมพันธ์กันกับการยับยั้ง Heinz body และยังพบว่าแทนนินสามารถพบได้ในสารสกัดจากพืชทั้งหมด 21 ชนิดรวมทั้ง *Albizia procera* (Roxb.) Benth อีกด้วย รวมถึงการศึกษาของ Kumar และ Khanum (2012) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัด *Cyperus rotundus* (CRE) โดยการเหนี่ยวนำ H_2O_2เป็นตัวชักนำให้เกิดพิษ ซึ่งศึกษาโดยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) และ LDH assay (lactate dehydrogenase assay) พบว่า CRE มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชั่นโดยการควบคุมระดับเอนไซม์ ผลการทดลองพบการซ่อมแซมความเสียหายของ cellular nuclear และ mitochondrial ที่ถูกชักนำโดย H_2O_2 รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ brain derived nerve growth factor (BDNF) ซึ่งประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชั่นและการต้านการตายของเซลล์

Mahasarakham University

ของสารสกัดจากพืชนี้จะขึ้นกับความเข้มข้นของ phenolics flavonoid เป็นหลัก ซึ่งจากการศึกษาเหล่านี้สนับสนุนฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นของตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอื่นๆ ที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการบำรุงร่างกายคือ แห้วหมู มีฤทธิ์ต้านการแพ้โดยการยับยั้งการผลิต leukotriene และการหลั่ง beta-hexosaminidase (Jin *et al.*, 2011) ฤทธิ์ต้านกระบวนการอักเสบโดยการเหนี่ยวนำของ HO-1 และยับยั้งการเหนี่ยวนำของ nitric oxide synthase (iNOS)/NO (Tsoyi *et al.*, 2011) และใช้วิธี carrageenan ชักนำการอักเสบของอุ้งเท้าหนู (Dang *et al.*, 2011) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (Kilani *et al.*, 2008) ซึ่งศึกษาด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) และ LDH assay (lactate dehydrogenase assay) (Kumar and Khanum, 2012) ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Kilani *et al.*, 2008) ช่วยมีฤทธิ์ในการรักษาอาการท้องเสีย และต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Rastogi *et al.*, 2006) ฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธี carrageenan ชักนำการบวมของอุ้งเท้าหนู (Sripanidkulchaia *et al.*, 2009) การรักษาเบาหวานและฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยวิธีชักนำให้หนูเป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin เข้าช่องท้อง (Kumar *et al.*, 2011) พริกไทยมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้ง lipopolysaccharide (LPS) (Bae *et al.*, 2010) และการยับยั้ง PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Kim *et al.*, 2012) ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง (Hwang *et al.*, 2011) และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน(Pathak and Khandelwal, 2009) (Sunila and Kuttan, 2004) (Bae *et al.*, 2012) ทิ้งถ่อนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยการเหนี่ยวนำ Heinz body (Tunsaringkarn *et al.*, 2012) และวิธี DPPH assay (Ramli *et al.*, 2008) บอระเพ็ดมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด โดยการศึกษาผลการดูดซึมของกลูโคสที่ลำไส้และเซลล์ไขมัน (Noor and Ashcroft, 1998) ฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต (Praman *et al.*, 2011) ตะไคนามีฤทธิ์ฟื้นฟูและบำรุงระบบประสาท (neurotonic) โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholinesterase (AChE) (Ingkaninan *et al.*, 2003) ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์ของสมุนไพรซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในตำรับในการบำรุงร่างกาย จึงเป็นข้อมูลสำคัญในการสนับสนุนประสิทธิภาพของยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายได้เป็นอย่างดี

