การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

โครงการวิจัย

ของ

สุทธิศักดิ์ ทีทา

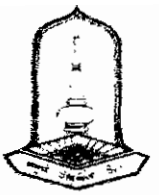
สันติภาพ พงษ์อานาม

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม



คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย ได้พิจารณาโครงการวิจัยของนายสุทธิศักดิ์ ทีทา และนายสันติภาพ พงษ์อานาม แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิตของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

..... ประธานกรรมการ
(ผศ.ดร.เมธิน ผดุงกิจ)

..... กรรมการ
(ผศ.ดร.วนิดา ไทรชมภู)

..... กรรมการ
(ผศ.ดร.ประสบอร รินทอง)

คณะเภสัชศาสตร์อนุมัติให้รับโครงการวิจัยฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิตของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ผศ.ดร.ชนัตถา พลอยเลื่อมแสง)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
วันที่..... เดือน..... พ.ศ. .....

โครงการวิจัยฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ คณะเภสัชศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 รอบ 2 ประเภท ทุนวิจัยสำหรับนิสิตเภสัชศาสตร์ ระดับปริญญาตรี

Mahasarakham University

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา ไทรชมภู ประธานกรรมการควบคุมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสบอร รินทอง กรรมการควบคุมโครงการวิจัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมธิน ผดุงกิจ ประธานกรรมการสอบ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อย่างดียิ่ง ตั้งแต่ต้นจนสำเร็จ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ นายกิตติศักดิ์ เกิดชาญ นางสาวภัชสุภัค มาตะรักษ์ นางสาวนิชานันท์ สาระราช และนางสาวไพฑูรย์ มูลทา นักวิทยาศาสตร์คณะเภสัชศาสตร์ ที่ช่วยสนับสนุน อำนวยความสะดวกในการจัดเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา คณาจารย์ และเพื่อนทุกคน สำหรับการช่วยเหลือสนับสนุนด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงการวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบิดา มารดา ผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ตลอดจนบูรพาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่คณะผู้วิจัยถึงปัจจุบัน

นายสุทธิศักดิ์ ทีทา

นายสันติภาพ พงษ์อานาม

ชื่อเรื่อง การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ
ผู้วิจัย นายสุทธิศักดิ์ ทีทา
นายสันติภาพ พงษ์อานาม
กรรมการควบคุม ผศ.ดร.วนิดา ไทรชมภู
ผศ.ดร.ประสบอร รินทอง
ปริญญา ภ.บ. (การบริบาลทางเภสัชกรรม)
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2561

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ ตามข้อกำหนดการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของ Thai Herbal Pharmacopoeia และหาปริมาณสาร phyllanthin โดยใช้เทคนิค TLC densitometry โดยการเก็บตัวอย่างต้นแท้ (authentic samples) จำนวน 3 แหล่ง และตัวอย่างสมุนไพรแห้งจากร้านขายยาสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อลูกใต้ใบจำนวน 5 แหล่ง ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์พบว่า ตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบมีที่แตกต่างกัน โดยสามารถแยกได้จากลำต้นของลูกใต้ใบจะมีลักษณะกลม ผลมีผิวผลกลมเกลี้ยง หญ้าใต้ใบจะมีลำต้นเหลี่ยม ผลมีผิวขรุขระและขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าลูกใต้ใบ ลักษณะทางจุลภาคของผงยาจากต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบพบเนื้อเยื่อที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ พบ paracytic stomata, xylem vessel และ trichomes ข้อกำหนดทางเคมีกายภาพที่ได้ของสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบทั้ง 5 แหล่งพบว่า ปริมาณสิ่งปนปลอม ไม่เกินร้อยละ 1 ปริมาณความชื้น ไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก ปริมาณเถ้ารวม ไม่เกินร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่เกินร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 16 โดยน้ำหนัก และปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก ผลการศึกษารูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ ด้วยระบบ toluene : ethyl acetate (85:15) และใช้น้ำยาพ่น anisaldehyde-sulfuric acid พบว่า ลูกใต้ใบพบองค์ประกอบทางเคมี จำนวน 5 จุด ที่ค่า hRf 3-5 (เทาอ่อน), 11-13 (น้ำเงินอ่อน), 23-27 (ดำอ่อน), 31-33 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งพบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 (แถบสีน้ำเงินอ่อน) หญ้าใต้ใบพบองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 3 จุด ที่ค่า hRf 23-25 (เทาอ่อน), 30-32 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งไม่พบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 แต่เนื่องจากผลการศึกษารูปแบบ TLC fingerprints ของต้นแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามเพียงแหล่งเดียว จึงอาจจะยังสรุปไม่ได้ว่าหญ้าใต้ใบไม่พบสาร phyllanthin ผลการหาป[illegible]สาร phyllanthin พบว่า ปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบ จาก

แหล่งร้อยเอ็ดมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.167 มก. หญ้าใต้ใบจากแหล่งมหาสารคาม มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.047 มก. ส่วนปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบพบว่า (S4) จากจังหวัดขอนแก่นมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.276 มก. และมีปริมาณสารน้อยสุดจากจังหวัดนครราชสีมา (S3) เท่ากับ 0.063 มก. และเมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ phyllanthin พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบของต้นแท้พบว่า ปริมาณสารสำคัญ phyllanthin เฉลี่ยของลูกใต้ใบมากกว่าหญ้าใต้ใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนปริมาณสาร phyllanthin จากตัวอย่างสมุนไพรแห้งนั้นพบว่า เราไม่สามารถแยกชนิดของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้ เนื่องจากแหล่งที่มีจำหน่ายสมุนไพรแห้งในท้องตลาดยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นชื่อลูกใต้ใบหรือหญ้าใต้ใบ โดยแต่ละแหล่งจะระบุภายใต้ชื่อว่า สมุนไพรใต้ใบ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งดังกล่าวก็มีปริมาณใกล้เคียงกับต้นแท้

คำสำคัญ: ลูกใต้ใบ, หญ้าใต้ใบ, สมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ, ปริมาณสาร phyllanthin

TITLE	The standardization of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria*
AUTHOR	Mr. Suttisak Theetha
	Mr. Santiphab Ponganam
ADVISORS	Asst. Prof. Wanida Caichompoo, Ph.D.
	Asst. Prof. Prasoborn Rinthong, Ph.D.
DEGREE	Pharm.D.
UNIVERSITY	Mahasarakham University **DATE** 2018

ABSTRACT

This aims of this study were to standardized the herbal plants following the Thai Herbal Pharmacopoeia and which were determined the amount of phyllanthin contents in *Phyllanthus amarus* and *P. urinaria* by using TLC densitometry. The authentic samples of *P. amarus* and *P. urinaria* from 3 different regions and the dried herbal samples under the name of "Look tai bai" from 5 different herbal drug stores were collected. The results showed that the botanical description of *P. amarus* and *P. urinaria* showed different part of stem and fruit. The stem of *P. amarus* was rounded and fruit subglobose as smooth surface but The stems of *P. urinaria* are square another fruit effect is rather rough and larger. Microscopic characters of *P. amarus* and *P. urinaria* consists of paracytic stomata, xylem vessel and trichomes. The physio-chemical constants of the dried herbal samples under the name of "Look tai bai" were evaluated. Foreign matter not more than 1%, Loss on drying not more than 8%, Total ash not more than 12%, Acid insoluble ash not less than 3%, Water-soluble extractive not less than 16% and Ethanol soluble extractive not less than 8%. TLC fingerprints of *P. amarus* and *P. urinaria* extraction were studied using toluene : ethyl acetate (85:15) and spraying with anisaldehyde-sulfuric acid reagent found that *P. amarus* showed 5 spots at hRf 3-5 (light gray), 11-13 (light blue), 23-27 (black), 31-33 (light purple), 82-87 (gray) and which as same as the hRf of the standard of phyllanthin at 11-13 (light blue) While *P. urinaria* showed 3 spots at hRf 23-25 (light gray) 30-32 (light purple), 82-87 (gray) which not fond the standard of phyllanthin. However, the authentic samples of *P. amarus* and *P. urinaria* were collected only one source from Mahasarakham thus this study was not conclude that *P. urinaria* not found phyllanthin. The high contents of phyllanthin in the authentic samples of *P. amarus* from Roi Et and *P. urinaria* from Mahasarakham were obtained 0.047 mg, respectively. The high contents of phyllanthin in the dried herbal

samples under the name of "Look tai bai" from Khon Khen (S4) was obtained 0.276 mg and the less contents of phyllanthin from Nakhon Ratchasima (S3) was obtained 0.063 mg. The results showed that the amount of phyllanthin contents was significantly higher in *P. amarus* as compared to *P. urinaria*. ($p<0.05$) Although, the spices of dried herbal samples of *P. amarus* and *P. urinaria* from herbal drug stores were not clear but the amount of phyllanthin contents was nearby the authentic samples.

Keywords: *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus urinaria*, Look tai bai, phyllanthin contents

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ 1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา 2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
สมมติฐานงานวิจัย 3
ขอบเขตของงานวิจัย 3
กรอบแนวคิด 4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
นิยามศัพท์เฉพาะ 5

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 6
ประโยชน์ทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน 10
องค์ประกอบทางเคมี 11
ฤทธิ์ทางชีวภาพ 14
การจัดทำมาตรฐานสมุนไพร 17
เทคนิค TLC densitometers 23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 26

3 วิธีดำเนินงานวิจัย 29
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ 29
วิธีการดำเนินการวิจัย 31
การพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพรโดยวิธี TLC 34
การหาปริมาณสาร phyllanthin 34
สถิติที่ใช้ในการวิจัย 36

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

4 ผลการวิจัยวิจัย 37

การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ 37

การทดสอบทางเคมีกายภาพ 45

รูปแบบ TLC fingerprints 48

วิเคราะห์หาปริมาณ สาร Phyllanthin 52

5 สรุปผล อภิปรายและข้อแสนอแนะ 58

สรุปผลการวิจัย 58

อภิปรายผล 60

ข้อเสนอแนะ 62

เอกสารอ้างอิง 63

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 68

ประวัติย่อของผู้วิจัย 69

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบลักษณะพฤกษศาสตร์ 6

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในลูกใต้ใบ (*P. amarus*) 11

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในหญ้าใต้ใบ *(P. urinaria)* 12

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบในการตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพรใน monograph 18

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างสมุนไพร 31

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ 44

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ย Foreign matter และ Loss on drying ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ . 45

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้ารวมของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ 46

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ 46

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากน้ำของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ 47

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากเอทานอลจากตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ 47

ตารางที่ 4.7 ค่า hRf ของสารสกัดลูกใต้ใบ 50

ตารางที่ 4.8 ค่า hRf ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ..... 50

ตารางที่ 4.9 ค่า Rf และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin จำนวน 5 ความเข้มข้น ... 53

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณสาร phyllanthin และ % yield (w/w) ในสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ จากแหล่งต่างๆ 57

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

ภาพประกอบที่ 2.1 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) 9

ภาพประกอบที่ 2.2 หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) 9

ภาพประกอบที่ 2.3 TLC fingerprint ของ *P. amarus* (PA) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Phyllanthin 24

ภาพประกอบที่ 2.4 แผนภาพแสดงร้อยละของสารสกัดหยาบของ Phyllanthus spp.ที่ได้โดยวิธี Soxhlet apparatus เมื่อใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน 27

ภาพประกอบที่ 4.1 ลูกใต้ใบ ตัวอย่างแหล่งมหาสารคาม 37

ภาพประกอบที่ 4.2 ลูกใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม (PA1) 38

ภาพประกอบที่ 4.3 ลูกใต้ใบ แหล่งร้อยเอ็ด (PA2) 38

ภาพประกอบที่ 4.4 ลูกใต้ใบ แหล่งขอนแก่น (PA3) 38

ภาพประกอบที่ 4.5 ลักษณะมหภาคของลูกใต้ใบ (PA1) 39

ภาพประกอบที่ 4.6.1 ภาพตัดลำต้นตามขวาง (PA1) 39

ภาพประกอบที่ 4.6.2 ภาพตัดลำต้นตามยาว (PA1) 39

ภาพประกอบที่ 4.7 ลักษณะผงยาของลูกใต้ใบ (PA1) 40

ภาพประกอบที่ 4.8 หญ้าใต้ใบ ตัวอย่างแหล่งมหาสารคาม (PU1) 40

ภาพประกอบที่ 4.9 หญ้าใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม (PU1) 41

ภาพประกอบที่ 4.10 หญ้าใต้ใบ แหล่งร้อยเอ็ด (PU2) 41

ภาพประกอบที่ 4.11 หญ้าใต้ใบ แหล่งขอนแก่น (PU3) 41

ภาพประกอบที่ 4.12 ลักษณะมหภาคของหญ้าใต้ใบ (PU1) 42

ภาพประกอบที่ 4.13.1 ภาพตัดลำต้นตามขวาง (PU1) 42

ภาพประกอบที่ 4.13.2 ภาพตัดลำต้นตามยาว (PU1) 42

ภาพประกอบที่ 4.14 ลักษณะผงยาของหญ้าใต้ใบ (PU1) 43

ภาพประกอบที่ 4.15 ตัวอย่างสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบจากร้านยาสมุนไพร 44

ภาพประกอบที่ 4.16 TLC Chromatogram ของสารสกัดของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ 49

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

ภาพประกอบที่ 4.17 รูปแบบ TLC fingerprints ของตัวอย่างแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างแห้งของสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบหลังพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid 51

ภาพประกอบที่ 4.18 รูปแบบ TLC fingerprints ของตัวอย่างแท้ (authentic samples) ของหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างแห้งของสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบหลังพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid 51

ภาพประกอบที่ 4.19 TLC chromatogram ภายใต้แสง UV 254 nm ของสารละลายมาตรฐาน.phyllanthin 5 ความเข้มข้น โดยที่ 1-5 เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml 52

ภาพประกอบที่ 4.20 spectrum ของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin ที่ได้จากการสแกน TLC 53

ภาพประกอบที่ 4.21 กราฟมาตรฐาน phyllanthin แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วย TLC densitometer 54

ภาพประกอบที่ 4.22 TLC Chromatogram ของสารสกัดลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm 55

ภาพประกอบที่ 4.23 spectrum ของสารสกัดลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm 55

ภาพประกอบที่ 4.24 TLC Chromatogram ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างสมุนไพร ลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm 56

ภาพประกอบที่ 4.25 spectrum ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm 56

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันสมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในชีวิตมากขึ้นในการใช้รักษาโรคหรือการใช้เป็นอาหารเสริม เนื่องจากสังคมได้ตระหนักเห็นถึงคุณค่าและประโยชน์ของสมุนไพร โดยพบว่าแนวโน้มการใช้ยาสมุนไพรในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น คิดเป็นมูลค่าการใช้ราวปีละ 14,000 ล้านบาท (ภัสรา, 2558) อีกทั้งนโยบายของรัฐบาลที่ผลักดันยาสมุนไพรเข้าสู่บัญชียาหลักแห่งชาติ เพื่อสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรในระบบบริการสาธารณสุขเพิ่มมากขึ้น แต่ทั้งนี้ประชาชนยังขาดความมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดหรือผลิตในโรงพยาบาล เนื่องจากยาสมุนไพรส่วนใหญ่นำวัตถุดิบจากธรรมชาติมาผลิตจึงมีโอกาสที่จะมีสิ่งปนเปื้อน เช่น ดินหรือน้ำในแหล่งที่เก็บพืชสมุนไพรอาจมีโลหะหนักที่เป็นพิษปนเปื้อน ได้แก่ สารหนู ตะกั่ว และแคดเมียม หรือการปนเปื้อนสารเคมี ยากำจัดศัตรูพืชจากการเพาะปลูก ตลอดจนการนำสมุนไพรมาทำเป็นรูปแบบยาต่าง ๆ เช่น ยาเม็ด ยาแคปซูล หรือยาน้ำ หากผลิตยาไม่ได้มาตรฐานอาจทำให้ได้ยาที่ไม่มีคุณภาพ เช่น มีสารปนเปื้อนหรือการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2555) ดังนั้นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีการจัดทำตำรามาตรฐานของสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ขึ้น ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ควบคุมคุณภาพของยาสมุนไพร และเป็นมาตรฐานอ้างอิงเพื่อการส่งออกนำเข้าวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพร รวมทั้งใช้อ้างอิงการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณและยาที่พัฒนาจากสมุนไพร ปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดทำข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรในตำรา Thai Herbal Pharmacopoeia แล้วทั้งสิ้น 4 เล่มและ 2 ฉบับเพิ่มเติมประกอบไปด้วยสมุนไพรจำนวนทั้งสิ้น 46 ชนิด (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558) ยกตัวอย่างเช่น บอระเพ็ด ชุมเห็ดเทศ ฟ้าทะลาย ขมิ้นชัน มะแว้งเครือ ไพล กระเทียม ดีปลี สมอไทย สมอพิเภก ว่านน้ำ หมากสง บัวบก ชุมเห็ดไทย ขมิ้นเครือ กระชายดำ หญ้าหนวดแมว ใบรางจืด บุนนาค เกสรบัวหลวง ลักจั่น เพชรสังฆาต พิกุล เทียนสัตตบุษย์ เทียนตากบ เป็นต้น และยาเตรียมจากสมุนไพร จำนวน 3 ตำรับ คือ ยาแคปซูลขมิ้นชัน ยาแคปซูลฟ้าทะลายโจร และยาชงชุมเห็ดเทศ ซึ่งตำราดังกล่าวได้บรรจุอยู่ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุตำรายา พ.ศ. 2556 เพื่อบังคับใช้เป็นตำรายาอ้างอิงของประเทศ โดยเนื้อหาของวัตถุดิบสมุนไพร ประกอบด้วยการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและการควบคุมคุณภาพสมุนไพรโดยวิธีอื่นๆ เช่น การหาปริมาณสิ่งแปลกปลอม การหาปริมาณความชื้น เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2558) อย่างไรก็ตามปัจจุบันกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้จัดทำมาตรฐานสมุนไพรแต่ยังไม่ครอบคลุมสมุนไพรจำนวนอีกหลายชนิด เช่น มะระขี้นก พริก คูน หม่อน โด่ไม่รู้ล้ม ลูกใต้ใบ

Mahasarakham University

และหญ้าใต้ใบ เป็นต้น และยังขาดการศึกษาข้อมูลด้านการพิสูจน์เอกลักษณ์และการควบคุมคุณภาพด้านอื่นๆ (กรวิกา, 2558) สมุนไพรที่น่าสนใจและพบว่ามีผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ ลูกใต้ใบแคปซูล ชาชงลูกใต้ใบ และยังพบว่ามีการขายในรูปแบบของสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบด้วย โดยกล่าวมีสรรพคุณไว้ที่ฉลากว่าช่วยบำรุงฟื้นฟูตับ ไวรัสตับอักเสบ ไขมันพอกตับ ลดอาการตับอักเสบ รักษาดีซ่าน

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็กอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล *Phyllanthus* อาจเรียกว่า มะขามป้อมดิน (ภาคเหนือ) หญ้าใต้ใบขาว (สุราษฎร์ธานี) จูเกี่ยเซ่า (จีน) ส่วนหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*) อยู่ในวงศ์และสกุลเช่นเดียวกันกับลูกใต้ใบ อาจเรียกว่า ไฟเดือนห้า (ชลบุรี) หมากไข่หลัง (เลย) ทั้งลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบสามารถเติบโตได้ดีในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทย โดยศาสตร์การแพทย์แผนจีนโบราณโดยระบุว่า หญ้าใต้ใบมีสรรพคุณเป็นยาเย็นออกฤทธิ์ต่อตับและปอด ใช้เป็นยาขับพิษไข้ในตับ แก้ตับอักเสบติดเชื้อเป็นยาขับพิษร้อน แก้ทางเดินปัสสาวะติดเชื้อแก้แผลบวมอักเสบ (วิทยา, 2554) ในด้านสรรพคุณแผนไทยโบราณนั้นจะใช้ลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบทั้งต้น ซึ่งมีสรรพคุณมีรสขม แก้ไข้ทุกชนิด แก้ไข้จับสั่น ดับพิษร้อน แก้พิษตานซาง แก้โทษน้ำดีพิการ กระตุ้นไตให้ทำงาน แก้ขัดเบา แก้กามโรค แก้ดีซาน แก้ริดสีดวง แก้โรคท้องมาน แก้ปวดท้อง แก้ไอ ขับระดูขาว ขับปัสสาวะลดความดันเลือด (วุฒิ วุฒิธรรม เวช.2540) และในปัจจุบันมีการนำมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบจากการศึกษาถึงสรรพคุณและสารสำคัญต่างๆในลูกใต้ใบและหญ้า พบว่าลูกใต้ใบมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ ที่สนใจ คือ hepatoprotective, anti-inflammatory และ antiviral (Patel et al.,2007) มีการศึกษาในลูกใต้ใบรายงานว่ามี phyllanthin และ hypo-phyllantin ที่สามารถลดความเป็นพิษต่อตับในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดตับอักเสบได้ (Khatoon et al., 2006) และในหญ้าใต้ใบก็พบว่ามี phyllanthin และ hypo-phyllantin เช่นเดียวกัน (Basshir et al., 2015)

จากผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าในตำรายาโบราณมีการกล่าวสรรพคุณของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบว่าใช้รักษาอาการดีซ่าน แก้โรคท้องมาน ริดสีดวงทวาร ขับปัสสาวะ และลดความดันโลหิต จึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจในการพัฒนาศักยภาพมาใช้เป็นยารักษาโรคตับ และยังขาดข้อมูลด้านการพิสูจน์เอกลักษณ์และการควบคุมคุณภาพด้านอื่นๆ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงความสนใจศึกษาการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ และหาปริมาณสาร phyllanthin ในลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ โดยศึกษาการอธิบายลักษณะของพืช (Description of the plant) สิ่งแปลกปลอม (Foreign matter) ปริมาณเถ้า(Ash) ปริมาณความชื้น(Loss on drying) ตามข้อกำหนดของมาตรฐานสมุนไพรใน Thai Herbal Pharmacopoeia และหาปริมาณสารสำคัญ phyllanthin โดยใช้เทคนิค TLC densitometry เพื่อให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจว่าสมุนไพรที่ใช้นั้นมีมาตรฐานและความปลอดภัย อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้เป็นมาตรฐานสมุนไพรของประเทศ และนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพในการผลิตเพื่อการส่งออก ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายการกระตุ้นเศรษฐกิจและสนับสนุนการใช้ภูมิปัญญาสมุนไพรไทย

1.2 วัตถุประสงค์

2.1 วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อจัดทำมาตรฐานสมุนไพรและหาปริมาณสาร phyllanthin ในลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

2.2 วัตถุประสงค์เฉพาะ

1. **เพื่อศึกษาการอธิบายลักษณะของพืช** (Description of the plant) **สิ่งแปลกปลอม** (Foreign matter) **ปริมาณเถ้า** (Ash) **ปริมาณความชื้น** (Loss on drying) **ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบตามข้อกำหนดการจัดทำมาตรฐานสมุนไพร**

2. **เพื่อศึกษารูปแบบ** TLC fingerprints **ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ**

3. **เพื่อหาปริมาณสาร** Phyllanthin **ของสารสกัดลูกใต้ใบ หญ้าใต้ใบ และตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ โดยใช้เทคนิค** TLC densitometry

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

ปริมาณสาร Phyllanthin ที่พบในสารสกัดจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบมีปริมาณไม่แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

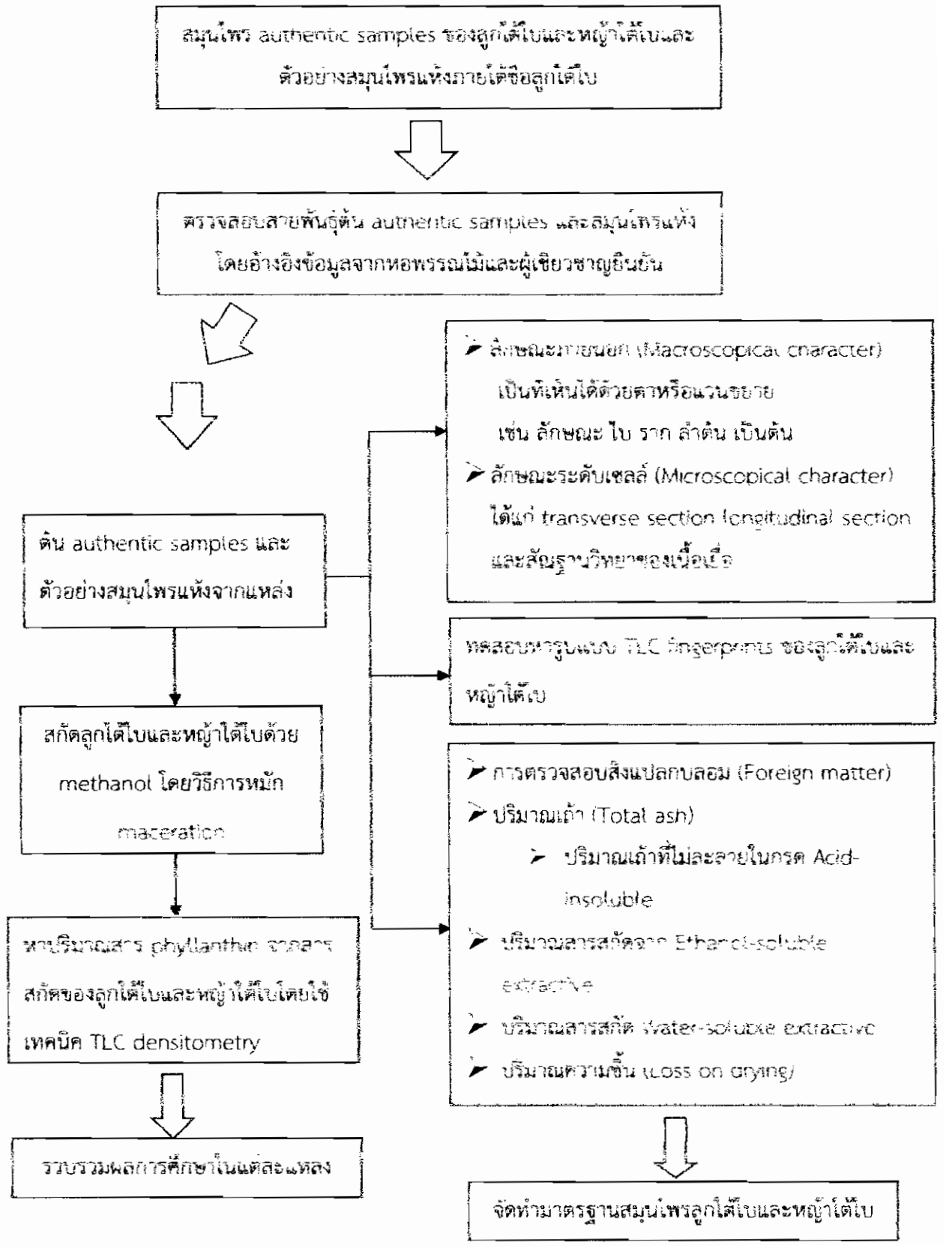
1.4.1 เตรียมสมุนไพร

เตรียมสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบตัวอย่างแท้ (authentic samples) **จำนวน 3 แหล่ง ในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ด และขอนแก่น ตัวอย่างสมุนไพรแห้งจากร้านยาสมุนไพร จำนวน 5 แหล่ง จากกรุงเทพมหานคร ระยอง นครราชสีมา ขอนแก่นและมหาสารคาม**

1.4.2 การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

ศึกษาและรวบข้อมูลสมุนไพร (Definition) **จากนั้นนำตัวอย่างพืชสมุนไพรจากแหล่งต่างๆ มาตรวจสอบลักษณะของพืช โดยระบุสัณฐานวิทยา** (morphology) **ลักษณะทางมหภาค** (Macroscopical character) **และลักษณะจุลภาคของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ** (histology) **จากกล้องจุลทรรศน์** (Microscopical character) **การทดสอบแยกสารสำคัญโดยใช้** TLC fingerprints **การตรวจสอบสิ่งแปลกปลอมในสมุนไพร ปริมาณเถ้า เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยาสมุนไพรว่ามีสารเจือปนหรือมีการปลอมปนสารอื่นๆ และปริมาณความชื้น รูปแบบ** TLC fingerprints **ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบตามข้อกำหนดจัดทำมาตรฐานสมุนไพร รวมทั้งหาปริมาณ** Phyllanthin **ที่เป็นสารสำคัญของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้** TLC densitometry

1.5 กรอบแนวคิด



1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้มาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรต่อไป

2. ทราบปริมาณสาร phyllanthin ในลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบของต้นสดและสมุนไพรแห้งที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ตัวอย่างพืชแท้ (authentic sample) หมายถึง ตัวอย่างต้นพืชจริง ต้นสด จากแหล่งที่น่าเชื่อถือ เช่น หอพันธุ์พืชหรือมีผู้เชี่ยวชาญยืนยันความถูกต้องของสายพันธุ์

2. เทคนิค TLC densitometry หมายถึง การทำ TLC ซึ่งใช้เครื่อง densitometers ที่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารที่อยู่บนแผ่น TLC หรือ paper chromatograph โดยใช้หลักการ scan ตามความเข้มของการดูดกลืนแสง/เรืองแสงของ band ที่ปรากฏบนแผ่นTLC แล้วแปลงสัญญาณเป็น densitogram ช่วยให้การวิเคราะห์หรือแยกสารด้วยเทคนิคTLC มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

3. ตัวอย่างสมุนไพรแห้ง หมายถึง ตัวอย่างสมุนไพรแห้งที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จากแหล่งจำหน่ายที่น่าเชื่อถือ

4. สารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ หมายถึง สารสกัดที่ได้จากการหมัก (maceration) ตัวอย่างต้นพืชแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบด้วยเมทานอล (methanol)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ มีการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

2.2 ประโยชน์ทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotanical used)

2.3 องค์ประกอบทางเคมี

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.5 การจัดทำมาตรฐานสมุนไพร

- การบรรยายถึงลักษณะเฉพาะทางกายภาพ (Description)
- การตรวจเอกลักษณ์ (Identification)
- การตรวจสอบสารปลอมปน (Foreign matter)
- ปริมาณเถ้า (Ash)
- การควบคุมปริมาณความชื้น (Loss on drying)

2.6 เทคนิค TLC densitometers

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลูกใต้ใบมีถิ่นกำเนิดในอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล *Phyllanthus* ลูกใต้ใบที่พบในประเทศไทย ตามการรายงานพบได้ทั่วไปอยู่ 4 ชนิด คือ *Phyllanthus amarus*, *P. debilis*, *P. urinaria* และ *P. virgatus* (มงคล และคณะ, 2556)

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบลักษณะพฤกษศาสตร์ (จารีย์, 2534)

ลักษณะ / ชนิด	*P. amarus*	*P. debilis*	*P. urinaria*	*P. virgatus*
ต้น-กิ่ง	ค่อนข้างกลม	เป็นเหลี่ยม	เป็นเหลี่ยม	เหลี่ยมค่อนข้างแบน
หูใบที่ลำต้น	สีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ	สีเขียวอ่อนและมักอมชมพู	สีเขียวอมน้ำตาล	สีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบลักษณะพฤกษศาสตร์ (จารีย์, 2534) (ต่อ)

ลักษณะ / ชนิด	*P. amarus*	*P. debilis*	*P. urinaria*	*P. virgatus*
ใบ	มี 2 ลักษณะ - ใบที่ลำต้นลดรูปคล้ายหู ใบ - ใบที่กิ่งออกสลับถี่คล้ายใบประกอบ	มี 2 ลักษณะ - ใบที่ลำต้นลดรูปคล้ายหู ใบ - ใบที่กิ่งออกสลับถี่คล้ายใบประกอบ	มี 2 ลักษณะ - ใบที่ลำต้นลดรูปคล้ายหู ใบ - ใบที่กิ่งออกสลับถี่คล้ายใบประกอบ	ใบที่ต้นและกิ่ง รูปร่างเหมือนกันไม่ลดรูป
แผ่นใบ	- รูปขอบขนาน - โคนใบมน - ปลายใบมนหรือมนและมีติ่ง - ขอบใบเรียบ	- รูปรี รีแกมรูปไข่ - โคนใบและปลายใบค่อนข้างแหลม - ขอบใบเรียบ	-รูปขอบขนาน -โคนใบมนและเบี้ยวเล็กน้อย -ปลายใบมีติ่งแหลมสีน้ำตาล - ขอบใบมีขน	- รูปขอบขนาน รีแกมขอบขนาน รูปไข่แกมขอบขนาน - โคนใบมน - ปลายใบมนแหลม -ขอบใบสีน้ำตาล
ขนาดใบ	กว้าง 2-6 มม. ยาว 4-11 มม	กว้าง 2-6 มม. ยาว 6-15 มม.	กว้าง 3-8 มม. ยาว 0.5-2 มม.	กว้าง 2-6 มม. ยาว 1-4.5 มม.
ดอก - ตำแหน่งกำเนิดดอก	- ง่ามใบบนกิ่งดังนี้ ที่ง่ามใบล่างจนถึงง่ามใบลำดับที่ 3 มีดอกตัวผู้อยู่เป็นกลุ่ม 2-3 ดอก ที่ง่ามใบลำดับเหนือขึ้นมาถึงที่ง่ามใบ ปลายกิ่งมักมีดอกอยู่เป็นคู่ ดอกตัวผู้ 1 ดอก และดอกตัวเมีย1 ดอก	- ง่ามใบบนกิ่งดังนี้ ที่ง่ามใบล่างถึงง่ามใบลำดับที่ 7 มีดอกตัวผู้อยู่เป็นกลุ่ม 3-5 ดอก ที่ง่ามใบลำดับเหนือขึ้นมาถึงที่ง่ามใบ ปลายกิ่งมีดอกตัวเมียอยู่เดี่ยวๆ	- ง่ามใบบนกิ่งดังนี้ ที่ง่ามใบล่างถึงง่ามใบตอนกลางกิ่ง มีดอกตัวเมียอยู่เดี่ยวที่ง่ามใบลำดับเหนือขึ้นมาถึงที่ง่ามใบ ปลายกิ่งมีดอกตัวผู้ 2-3 ดอก	- ง่ามใบทั้งที่ต้นและกิ่ง ตำแหน่งที่ดอกแต่ละเพศออกไม่แน่นอน ดอกตัวผู้มักอยู่เป็นกลุ่ม 2-5 ดอก ที่ง่ามใบ ดอกตัวผู้ 1 ดอก ดอกตัวเมียมักอยู่เดี่ยวหรืออยู่ปนกับกลุ่มดอกตัวผู้ที่มีอยู่เพียง 1-2 ดอก
จำนวนกลีบ	5 กลีบ	6 กลีบ	6 กลีบ	6 กลีบ
ดอกตัวเมีย ลักษณะกลีบ	รูปไข่แกมขอบขนาน ปลายกลีบแหลม	รูปไข่กลับแกมรูปขอบขนาน หรือรูปไข่แกมขอบขนาน ปลายกลีบมน	รูปไข่แกมขอบขนาน หรือรูปรีแกมขอบขนาน ปลายกลีบมน	รูปไข่แกมขอบขนาน ปลายกลีบแหลมเล็กน้อย
ขอบจาน ฐานดอก	หยักเว้าลึก 5หยัก	หยักเว้าตื้น 6 หยัก	ขอบหยักโดยรอบไม่สม่ำเสมอ มีมากกว่า 6 หยัก	ขอบหยักเว้า 6 หยัก
ผิวรังไข่	เกลี้ยง	เกลี้ยง	ขรุขระมาก	ขรุขระเล็กน้อย

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบลักษณะพฤกษศาสตร์ (จารีย์, 2534) (ต่อ)

ลักษณะ / ชนิด	*P. amarus*	*P. debilis*	*P. urinaria*	*P. virgatus*
ดอกตัวผู้	รูปรี รูปไข่	รูปไข่กลับ	รูปไข่กลับ	รูปไข่ รูปไข่กลับเกือบกลม
ลักษณะกลีบ	ปลายกลีบแหลม	ปลายกลีบมน	ปลายกลีบมน	ปลายกลีบแหลมเล็กน้อย
ฐานรองดอก	5 อัน	6 อัน	6 อัน	6 อัน
ก้านเกสรตัวผู้ทั้ง 3 อัน	ติดรวมกัน	ติดรวมกัน	ติดรวมกัน	แยกเป็นอิสระ
ผล - ก้านผล - เส้นผ่านศูนย์กลาง - ผิว	 ยาวประมาณ 1 มม. ยาว 1-1.5 มม. เกลี้ยง	 ยาวประมาณ 1 มม. ยาว 1.5-2.5 มม. เกลี้ยง	 ยาวประมาณ 1 มม. ยาว 2-3 มม. ขรุขระมาก	 ยาว 5-12 มม. ยาวประมาณ 3 มม. ขรุขระเล็กน้อย
เมล็ด	มีลายเส้นตามแนวยาว	มีลายเส้นตามแนวยาว	มีลายเส้นตามแนวขวาง	มีลายเส้นตามแนวยาว

ต่อมาได้มีการค้นพบลูกใต้ใบในประเทศไทยพบเพิ่มเติมอีก 3 ชนิด (มงคล และคณะ, 2556) ดังนี้

1) ลูกใต้ใบดอกขาว ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus* sp.1 วงศ์ลูกใต้ใบ (Phyllanthaceae) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ใบเดี่ยวเรียงสลับ คล้ายใบประกอบ ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง 6 กลีบผลมีก้านยาว ลักษณะเด่น กลีบเลี้ยงสีขาว ก้านยาว พบครั้งแรกที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ ค้นพบโดย ศ.ดร.ประนอม จันทรโณทัย และนายจิโรจน์ แสงรัตนประเสริฐ

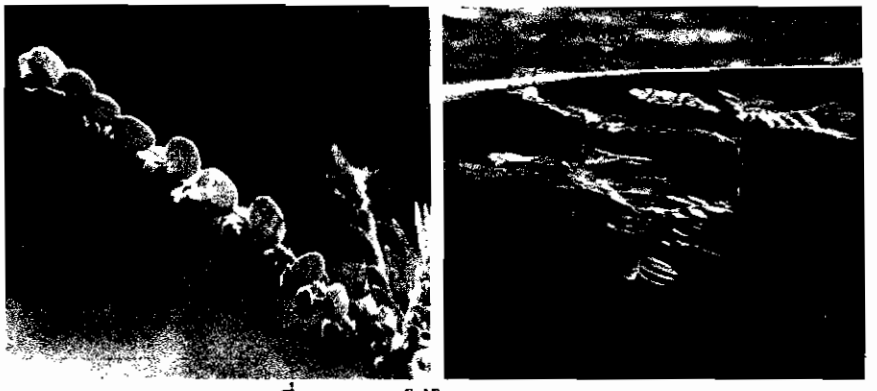
2) ลูกใต้ใบตีนชี้ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus* sp.2 วงศ์ลูกใต้ใบ (Phyllanthaceae) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกฤดูเดียว ใบเดี่ยวเรียงสลับ คล้ายใบประกอบ ขอบกลีบดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ขอบกลีบจัก ผลเรียบ พบครั้งแรกที่ดอยหัวหมด จังหวัดตาก ค้นพบโดย ศ.ดร. ประนอม จันทรโณทัย

3) ลูกใต้ใบหัวหมด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phyllanthus* sp.3 วงศ์ลูกใต้ใบ (Phyllanthaceae) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกฤดูเดี่ยว ใบเดี่ยวเรียงสลับ คล้ายใบประกอบ ดอกมีกลีบรวม 6 กลีบ ผลมีขนกระจายห่างๆ พบครั้งแรกที่ดอยหัวหมด จังหวัดตาก ค้นพบโดย ศ.ดร.ประนอม จันทรโณทัย

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยมีความสนใจที่ศึกษาในลูกใต้ใบ 2 ชนิด ที่พบว่าในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาดและยังขาดข้อมูลการจัดทำมาตรฐานสมุนไพร (กรวิกา จารุพันธุ์, 2558) คือ ผลิตภัณฑ์สมุนไพรจาก ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) และหญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*)

ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn.)

ชื่อไทย : **มะขามป้อมดิน ลูกใต้ใบ* หญ้าใต้ใบขาว วงศ์** : Euphorbiaceae สกุล *Phyllanthus* (The gardener's Chronicle, 1881)



ภาพประกอบที่ 2.1 ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*)
(สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2553)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก สูง 30-60 ซม. ทุกส่วนมีรสขม ใบเดี่ยว เรียงสลับในระนาบเดียวกัน รูปวงรีหรือรูปขอบขนาน กว้าง 3-4 มม. ยาว 5-9 มม. ดอก ออกที่ซอกใบ แยกเพศ อยู่บน ต้นเดียวกัน เพศเมียเป็นดอกเดี่ยว เพศผู้ออกเป็นกระจุก สีนวล ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ กลม ผิวเรียบ หรือมีพูบ้าง

หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* L.)