การทดสอบคุณลบบัติทางกายภาพ พบว่าลักษณะของตะกอนมีความคล้ายคลึงกันทั้ง 4 ตำรับ โดยทบตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะจับกันเป็นแพ ไม่แตกกระจายเมื่อตั้งทิ้งไว้ และเมื่อเขย่าด้วยแรงปานกลางพบว่ามีการกระจายตัวสม่ำเสมอ และสามารถเทออกจากขวดได้ง่าย ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของตำรับในด้านความคงตัวของเภสัชภัณฑ์ (นัยนา, 2551) และจากการศึกษาเปรียบเทียบค่า sedimentation volume (F) ของยาน้ำสมุนไพรแต่ละตำรับ พบว่า มีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละตำรับ โดยตำรับ D เป็นตำรับที่มีค่า F ที่ดีสุด ซึ่งแสดงถึงในตำรับนั้นมีการกระจายตัวของตะกอนในน้ำกระสายยาอย่างสม่ำเสมอ ในส่วนของตำรับ C พบว่ามีค่าน้อยที่สุด ซึ่งค่า F ที่เหมาะสมที่สุดควรจะมีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งแสดงถึง การไม่มีการนอนก้นของตะกอนในเวลาที่กำหนด โดยค่ายิ่งน้อยยิ่งแสดงถึงความคงตัวทางกายภาพที่ลดลง (ทิวา, 2550) ซึ่งอาจเกิดได้จากการที่ตำรับ C นั้น ตัวยาสำคัญในตำรับสามารถละลายได้ดีมาก

Mahasarakham University

ในน้ำกระสายยา จนเหลือตะกอนในตำรับน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่น ดังที่กล่าวมาข้างต้น และนอกจากนี้ลักษณะตะกอนของแต่ละตำรับมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการตกตะกอนของส่วนประกอบในตำรับที่ไม่ได้แตกต่างกันมาก จึงทำให้ลักษณะของตะกอนไม่ได้แตกต่างกันมาก ในส่วนของสีสันในทุกตำรับจะมีสีใสไม่ขุ่น มีสีที่อ่อนและเข้มแตกต่างกันไปตามสารแต่งรสชาติของตำรับ แต่เป็นสีที่น่ารับประทานเช่นเดียวกัน ส่วนในด้านของกลิ่น ตำรับ A และตำรับ B จะมีกลิ่นหอมเย็น ตำรับ C จะมีกลิ่นหอม ฉุนเล็กน้อย มีกลิ่นของตัวยาสำคัญ แต่ตำรับ D จะมีกลิ่นฉุนแรง โดยเกิดจากการที่ตำรับนี้มีความเป็นกรดมากกว่าตำรับอื่น สาเหตุอาจเกิดจาก สูตรตำรับมีส่วนประกอบของมะคูมปริมาณมาก ซึ่งมะคูมนั้นมีสาร hexadecanoic acid ที่มีฤทธิ์เป็นกรดประกอบอยู่ด้วย จึงทำให้ตำรับมีค่า pH ที่ลดลงมาก และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีของส่วนประกอบในตำรับ ทำให้กลิ่นและรสชาติของตำรับเปลี่ยนแปลงไปได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบความคงตัวทางเคมี ที่พบว่า ตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C มีค่าความเป็นกรดต่างใกล้เคียงกันที่ pH เท่ากับ 4.5 – 4.6 ส่วนตำรับ D มีค่าความเป็นกรดต่างที่มากที่สุด คือ pH เท่ากับ 3.87 ตำรับ D จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย และในด้านของรสชาติ จะมีความแตกต่างกันในทุกตำรับ โดยตำรับ A มีรสชาติ หวาน หอมเย็น ตำรับ B มีรสชาติหอม ได้กลิ่นตัวยาสำคัญที่ชัดเจน ตำรับ C มีรสชาติหอม ไม่หวาน ขมเล็กน้อย มีกลิ่นตัวยาสำคัญเล็กน้อย แต่ตำรับ D มีรสชาติไม่หวาน ขมมาก มีกลิ่นตัวยาสำคัญชัดเจน ซึ่งจากรสชาติที่ขมมากและมีกลิ่นฉุนแรงทำให้ไม่มีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกาย

การควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา สำหรับการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ยาเตรียมสมุนไพร ที่ต aerobic bacteria จะต้องมีไม่เกิน 5×10^5 CFU/มิลลิลิตร (นันทนา, 2547) ซึ่งผลการทดสอบทางจุลชีววิทยาพบว่า ตำรับยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายผ่านมาตรฐานทั้ง 4 ตำรับ และในส่วนของตำรับควบคุมไม่ผ่านมาตรฐานทั้ง 4 ตำรับ แสดงให้เห็นว่าตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D มีการปนเปื้อนทางจุลชีววิทยา ที่ผ่านมาตรฐานเช่นเดียวกัน เนื่องมาจากตำรับ A ตำรับ B ตำรับ C และตำรับ D ได้มีการเติมสารกันเสียลงในตำรับ ซึ่งในส่วนของตำรับควบคุมจะไม่มีการเติมสารกันเสียใดๆ โดยที่สารกันเสียที่เติมลงไปคือ concentrate paraben (methylparaben + propylparaben) แสดงให้เห็นว่าสารกันเสียสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้เป็นอย่างดี

จากการทดสอบฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ ซึ่งประกอบไปด้วยฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นโดย DPPH assay และ FRAP assay และการประกันคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพร โดยประเมินคุณภาพรูปแบบยาน้ำ และทดสอบการปนเปื้อนทางจุลชีววิทยา ซึ่งประกอบไปด้วยยาน้ำสมุนไพรบำรุงร่างกายทั้งหมด 4 ตำรับ เพื่อที่จะคัดเลือกตำรับที่มีประสิทธิภาพ และมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด ซึ่งในด้านของฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ทดสอบโดย DPPH assay และ FRAP assay จะเห็นได้ว่าใน 2 อันดับแรกของตำรับที่มีฤทธิ์ต้านออกซิออกซิเดชั่นที่สูงสุดคือ ตำรับ D ตามด้วยตำรับ C และ ตำรับ C ตามด้วยตำรับ A ตามลำดับ

Mahasarakham University

จะเห็นได้ว่าทั้ง 2 วิธีในการทดสอบพบว่า ตำรับ C จะอยู่ใน 2 อันดับแรกในทั้ง 2 วิธี และมีฤทธิ์ต้านออกซิออกซิเดชั่นที่ดีที่สุดเมื่อทดสอบโดย FRAP assay จึงสามารถสรุปได้ว่า ในส่วนของการทดสอบทางด้านชีวภาพ ตำรับที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือตำรับ C และจากการทดสอบด้านการประกันคุณภาพตำรับยาน้ำสมุนไพร โดยทดสอบสอบทั้งความคงตัวด้านกายภาพ เคมี และการปนเปื้อนทางจุลชีวิทยา ซึ่งประเมินผลโดยผู้วิจัยเอง พบว่า ตะกอน สี กลิ่น รสชาติ และความเป็นกรดด่างของแต่ละตำรับจะมีความแตกต่างกันไป แต่ในด้านของมาตรฐานการปนเปื้อนทางจุลชีววิทยาทุกตำรับผ่านมาตรฐานเช่นเดียวกัน โดยผู้วิจัยเห็นว่าตำรับที่มีความเหมาะสมที่สุด คือ ตำรับ C เนื่องจากตำรับนี้นอกจากจะมีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชั่นที่ดีที่สุดแล้ว ประกอบกับเมื่อทดสอบทางกายภาพยังมีกลิ่นที่หอมหวานของมะตูม โดยรสชาติไม่หวานจนเกินไป ได้กลิ่นของตัวยาสำคัญเล็กน้อย ไม่ฉุนและขมจนเกินไป คล้ายกับกลิ่นยาหอม สามารถรับประทานได้ง่าย และที่สีสันที่เหมาะสม โดยมีสีไม่อ่อนหรือเข้มจนเกินไป นอกจากนี้การทดลองด้านเคมี ยังพบว่าความเป็นกรดด่างเปรียบเทียบระหว่าง 4 ตำรับ ตำรับ C มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือไม่สูงหรือต่ำจนเกินไป ด้วยเหตุผลดังกล่าวมานี้ ตำรับ C จึงเป็นตำรับที่มีความเหมาะสมมากที่สุดที่จะนำไปพัฒนาต่อไปในอนาคต

3. ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

3.1 ข้อจำกัดจากการศึกษา

3.1.1 ในการควบคุมคุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา ยังมีเกณฑ์มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ยาเตรียมสมุนไพรอื่นๆ ที่ยังไม่ได้ทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเฉพาะ aerobic bacteria เนื่องจากจะมักพบการปนเปื้อนได้ง่ายในตำรับที่เป็นยาน้ำ และสามารถทดสอบได้ง่ายและสะดวก ซึ่งการทดสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จึงควรที่จะมีการทดสอบต่อไป เช่น เชื้อรา, *Escherichia coli* เป็นต้น

3.1.2 เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีระยะเวลาในการศึกษาที่ค่อยข้างจำกัด จึงใช้เวลาในระยะสั้นคือ 90 วันหลังตั้งตำรับ เพื่อทดสอบทางด้านกายภาพ เคมี และด้านจุลชีววิทยาของตำรับ หากมีระยะเวลาที่ไม่จำกัด ควรที่จะใช้ระยะเวลา 2-3 ปี เพื่อให้เพียงพอและเหมาะสมต่อการศึกษาทางด้านความคงตัวของตำรับต่อไป

3.1.3 เนื่องจากบอระเพ็ดซึ่งเป็นตัวยาสำคัญในตำรับมีรสชาติที่ขมมาก ในการลดปริมาณเพื่อให้รสชาติขมลดลงอาจทำให้ฤทธิ์ของตัวยาสำคัญชนิดนั้นลดลงไปด้วย ในการศึกษาต่อไปครั้งต่อไปอาจใช้การกลบรสชาติด้วยวิธีอื่นเพื่อที่ปริมาณของตัวยาสำคัญในตำรับจะได้ไม่ลดน้อยลง

Mahasarakham University

3.2 ข้อเสนอแนะ

3.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นในปัจจุบันมีหลายวิธีโดยแต่ละวิธีจะมีกลไกที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการเพิ่มวิธีการในการศึกษา เพื่อเพิ่มความชัดเจนในการศึกษาที่มากยิ่งขึ้น

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดยวิธี DPPH assay และ FRAP assay เป็นการศึกษาเพื่อดูแนวโน้มการต้านออกซิเดชั่นในหลอดทดลอง หากอธิบายในระบบร่างกายมนุษย์อาจจำเป็นต้องใช้การทดลองที่ใกล้เคียงกับมนุษย์มากขึ้น

3.2.3 ควรมีการศึกษาฤทธิ์อื่นๆ นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น เช่น การกระตุ้นระบบภูมิคุ้นกันของร่างกาย ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์อื่นๆของตำรับ ที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการบำรุงร่างกายของตำรับ เพื่อที่จะพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และสามารถพัฒนาไปสู่เชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

Mahasarakham University

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กฎกระทรวง ฉบับที่ 25 (พ.ศ. 2537). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 51 ก (ลงวันที่ 16 พฤศจิกายน 2537)

ครุฌ เพ็ชรพลาย, จารีย์ บันสิทธิ์, ณฉัตร จันทร์สุวานิชย์, ประดม ทองศรีรักษ์, ชาตรี ชาญ ประเสริฐ. สมุนไพรพื้นฐานฉบับรวม. กรุงเทพฯ: รุ่งเรืองการพิมพ์; 2541.

เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ประชาชน; 2544.

ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์. กระบวนการเตรียมยาสมุนไพร. ใน: สถาบันวิจัยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การควบคุมคุณภาพสมุนไพร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2536. น.59-92.

ทิวา ตั้งสุขสันต์. การพัฒนาตำรับยาน้ำแขวนตะกอนไรเฟมปินสำหรับผู้ป่วยเด็กเฉพาะราย โรงพยาบาลมหาสารคาม [วิทยานิพนธ์]. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2550.

ธนสร ตันศฤงฆาร, สุพรรณ สุขอรุณ, แจ่มใส สุวรรณศักดิ์ศรี, อนุสรณ์ รังสิโยธิน. ฤทธิ์ต้านการเหนี่ยวนำการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงและการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวของสารสกัดสมุนไพรไทย [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2552.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. คุณภาพเครื่องยาจากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2551.

นันทนา สิทธิชัย. นาครฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย. สมุนไพร 2547 ;11(1):29-31.

นันทวัน บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ: ประชาชน; 2542.

นัยนา สันติยานนท์. ความคงตัวของเภสัชภัณฑ์และการเก็บรักษา. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2551;3(1):180-7.

นิจศิริ เรืองรังสี, อวัชชัย บังคสะคุปต์. สมุนไพรไทย (Thai herbs). กรุงเทพฯ: บิสซิเนสอิมเมจ; 2547.

พวงรัตน์ ภักดีโชติ, ยุพา คู่คงวิริยพันธุ์, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. การตรวจกรองฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในต้นคำฝอยและบัวบก. Srinagarind Med J 2546;18(2):7-14.