ชื่อไทย : **ไฟเดือนห้า มะขามป้อมดิน หมากไข่หลัง วงศ์** . Euphorbiaceae สกุล *Phyllanthus*

ภาพประกอบที่ 2.2 หญ้าใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria*)
(สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2553)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุก ลักษณะคล้ายลูกใต้ใบ ส่วนที่แตกต่างคือ ใบรูปขอบขนาน กว้าง 3-5 มม. ยาว 6-14 มม. ขอบใบสีม่วงแกมน้ำตาล ผลมีผิวขรุขระและขนาดค่อนข้างใหญ่กว่า

2.2 ประโยชน์ทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน (Ethnobotanical used)

ในสารานุกรมสมุนไพร-จีนระบุว่า หญ้าใต้ใบ (*P. amnora*) ในศาสตร์การแพทย์แผนจีนโบราณระบุว่ามีสรรพคุณมีรสขมจัด โดยใช้ทั้งต้นเป็นยาเย็นออกฤทธิ์ต่อตับและปอด ใช้เป็นยาขับพิษไข้ในรัง แก้ตับอักเสบติดเชื้อโตอักเสบบวมน้ำ เป็นยาขับพิษไข้ ขับปัสสาวะ ขับน้ำชื้นในร่างกาย แก้ทางเดินปัสสาวะติดเชื้อเด็กเป็นตาซโมย แก้บิดมูกเลือด ลำไส้อักเสบ แก้แผลบวมอักเสบ ภายนอกแก้พิษฝีหนองใช้ตำพอกบริเวณที่เป็นแผล

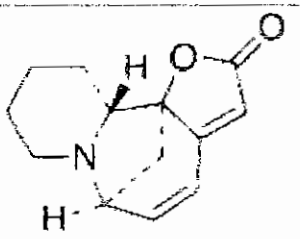
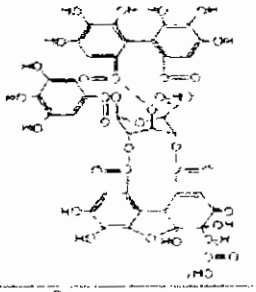
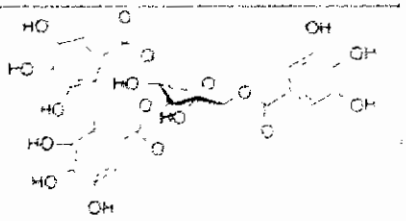
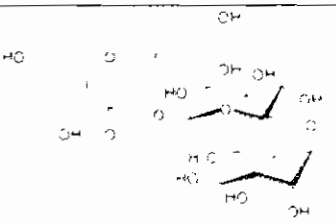
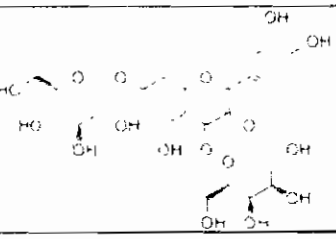
ปริมาณที่ใช้ ยาสดปริมาณที่ใช้ครั้งละ 35-70 กรัม ยาแห้ง ใช้ครั้งละ 15-30 กรัม ใช้ภายนอกกะปริมาณตามความเหมาะสมใช้ตำพอกบริเวณที่เป็นแผล ในตำรายาจีนแนะนำใช้หญ้าใต้ใบสด 50-80 กรัม (ต้นแห้งใช้ 35-70 กรัม) นำใบต้มในน้ำ 500 ซีซี ต้มจนเหลือ 200 ซีซี รับประทาน ใช้แก้บิดและให้ใช้หญ้าใต้ใบต้นสด 30-60 กรัม ต้มน้ำรับประทาน วันละ 1 ครั้ง ให้ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วันรักษาตับอักเสบติดเชื้อ (วิทยา, 2554)

ในสารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทยได้ระบุในด้านสรรพคุณแผนไทยโบราณนั้นจะใช้ลูกใต้ใบทั้งต้น มีสรรพคุณแก้ไข้ทุกชนิด แก้ไข้จับสั่น ดับพิษร้อน แก้พิษตานซาง แก้โทษน้ำดีพิการ กระตุ้นไตให้ทำงาน แก้ขัดเบา แก้กามโรค แก้ดีซาน แก้ริดสีดวง แก้โรคท้องมาน แก้ปวดท้อง แก้ไอ ขับระดูขาว ขับปัสสาวะ ลดความดันโลหิต รักษาโรคไวรัสตับอักเสบชนิด บี หญ้าใต้ใบ ใช้ทั้งต้นมีสรรพคุณมีรสขม แก้ไข้ทุกชนิด แก้ไข้จับสั่น ดับพิษร้อน แก้พิษตานซาง แก้โทษน้ำดีพิการ กระตุ้นไตให้ทำงาน แก้ขัดเบา แก้กามโรค แก้ดีซาน แก้ริดสีดวง แก้โรคท้องมาน แก้ปวดท้อง แก้ไอ ขับระดูขาว ขับปัสสาวะ(วุฒิ, 2540)

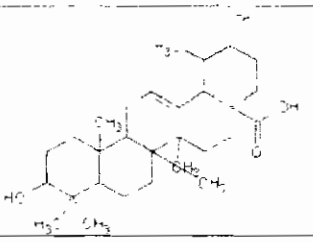
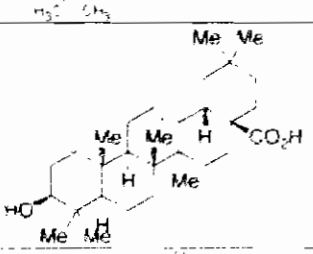
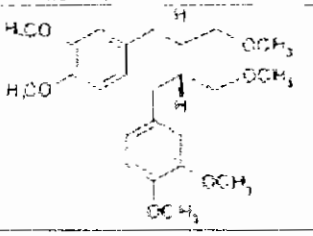
2.3 องค์ประกอบทางเคมี

ลูกใต้ใบ (*P. amarus*) การศึกษาพฤกษเคมีในส่วนใบรากและลำต้นลูกใต้ใบพบว่ามีสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) ได้แก่ securinine, dihydrosecurinine และ tetrahydrosecurinine ส่วนเหนือดินประกอบด้วยสารกลุ่มแทนนิน (tannins) ได้แก่ amarin, phyllanthusiin D, geraniine, cordagin และ elecarpusin สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ได้แก่ rutin, quercetin-3-0-glucoside, สารกลุ่มลิกแนนส์ (lignans) ได้แก่ phyllanthin, hypo-phyllanthin และสารกลุ่มไตรเทอปีน (triterpine) ได้แก่ ursolicacid และ oleanolicacid (Gruenwald et al.,2000) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในลูกใต้ใบ (*P. amarus*) (Gruenwald et al.,2000 Akin et al., 2011)

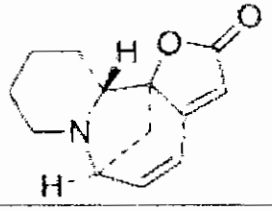
กลุ่มสาร	สารสำคัญที่พบ	สูตรโครงสร้าง	ส่วนที่พบ
Alkaloids	Securinine		ส่วนเหนือดิน ราก
Tannins	Amariin		ส่วนเหนือดิน
	phyllanthusiin D		
	Corilagin		
Flavonoids	Rutin		ส่วนเหนือดิน
	Quercetin-3-0-glucoside		

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในลูกใต้ใบ (*P. amarus*) (Gruenwald et al.,2000 Akin et al., 2011) (ต่อ)

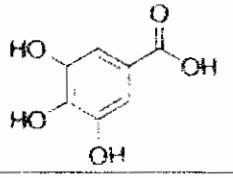
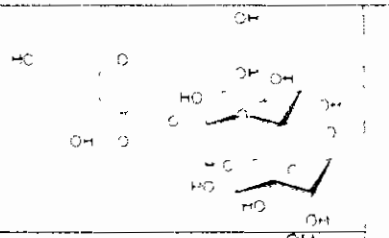
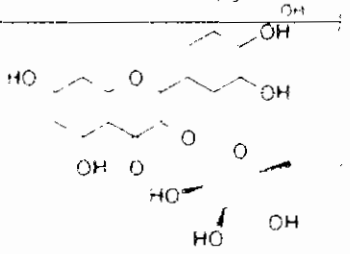
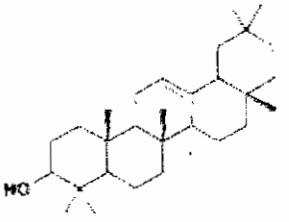
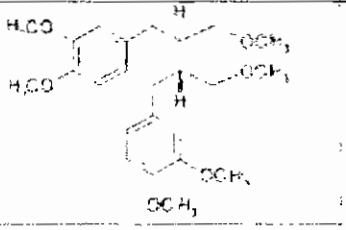
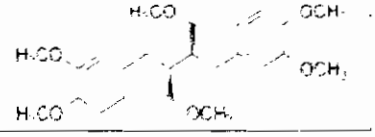
กลุ่มสาร	สารสำคัญที่พบ	สูตรโครงสร้าง	ส่วนที่พบ
Triterpenes	Ursolic acid		ส่วนเหนือดิน
	Oleanolic acid เป็น pentacyclic triterpenoid related to oetulinic acid		
Lignans	Phyllanthin		ส่วนเหนือดิน ราก

หญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) การศึกษาฤทธิ์เคมีในส่วนของ ใบ ราก และลำต้นพบว่าประกอบด้วยสารกลุ่มอัลคอลลอยด์ (alkaloids) คือ Securinine สารกลุ่มแทนนิน (tannin) ได้แก่ Corilagin และ Gallic acid สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ได้แก่ Rutin และ Quercitrin สารกลุ่มไตรเทอปีน (Triterpenes) ได้แก่ Methylgallate และ β-Amyrin สารกลุ่มลิกแนนส์ (lignans) ได้แก่ phyllantnin, hypo-phyllanthin และ niranthin (Bharti Sarinet et al. ,2014) ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) (Bhart Sarin et al., 2014)

กลุ่มสาร	สารสำคัญที่พบ	สูตรโครงสร้าง	ส่วนที่พบ
Alkaloids	Securinine		ส่วนเหนือดิน ราก
Tannins	Corilagin		ส่วนเหนือดิน ,ราก

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในหญ้าใต้ใบ (*P. urinoria*) (Bhart Sarin et al., 2014) (ต่อ)

กลุ่มสาร	สารสำคัญที่พบ	สูตรโครงสร้าง	ส่วนที่พบ
Tannins	Gallic acid		ส่วนเหนือดิน ราก
Flavonoids	Rutin		ส่วนเหนือดิน ราก
	Quercetin		
Triterpenes	β-Amyrin		ส่วนเหนือดิน ราก
Lignans	Phyllanthin		ส่วนเหนือดิน ราก
	Hypo-phyllanthin		
	Niranthin		

2.4 ฤทธิ์ทางชีวภาพ

ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบ มีรายงานการศึกษาวิจัย ฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus, HBV) ของยาแคปซูลที่มีส่วนผสมของ *P. amarus* ปริมาณ 375 mg ในผู้ป่วย chronic viral hepatitis B จำนวน 30 คน รับประทานวันละ 3 ครั้ง วันละ 4 แคปซูล เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีผลต่อ ไวรัสตับอักเสบ บี ทำให้เกิดการฟื้นตัวของการทำหน้าที่ของตับและสามารถการยับยั้ง HBV replication (Xin-Hua et al., 2001) และมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องถึงกลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งพบว่ามีหลายกลไกการออกฤทธิ์ เช่น การยับยั้ง HBV DNA polymerase, ยับยั้ง HBV mRNA transcription & replication ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เป็นต้น (Ott et al., 1997) และมีรายงานการศึกษาในมนุษย์หลายรายงาน ซึ่ง The Cochrane Hepato-Biliary Group ได้สรุปผลงานวิจัยที่เป็น randomized controlled trial (RCT) ของพืชสกุล *Phyllanthus* ในโรคตับอักเสบเรื้อรังไว้ มีเพียง 5 รายงานที่มีคุณภาพดี สรุปได้ว่า *Phyllanthus* sp. ให้ผลบวกต่อการ clearance ของ serum HbsAg เมื่อเทียบกับ placebo หรือเมื่อไม่ให้การรักษาไม่มีความแตกต่างในการ clearance ของ serum HBsAg, HBeAg, HBV DNA ระหว่าง *Phyllanthus* sp. กับ interferon (IFN) และ *Phyllanthus* sp. ให้ผลดีกว่า non-specific treatment หรือยาจากสมุนไพรอื่นๆ ในการเพิ่ม clearance ของ serum HBsAg, HBeAg, HBV DNA และการกลับมาเป็นปกติของค่า liver enzymes การใช้ *Phyllanthus* sp. ร่วมกับ IFN จะให้ผลดีกว่า IFN อย่างเดียวในการ clearance ของ serum HbeAg และ HBV DNA ไม่พบ serious adverse event จึงสรุปได้ว่า *Phyllanthus* sp .อาจมี positive effect ในด้าน antiviral activity และต่อ liver biochemistry ในโรคตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม หลักฐานที่มียังไม่เพียงพอเนื่องจากคุณภาพของวิธีวิจัยและความแตกต่างของสมุนไพรที่นำมาวิจัย จึงควรมีงานวิจัยในขนาดใหญ่ต่อไปในอนาคต (Xia Y et al., 2013)

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี สารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของ *P. amarus* มีฤทธิ์แรงในการยับยั้ง HIV-1 replication ได้มากกว่า 30% .โดยสารออกฤทธิ์อยู่ในกลุ่ม gallotannins โดยสาร geraniin และ corilagin มีฤทธิ์แรงที่สุด นอกจากนี้ สารสกัดทั้งสองและสาร geraniin ยังสามารถยับยั้ง virus uptake ได้ 70-75% รวมทั้งยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase ด้วยทั้ง in vitro และ in vivo (Notka Frank et al., 2004)

ฤทธิ์ต้านไวรัสหัวเหลือง (Yellow head virus, YHV) ในกุ้งกุลาดำ นักวิจัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ร่วมมือกับสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา ทำการวิจัยฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* ที่ผสมในอาหารในการป้องกันการติดเชื้อ YHV ในกุ้งกุลาดำ โดยเอากุ้งมาฉีดเชื้อ YHV พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสารสกัดลูกใต้ใบชนิด *P. urinaria* มีอัตราการรอดตายสูง และสามารถฟื้นเป็นปกติได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่พบอัตราการรอดเลย (อังคณา หิรัญและคณะ, 2539)

ฤทธิ์ต้านอักเสบ สารสกัดด้วยเฮกเซน (hexane) และน้ำหรือแอลกอฮอล์ของ *P. amarus* มีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยการยับยั้ง endotoxin-induced nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX-2)

และ tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ทั้ง in vitro และ in vivo และสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเมธานอลมีฤทธิ์ต้านอักเสบโดยลดการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ (Kiemer Alexandra et al., 2003)

ฤทธิ์ antioxidant และต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดด้วย 70% เมธานอลของ *P. amarus* พบว่ามี glycoside และ gallic acid เป็นองค์ประกอบหลัก มีฤทธิ์ antioxidant สามารถยับยั้ง lipid peroxidation และต้านอนุมูลอิสระได้เมื่อศึกษาในหลอดทดลอง (Maity et al., 2013)

ฤทธิ์ลดการเจ็บปวดและอาการบวม มีการศึกษาฤทธิ์ระงับอาการปวดกล้ามเนื้อเรื้อรังของ *P. amarus* โดยทดลองฉีด carrageenan เข้าบริเวณกล้ามเนื้อน่องของหนูแรทเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบและบวมของกล้ามเนื้อแบบเรื้อรัง จากนั้น 2 สัปดาห์ ทำการฉีดสารสกัดชนิดต่างๆ จาก *P. amarus* ซึ่งประกอบไปด้วยสารสำคัญกลุ่ม lignin และ tannin ได้แก่ สารสกัดน้ำจากลำต้น สารสกัดเมทานอลจากใบ (ประกอบด้วยสารสำคัญ phyllanthin และ hypophyllanthin มากกว่า 25%) และสารสกัดน้ำ-เมทานอลจากใบ (ประกอบด้วยสารสำคัญ corilagin มากกว่า 5%) ขนาด 100, 200 และ 400 มก./กก. น้ำหนักตัวเข้าทางช่องท้องของหนู (วันละ 2 ครั้ง ทุก 12 ชั่วโมง) นาน 7 วัน ผลจากการทดสอบพฤติกรรมการตอบสนองต่อความเจ็บปวดกล้ามเนื้อของหนูแรทพบว่า สารสกัด *P. amarus* ทุกชนิดและทุกขนาดมีฤทธิ์ยับยั้งอาการปวดกล้ามเนื้อได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสารสกัด *P. amarus* ขนาด 200 และ 400 มก./กก. ให้ผลใกล้เคียงกับยาแก้ปวด aceclofenac นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัด *P. amarus* มีผลยับยั้งฮอร์โมน prostaglandin E-2 ในกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นตัวชี้วัดถึงการอักเสบและอาการปวดได้อีกด้วย ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าต้น *P. amarus* มีฤทธิ์ระงับอาการปวดกล้ามเนื้อแบบเรื้อรังได้ (Atul R et al.,2015)

ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลของกระเพาะอาหาร สารสกัดด้วยเมธานอลของ *P. amarus* สามารถลดอัตราตาย (mortality) ลดพื้นที่ที่เกิดแผลในกระเพาะอาหาร (ulcer index) และลดอาการเลือดออก (intraluminal bleeding) ในหนูถีบจักร เนื่องจากได้รับเอธานอลได้ ซึ่งสารสกัดที่ได้และทำให้เกิดฤทธิ์ต้านการเกิดแผลของกระเพาะอาหารอาจจะเป็นสารในกลุ่มแทนนิน (tannins) (Raphael Regi et al., 2003)

ฤทธิ์ต้านอาการท้องเสีย สารสกัดด้วยน้ำจากใบของ *P. amarus* ให้ในปริมาณ 400 mg/kg สามารถลดการเคลื่อนตัวของอาหารในลำไส้หนูถีบจักร ชะลอการเกิดท้องเสีย และจำนวนครั้งที่ถ่ายหลังจากหนูถีบจักร ได้รับน้ำมันละหุ่ง (Odetola et al., 2000)

ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ผสมกับน้ำ (hydroalcoholic extract) ของ *P. amarus* มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง ที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีดสาร alloxan (Lawson-Evi et al.,2011) และสารสกัดด้วยน้ำจากใบและเมล็ดของ *P. amarus* ช่วยลดน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง โดยให้ดื่มน้ำตาลซูโครส 10 % ตลอด 30 วันเพื่อเพิ่มภาวะน้ำตาลในเลือด พบว่าสามารถลดภาวะเบาหวานได้และควบคุม insulin resistance DM ได้ (Adeneye, 2012)

ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ สารสกัดด้วยเมธานอลของ *P. amarus* มีฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสาร 2-acetaminofluorene (2-AFF), aflatoxin B1, sodium azide (NaN(3)), N-methyl-N-nitro-N-

nitrosoguanidine (MNNG) และ 4-nitro-0-phenylenediamine (NPD) เมื่อศึกษาด้วย Ames test (Raphael et al., 2002)

ฤทธิ์ต้านเนื้องอกและต้านมะเร็ง สารสกัดด้วยน้ำของ *P. amarus* สามารถต้านการเกิดมะเร็ง sarcoma ในหนูทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 20-methylcholanthrene และยืดอายุของหนูทดลองที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง Dalton's lymphoma ascites และ Ehrlich Ascites carcinoma และทำให้ก้อนเนื้องอกมีขนาดเล็กลง (Rajeshkumar et al.,2002)

ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส สารสกัดจากหญ้าใต้ใบ *P. urinaria* สามารถต้านเชื้อไวรัส Herpes simplex Type 1 และ 2 สารสกัด geraniin และ 1,3,4,6-tetra-O- galloyl-β-D-glucose (1346TOGDG) จากต้นหญ้าใต้ใบ เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส Herpes simplex type I และ II (HSV I, II) ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัด geraniin และ 1346TOGDG สามารถต้านเชื้อ HSV type I และ II ได้ โดยค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ HSV type I และ II ได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) ของ geraniin และ 1346TOGDG มีค่าเท่ากับ 35.0±4.2, 18.4±2.0 และ 19.2±4.0, 29.3±3.0 ไมโครโมล ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสาร geraniin สามารถยับยั้งเชื้อ HSV type II ได้ดีกว่า 1346TOGDG ในขณะที่สาร 1346TOGDG สามารถยับยั้งเชื้อ HSV type I ได้ดีกว่าสาร geraniin และสารทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่เป็นพิษกับเซลล์ (Vero Cell) (Yang et al., 2007)

ฤทธิ์ปกป้องตับ การศึกษาในหนูขาวโดยแบ่งหนูขาวออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมให้กินสารละลายกลูโคส (Isocaloric glucose solution) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ได้รับสารละลายเอทานอล (20% น้ำหนัก/ปริมาตร) ขนาด 5 ก./กก./วัน กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดใบของลูกใต้ใบด้วยเมทานอลขนาด 250 มก./กก./วัน ร่วมกับสารละลายกลูโคส กลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบของลูกใต้ใบด้วยเมทานอลขนาด 250 และ 500 มก./กก./วัน ร่วมกับสารละลายเอทานอลขนาด 5 ก./กก./วัน ตามลำดับ นาน 4 สัปดาห์ (เอทานอลให้นาน 3 สัปดาห์) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับเอทานอลเพียงอย่างเดียว สารสกัดลูกใต้ใบขนาด 250 และ 500 มก./กก./วัน ในหนูกลุ่มที่ 4 และ 5 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษที่ตับด้วย เอทานอลสามารถลดระดับการเกิด lipid peroxidation ได้ 29.10 และ 45.67% ตามลำดับ และยังสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ reduced glutathione (GSH), superoxide dimutase (SOD), catalase (CAT) ในตับ โดยกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบขนาด 250 มก./กก./วัน สามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ GSH, SOD และ CAT ได้ 27.60, 36.36 และ 28.61% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบขนาด 500 มก./กก./วัน สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้ 81.60, 51.03 และ 37.41% ตามลำดับ และหนูในกลุ่มที่ 4 และ 5 ยังสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ glutathione-S transferase ได้ 28.19 และ 47.99% นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบ 250 มก./กก./วัน ร่วมกับ เอทานอล (กลุ่มที่ 4) การทำงานของเอนไซม์ alanine transaminase (ALT) aspartate transaminase (AST) และ alkaline phosphatase (ALP) ในตับเพิ่มขึ้น 12.68, 42.35 และ 40.01% ตามลำดับ ในขณะที่ ALT และ AST ในพลาสมาลดลง 41.38 และ 51.90% เช่นเดียวกับหนูในกลุ่มที่ 5 ที่ได้รับสารสกัดลูกใต้ใบ 500 มก./กก./วัน ร่วมกับเอทานอล ระดับของ ALT, AST และ ALP ในตับเพิ่มขึ้น 42.35, 21.63 และ 116.9% ในขณะ

ที่ค่า ALT และ AST ในพลาสมาลดลง 51.90 และ 51.20% จากการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดใบของลูกใต้ใบด้วยเมทานอลสามารถป้องกันการถูกทำลายของตับในหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดพิษที่ตับได้ (Toyin YF et al.,2008)

ฤทธิ์ป้องกันการเกิดพิษต่อตับของหนูขาวที่ได้รับพาราเซทตะมอล พบว่า การให้น้ำต้มหรือผงลูกใต้ใบ จานวน 1 ครั้งในขนาด 3.2 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของหนูทดลอง ก่อนให้พาราเซทตะมอลเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีผลลดความเป็นพิษของพาราเซทตะมอล ลงได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากค่าเอ็นไซม์ SGOT และ SGPT แต่ SALP และจุลพยาธิวิทยาของตับไม่เปลี่ยนแปลง โดยกลไกการออกฤทธิ์ไม่ได้เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 แต่ส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มระดับรีดิวส์กลูตาไธโอนที่ตับ (Wongnawa et. al., 2006)