ภูมิพิชญ์ สุชาวรรณ. พืชสมุนไพรใช้เป็นยา. กรุงเทพฯ: อักษราพิพัฒน์; 2536.

Mahasarakham University

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ และ ศูนย์สมุนไพรทักษิณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2551.

มูลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล. สารานุกรมสมุนไพร เล่มที่ 4 กลยาอิสาน. กรุงเทพฯ: อมรินทร์; 2542.

ยุทธนา ทงพิพิริยะเดชะ, พัชรินทร์ นวสศรีทอง, มลฤมล ศิรินทราเวช. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แซนธีนออกซิเดสจากสมุนไพรไทยกลุ่มบำรุงกำลังและอายุวัฒนะ. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: 17-20 มี.ค. 2552: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2552. หน้า 94-102

รัตนา อินทรานุปกรณ์. การตรวจสอบและการสกัดแยก สารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2547.

ศิริเพ็ญ เลื่อมเชย, ศิริรัตน์ เลียงกูล. การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของตำรับสมุนไพรอายุวัฒนะของไทย [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2551.

สุรพงศ์ รัตนะ. องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของไบย่านาง [วิทยานิพนธ์]. มหาสารคาม: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2555.

สิวาพร ศิวเวชช. วัตถุเจือปนอาหาร เล่ม 1. กรุงเทพฯ: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ; 2546.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. การสกัดสารจากสมุนไพร. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข; 2546.

สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน. สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน สำหรับบุคคลากรสาธารณสุข. กรุงเทพฯ: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2533.

สุพัตรา ปรศุพัฒนา, วงส์วิวัฒน์ ทัศนียกุล. เอกสารประชุมวิชาการ เรื่อง "คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่นของพืชและน้ำหมักชีวภาพ". ขอนแก่น: ภาควิชาพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2547.

หนึ่งฤทัย คำเงิน. การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของคายขัด [วิทยานิพนธ์]. มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม; 2554.

โอภา วัชระคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ(Radical Scavenging Agent). นนทบุรี: พี.เอส.พริ้นท์; 2549.

Amom Z, Bahari H, Isemaail S, Ismail NA, Shah ZM, Arsyad MS. Nutritional composition, antioxidant ability and flavonoid content of *Tinospora crispa* stem. Adv. in Nat. Appl. Sci 2009;3(1):88-94.

Mahasarakham University

Bae GS, Kim MS, Jung WS, Seo SW, Yun SW, Kim SG, *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. Eur J Pharmacol 2010;642:154-62.

Bae GS, Kim JJ, Park KC, Koo BS, Jo IJ, Choi SB, *et al.* Piperine inhibits lipopolysaccharide-induced maturation of bone-marrow-derived dendritic cells through Inhibition of ERK and JNK Activation. Phytother Res 2012;26(12):1893-7.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Methods in enzymology. New York: Academic; 1990.

Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W, Potterat O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. Planta Med 1998;64(5):393-6.

Dang GK, Parekar RR, Kamal SK, Scindia AM, Rege NN. Antiinflammatory activity of *Phyllanthus emblica*, *Plumbago zeylanica* and *Cyperus rotundus* in acute models of inflammation. Phytother Res 2011;25:904–8.

Department of medical science, Ministry of public health. Thai herbal pharmacopoeia Vol II. Bangkok: Prachachoen; 2000.

Hwang YP, Yun HJ, Kim HG, Han EH, Choi JH, Chung YC, *et al.* Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKCalpha/ERK1/2-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. Toxicol Lett 2011;203(1):9-19.

Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J Ethnopharmacol 2003;89(1):261 - 4.

Jaziri SK, Neffati A, Limem I, Boubaker J, Skandrani I, Sghair MB, *et al.* Relationship correlation of antioxidant and antiproliferative capacity of *Cyperus rotundus* product towards K562 erythroleukemia cell. Chem Biol Interact 2009;181:85–94.

Jin JH, Lee DU, Kim YS, Kim HP. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. Arch Pharm Res 2011;34(2):223-8.