การทดสอบความเป็นพิษ มี

การศึกษาพบวาสารสกัดพืชทั้งต้นของ *P. amarus* ด้วยเอทานอล (50%) เมื่อให้หนูกินหรือฉีดเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 10 ก. /กก. ไม่พบพิษ (Mokkhasmit M et al., 1971)

มีการศึกษาโดยให้ผู้ใหญ่รับประทานพืชส่วนที่อยู่เหนือดินของ *P. amarus* ขนาด 1.5 กรัม ไม่พบพิษ (Thamlikitkul et al., 1991)

มีการศึกษาโดยให้เด็กรับประทานพืชทั้งต้นของ *P. amarus* (ไม่ระบุขนาดที่รับประทาน) ไม่พบพิษ (Thabrew et al.,1996)

มีการศึกษาโดยในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบชนิด บี แบบเฉียบพลัน ให้รับประทานพืชทั้งต้นของ *Phyllanthus amarus* ในขนาด 2.7 ก./วัน ไม่พบพิษ (Narendranathan et al.,1999)

2.5 การจัดทำมาตรฐานสมุนไพร (นันทนา สิทธิชัย, 2547)

ตำรายามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ได้จัดทำขึ้นเพื่อส่งเสริมศักยภาพในการผลิต และการใช้สมุนไพรทั้งแผนปัจจุบันและแผนโบราณ ยาสมุนไพรบางชนิดมีราคาแพง ขาดแคลน และคุณภาพไม่ดีพอ มีการปลอมปน การขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และไม่มีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ทำให้ยาสมุนไพรที่ใช้ในการแพทย์และเภสัชกรรมแผนโบราณ ยังไม่เป็นที่ยอมรับในการบำบัดโรค การสร้างมาตรฐานของสมุนไพรรองรับ ทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากขึ้น

ลักษณะของ monograph ของสมุนไพร ประกอบด้วยข้อกำหนดที่ถือว่าเป็นข้อบังคับ (requirements) และข้อกำหนดที่เป็นข้อมูลทั่วไป (information) ในภาคข้อสังเกตทั่วไป (General Notices) จะระบุว่าหัวข้อใดบ้างที่ไม่ถือว่าเป็นข้อบังคับ หัวข้อดังกล่าว ได้แก่ Description, Solubility, Constituents, Packaging and storage, Contra-indication, Warning, Precaution และ Additional information อย่างไรก็ตามลักษณะทางจุลทรรศน์ (microscopical) และมหทรรศน์ (macroscopical) จะนำมาเป็นส่วนประกอบในการตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพรด้วยโครงสร้าง monograph ประกอบด้วยข้อกำหนดที่จำเป็นดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบในการตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพรใน monograph

ส่วนประกอบใน monograph	
Nomenclature	Test
Definition	- Foreign matter
Description	- Loss on drying or Water
- morphology of plants	- Ash, etc
- organoleptic characters	Assay
- macroscopical characters	Test for contaminants
microscopical characters	Microbial limit
Packaging and storage	Pesticide residues
Identification	Category and Dose
- chemical tests	
chromatographic examination	

Nomenclature แบ่งย่อยออกเป็น Main title ใช้ชื่อไทยและวงเล็บคำภาษาอังกฤษที่ถอดจากชื่อไทย โดยยึดถือกฎของราชบัณฑิตยสถานในการถอดคำดังกล่าว ถ้าคำนั้นมีหลายพยางค์และอาจมีปัญหาในการออกเสียง จะใช้เครื่องหมาย hyphen (-) คั่นระหว่างพยางค์นั้น เช่น ดีปลี (DEE-PLEE) ถ้าคำนั้นมีหลายพยางค์แต่บางพยางค์มีความหมายในตัวเอง ในกรณีนี้จะเขียนแยกแต่ละคำย่อยดังกล่าวเช่น หมากสง (MAAG SOENG)Definition เป็นส่วนสำคัญของ monograph เป็นการให้คำจำกัดความว่าตัวยานี้หมายถึงอะไร สำหรับสมุนไพรจะระบุส่วนหรืออวัยวะที่ใช้ประโยชน์ของพืชหรือสัตว์ที่นำมาใช้ รวมทั้งชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชหรือสัตว์ ในกรณีเป็นพืช จะระบุวงศ์ (family) ไว้ด้วย ถ้าตัวยานั้นมีสารสำคัญ (active ingredients) ที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ จะมีการระบุปริมาณสารสำคัญในหัวข้อนี้ด้วย ในการระบุชื่อวิทยาศาสตร์นั้น จะเขียนชื่อเต็มของผู้ตั้งชื่อ (author) ยกเว้นชื่อ Linnaeus เท่านั้น จึงจะย่อเป็น L. แต่ถ้ากล่าวถึงชื่อเดิมใน ครั้งต่อไปจะใช้ชื่อย่อของผู้ตั้งชื่อได้ ชื่อพ้องของชื่อทางวิทยาศาสตร์จะระบุไว้ในวงเล็บต่อจากชื่อวิทยาศาสตร์ และแจ้งหมายเลข herbarium specimen ที่เก็บไว้ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSc) หรือหมายเลขของหอพันธุ์ไม้ กรมป่าไม้ (BKF) พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ (QBG) และระบุหมายเลข crude drug ไว้ด้วย ทั้งนี้เพื่อการตรวจพิสูจน์ชนิดของตัวอย่างสมุนไพร

Description รายละเอียด ในหัวข้อนี้เป็นการบรรยายถึงลักษณะเฉพาะทางกายภาพของตัวสมุนไพรนั้นๆ อาจแบ่งลักษณะสำคัญของหัวข้อนี้เป็นดังนี้

Morphology of plants เพื่ออำนวยความสะดวกให้นักวิเคราะห์ในการตรวจลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างยาสมุนไพร โดยระบุสัณฐานวิทยา (morphology) ของพืชที่เป็นแหล่งกำเนิดของสมุนไพรนั้นๆภายใต้ Description of the plant โดยบอกชนิดของพรรณไม้ว่าเป็นไม้ประเภทล้มลุกหรือยืนต้น ความสูงของลำต้น ลักษณะของใบ ดอกและผล รวมทั้งเมล็ดอย่างละเอียด

Organoleptic characters เป็นการบรรยายถึงกลิ่นและสีของยาสมุนไพรรวมถึงรสชาติ ถ้าไม่แน่ใจว่ายานั้นไม่เป็นอันตรายเมื่อทดลองชิม ข้อมูลเหล่านี้จะอยู่ภายใต้หัวข้อ Description'

Ma[illegible]opical characters อยู่ภายใต้หัวข้อ Description เป็นการบรรยายลักษณะมหทรรศน์ (ที่

เห็นได้ด้วยตาหรือแว่นขยาย) โดยละเอียดของยาสมุนไพรเฉพาะส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ (part used) เช่น ใบ ราก หรือ ลำต้น ตามที่ระบุไว้ในหัวข้อ definition

Microscopical characters เป็นลำดับถัดมาจาก Macroscopical ภายใต้หัวข้อ Description เช่นกัน เป็นการบรรยายจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (histology) โดยละเอียดของยาสมุนไพรจากส่วน transverse section และ/หรือ longitudinal section รวมถึงการบรรยายสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อด้วยลักษณะที่สังเกตจากกล้องจุลทรรศน์

Identification การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้อง จะสัมพันธ์กับความปลอดภัยของยาสมุนไพร ในการตรวจเอกลักษณ์ จะใช้การตรวจทางเภสัชเวท (macroscopical และ microscopical) ประกอบกับการตรวจด้วยรงคเลขผิวบาง (Thin-layer chromatography) หรือปฏิกิริยาเคมี ในการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรที่เป็นพืชจะให้ความสำคัญกับผลการตรวจทางเภสัชเวทมากกว่าผลการตรวจทางเคมี วิธีตรวจเอกลักษณ์ในตำรายาแบ่งออกเป็น 2 วิธี

1) วิธีตรวจทางเคมี โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างสารประกอบในยาสมุนไพรนั้นกับสารเคมีที่เติมลงไป ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจจะทำให้เกิดตะกอนหรือเกิดสี วิธีตรวจทางเคมีที่กำหนดไว้ควรจะมีความเฉพาะเจาะจง (specific) แต่ในขณะเดียวกันไม่ไวจนเกินไปเพื่อหลีกเลี่ยงปฏิกิริยาลวง (false reactions) เช่น การทดสอบ anthraquinones ในชุมเห็ดเทศ โดยอาศัยปฏิกิริยา Borntrager สลาย O-glycosides ในตัวยาด้วยกรดจากนั้นสกัด anthraquinones ด้วย ether ซึ่งเมื่อเขย่าสารละลาย ether กับสารละลายแอมโมเนียเจือจางจะได้สีแดงในชั้นของแอมโมเนีย

2) วิธีตรวจโดยรงคเลขผิวบาง (TLC) เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจงพอควร เนื่องจากสารสำคัญในสมุนไพรส่วนใหญ่ยังมิได้มีการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและในบางครั้งไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าสารนั้นเป็นตัวใด ดังนั้นการเปรียบเทียบลักษณะของโครมาโตแกรมระหว่างตัวยามาตรฐาน (authentic specimen) กับตัวอย่างที่สงสัย โดยสังเกตรูปแบบของโครมาโตแกรม ตลอดจนตำแหน่งและสีของแต่ละจุดหรือแถบที่ปรากฏจะช่วยยืนยันเอกลักษณ์ของตัวอย่างที่สงสัยได้ ในกรณีที่ทราบว่าสารสำคัญในสมุนไพรเป็นสารประกอบตัวใดจะกำหนดให้ใช้สารนั้นเป็นสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารมาตรฐานในการตรวจเอกลักษณ์ โดยวิธีนี้สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ สารมาตรฐานนั้นต้องมีจำหน่ายในท้องตลาดและราคาไม่แพงจนเกินไป ในกรณีที่ไม่มีสารมาตรฐานที่เหมาะสม อาจใช้สารอื่นที่มิใช่เป็นส่วนประกอบในยาสมุนไพรนั้นแต่มีค่า R_f value ใกล้เคียงกันกับสารสำคัญในตัวยาเป็นสารเปรียบเทียบ (marker) แทน เช่น ในการตรวจกระเทียมใช้ L-methionine เป็นสารเปรียบเทียบและกำหนดค่า relative R_f value (RR_f) แทน การตรวจหาจุดหรือแถบที่ได้หลังจากการ develop โดยทั่วไปจะส่องด้วยแสง ultraviolet ช่วงคลื่นสั้น 254 mm หรือช่วงคลื่นยาว 366 mm จากนั้นจะนำไปพ่นด้วยสารเคมีหรืออังด้วยไอโอดีนหรือแอมโมเนีย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารประกอบในยาสมุนไพรที่ต้องการตรวจ เช่น การตรวจสอบสารประกอบ triterpenoid ในบัวบก เมื่อพ่นสารละลาย anisaldehyde จะเป็นจุดสีม่วง ในบางครั้งจะตรวจสอบสารบางชนิดในสมุนไพรนั้นได้โดยการส่งด้วยแสง ultraviolet ในช่วงคลื่นยาวหลังจากพ่นด้วยสารเคมีบางประเภท เช่น สารละลาย aluminium chloride ในการตรวจสอบสารประกอบ

phenols ในการเลือกใช้ spaying reagent และตัวทำละลาย ควรหลีกเลี่ยงการใช้สารที่มีพิษ เช่น สารก่อมะเร็ง (carcinogens) เนื่องจากนักวิเคราะห์มีโอกาสที่จะสัมผัสและสูดดมไอระเหยของตัวละลายเหล่านั้นในระหว่างการทดสอบ ประกอบกับปริมาณของตัวทำละลายที่ใช้มากกว่าการทดสอบประเภทอื่นๆจึงมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเกิดอันตรายจากตัวทำละลายเหล่านั้น

Tests การทดสอบที่นอกเหนือไปจากวิธีการตรวจเอกลักษณ์ที่ระบุไว้ใน monograph นั้นมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ได้แก่

1) เพื่อตรวจสอบสารเจือปน (impurities) หรือสารปลอมปน (adulterants) ตลอดจนสารปนเปื้อน (contaminants) ที่อาจปะปนมาในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การผลิต และระหว่างการเก็บรักษา การเจือปนเหล่านี้อาจจะมาจากดิน ทราย หรือเป็นสารตกค้างเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลงในปริมาณมากเกินไป ตัวอย่างของการทดสอบ เช่น Foreign matter, Ash, Heavy metals

2) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติอื่นๆ เฉพาะตัวของยาสมุนไพรนั้นๆ ที่จำเป็นต้องระบุไว้ เพื่อให้ทราบว่ายาสมุนไพรดังกล่าวมีคุณภาพเหมาะสมเพียงใด ตัวอย่างการทดสอบ เช่น Swelling index, Loss on drying, water content

Foreign matter พืชสมุนไพรที่มีคุณภาพดีควรปราศจากแมลง เชื้อรา และชิ้นส่วนอื่นๆ ของพืชหรือสัตว์ที่ไม่ต้องการเจือปนมา ถือได้ว่าเป็นสิ่งปลอมปนในตัวยา

- Foreign elements หมายถึง ชิ้นส่วนอื่นๆ ของพืชที่มิได้ระบุไว้ในหัวข้อ definition เช่น monograph ของชุมเห็ดเทศ ระบุให้ใช้ส่วนของใบ ถ้าพบว่ามีรากหรือดอกปนมา ถือได้ว่าเป็นสิ่งปลอมปนในตัวยา

- Foreign matter หมายถึง สารปลอมปนที่มิได้มาจากพืชที่เป็นแหล่งกำเนิด อาจจะเป็นการปลอมปนด้วยสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่ด้อยคุณภาพกว่าหรือเป็นอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของสัตว์ เช่น ขาหรือปีกแมลงสาบ และในบางครั้งเป็นสารอื่นๆ เช่น ก้อนกรวด หรือก้อนหิน

ในการระบุค่าอาจจะกำหนดค่า รวมทั้ง foreign elements และ foreign matter เช่น กำหนดว่าไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก หรือแยกค่าระหว่าง foreign elements และ foreign matter เช่น กำหนดให้มีปริมาณหัวกระเทียมผ่อไม่เกินร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก และสารปนปลอมอื่นๆ ไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก

Ash เป็นการทดสอบวิธีหนึ่งในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยาสมุนไพรว่ามีสารเจือปนหรือมีการปลอมปนสารอื่นๆ มาในตัวยานั้นหรือไม่ ในพืชสมุนไพรนั้น ส่วนที่เป็น physiological ash เป็นเถ้าที่มาจากพืชโดยตรง อาจเป็นผลึกของ calcium oxalate ที่พบในพืชหลายชนิด เช่น ใบสวาด ใบชุมเห็ดเทศ สำหรับเถ้าอีกประเภทหนึ่งซึ่งเรียกได้ว่า non-physiological ash เป็นเถ้าที่ได้จากสารอื่นๆ ที่มิใช่พืช เช่น ดิน ทราย ซึ่งอาจติดมาจากการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสม หรือจงใจปลอมปนเพื่อประโยชน์ทางการค้า โดยทั่วไปการหาปริมาณ ash แบ่งได้เป็น 4 ประเภท คือ

1) Total ash เป็นเถ้าที่ได้หลังจากเผาตัวยาที่อุณหภูมิ (450°C - 800°C) ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยกำหนดให้เผาที่อุณหภูมิไม่เกิน 450°C (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007) การหาปริมาณเถ้าวิธีนี้

เหมาะกับตัวยาและสมุนไพรที่มีสารอนินทรีย์ชนิด non-volatile เช่น wax และสมุนไพรที่มีปริมาณ calcium oxalate น้อยมาก เช่น ขิง ในการเผาถ้าได้เถ้าสีขาว จะแนะนำให้ละลายเถ้าดังกล่าวในน้ำ หรือสารละลาย ammonium carbonate ซึ่งเป็นตัวออกซิไดส์ก่อนที่จะนำไปกรองและนำน้ำยาที่กรองได้มาระเหย และเผาอีกทีจนได้เถ้าสีขาว การเพิ่มอุณหภูมิในการเผาควรเพิ่มทีละน้อยเพื่อมิให้เกิด graphite carbon ซึ่งถูกออกซิไดส์ได้ยากมาก สำหรับการทดสอบนี้ ในปัจจุบัน ปริมาณ total ash ที่พบในพืชเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากการใช้สารเคมีในการเพาะปลูกพืช

2) Surfated ash เป็นเถ้าที่ได้จากการเผาตัวยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง (550°C - 800°C) ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย กำหนดให้เผาที่อุณหภูมิประมาณ 800°C (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007) วิธีการทดสอบนี้ใช้ควบคุมปริมาณสารอนินทรีย์ชนิด non-volatile ที่เจือปนในสารอินทรีย์ การกำหนดให้เตรียม ammonium carbonate จะช่วยทำให้เป็นกลาง (neutralize) จากกรดซัลฟิวริกที่เหลืออยู่ เมื่อตัวอย่างเกิดการเผาไหม้แล้วจะคงเหลือเกลือซัลเฟตของสารอนินทรีย์ที่ไม่ระเหยหรือเกลือที่คงทนที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น วิธีนี้ให้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรง (precise) และทำซ้ำได้ (reproducible) ดีกว่าการเผาแบบธรรมดาในปัจจุบันพบว่าปริมาณ sulfated ash ในสมุนไพรเพิ่มขึ้นเนื่องจากการใช้ปุ๋ยเคมีเช่นกัน

3) Acid-insoluble ash เป็นเถ้าที่ได้จากการต้ม total ash หรือ sulfated ash กับกรดเกลือชนิดเจือจาง จากนั้นกรองแล้วล้างตะกอนที่เหลือและนำไปเผาจนได้เถ้าที่มีน้ำหนักคงที่ วิธีการทดสอบนี้เป็นการตรวจสาร non-volatile ที่ปนเปื้อนมากับตัวยา เช่น ดิน ทราย siliceous earth สิ่งเหล่านี้มักจะปนมากับรากหรือเหง้า แต่อาจจะพบว่ามีผสมมากับใบไม้ได้เช่นกัน ถ้าการเก็บพืชสมุนไพรนั้นไม่เหมาะสม ค่าที่กำหนดในตำรายาส่วนใหญ่จะไม่เกินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ยกเว้นพืชสมุนไพรที่มี silicic acid

4) Water-soluble ash เป็นค่าความต่างระหว่างปริมาณของ total ash และเถ้าที่เหลือหลังจากต้ม total ash กับน้ำ สำหรับ ash ประเภทนี้ จะปรากฏในตำรายาของประเทศไทยใน monograph ของ Ginger ทั้งนี้เพื่อใช้แยกขิงที่สกัดด้วยน้ำแล้วจากขิงสด

ในตำรับยาจะกำหนด Total ash หรือ Sulfated ash ควบคู่ไปกับ Acid-insoluble ash เพื่อเป็นการควบคุมสารอนินทรีย์ที่อาจเจือปนมาในตัวยาหรือที่มีอยู่ตามธรรมชาติในตัวยานั้นๆ

Loss on drying การควบคุมปริมาณความชื้นในตัวยาสมุนไพรเป็นสิ่งที่จำเป็น เนื่องจากความชื้นที่มากเกิน อาจทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเชื้อราจุลินทรีย์ และเกิดการสลายตัวของยาได้ง่าย สำหรับ Loss on drying เป็นการทดสอบเพื่อหาปริมาณความชื้นและสารระเหยอื่นๆ ที่ระเหยได้ ณ อุณหภูมิที่ระบุโดยอุณหภูมิที่ใช้ส่วนใหญ่เท่ากับ 100°C - 105°C (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007) ดังนั้นสมุนไพรที่ทนต่อความร้อนสูงประมาณ 105°C จะทดสอบโดยวิธีนี้ได้ อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวอย่างสำหรับยาสมุนไพรจะกำหนดไว้สูงกว่าตัวยาเคมี เพราะความสม่ำเสมอของตัวอย่างจะน้อยกว่า ตำรายาของประเทศไทยและตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007) กำหนดจำนวนตัวอย่างสำหรับตัวยาสมุนไพร เท่ากับ 2-5 กรัม ในขณะที่ตัวยาเคมีใช้เพียง 1 กรัม