Kilani S, Sghaier MB, Limem I, Bouhlt I, Boubaker J, Bhouri W, *et al. In vitro* evaluation of antibacterial antioxidant cytotoxic and apoptotic activity of the tubers infusion and extracts of *Cyperus rotundus*. Bioresource Technology 2008;99:9004–8.

Mahasarakham University

Kim HG, Han EH, Jang WS, Khanal T, Park BH, Tran TP, *et al*. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF-jB C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. Food Chem Toxicol 2012;50:2342-8.

Kumar RBS, Kar B, Dolai N, Bala A, Haldar PK. Evaluation of antihyperglycemic and antioxidant properties of *Streblus asper* Lour against streptozotocin-induced diabetes in rats. Asian Pac Trop Dis 2012;2:139-43.

Kumar KH, Khanum F. Hydroalcoholic extract of *Cyperus rotundus* ameliorates H_2O_2-induced human neuronal cell damage via its anti-oxidative and anti-apoptotic machinery. Cell Mol Neurobiol 2012;33(1):5-17.

Mathew S, Kuttanu G. Immunomodulatory and antitumour activities of *Tinospora cordifolia*. Filoterapia 1999;70:35-43.

Maturin LJ, Peeler JT. Aerobic plate count. In: Maturin LJ, Peeler JT, editors. Food and drug administration bacteriological analytical manual. 8th ed. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2001.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004;26(2):211-219

Noor H, Ashcroft SJ. Pharmacological characterisation of the antihyperglycaemic properties of *Tinospora crispa* extract. J Ethnopharmacol 1998;62(1):7-13.

Pathak N, Khandelwal S. Immunodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. Environ Toxicol Pharmacol 2009;28:52–60.

Praman S, Mulvany MJ, Allenbach Y, Marston A, Hostettmann K, Sirirugsa P, *et al*. Effects of an n-butanol extract from the stem of *Tinospora crispa* on blood pressure and heart rate in anesthetized rats. J Ethnopharmacol 2010;133(2):675-86.

Ramli S, Bunrathep S, Tansaringkarn T, Ruangrungsi N. Screening for free radical scavenging activity from ethanolic extract of mimosaceous plants endemic to Thailand. J Health Res 2008 :22(2):55-9.

Rastogi S, Kulshreshtha DK, Rawat KS. *Sterblus asper* Lour.(Shakhotaka): A review of its chemical pharmacological and ethnomedicine properties. evid Based Complement Alternat Med 2006;3(2):217–22.

Sripanidkulchaia B, Junlatata J, Wara-aswapatia N, Horndee D. Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. J Ethnopharmacol 2009;124(3):566-70.

Sunila ES, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. J Ethnopharmacol 2004;90:339–46.

Tsoyi K, Jang HJ, Lee YS, Kim YM, Kim HJ, Seo HG, et al. (+)-Nootkatone and (+)-valencene from rhizomes of *Cyperus rotundus* increase survival rates in septic mice due to heme oxygenase-1 induction. J Ethnopharmacol 2011;137(3):1311-7.

Tunsaringkarn T, Soogarun S, Rungsiyothin A, Palasuwan A. Inhibitory activity of heinz body induction *in vitro* antioxidant model and tannin concentration of Thai mimosaceous plant extracts. J Med Plants Res 2012;6(24):4096-101.

Wade A, Weller PJ. Handbook of pharmaceutical excipients. 2nd ed. London: Pharmaceutical Press; 1994.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. Food Sci Nutr 2004;44(4):275-95.

Mahasarakham University

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดย DPPH assay

การเตรียม 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยการชั่ง DPPH 0.012 กรัม นำมาละลายใน methanol 200 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ในภาชนะทึบแสง

2. การเตรียมสารในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นโดย FRAP assay

การเตรียม FRAP reagent ประกอบด้วย acetate buffer TPTZ และ $FeCl_3$ ด้วยอัตราส่วน 10: 1:1 ตามลำดับ

2.1 การเตรียม acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6

ชั่ง sodium acetate ($3H_2O$) 310 มิลลิกรัม จากนั้นควง glacial acetic acid 16 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย distilled water จนได้ 100 มิลลิลิตร (ปรับ pH จนได้ 3.6)

2.2 การเตรียม HCl 40 มิลลิโมลาร์

ควง HCl 0.412 มิลลิลิตร จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย Distilled water จนได้ 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียม TPTZ 10 มิลลิโมลาร์