Assay โดยธรรมชาติของยาสมุนไพรนั้นจะประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดในปริมาณที่ต่างกันและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารดังกล่าว อาจจะแตกต่างกันไปโดยการเสริมฤทธิ์หรือต้านฤทธิ์ในบางโอกาส จึงเป็นเรื่องยากที่จะสรุปว่าสารใดในตัวยาเหล่านั้นที่เป็นส่วนประกอบหลัก (major constituents) ในกรณีที่มีวิธีทำให้สมุนไพรที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่สูงมาก และเครื่องกลั่นประเภทนี้จะลดความผิดพลาดเนื่องจากการระเหยของน้ำมันหอมระเหยในระหว่างกลั่นได้ดี เพราะทุกชิ้นส่วนของเครื่องกลั่นเชื่อมต่อกันเป็นเครื่องเดียวกัน สำหรับเครื่องกลั่นสำเร็จแบบแยกส่วน มีข้อดีที่โครงสร้างง่ายกว่าและทำความสะอาดได้ง่าย เพราะ condenser จะถูกแยกเป็นอีกส่วน มีข้อดีที่โครงสร้างง่ายกว่าและทำความสะอาดได้ง่ายเพราะ condenser จะถูกแยกเป็นอีกส่วนหนึ่ง สำหรับตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย จะใช้เครื่องกลั่นสำเร็จรูป แบบแยกส่วน เพราะสมุนไพรที่ได้รับการคัดเลือกไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยนั้นมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกันมาก และมีความสม่ำเสมอของตัวอย่างน้อยมาก ดังนั้นเพื่อช่วยลดความผิดพลาดในการสุ่มตัวอย่าง จึงควรใช้ปริมาณตัวอย่างมากขึ้น โดยเครื่องกลั่นนั้น จะมีหลอดแก้ววัดปริมาตรขนาด 4 มิลลิลิตร และกำหนดให้ใช้ xylene เติมลงในหลอดแก้ววัดปริมาตรเพื่อเป็นตัวนำพา (entrainer) ให้น้ำมันลอยอยู่เหนือน้ำ ในการกลั่นต้องระบุน้ำหนักของตัวอย่างให้สัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่วัดได้ในหลอดแก้ววัดปริมาตร และจำเป็นต้องระบุความละเอียดของผงยาที่จะกลั่นด้วย สมุนไพรที่มีลักษณะแข็ง เช่น เปลือก รากหรือเหง้า ควรบดหยาบก่อนกลั่น พืชที่มีใบหนา ควรทุบเบาๆ หรือหั่นละเอียด สมุนไพรที่ประกอบด้วยดอกกลีบบางหรือใบบาง ควรกลั่นทั้งดอกหรือใบ เช่น ไพล กำหนดไว้ว่าให้ใช้ผงหยาบ (coarse powder) กะเพราแดง ใช้ทั้งใบขยี้ (hand-crushed) ก่อนนำมากลั่น distillation liquid ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นน้ำกลั่นในปริมาณ 5-10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่างสมุนไพร เพื่อให้ท่วมตัวยา ตัวอย่างบางชนิดอาจเกิดฟองในขณะต้ม จำเป็นต้องใช้สาร antifoam เช่น silicone 1-2 หยด เติมลงในภาชนะที่ใช้กลั่น และปริมาณของ xylene ที่เพียงพอด้วย

Extractive เป็นการทดสอบหาปริมาณสารสกัดที่ได้จากสมุนไพร เมื่อใช้ตัวทำละลายต่างกัน วิธีนี้จะกำหนดไว้สำหรับตัวยาสมุนไพรที่ไม่มีวิธีวิเคราะห์ทางเคมีหรือชีววิทยาที่เหมาะสมในการหาปริมาณสารสำคัญในตัวยาดังกล่าว การเลือกใช้ตัวทำละลายจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารสำคัญและส่วนประกอบอื่นๆในตัวยาสามารถละลายได้มากน้อยเพียงใดในตัวทำละลายนั้น เช่น

Water-soluble extractive จะเป็นสารจำพวก glucose, Mucilage, และ pectin

Ethanol-soluble extractive จะเป็นสารจำพวก Ketones, alcohol, ผลึก calcium oxalate

Chloroform-soluble extractive จะเป็นสารจำพวก Anthraquinoine, resin และ glycosides

ในตำรายามาตรฐานสมุนไพรกำหนดการหาสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ water, ethanol, chloroform และ hexane วิธีการสกัดมีทั้งวิธีที่ใช้ความร้อน (hot extractive)และการความเย็น (cold maceration) ขึ้นอยู่กับลักษณะของยาสมุนไพรแต่ละชนิด การสกัดโดยใช้ความร้อนมีข้อดีที่ประหยัดเวลา แต่ไม่เหมาะกับการหา Water soluble extractive ในตัวอย่างที่มี starch หรือ mucilage จำนวนมาก ในการสกัดโดยใช้ความร้อนจะอาศัยหลักการ percolation และการใช้เครื่องสำเร็จ สำหรับการสกัดอย่างต่อเนื่อง (continuous extraction) ซึ่งจะประหยัดเวลาและมีประสิทธิภาพกว่าการสกัดแบบ cold

maceration เนื่องจากเป็นการกลั่นแบบไหลกลับ reflux ดังนั้นตัวทำละลายจะถูกกลั่นและนำกลับมาใช้ได้อีก ทำให้ตัวทำละลายใหม่ๆไหลผ่านตัวยาอยู่ตลอดเวลา สำหรับการใช้ ethanol เป็นการทำละลายในการสกัดนั้น อาจใช้ความแรงต่างกันในบางโอกาส จะใช้ 50 % Ethanol แต่โดยทั่วไปแล้วจะหมายถึง Ethanol ซึ่งมีความแรงเป็น 95%

สำหรับวิธี Water soluble extractive และ Ethanol –soluble extractive ในตำรายาของประเทศไทย ใช้วิธี Cold maceration ในขณะที่วิธีของ hexane –soluble และ chloroform –soluble extractive ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยใช้วิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อน

Packaging ard storage การเก็บรักษาตัวยาให้คงสภาพเดิมได้นานเพื่อให้ยานั้นมีความคงตัวทั้งในด้านกายภาพ ตลอดจนฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยาภาชนะบรรจุ (Container) ที่แนะนำในการเก็บยาสมุนไพรนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวยา แต่ละชนิดส่วนใหญ่จะระบุให้ใช้ภาชนะปิดสนิท Well – closed container) เท่านั้นเพื่อให้ปลอดจากฝุ่นผง และแมลง การแนะนำให้ใช้ภาชนะปิดสนิทที่กันความชื้นได้ (tightly closed container) อาจทำให้ยานั้นขึ้นราได้ง่ายถ้าตัวยาไม่แห้งจริง

Category รายละเอียดที่ระบุไว้ในหัวข้อ "Category" นั้นเป็นการให้ข้อมูลสำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของยาสมุนไพรในแต่ละ monograph

วิธีตรวจสอบเอกลักษณ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography fingerprint, TLC fingerprint) (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2551)

วิธีตรวจสอบโดยเอกลักษณ์โครมาโทกราฟแบบชั้นบาง เป็นวิธีทางโครมาโทกราฟีประเภทหนึ่ง ที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และให้ผลที่ให้ผลที่มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ เป็นวิธีที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพรหรือเครื่องยา และหาปริมาณสารสำคัญได้ โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างของสมุนไพรหรือเครื่องยาที่ถูกต้อง หรือสารมาตรฐาน โดยพิจารณาเอกลักษณ์ของโครมาโตแกรม ทั้งรูปแบบตลอดจนสีและตำแหน่งของแต่ละแถบ ตำแหน่งของแถบสารบันทึกในค่า Rf ซึ่งเป็นค่าของระยะทางของแถบที่เคลื่อนที่ไปหรือระยะทางของวัฏภาคเคลื่อนที่เคลื่อนที่ไป หลักการของวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบางเป็นวิธีการแยกสาร โดยอาศัยกลไกในการแยกแบบ partition และ adsorption ของ 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่ที่นิยมใช้ ได้แก่ ซิลิกาเจล (silica gel) อะลูมินา (alumina) หรือ เซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นแผ่นเคลือบบนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบ ได้แก่ แก้ว อะลูมิเนียม หรือแผ่นพลาสติก ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่จะเป็นสารผสมของตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งในกรณีที่วัฏภาคคงที่เป็นสารที่มีขั้ว วัฏภาคเคลื่อนที่จะเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanal เป็นต้น การตรวจสอบเอกลักษณ์โครมาโทกราฟีแบบชั้นบางทำได้โดยตรวจสอบทางกายภาพ คือ การดูด้วยตาเปล่า หรือภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตทั้งความยาวคลื่นสั้น (254 นาโนเมตร) และคลื่นยาว (366 นาโนเมตร) และตรวจสอบทางเคมีด้วยน้ำยาพ่น ตัวอย่างเช่น น้ำยา anisaldehyde/ H_2SO_4 จะให้ผลบวกเป็นสีม่วง ม่วงน้ำเงินและสีเขียว กับสารกลุ่ม terpenoids และ สารกลุ่ม long chain hydrocarbons ส่วนน้ำยาพ่น phosphomolybdic acid จะให้ผลบวกเป็นสีเทา-ดำ

วิธีตรวจสอบเอกลักษณ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC fingerprint) (Khatoon et al., 2006) ได้มีการศึกษาทางเภสัชเวท (pharmacognostic) ใน *Phyllanthus* species 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Phyllanthus amarus*, *P. fraternus* และ *P. maderaspatensis* โดยมีการศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร (Indenfication) โดยวิธี TLC มีวิธีการดังนี้ การสกัดสารโดย นำผงสมุนไพรทั้ง 3 สายพันธุ์ ปริมาณ 2 กรัม ใช้เมทานอล (methanol) ปริมาณ 10 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลาย ใน waterbath เป็นเวลาครั้งละ 25 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman ขนาด 25 มม. × 100 มม. จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วย Evaporating dish จากนั้นจึงนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน (Khatoon et al., 2006)

นำสารมาตรฐาน phyllanthin และ hypophyllanthin ปริมาณ 1 mg ใส่ใน volumetric flask ละลายด้วยสารละลายเมทานอล (methanol) มาตรฐาน Analytical grade ปริมาตร 1 ml

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสำคัญโดยวิธี TLC (Khatoon et al., 2006)

ใช้สารสกัดจากผงของพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. amarus* (PA), *P. fraternus* (PF) และ *P. maderaspatensis* (PM) จากนั้น Spot ลงบนแผ่น TLC silica gel G_{60} F_{254} Merck glass plate (10 cm×10 cm) Spot สารมาตรฐาน phyllanthin(R1) และ hypophyllanthin(R2) ที่เตรียมไว้ ลงบนแผ่น TLC และสารสกัดพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ลงในแผ่นเดียวกัน โดยใช้ solvent system คือ toluene : ethyl acetate (85:15) v/v ทิ้งไว้สักครู่ให้ solvent system ชะผ่านจุดสาร spot ได้ระยะทางที่กำหนด หลังจากนั้นนำไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อเปรียบเทียบกับแถบอ้างอิง คือ R1 และ R2 จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde sulphuric acid นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที ได้ผล ดังภาพประกอบที่ 2.3 (Khatoon et al., 2006)

ภาพประกอบที่ 2.3 TLC fingerprint ของ *P. amarus* (PA) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน phyllanthin

2.6 เทคนิค TLC densitometry

การทำ TLC ซึ่งใช้เครื่อง TLC-densitometry ที่สามารถตรวจวัดปริมาณของสารที่อยู่บนแผ่น TLC หรือpaper chromatograph โดยใช้หลักการ scan ตามความเข้มของการดูดกลืนแสง/เรืองแสงของ band ที่

ปรากฏบนแผ่น TLC แล้วแปลงสัญญาณเป็น densitogram ช่วยให้การวิเคราะห์/แยกสารด้วยเทคนิค TLC มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

การหาปริมาณสาร Phyllanthinโดยใช้เทคนิค TLC densitometry (Pakabhorn, 2015)

การสกัดสารในลูกใต้ใบ (*P. amarus*) ปริมาณ 10 กรัม กลั่นด้วยตัวทำละลาย methanol ปริมาณ 500 มิลลิลิตรในอุปกรณ์ Soxhlet apparatus เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 $^{\circ}$C จากนั้นละลายด้วยเมทานอล (methanol) 15 mg/mL อีกครั้งกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm จากนั้นจึงนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน (Pakabhorn, 2015)

นำสารมาตรฐาน Phyllanthin ปริมาณ 0.2, 0.4, 1, 1.5 และ 2 mg/mL ใส่ใน volumetric flask ละลายด้วยสารละลายเมทานอล (methanol) มาตรฐาน HPLC grade ปริมาตร 5 ml จะได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Phyllanthin 1, 2, 5, 7.5, and 10 µg/spot ตามลำดับ

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสำคัญโดยเครื่อง TLC – densitometry (Pakabhorn, 2015)

ใช้สารมาตรฐาน Phyllanthin ละลายในเมทานอลอัตราส่วนต่างๆ จากนั้น spot สารละลายกับสาร standard ลงบนแผ่น TLC โดยใช้ตัวทำละลาย hexane-EtOAc-MeOH-formic acid (7:3:0.2:0.3,v/v/v/v) เป็น mobile phase และนำไปแผ่น TLC วางใน TLC chamber นาน 30 นาที เหนือ mobile phase 10 mm. จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ Phyllanthin โดยใช้เครื่อง TLC-densitometry จะได้ค่า phyllanthin content (% w/w)

การวิเคราะห์ปริมาณสาร Phyllanthin โดยวิธี TLC densitometry (นพมาศ, 2551)

การกำหนดพารามิเตอร์ของเครื่องเดนซิโทมิเตอร์

การกำหนดค่าความยาวคลื่นแสงที่จะใช้ จะเลือกตามความยาวคลื่นแสงที่สารเป้าหมายสามารถดูดกลืนได้มากที่สุด (λ_{max}) เพราะจะทำให้การวิเคราะห์มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (Selectivity) มากที่สุด หากไม่ทราบค่าดังกล่าว สามารถใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 254 หรือ 210 นาโนเมตร เนื่องจากสารส่วนมากจะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงนี้ได้ แต่ความไวและความจำเพาะของการวิเคราะห์จะลดลง นอกจากนี้ การกำหนดความเร็วในการเคลื่อนที่ของแผ่น TLC ภายใต้ลำแสง(Scan speed) หากกำหนดช้า จะให้เดนซิโทแกรมที่ดีกว่า แต่จะทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์

การสร้างกราฟมาตรฐาน (นพมาศ, 2551)

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น หยดลงแผ่น TLC และพัฒนาเป็นโครมาโทแกรมตามระบบที่พัฒนาขึ้น นำไปตรวจวัด และแสดงผลเป็นเดนซิโทแกรม หาพื้นที่ใต้กราฟ หรือความสูงของพีคด้วยโปรแกรมประมวลผลของเครื่องเดนซิโทมิเตอร์ หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานต่อจุดกับพื้นที่ใต้กราฟหรือความสูงของพีค แสดงเป็นกราฟ หรือสมการมาตรฐาน โดยทั่วไปพื้นที่ใต้กราฟจะมีความเหมาะสมกว่าการใช้ความสูงของพีค แต่ความสูงของพีคจะให้ผลดีกว่าหากพีคของสารเป้าหมายแยกจากสารอื่นได้ไม่ดี

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีการสกัดสาร phyllanthin

จากการศึกษาของ Sonia Verma และ Reena Hooda (2016) ได้ทำศึกษาการสกัดสาร Phyllanthin จากลูกใต้ใบ (*P. amarus*) 2 วิธี ได้แก่

1. **วิธีการหมัก (Maceration)**

หมักผงสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบน้ำหนัก 10 กรัม ในสารละลาย เมทานอล ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นทิ้งไว้เป็นเวลานาน 7 วันนำสารที่ได้มากรองและนำไปคำนวณร้อยละผลได้ของน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้

2. **วิธีการสกัดแบบ Soxhlation**

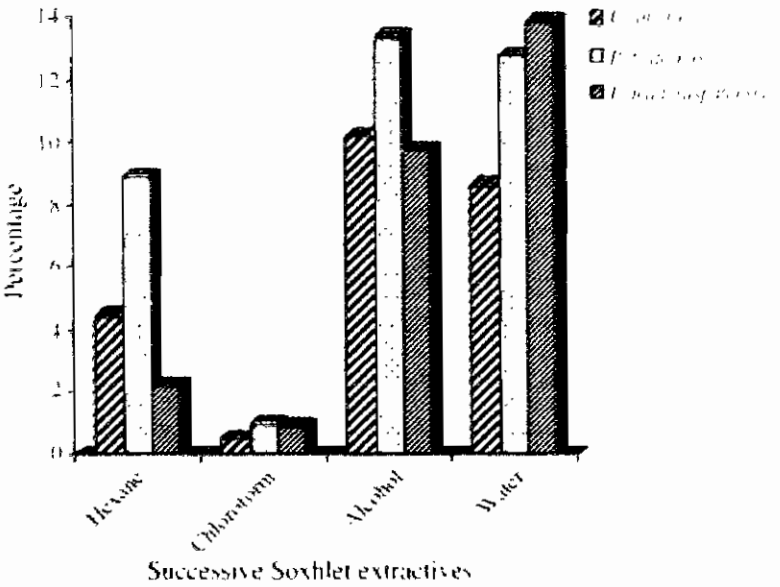
ชั่งผงแห้งของลูกใต้ใบน้ำหนัก 10 กรัม ละลายในสารละลายเมทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร ใน soxhlet apparatus ทำการกลั่นสารเป็นเวลาทั้งหมด 3 ชั่วโมง นำสารที่ได้มากรองเอาตะกอน และนำไประเหยแห้งที่อุณหภูมิ 40°C และนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปคำนวณร้อยละผลได้ของน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้จากสูตร

The percentage yield of extract = (weight of extract/weight of drug taken) × 100

จากผลการศึกษาพบว่าการสกัดสารทั้งสองวิธีนั้นให้ผลแตกต่างกันดังนี้

วิธีการสกัด	Yield of phyllanthin (%w/w)	Yield of extract (%w/w)
วิธีการหมัก (Maceration)	0.023	14
วิธีการสกัดแบบ Soxhlation	0.026	6

การสกัดสารในลูกใต้ใบโดยตัวทำละลาย (S. Khatoon et al., 2005) ได้ทำการสกัดพืชในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล *Phyllanthus* ทั้งสิ้น 3 ชนิด ในตัวทำละลายดังนี้ Hexane, Chloroform, Alcohol, Water



ภาพประกอบที่ 2.4 แผนภาพแสดงร้อยละของสารสกัดหยาบของ *Phyllanthus* spp.ที่ได้โดยวิธี Soxhlet apparatus เมื่อใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน (S. Khatoon et al., 2006)

จากการศึกษานี้พบว่าพืชที่นำมาสกัดทั้ง 3 สายพันธุ์รวมทั้ง ลูกใต้ใบ (*P. amarus)* ที่มีในการศึกษานี้นั้นพบว่าในสารละลาย Alcohol ให้ปริมาณของสารสกัดหยาบออกมาได้มากที่สุด (ร้อยละ13) และรองลงมาคือตัวทำละลายน้ำ

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการรักษาโรคตับอักเสบ

มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ 3 ชนิดได้แก่ *P. virgatus, P. amarus* และ *P. urinaria* โดยทำการวิเคราะห์หาสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในสารสกัด แล้วทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดทั้งสามชนิด จากการตรวจหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัด 50% เมธานอล พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าสารสกัดจาก *P. urinaria* และ *P. amarus* เมื่อทำการทดสอบโดยใช้วิธี DPPH free radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาบจาก *P. virgatus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของ linoleic acid system ได้ดีที่สุดอีกด้วย และเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดลูกใต้ใบต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยวิธี MTT และ trypan blue พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 มากกว่าสารสกัดจาก *P. amarus* และ *P. urinaria* ซึ่งสามารถยืนยันได้จากภาพถ่ายที่แสดงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เมื่อนำสารสกัดที่มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 500 µg/mL มาทดสอบหาอัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ด้วยการใช้ Clark oxygen electrode พบว่าสารสกัดจาก *P. virgatus* กระตุ้นให้เซลล์มะเร็ง HepG2 มีการใช้ออกซิเจนมากที่สุด เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นออร์กา[illegible]ที่สำคัญที่สุดในการใช้ออกซิเจนของเซลล์ ผลการศึกษานี้จึงชี้แนะว่าความเป็นพิษของสารสกัด

จากลูกใต้ใบต่อเซลล์มะเร็งอาจมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งนาจะมีการศึกษาในรายละเอียดให้ลึกซึ้งต่อไป (นวลน้อย, 2555)

การศึกษา randomized trials ทั้งหมด 16 การศึกษา มีผู้เข้าร่วมทั้งสิ้น 1,326 คน ซึ่งใน 1 การศึกษาได้ทำการเปรียบเทียบผู้ป่วยทั้งหมด 42 รายที่ได้รับการรักษาด้วยสมุนไพรลูกใต้ใบกับยาหลอกพบว่าอาการที่เกิดระหว่างเริ่มรับเชื้อไปจนถึงจุดเกิดภูมิคุ้มกัน (HBeAg seroconversion) นั้นไม่แตกต่างกัน (risk ratio (RR) 0.9; 95% (confidence intervals) CI 0.73–1.25] or follow-up (RR 1.00; 95% CI 0.63–1.60) และอีก 15 การศึกษาได้ศึกษาผู้ป่วยที่ได้รับสมุนไพรลูกใต้ใบ *P. amarus* ร่วมกับยาต้านไวรัส เช่น IFN-α, lamivudine, adefovirdipivoxil, thymosin และ vidarabine เป็นต้น เปรียบเทียบกับการได้รับยาต้านไวรัสเพียงอย่างเดียวพบว่าลูกใต้ใบมีผลต่อ serum HBV DNA, serum HBeAg และ HBeAg seroconversion อย่างมีนัยสำคัญของ (Xia et al., 2011)

การศึกษาแบบ systematic review of randomized clinical trials ในด้านประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ระหว่างการใช้พืชในจีนัส *Phyllanthus* เปรียบเทียบกับยาหลอก และการรักษาด้วยอินเตอร์เฟียรอน ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง พบว่าการใช้พืชในจีนัส *Phyllanthus* ได้ผลดีกว่าเมื่อตรวจดู serum HBsAg ในผู้ป่วยเมื่อเทียบกับยาหลอก แต่ผลต่อ serum HBsAg, HBeAgและ HBV DNA ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการรักษาด้วย อินเตอร์เฟียรอน แต่ก็มีการศึกษาที่ให้ พืชในจีนัส *Phyllanthus* ร่วมกับ อินเตอร์เฟียรอนและได้ผลดีกว่าการให้ อินเตอร์เฟียรอนเพียงอย่างเดียวโดยใช้ระดับ HBeAg เป็นตัวชี้วัดในผู้ป่วย (Liu et al.,2001)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัย

การดำเนินการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experiment research) เพื่อจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ โดยการเก็บตัวอย่างแท้ (authentic samples) สมุนไพรชนิดละ 3 แหล่งรวมเป็น 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ดและจังหวัดขอนแก่น ส่วนตัวอย่างสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้จากร้านขายยาสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อลูกใต้ใบเท่านั้น จำนวน 5 แหล่ง เป็น 5 ตัวอย่าง ได้แก่ จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร ระยอง นครราชสีมา ขอนแก่นและจังหวัดมหาสารคาม โดยจัดทำตามมาตรฐานของ Thai Herbal Pharmacopoeia ซึ่งผู้วิจัยได้แบ่งตามหัวข้อต่างๆ ดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างสมุนไพร (authentic specimens)

3.2.2 มาตรฐานสมุนไพร

3.2.3 การตรวจสอบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

3.2.4 การหาปริมาณสาร Phyllanthin

3.3สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

3.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ

- TLC Siliga gel 60 F_{254} aluminum plates (Merck, Germany)
- เครื่อง TLC densitometer (Camag TLC scanner 3, reprostar 3, limonat 5, Switzerland)
- Spectrophotometer (Camag, Switzerland)
- Microscope (Primo Star, ZEISS)
- Shanking Incubator (Model JSSI100C, Korea)
- เตาเผาอุณหภูมิสูง (Dentsply Prosthetics, USA.)
- Evaporating dish
- Flask
- Be

- Hot air oven (Contherm thermotec2000 , Switzerland)
- เครื่องบดสมุนไพร (WF-20B, China)
- Filter paper Whatman™ No.1
- กระดาษกรอง 0.45 µm
- funnel
- Cylinder
- Crucible
- Pipette
- Aluminum foil
- Stand and O-ring
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (CAMAG, Switzerland)
- เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง (GENIUS, Germany)
- กล้องจุลทรรศน์
- cover slip
- สไลด์กระจก
- TLC tank (CAMAG, Switzerland)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Phyllanthin standard (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethyl acetate (Marck, Germany)
- toluene (Marck, Germany)
- Methanol (Marck, Germany)
- Chloroform (Marck, Germany)
- Hydrochloric acid
- 75% chloral hydrate
- Anisaldehyde sulphuric acid

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 มาตรฐานสมุนไพร

3.2.2.1 ตัวอย่างสมุนไพร

เป็นการเก็บตัวอย่างแท้ (authentic samples) ชนิดละ 3 แหล่งรวมเป็น 6 ตัวอย่าง ในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น และร้อยเอ็ด ส่วนตัวอย่างสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้จากร้านขายยาสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อลูกใต้ใบเท่านั้น ดังตารางที่ 3.1

ตาราง 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างสมุนไพร

สมุนไพร	แหล่งที่เก็บ	
	ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ
ตัวอย่างแท้ (authentic samples)	มหาสารคาม (PA1)	มหาสารคาม (PU1)
	ขอนแก่น (PA2)	ขอนแก่น (PU2)
	ร้อยเอ็ด (PA3)	ร้อยเอ็ด (PU3)
ตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ลูกใต้ใบ	กรุงเทพฯ (S1)	
	ระยอง (S2)	
	นครราชสีมา (S3)	
	ขอนแก่น (S4)	
	มหาสารคาม (S5)	

3.2.2 Description of the plant

3.2.2.1 ศึกษาลักษณะภายนอกของพืช ดังนี้

- Morphology of plan สัณฐานวิทยาของพืชประเภท ลักษณะลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด
- Organoleptic character กลิ่น สี รสชาติ
- Macroscopical character ลักษณะที่มองเห็นด้วยตา(เฉพาะส่วนที่ใช้)

3.2.2.2 การศึกษาลักษณะทางจุลทรรศน์

3.2.2.2.1 ศึกษาลักษณะทางจุลทรรศน์ของเครื่องยา

ศึกษาลักษณะทางจุลภาค (Microscopical) ของสมุนไพรที่บดเป็นผง โดยดูลักษณะของเซลล์เนื้อเยื่อหรือสารที่ปรากฏในเนื้อเยื่อ ที่มีลักษณะเฉพาะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำผงยาผ่านแร่งเบอร์ 80 เพื่อนำไปจัดทำเอกลักษณ์ผงยาด้วยเทคนิคทางจุลทรรศน์ โดยหยดน้ำยา 1-2 หยดลงบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยแตะผงยาเล็กน้อย แล้ววางบนสไลด์ จากนั้นทำให้ผงยากระจายตัววาง cover slip ลงในมุม 45° แล้วลากมาแตะกับน้ำยาจนน้ำยาสัมผัสทั่วขอบของ cover slip ที่สัมผัสกับสไลด์ แล้วจึงค่อยๆ ปิด cover slip

3.2.2.2.2 ศึกษาลักษณะทางจุลทรรศน์ของตัวอย่างพืชสด

ศึกษาสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อโดยสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ จากส่วน transverse section และ Longitudinal section

น้ำยาที่ใช้ในการย้อมเพื่อดูลักษณะทางจุลทรรศน์ของผงยา

1. 75% chloral hydrate เพื่อกำจัดคลอโรพลาสต์ แป้ง โปรตีน และสารอื่นๆ ทำให้รูปร่างลักษณะของเซลล์ และเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น ใช้ย้อมดูผนังเซลล์ และใบพืชได้ง่ายขึ้น

2. 2% Iodine ใช้ย้อมดูเม็ดแป้ง โดยเม็ดแป้งจะติดสีม่วง หรือสีน้ำเงิน

3.2.3 Loss on drying (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

1. ชั่งตัวอย่างผงยา 2 กรัมอย่างละเอียด ใส่ภาชนะระเหยแห้ง (evaporating dish) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

2. ทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วทิ้งให้เย็นในภาชะทำให้แห้ง (desiccator) แล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง (อุณหภูมิที่ใช้อบอยู่ในช่วง ± 2°C ของอุณหภูมิที่กำหนด)

3. น้ำหนักครั้งสุดท้าย ลบด้วยน้ำหนักครั้งแรก

4. ความแตกต่างของน้ำหนักที่ได้ เมื่อคำนวณเป็น % w/w จะเป็นค่าปริมาณความชื้นของสารที่ระเหยได้

$$\text{การคำนวณ \% (W/W) ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3.2.4 Foreign matter (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

ทำการสุ่มตัวอย่างสมุนไพรมา 100-500 กรัม ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

1. คัดแยกส่วนที่ต้องการ และไม่ต้องการออกจากกัน แล้วนำไปชั่งน้ำหนักโดยละเอียด

2. คำนวณร้อยละสิ่งแปลกปลอมดังนี้

$$\text{\% สิ่งแปลกปลอม} = \frac{\text{น้ำหนักสิ่งแปลกปลอม}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างสมุนไพรทั้งหมด}} \times 100$$

3.2.5 Total ash (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

1. ผงยา 2-4 กรัม ใส่ในถ้วยเผา (crucible) ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำเข้าเตาเผา ค่อยๆ เพิ่มความร้อน อุณหภูมิไม่เกิน 450°C จนกระทั่งมีสีขาว (แสดงว่าไม่มีคาร์บอนหลงเหลือ)

3. ทำให้เย็นในภาชนะทำให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนักของเถ้าที่เกิดขึ้น

การคำนวณ %(W/W) เถ้า = $\frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \times 100$

3.2.6 Acid-insoluble ash (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

1. เติมกรดเจือจาง (dilute hydrochloric acid) ปริมาตร 25ml ลงในเถ้า แล้วต้มนาน 5 นาที
2. กรองผ่านกระดาษกรองที่ไร้เถ้า
3. ล้างเถ้าที่เหลือด้วยน้ำร้อน จนของเหลวที่ได้มีสภาพเป็นกลาง
4. นำเถ้าและกระดาษกรองไปเผาในเตา ที่อุณหภูมิ 500°C แล้วทำให้เย็นในภาชนะทำให้แห้ง

% w/w = $\frac{\text{น้ำหนักผงของเถ้าหลังเผา}}{\text{น้ำหนักผงยาก่อนเผา}} \times 100$

3.2.7 Ethanol-soluble extractive (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

1. ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียดของตัวอย่างผงยา 5 กรัมใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท
2. เติมเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราวนาน 6 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมงแล้วกรองแบบเร็วแบ่งมา 20 มิลลิลิตร (ตวงปริมาตรอย่างละเอียด)
3. ใส่ในภาชนะระเหยแห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ทำให้แห้งบนหม้ออังไอน้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C
4. ทำให้เย็นในภาชนะทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดจนได้น้ำหนักคงที่
5. คำนวณเป็น % w/w ของน้ำหนักแห้งของผงยาตัวอย่าง

% w/w = $\frac{\text{น้ำหนักผงของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักผงตัวอย่างสมุนไพรก่อนสกัด}} \times 100$

3.2.8 Water soluble extractive (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2007)

1. ชั่งน้ำหนักอย่างละเอียดของตัวอย่างผงยา 5 กรัมใส่ในภาชนะที่ปิดสนิท
2. เติม Chloroform water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราวนาน 6 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมงแล้วกรองแบบเร็วแบ่งมา 20 มิลลิลิตร (ตวงปริมาตรอย่างละเอียด)
3. ใส่ในภาชนะระเหยแห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ทำให้แห้งบนหม้ออังไอน้ำ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C
4. ทำให้เย็นในภาชนะทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของสารสกัดจนได้น้ำหนักคงที่
5. คำนวณเป็น % w/w ของน้ำหนักแห้งของผงยาตัวอย่าง

$$\% \text{ w/w} = \frac{\text{น้ำหนักผงของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างสมุนไพรก่อนสกัด}} \times 100$$

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร (Identification) โดยวิธี TLC

การสกัดสารในลูกใต้ใบและหญ้าโดยตัวทำละลาย (ดัดแปลงจากวิธีของ Khatoon et al., 2006)

นำผงลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ ต้นตัวอย่างแท้ authentic ปริมาณ 0.2 กรัม ทำละลายด้วยเมทานอล (methanol) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไปพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน

นำสารมาตรฐาน Phyllanthin ปริมาณ 1 mg ใส่ใน volumetric flask ละลายด้วยสารละลายเมทานอล (methanol) มาตรฐาน Analytical grade ปริมาตร 1 ml

ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสำคัญโดยวิธี TLC

ใช้สารสกัดจากนำผงของลูกใต้ใบหรือหญ้าใต้ใบต้น authentic samples มา Spot ลงบนแผ่น TLC silica gel G_{60} F_{254} Merck glass plate (10 cm×10 cm) Spot สารมาตรฐาน phyllanthin ที่เตรียมไว้ ลงบนแผ่นTLC และสารสกัดจากลูกใต้ใบหรือหญ้าใต้ใบแห้งจากแหล่งต่างๆ ลงในแผ่นเดียวกัน โดยใช้ Solvent system: toluene: ethyl acetate (85:15) v/v เป็น mobile phase จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 366 นาโนเมตร เพื่อเป็นแถบอ้างอิงสารมาตรฐาน phyllanthin และแถบของสารสกัดจากต้น authentic จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde sulphuric acid นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที

3.4 การหาปริมาณสาร Phyllanthin

การสกัดสารในลูกใต้ใบ

นำผงยาที่ได้ของลูกใต้ใบ หญ้าใต้ใบและตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ ปริมาณอย่างละ 0.025 กรัม นำมาสกัดด้วย วิธีการหมัก (maceration) ใช้เวลาในการหมัก 1 คืน โดยใช้ methanol ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เป็นตัวทำ ละลาย กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง 0.45 µm และนำมาพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

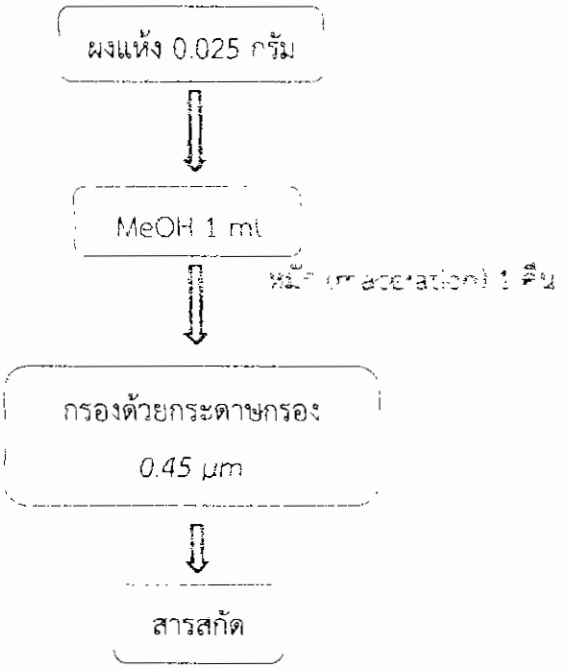
ขั้นตอนการเตรียมสารมาตรฐาน

ใช้สารมาตรฐาน phyllanthin 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นอ้างอิง

ขั้นตอนการสกัดสารตัวอย่างจากพืช

1. นำต้นลูกใต้ใบ/หญ้าใต้ใบที่เก็บได้ มาตากแห้ง และสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบตัวอย่าง จากนั้นบดเป็นผงละเอียด

2. ชั่งน้ำหนักผงแห้งของลูกใต้ใบ/หญ้าใต้ใบที่เก็บได้ และสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบตัวอย่าง อย่างละ 0.025 กรัม และนำมาสกัดตามขั้นตอน ดังนี้



3. ขั้นตอนการวิเคราะห์สารสำคัญโดยเครื่อง TLC–densitometry (ดัดแปลงจาก Pakabhorn et al., 2015)

3.1 การเตรียมสาร

3.1.1 สารมาตรฐาน

ใช้สารมาตรฐาน phyllanthin 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นอ้างอิง

3.1.2 สารตัวอย่าง

ชั่งผงยาที่ได้ของลูกใต้ใบ หญ้าใต้ใบและสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จำนวน 11 ตัวอย่าง อย่างละ 0.025 กรัม ในสารละลายเมทานอล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

Spot สารจากข้อ 3.1.2 ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC โดยใช้ตัวทำละลาย toluene: ethyl acetate (85:15) v/v เป็น mobile phase และนำไปแผ่น TLC วางใน TLC chamber นาน 30 นาทีเหนือ mobile phase 10 mm. จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ phyllanthin โดยใช้เครื่อง TLC-densitometry และบันทึกค่า phyllanthin content (% w/w)

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) และสถิติที่ใช้ในการทดสอบสมมติฐานของการเปรียบเทียบปริมาณสาร phyllanthin ในลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ ได้แก่ Mann-Whitney

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ โดยการเก็บตัวอย่างแท้ (authentic samples) สมุนไพรชนิดละ 3 แหล่งรวมเป็น 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ด และขอนแก่น ส่วนตัวอย่างสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้จากร้านขายยาสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อลูกใต้ใบเท่านั้น จำนวน 5 แหล่งเป็น 5 ตัวอย่าง ได้แก่ จากจังหวัดกรุงเทพมหานคร ระยอง นครราชสีมา ขอนแก่นและจังหวัดมหาสารคาม มาจัดทำมาตรฐานโดยใช้เกณฑ์ตามข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพรไทยใน Thai Herbal Pharmacopoeia

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนรายละเอียด ดังนี้

1. การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ
2. รูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ
3. การหาปริมาณสาร Phyllanthin ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้เทคนิค TLC densitometry

4.1 การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

4.1.1 ลูกใต้ใบ (LOOK TAI BAI)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phyllanthus amarus* หมายเลขพืชอ้างอิง (Herbarium Specimen Number) No.MSU.PH-EUP-PA1-3 (Family Euphorbiaceae)

ชื่อพ้อง : มะขามป้อมดิน (MA-KHAM-POM-DIN), จูเกี๋ยเช่า (JU-KIA-CHAO)

ภาพประกอบ 4.1

ลูกใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม

4.1.1.1 Definition

ส่วนที่ใช้ : ใช้ทุกส่วน

4.1.1.2 Constituent

องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมลูกใต้ใบ (*P. amarus*) ประกอบด้วยสารกลุ่ม Alkaloids เช่น securinine, dihydrosecurinine, tetrahydrosecurinine ส่วนเหนือดินประกอบด้วยสารกลุ่ม Tannins เช่น phyllanthusiin D. geraniine, corilagin, elecarpusin สารกลุ่ม Flavonoids เช่น rutin, quercetin-3-0-glucoside สารกลุ่ม Lignans เช่น phyllanthin, hypo-phyllanthin และสารกลุ่ม Triterpine เช่น ursolic acid, oleanolic acid (Gruenwald et al., 2000)

4.1.1.3 Description of the plant

ลูกใต้ใบ (ภาพประกอบ 4.2-4.4) เป็นพืชล้มลุกวงจรชีวิตสั้น ลำต้นสูง 30-60 ซม. ต้นและกิ่งค่อนข้างกลม ทุกส่วนมีรสขม ใบเดี่ยว เรียงสลับในระนาบเดียวกัน รูปวงรีหรือรูปขอบขนาน กว้าง 3-4 มม. ยาว 5-9 มม. ดอกออกที่ซอกใบ แยกเพศ อยู่บนต้นเดียวกัน เพศเมียเป็นดอกเดี่ยว เพศผู้ออกเป็นกระจุก สีนวล ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ กลม ผิวเรียบหรือมีพูบ้าง

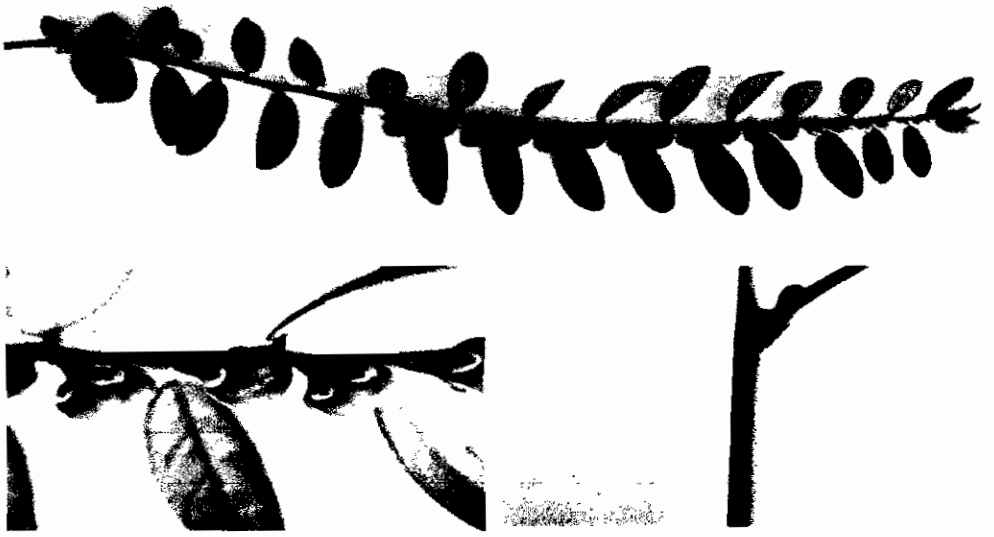
ภาพประกอบ 4.2
ลูกใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม
(PA1)

ภาพประกอบ 4.3
ลูกใต้ใบ แหล่งร้อยเอ็ด
(PA2)

ภาพประกอบ 4.4
ลูกใต้ใบ แหล่งขอนแก่น
(PA3)

4.1.1.4 Description

ลักษณะมหภาคของพืช (Macroscopical character) ต้นและกิ่งค่อนข้างกลม ผลเป็นผลกลม ผิวเรียบหรือมีพูบ้าง ใบเดี่ยว เรียงสลับในระนาบเดียวกัน

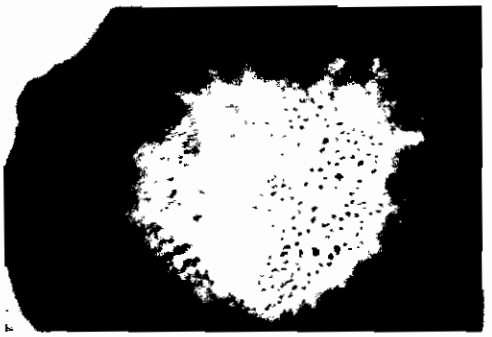


ภาพประกอบ 4.5 ลักษณะมหภาคของลูกใต้ใบ (PA1)

ลักษณะจุลภาคของพืช (Microscopical character)