ชั่ง TPTZ 31.24 มิลลิกรัม ละลายใน 10 มิลลิลิตรของ HCl 40 มิลลิโมลาร์

2.4 การเตรียม $FeCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์

ชั่ง $FeCl_3$ 54.06 มิลลิกรัม จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วย distilled water จนได้ 10 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารในการควบคุมคุณภาพด้านจุลชีววิทยา

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่ง soybean casein digest agar (tryptone soya agar) 40 กรัม

2. ละลายใน purified water 1,000 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด

3. นำไป sterilize ด้วยการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121° C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

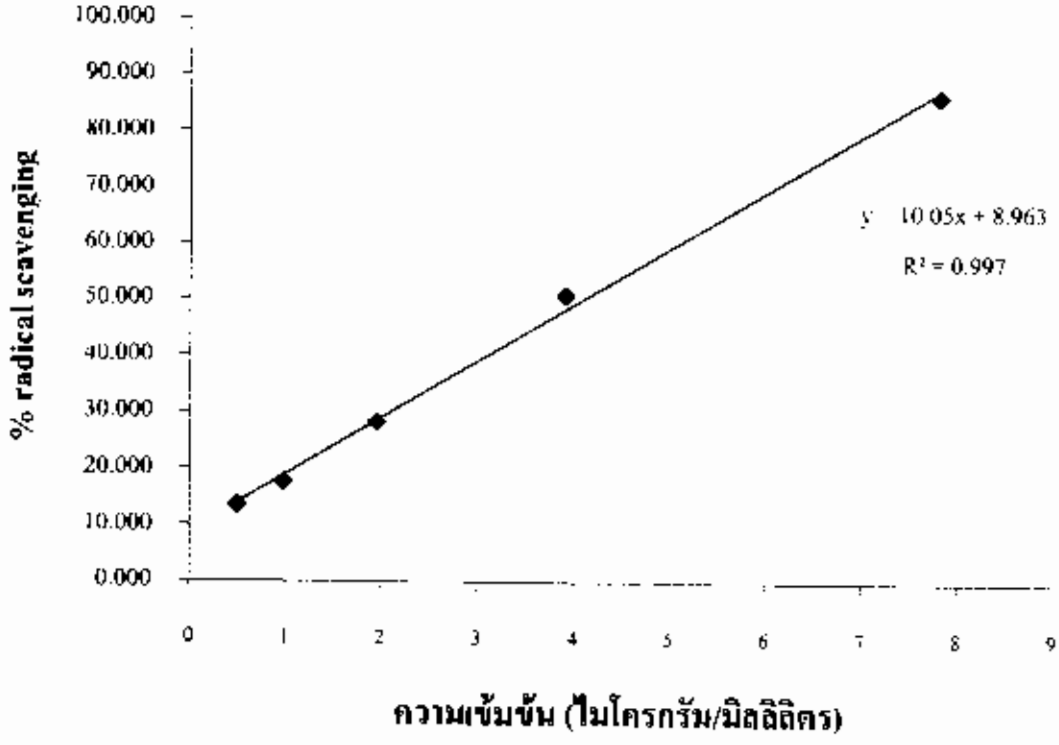
ส่วนประกอบ soybean casein digest agar ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร

pancreatic	15 กรัม
papaic digest of soybean	5 กรัม

Mahasarakham University

meal	5 กรัม
sodium chloride	5 กรัม
agar	15 กรัม

4. กราฟมาตรฐาน DPPH assay



ภาพประกอบ ก กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid โดยวิธี DPPH assay

กระบวนการวิเคราะห์ข้อมูล

1. หลังจากวัดค่า absorbance ของ sample และ control จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ radical scavenging ตามสูตร % radical scavenging = $(A_{control} - A_{sample}) \times 100 / A_{control}$

2. จากนั้นพล็อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ radical scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัดในตำรับ แล้วหาค่า EC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำลาย DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง ดังตัวอย่างกราฟเป็นของ ascorbic acid