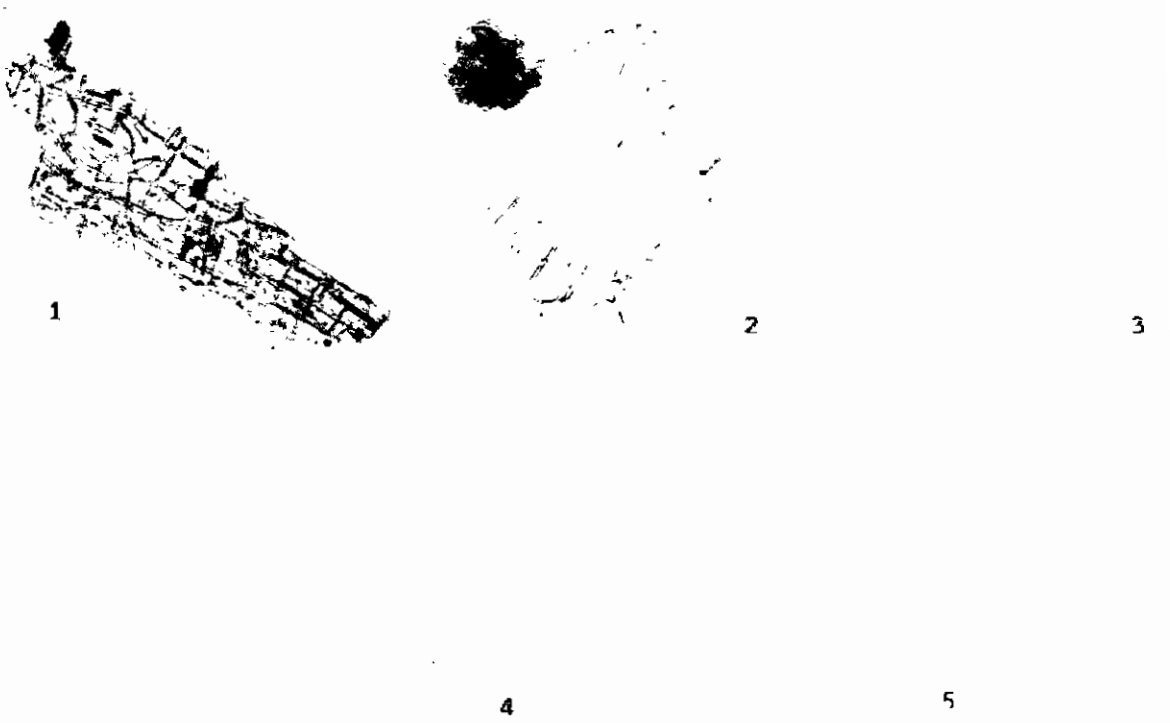
จากการศึกษาลักษณะจุลภาคของลูกใต้ใบ พบเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ Parenchyma cell and stomata, trichomes, fiber and spiral vessel เป็นต้น (ภาพประกอบ 4.6)

การศึกษาภาคตัดขวาง (transverse section) ของลำต้นลูกใต้ใบพบเนื้อเยื่อ parenchyma, phloem, xylem เป็นต้น (ภาพประกอบ 4.6.1-4.6.2)



ภาพประกอบ 4.6.1
ภาพตัดลำต้นตามขวาง (PA1)

ภาพประกอบ 4.6.2
ภาพตัดลำต้นตามยาว (PA1)



ภาพประกอบ 4.7 ลักษณะผงยาของลูกใต้ใบ (PA1)

Parenchyma cell and stomata (1-2) Trichomes (3)

Fiber and spiral vessel (5)

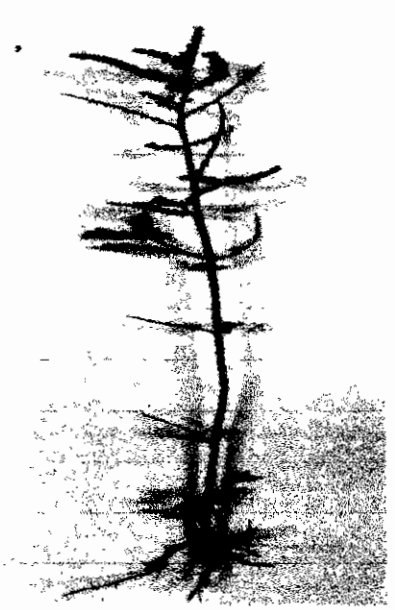
4.1.2 หญ้าใต้ใบ (YAA-TAI-BAI)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Phyllanthus urinaria* หมายเลขพืชอ้างอิง (Herbarium Specimen Number) No.MSU.PH-EUP-PU1-3 (Family Euphorbiaceae)

ชื่อพ้อง : ไฟเดือนห้า (FAI-DUEN-HAA), หมากไข่หลัง (MHAK-KAI-LANG)

ภาพประกอบ 4.8

หญ้าใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม (PU1)



ภาพประกอบ 4.9
หญ้าใต้ใบ แหล่งมหาสารคาม
(PU1)

ภาพประกอบ 4.10
หญ้าใต้ใบ แหล่งร้อยเอ็ด
(PU2)

ภาพประกอบ 4.11
หญ้าใต้ใบ แหล่งขอนแก่น
(PU3)

4.1.2.1. Definition

ส่วนที่ใช้ : ใช้ทุกส่วน

4.1.2.2 Constituent

องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรมหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) ประกอบด้วยสารกลุ่ม Alkaloids เช่น securinine สารกลุ่ม Tannin เช่น corilagin, gallic acid สารกลุ่ม Flavonoids เช่น rutin, quercitrin สารกลุ่ม Triterpenes เช่น methylgallate, β-amyrin สารกลุ่ม Lignans) เช่น phyllanthin, hypo-phyllanthin, niranthin (Bharti et al., 2014)

4.1.2.3 Description

หญ้าใต้ใบ (ภาพประกอบ 4.9-4.11) เป็นพืชไม้ล้มลุกวงจรชีวิต ต้นและกิ่งเป็นเหลี่ยม ลักษณะคล้ายลูกใต้ใบ ส่วนที่แตกต่างคือ ใบรูปขอบขนาน กว้าง 3-5 มม. ยาว 0.5-3 มม. ขอบใบสีม่วงแกมน้ำตาล ผลมี ผิวขรุขระและขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าลูกใต้ใบ

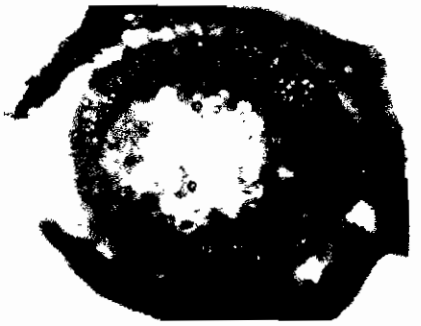
4.1.2.4 Description of the plant

ลักษณะมหภาคของพืช (Macroscopical character) ต้นและกิ่งเป็นเหลี่ยม ผลมีผิวขรุขระ

ภาพประกอบ 4.12 ลักษณะมหภาคของหญ้าใต้ใบ (PU1)

ลักษณะจุลภาคของพืช (Microscopical character)

จากการศึกษาภาคตัดขวาง (transverse section) ของลำต้นหญ้าใต้ใบพบเนื้อเยื่อ parenchyma, phloem, xylem เป็นต้น (ภาพประกอบ 4.13.1-4.13.2)



ภาพประกอบ 4.13.1
ภาพตัดลำต้นตามขวาง (PU1)

ภาพประกอบ 4.13.2
ภาพตัดลำต้นตามยาว (PU1)

การศึกษาลักษณะจุลภาคของหญ้าใต้ใบ พบเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ Part of fiber, boarded pitted and vessel, fiber and spiral vessel trichomes. Tannin containting cell เป็นต้น (ภาพประกอบ 4.14)

ภาพประกอบ 4.14 ลักษณะผงยาของหญ้าใต้ใบ (PU1)

Part of fiber, boarded pitted and vessel (1-2)
Parenchyma cell and stomata (3)
Trichomes (4)
Tannin containting cell (5)

แหล่งที่มาของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

ลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบที่ศึกษาครั้งนี้ได้จากการเก็บตัวอย่างแท้ (authentic samples) ชนิดละ 3 แหล่ง รวมเป็น 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างสมุนไพรแห้งของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้จากร้านขายยาสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดภายใต้ชื่อลูกใต้ใบจำนวน 5 ตัวอย่าง จำนวนทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

สมุนไพร	แหล่งที่เก็บ	
	ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ
ตัวอย่างแท้ (authentic samples)	มหาสารคาม (PA1)	มหาสารคาม (PU1)
	ขอนแก่น (PA2)	ขอนแก่น (PU2)
	ร้อยเอ็ด (PA3)	ร้อยเอ็ด (PU3)
ตัวอย่างสมุนไพรแห้ง	กรุงเทพฯ (S1)	
	ระยอง (S2)	
	นครราชสีมา (S3)	
	ขอนแก่น (S4)	
	มหาสารคาม (S5)	

แหล่งกรุงเทพ (S1)

แหล่งระยอง (S2)

แหล่งนครราชสีมา (S3)

แหล่งขอนแก่น (S4)

แหล่งมหาสารคาม (S5)

ภาพประกอบ 4.15 ตัวอย่างสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบจากร้านยาสมุนไพร

4.2 การทดสอบทางเคมีกายภาพ (Physicochemical)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ โดยรายงานผลการศึกษาในหัวข้อดังต่อไปนี้ Foreign matter, Loss on drying, Total ash, Acid-insoluble ash, Ethanol soluble extractive, Water soluble extractive

4.2.1 Foreign matter

จากการหาปริมาณสิ่งปนปลอม (Foreign matter) พบว่า ตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จากทั้ง 5 แหล่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.42 ± 2.08% โดยตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมามีค่าเฉลี่ยปริมาณสิ่งปนปลอมมากที่สุด และตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยปริมาณสิ่งปนปลอมน้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.2 และสามารถจัดทำข้อกำหนดทางกายภาพเพื่อควบคุมคุณภาพโดยกำหนดเกณฑ์สูงสุดจากค่าเฉลี่ยบวกด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้น กำหนดให้ปริมาณสิ่งปนปลอมของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่เกินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

4.2.2 Loss on drying

จากการหาปริมาณความชื้น (Loss on drying) พบว่าตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จากทั้ง 5 แหล่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.98 ± 1.53% โดยตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคามมีค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้นมากที่สุด และตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้นน้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.2 และสามารถจัดทำข้อกำหนดทางกายภาพเพื่อควบคุมคุณภาพ โดยกำหนดเกณฑ์สูงสุดจากค่าเฉลี่ยบวกด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้นกำหนดให้ปริมาณความชื้นของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4.2 แสดงค่าเฉลี่ย Foreign matter และ Loss on drying ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ

ลำดับ	แหล่ง	Foreign matter (ร้อยละ)	Loss on drying (ร้อยละ)
1	กรุงเทพฯ (S1)	0.72±0.65	7.22±0.15
2	ระยอง (S2)	0.09±0.05	5.34±0.15
3	นครราชสีมา (S3)*	2.64±1.41*	5.52±0.06
4	ขอนแก่น (S4)	0.60±0.27	7.91±0.06
5	มหาสารคาม (S5)	0.27±0.12	8.90±0.08
Mean±SD		**0.42±2.08**	**6.98±1.53**

*แหล่งนครราชสีมามี Foreign matter ที่สูงกว่าแหล่งอื่นๆ จึงไม่นำมาคิดค่าเฉลี่ยร้อยละ

4.2.3 Total ash

จากการหาปริมาณเถ้ารวม (Total ash) พบว่าตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จากทั้ง 5 แหล่ง มี ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 10.35 ± 2.10% โดยตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพฯมีค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้ารวมมากที่สุด แ[illegible]ย่างจาก จังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้ารวมน้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.3 และใน

การกำหนด เกณฑ์สูงสุด จากค่าเฉลี่ยบวกด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้นกำหนดให้ปริมาณเถ้ารวมของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่เกินร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้ารวมของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ

ลำดับ	แหล่ง	Total ash (ร้อยละ)
1	กรุงเทพฯ (S1)	11.02±0.09
2	ระยอง (S2)	3.09±0.05
3	นครราชสีมา (S3)	8.95±0.05
4	ขอนแก่น (S4)	8.03±0.04
5	มหาสารคาม (S5)	10.25±0.07
Mean±SD.		**10.35±2.10**

4.2.4 Acid insoluble ash

จากการหาปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash) พบว่าตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จาก ทั้ง 5 แหล่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.82 ± 0.77 โดยตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมามีค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้าที่ละลายใน กรดมากที่สุด และตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่นมีค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้าที่ละลายในกรดน้อยที่สุด ดังแสดง ในตาราง 4.4 และในการกำหนดเกณฑ์สูงสุดจากค่าเฉลี่ยบวกด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้น กำหนดให้ ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่เกินร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ

ลำดับ	แหล่ง	Acid insoluble ash (ร้อยละ)
1	กรุงเทพฯ (S1)	2.66±0.05
2	ระยอง (S2)	1.57±0.02
3	นครราชสีมา (S3)*	5.95±0.02*
4	ขอนแก่น (S4)	0.87±0.04
5	มหาสารคาม (S5)	2.18±0.15
Mean±SD.		**1.82±0.70**

*แหล่งนครราชสีมามีค่า Acid insoluble ash ที่สูงกว่าแหล่งอื่นๆ จึงไม่นำมาคิดค่าเฉลี่ยร้อยละ

4.2.5 Water soluble extractive

จากการหาปริมาณสารสกัดจากน้ำ (Water soluble extractive) พบว่าตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จากทั้ง 5 แหล่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.21 ± 2.68 โดยตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่นมีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากน้ำมากที่สุด และตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากน้ำน้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.5 และสามารถกำหนดเกณฑ์ต่ำสุดจากค่าเฉลี่ยลบด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้นกำหนดให้ปริมาณสารสกัดจากน้ำของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่น้อยกว่าร้อยละ 16 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากน้ำของตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ

ลำดับ	แหล่ง	Water Extractive soluble
1	กรุงเทพฯ (S1)	16.17±0.64
2	ระยอง (S2)	11.15±1.39
3	นครราชสีมา (S3)	15.30±1.44
4	ขอนแก่น (S4)	20.47±1.24
5	มหาสารคาม (S5)	19.92±0.17
Mean±SD.		**14.21±.2.68**

4.2.6 Ethanol soluble extractive

จากการหาปริมาณสารสกัดจากเอทานอล (Ethanol soluble extractive) พบว่าตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จากทั้ง 5 แหล่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.63 ± 1.74 โดยตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่นมีค่าเฉลี่ยปริมาณสาร สกัดจากเอทานอลมากที่สุด และตัวอย่างจากจังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากเอทานอลน้อยที่สุด ดังแสดงในตาราง 4.6 และสามารถกำหนดเกณฑ์ต่ำสุดจากค่าเฉลี่ยลบด้วยร้อยละ 10 ของค่าเฉลี่ย ดังนั้น กำหนดให้ปริมาณสารสกัดจากเอทานอลของสมุนไพรลูกใต้ใบไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก

ตาราง 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณสารสกัดจากเอทานอลจากตัวอย่างสมุนไพรแห้งลูกใต้ใบ

ลำดับ	แหล่ง	Ethanol Extractive soluble (ร้อยละ)
1	กรุงเทพฯ (S1)	6.54±0.47
2	ระยอง (S2)	4.74±0.29
3	นครราชสีมา (S3)	7.64±0.40
4	ขอนแก่น (S4)	9.01±0.38
5	มหาสารคาม (S5)	5.24±0.70
Mean±SD.		**6.63±1.74**

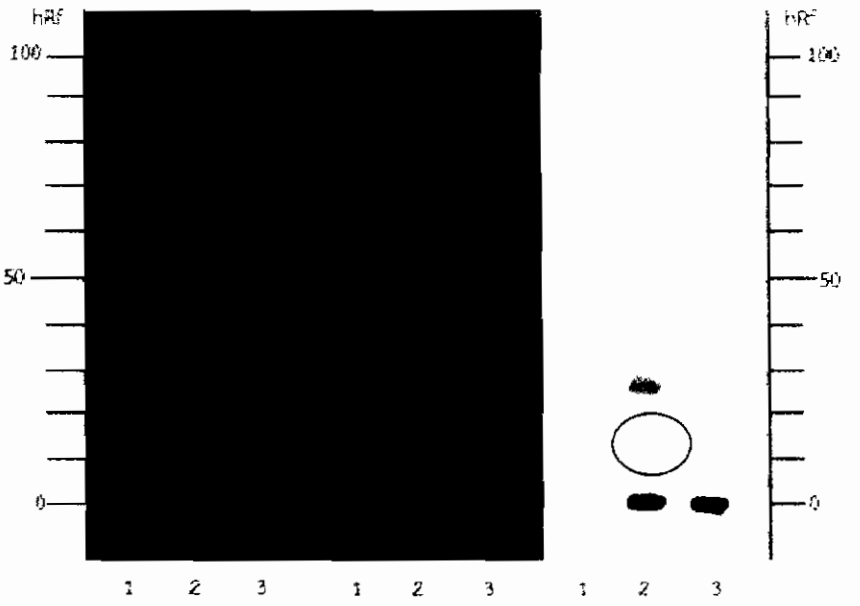
4.2.7. Identification

Chemical identification รูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

ทำการทดสอบโดยใช้ silica gel GF_{254} เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และใช้ toluene: ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้สาร phyllanthin ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร (1) เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบกับสารสกัดตัวอย่างต้นลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบปริมาณ 5.0 ไมโครลิตร และนำมาตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 254, 366 นาโนเมตร และพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid พบว่า สาร phyllanthin ตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีค่า hRf เท่ากับ 11-13 เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรไม่พบจะเห็นจุดเรืองแสงของสาร phyllanthin และพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid พบจุด quenching ของ phyllanthin ที่ hRf 11-13 (แถบสีน้ำเงินอ่อน)

ผลการศึกษารูปแบบ TLC fingerprints ของต้นแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามเพียงแหล่งเดียวพบว่า ลูกใต้ใบ (PA1) จะเห็นจุด quenching ของสารจำนวน 4 จุด ที่ค่า hRf 11-13, 25-27, 35-37, 39-40 ซึ่งตรงกับจุด quenching ของสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ค่า hRf 11-13 เมื่อตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะเห็นจุดเรืองแสงของลูกใต้ใบ (PA1) จำนวน 5 จุด ที่ค่า hRf 25-27, 35-37, 40-42, 47-50, 55-57 โดยปรากฏเป็นสีแดงทั้งหมด แต่ไม่พบจุดเรืองแสงที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin และเมื่อพ่น anisaldehyde-sulfuric acid แล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จะเห็นจุดสีของลูกใต้ใบ (PA1) จำนวน 5 จุด ที่ค่า hRf 3-5 (เทาอ่อน), 11-13 (น้ำเงินอ่อน), 23-27 (ดำอ่อน), 31-33 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งพบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 (แถบสีน้ำเงินอ่อน)

ส่วนหญ้าใต้ใบ (PU1) จะเห็นจุด quenching ของสาร จำนวน 2 จุด ที่ค่า hRf 35-37, 40-42 ซึ่งไม่มีจุดใดที่ตรงกับจุด quenching ของสารมาตรฐาน phyllanthin ตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโลเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะเห็นจุดเรืองแสงของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1) จำนวน 5 จุด ที่ค่า hRf 5-7, 17-19, 36-38, 40-42, 55-57 โดยปรากฏเป็นสีแดงทั้งหมด ไม่พบจุดเรืองแสงที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin และเมื่อพ่น anisaldehyde-sulfuric acid แล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จะเห็นจุดสีของสารสกัด (PU1) จำนวน 3 จุด ที่ค่า hRf 23-25 (เทาอ่อน), 30-32 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งไม่พบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 ดังแสดงในภาพประกอบ 4.16 และตาราง 4.7, 4.8



ภาพประกอบ 4.16 TLC Chromatogram ของสารสกัดของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

1 = Phyllanthin

2 = ลูกใต้ใบ Authentic (PA1)

3 = หญ้าใต้ใบ Authentic (PU1)

I = detection with UV 254 nm

II = detection with UV 366 nm

III = detection with anisaldehyde-H_2SO_4

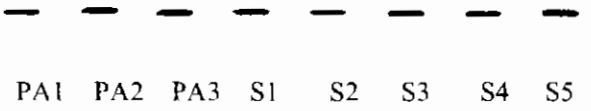
ตาราง 4.7 ค่า hRf ของสารสกัดลูกใต้ใบ

Spot	hRf value	Detection with		
		UV 254	UV 366	Anisaldehyde-sulfuric acid
1	3-5	-	-	pale grey
2	11-13*	quenching	-	pale blue
3	23-27	-	-	pale black
4	25-27	quenching	red	-
5	31-33	-	-	pale violet
6	35-37	quenching	red	-
7	39-40	quenching	-	-
8	40-42	-	red	-
9	47-50	-	-	-
10	55-57	-	red	-
11	82-87	-	red	grey

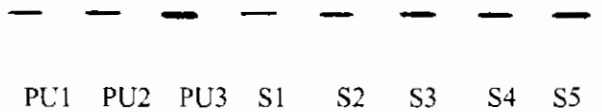
* phyllanthin

ตาราง 4.8 ค่า hRf ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ

Spot	hRf value	Detection with		
		UV 254	UV 366	Anisaldehyde-sulfuric acid
1	5-7	-	red	-
2	17-19	-	red	-
3	23-25	-	-	pale grey
4	23-27			pale violet
5	30-32	-	-	-
6	34-36	-	red	-
7	35-37	quenching	-	-
8	40- 42	quenching	red	-
9	55-57	-	red	-
10	82-87	-	-	grey



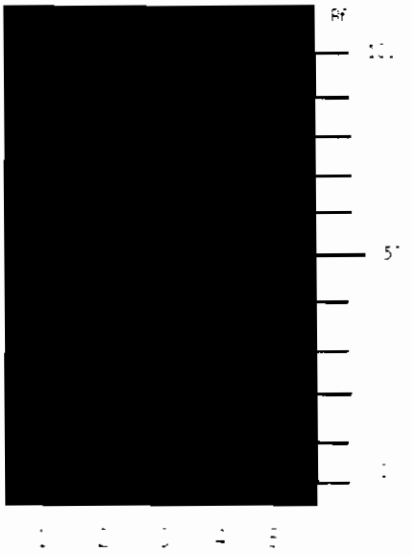
ภาพประกอบ 4.17 รูปแบบ TLC fingerprints ของตัวอย่างแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างแห้งของสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบหลังพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid



ภาพประกอบ 4.18 รูปแบบ TLC fingerprints ของตัวอย่างแท้ (authentic samples) ของหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างแห้งของสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบหลังพ่นด้วย anisaldehyde-sulfuric acid แสดงดังภาพ