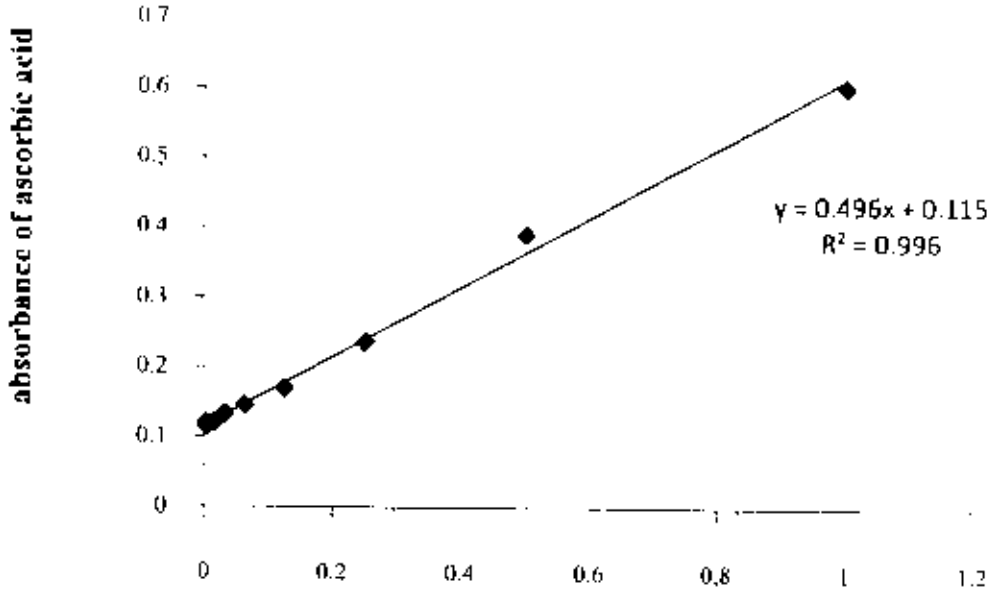
3. เมื่อได้ค่า EC_{50} ที่ได้จากการทดลอง 5 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์และทดสอบทางสถิติเพื่อดูการกระจายของข้อมูลคือ Run test, Homogeneity of variance พบว่าในการศึกษาครั้งนี้ข้อมูลที่ได้มีค่าการกระจายแบบปกติ จึงใช้สถิติทดสอบสมมติฐานในการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA)

4. กราฟมาตรฐาน FRAP assay

ตาราง 9 ค่า absorbance และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ascorbic acid

ลำดับหลอด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	absorbance ของ ascorbic acid
1	1	0.6014
2	0.5	0.39
3	0.25	0.2358
4	0.125	0.1696
5	0.0625	0.1454
6	0.03125	0.1332
7	0.015625	0.1216
8	0.007813	0.1184
9	0.003906	0.1154
10	0.001953	0.1192
11	0.000977	0.1166

Mahasarakham University



ภาพประกอบ ข กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง absorbance และความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารมาตรฐาน ascorbic acid

ประวัติย่อของนักวิจัย

ประวัติย่อของนักวิจัย

ชื่อ	นางสาวกรกนก โอภาสตระกูล
วันเกิด	วันที่ 14 สิงหาคม 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดมหาสารคาม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 1 ซอย 42 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000
สถานที่ศึกษาปัจจุบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2544	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนพระกุมารมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2557	ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประวัติย่อของนักวิจัย

ชื่อ	นายชวิกานต์ ทับบุญ
วันเกิด	วันที่ 4 สิงหาคม 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 47 หมู่ 6 ตำบลนาเพียง อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดมหาสารคาม 44140
สถานที่ศึกษาปัจจุบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านหนองโก จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนโกสุมวิทยาสรรค์ จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสารคามพิทยาคม จังหวัดมหาสารคาม
พ.ศ. 2557	ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประวัติย่อของนักวิจัย

ชื่อ	นางสาวพรรณวดี อุปนันท์
วันเกิด	วันที่ 5 ตุลาคม 2532
สถานที่เกิด	จังหวัดขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 33 หมู่ 1 ตำบลดอนเงิน อำเภอเชียงยืน จังหวัดมหาสารคาม 44160
สถานที่ศึกษาปัจจุบัน	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	ประถมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนมหาไถ่ศึกษาขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนกัลยาณวัตร จังหวัดขอนแก่น
พ.ศ. 2557	ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Mahasarakham University