4.3 การหาปริมาณ สาร Phyllanthin ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้เทคนิค TLC densitometry

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร Phyllanthin ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้เทคนิค TLC densitometry โดยการสร้างกราฟของสารมาตรฐาน phyllanthin โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คือ ความเข้มข้นลำดับที่ 1-5 ได้แก่ ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ด้วยวิธี TLC densitometer โดยมี mobile phase คือ toluene: ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 ถ่ายภาพภายใต้แสง UV 254 nm ผล TLC chromatogram แสดงดัง ภาพประกอบที่ 4.19 และ spectrum แสดงดังภาพประกอบที่ 4.20 และพื้นที่ใต้กราฟที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.9 โดยมีค่า Rf เฉลี่ยเท่ากับ 0.19±0.01



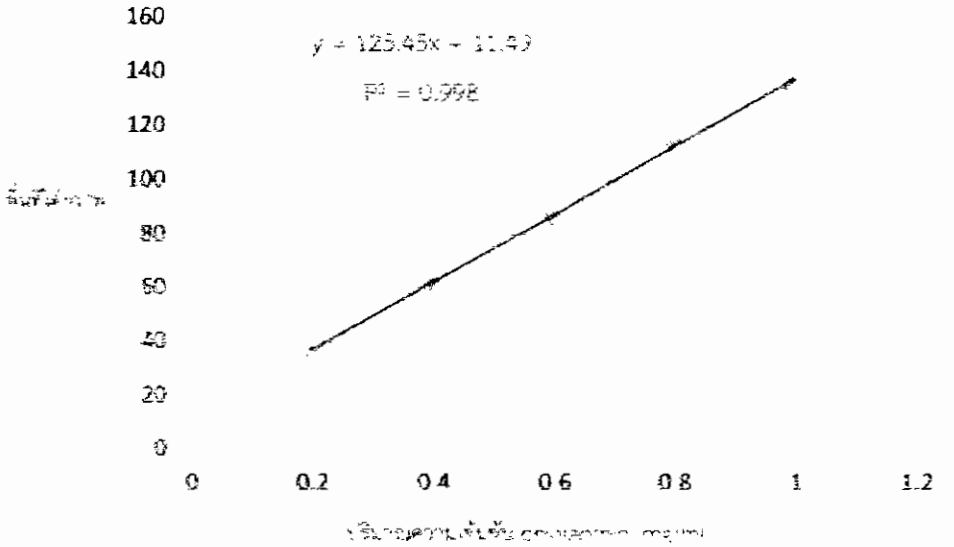
ภาพประกอบ 4.19 TLC chromatogram ภายใต้แสง UV 254 nm ของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin 5 ความเข้มข้น โดยที่ 1-5 เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml (ตามลำดับ)

ภาพประกอบ 4.20 spectrum ของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin ที่ได้จากการสแกน TLC ในตารางที่ 4.9 โดยความเข้มข้นที่ 1-5 เท่ากับ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 mg/ml (ตามลำดับ)

ตาราง 4.9 ค่า Rf และพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin จำนวน 5 ความเข้มข้น

ลำดับที่	ความเข้มข้น phyllanthin (mg/ml)	Rf	พื้นที่ใต้กราฟ
1	0.2	0.18	35.7
2	0.4	0.19	61.8
3	0.6	0.19	87
4	0.8	0 19	114.5
5	1	0.19	134.8

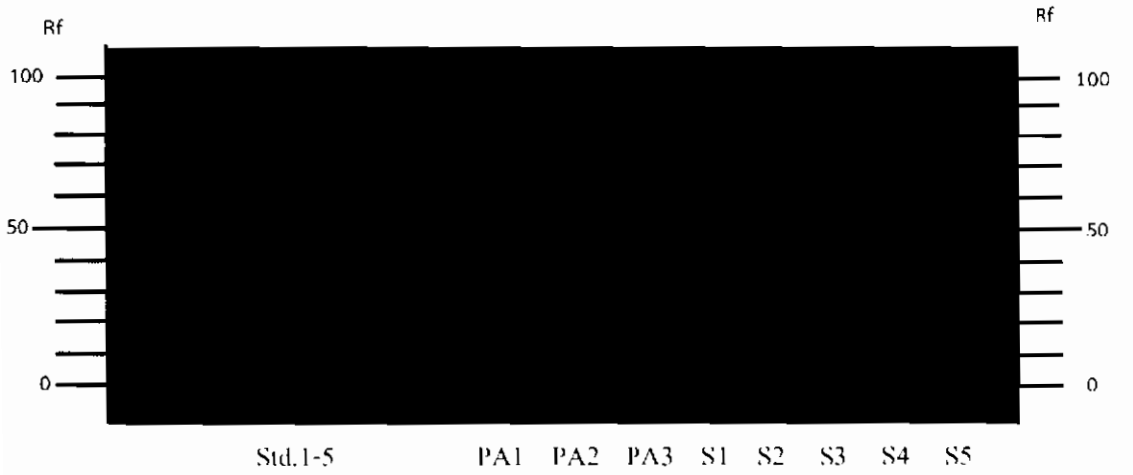
จากนั้นนำผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานได้สมการเส้นตรง คือ Y= 125.45X + 11.49 , R^2=0.998 ดังภาพประกอบที่ 4.21



ภาพประกอบ 4.21 กราฟมาตรฐาน phyllanthin แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน phyllanthin กับพื้นที่ใต้กราฟจากการวิเคราะห์ด้วย TLC densitometer

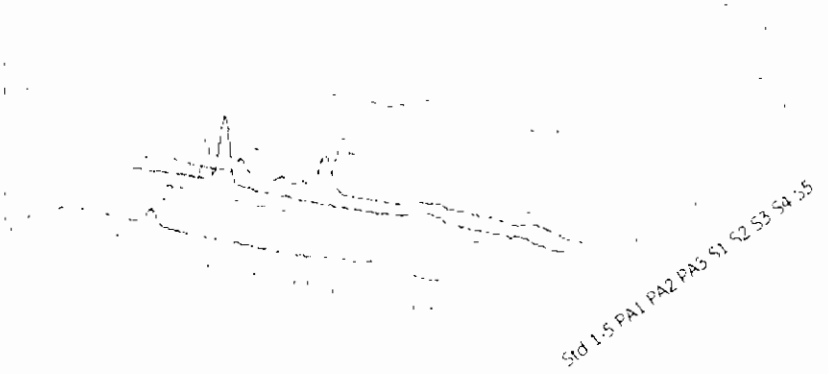
การวิเคราะห์หาปริมาณสาร phyllanthin จากตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ และตัวอย่าง สมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยความเข้มข้น 25 mg/mL เทียบกับสารละลายมาตรฐาน phyllanthin ทำละลายด้วย methanol 1 mg/mL ด้วยวิธี TLC densitometer โดยมี mobile phase คือ toluene: ethyl acetate (85:15) ทำ 3 ซ้ำ ถ่ายภาพและสแกนภายใต้แสง UV 254 nm ผล TLC chromatogram ทั้ง 3 ซ้ำแสดงดังภาพประกอบที่ 4.22 และภาพประกอบที่ 4.23 ภาพแสด spectrum ของสารสกัดลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm ดังภาพประกอบที่ 4.24 และภาพแสด spectrum ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm ดังภาพประกอบที่ 4.25

ปริมาณสาร phyllanthin เฉลี่ยจากตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ และตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบจากแหล่งต่างๆ ซึ่งคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน คือ Y= 125.45X + 11.49 , R^2=0.998 แสดงในรูปปริมาณสาร phyllanthin หน่วย mg

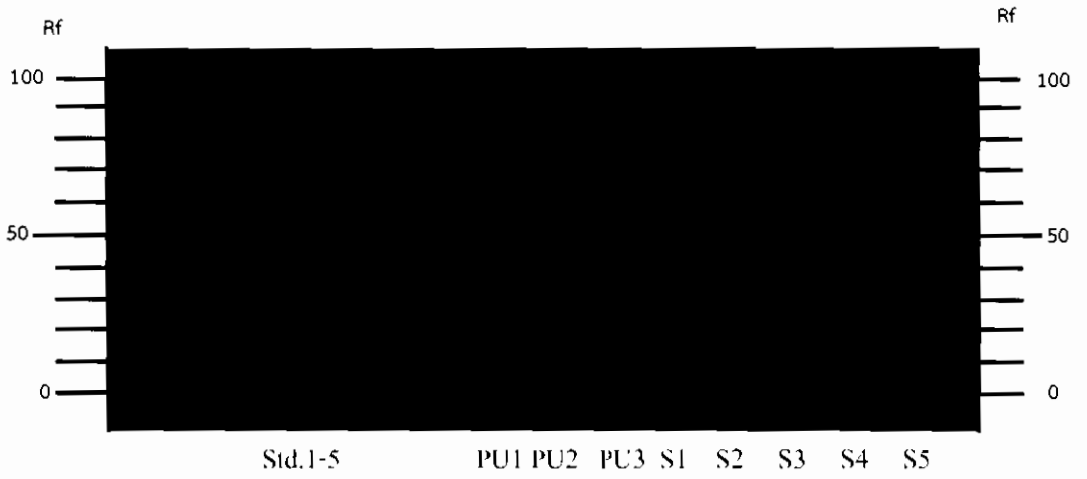


ภาพประกอบ 4.22 TLC Chromatogram ของสารสกัดลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm

Std.1-5 - Phyllanthin
PA1-Authentic1
PA2-Authentic2
PA3-Authentic3
S1 กรุงเทพฯ
S2-ระยอง
S3-นครราชสีมา
S4-ขอนแก่น
S5-มหาสารคาม

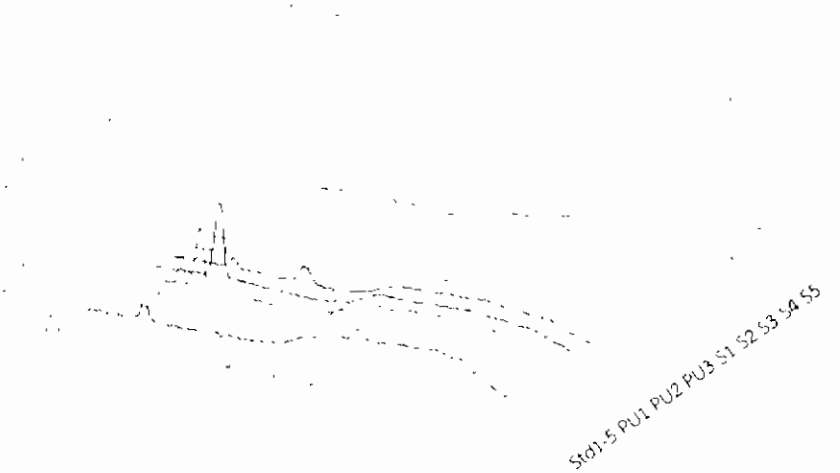


ภาพประกอบ 4.23 spectrum ของสารสกัดลูกใต้ใบ (PA1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm



ภาพประกอบ 4.24 TLC Chromatogram ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm

Std.1-5 Phyllanthin
PU1-Authentic1
PU2-Authentic2
PU3-Authentic3
S1-กรุงเทพฯ
S2-ระยอง
S3-นครราชสีมา
S4-ขอนแก่น
S5-มหาสารคาม



ภาพประกอบ 4.25 spectrum ของสารสกัดหญ้าใต้ใบ (PU1-3) และตัวอย่างสมุนไพรลูกใต้ใบ ตรวจสอบด้วย UV 254 nm

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร phyllanthin จากตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ และตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบจากร้อยเอ็ดมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.167 mg คิดเป็นร้อยละ 0.668 และตัวอย่างต้นแท้ของหญ้าใต้ใบจากมหาสารคาม มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.47 mg คิดเป็นร้อยละ 0.188 ส่วนปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบพบว่า (S4) จากจังหวัดขอนแก่นมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.276 mg คิดเป็นร้อยละ 1.140 และมีปริมาณสารน้อยสุดจากจังหวัดนครราชสีมา (S3) เท่ากับ 0.063 mg คิดเป็นร้อยละ 0.002 ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตาราง 4.10 แสดงปริมาณสาร phyllanthin และ % yield (w/w) ในสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากแหล่งต่างๆ

ที่	แหล่งตัวอย่าง	ปริมาณสาร Phyllanthin (mg) (% yield w/w)		*p*-value
		ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ	
1	authentic มหาสารคาม	0.158 (0.632)	0.047 (0.188)	0.0459
2	authentic ร้อยเอ็ด	0.167 (0.668)	ND	-
3	authentic ขอนแก่น	0.075 (0.003)	0.007 (0.028)	0.0459
4	กรุงเทพฯ (S1)	0.102 (0.004)		
5	ระยอง (S2)	ND		
6	นครราชสีมา (S3)	0.063 (0.002)		
7	ขอนแก่น (S4)	0.276 (1.104)		
8	มหาสารคาม (S5)	ND		

ND = Not detected

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ phyllanthin พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบมีปริมาณสารสำคัญ phyllanthin เฉลี่ยมากกว่าสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ โดยมีปริมาณ 0.133 mg และ 0.031 mg ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1.1 ผลการจัดทำมาตรฐานของสมุนไพร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ ผลการศึกษาพบข้อเหมือนและข้อแตกต่างกัน โดยสามารถแยกจากส่วนของลำต้นและส่วนผล รายละเอียดดังนี้

ข้อกำหนด	ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ
ชื่อไทย	ลูกใต้ใบ (LOOK TAI BAI)	หญ้าใต้ใบ (YAA-TAI-BAI)
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Phyllanthus amarus*	*Phyllanthus urinaria*
ชื่อวงศ์	Euphorbiaceae	Euphorbiaceae
Herbarium Specimen Number	No.MSU.PH-EUP-PA1-3	No.MSU.PH-EUP-PU1-3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	- ไม้ล้มลุก สูง 30-50 เซนติเมตร - ใบเดี่ยว เรียงสลับใน ระนาบเดียวกัน - ดอกออกที่ซอกใบ - ผลเป็นผลแห้ง แตกได้ กลม ผิวเรียบ หรือมีพูบ้าง	- ไม้ล้มลุกต้นและกิ่งเป็นเหลี่ยม - ขอบใบสีม่วงแกมน้ำตาล - ผลมีผิวขรุขระและขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าลูกใต้ใบ
ลักษณะจุลภาคของพืช	Parenchyma cell and stomata, trichomes, fiber and spiral vessel	Part of fiber, boarded pitted and vessel, fiber and spiral vessel trichomes, Tannin containting cell

การทดสอบทางเคมีกายภาพ (Physicochemical) ทำการศึกษาสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ เนื่องจากแหล่งที่มีจำหน่ายสมุนไพรแห้งในท้องตลาดยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นชื่อลูกใต้ใบหรือหญ้าใต้ใบ โดยแต่ละแหล่งจะระบุภายใต้ชื่อว่า สมุนไพรใต้ใบ ผลการศึกษาข้อกำหนดทางเคมีกายภาพที่ได้ รายละเอีย

ข้อมาตรฐาน	สมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ
ปริมาณสิ่งปนปลอม (Foreign matter) (เกณฑ์มาตรฐานไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก)	ไม่เกินร้อยละ 1
ปริมาณความชื้น (Loss on drying)	ไม่เกินร้อยละ 8
ปริมาณเถ้ารวม (Total ash) (เกณฑ์มาตรฐานกำหนดไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก)	ไม่เกินร้อยละ 12
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash) (เกณฑ์มาตรฐานกำหนดไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก)	ไม่เกินร้อยละ 3
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (Water soluble extractive)	ไม่น้อยกว่าร้อยละ 16 โดยน้ำหนัก
ปริมาณสารสกัดด้วยเอทานอล (Ethanol soluble extractive)	ไม่น้อยกว่าร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก

5.1.2 รูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

รูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากตัวอย่างแท้ (authentics samples) พบว่า ลูกใต้ใบพบองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 5 spots มีค่า hRf ดังนี้ hRf 3-5 (เทาอ่อน), 11-13(น้ำเงินอ่อน), 23-27 (ดำอ่อน), 31-33 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งพบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 (แถบสีน้ำเงินอ่อน)

ส่วน TLC fingerprints ของหญ้าใต้ใบพบองค์ประกอบทางเคมีจำนวน 3 spots มีค่า hRf ดังนี้ hRf 23-25 (เทาอ่อน), 30-32 (ม่วงอ่อน), 82-87 (เทา) ซึ่งไม่พบจุดสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ที่ hRf 11-13 แต่เนื่องจากผลการศึกษารูปแบบ TLC fingerprints ของต้นแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามเพียงแหล่งเดียว จึงอาจจะยังสรุปไม่ได้ว่าหญ้าใต้ใบไม่พบสาร phyllanthin รายละเอียดดังนี้

รูปแบบ TLC fingerprints	ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ
องค์ประกอบทางเคมี	5 spots	3 spots
hRf	3-5 (เทาอ่อน) 11-13 (น้ำเงินอ่อน) 23-27 (ดำอ่อน) 31-33 (ม่วงอ่อน) 82-87 (เทา)	23-25 (เทาอ่อน) 30-32 (ม่วงอ่อน) 82-87 (เทา)

รูปแบบ TLC fingerprints	ลูกใต้ใบ	หญ้าใต้ใบ
สารมาตรฐาน phyllanthin	พบสาร phyllanthin hRf 11-13 (แถบสีน้ำเงินอ่อน)	ไม่พบสาร phyllanthin

5.1.3 การหาปริมาณสาร Phyllanthinของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของ phyllanthin จากตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ และตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบ พบว่า ปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างต้นแท้ของลูกใต้ใบ จากแหล่งร้อยเอ็ดมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.167 mg หญ้าใต้ใบจากแหล่งมหาสารคาม มีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.047 mg ส่วนแหล่งร้อยเอ็ดไม่สามารถหาปริมาณได้ (Not detected) ส่วนปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อลูกใต้ใบพบว่า (S4) จากจังหวัดขอนแก่นมีปริมาณสารสูงสุด เท่ากับ 0.276 mg และมีปริมาณสารน้อยสุดจากจังหวัดนครราชสีมา (S3) เท่ากับ 0.063 mg และเมื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ phyllanthin พบว่าสารสกัดจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบของต้นแท้พบว่าปริมาณสารสำคัญ phyllanthin เฉลี่ยของลูกใต้ใบมากกว่าหญ้าใต้ใบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

5.2 อภิปรายผลการศึกษา

5.2.1 การจัดทำมาตรฐานสมุนไพรลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้เกณฑ์ตามข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพรไทยใน Thai Herbal Pharmacopoeia จากการศึกษาตัวอย่าง authentic samples จำนวน 3 แหล่ง พบว่า ลักษณะทางพฤกษศาสตร์มหภาคของลูกใต้ใบมีความต่างกันกับหญ้าใต้ใบที่บริเวณลำต้นและผล โดยลำต้นของลูกใต้ใบมีลักษณะกลมส่วนหญ้าใต้ใบนั้นมีลักษณะเหลี่ยม ผลของลูกใต้ใบมีลักษณะกลมมน ผิวเรียบ ส่วนผลของหญ้าใต้ใบนั้นมีลักษณะผิวขรุขระ และมีขนาดใหญ่กว่าผลของลูกใต้ใบ ผลการศึกษาลักษณะทางจุลภาคของผงยาจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบพบว่าเนื้อเยื่อของลูกใต้ใบ และหญ้าใต้ใบมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรมของของ Parmar และคณะ (2013) ที่พบว่าทั้งลูกใต้ใบ และหญ้าใต้ใบนั้นจะมีเซลล์ Paracytic stomata , xylem vessel และ Starch grains แต่ในการศึกษาทางจุลภาคครั้งนี้ทั้งลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบของผู้วิจัยไม่พบในส่วนของ Starch grains

เมื่อนำมาศึกษาข้อกำหนดทางเคมีกายภาพที่ได้ ดังนี้ Foreign matter, Loss on drying, Total ash, Acid insoluble ash และปริมาณสารสกัด ได้แก่ Water soluble extractive และ Ethanol soluble extractive พบว่าค่าร้อยละปริมาณสิ่งปนปลอม (Foreign matter) จากตัวอย่างสมุนไพรภายใต้ชื่อลูกใต้ใบที่ได้นั้น “ไม่เกินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก” ซึ่งสอดคล้องกับเกณฑ์กำหนดของวิธีการจัดทำตำรามาตรฐานสมุนไพรไทย (นันทนา สิทธิชัย, 2538) ที่ระบุว่ามาตรฐานของสิ่งปนปลอมที่ได้จากการจัดทำมาตรฐานในสมุนไพรที่ดีนั้นควร “ไม่เกินร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก” นอกจากนั้นยังพบว่า ในตัวอย่างสมุนไพรจากแหล่งนครราชสีมามีค่าร้อยละปริมาณสิ่งปนปลอม (Foreign matter) ที่สูงกว่าแหล่งอื่นๆ จึงไม่นำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยรวม สาเหตุอาจเกิดจากมีการปลอมปนด้วยสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่ด้อยคุณภาพกว่าหรือเป็นอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของสัตว์ เช่น

ขาหรือปีกของแมลงบางชนิด สารอื่นๆ เช่น ก้อนกรวด หรือก้อนหิน เป็นต้น และจากข้อมูลการศึกษาของพืชกลุ่ม *P. amarus* (Parmar, 2013) พบว่าค่า ร้อยละของปริมาณ Loss on drying, Total ash, Acid insoluble ash จะต้องมีค่าไม่เกินร้อยละ 5, 8 และ 2 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ผลการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าร้อยละของปริมาณ Loss on drying มีค่าร้อยละของปริมาณมากกว่าในการศึกษาที่ได้ทบทวนวรรณกรรม อาจเนื่องมาจากกระบวนการในการเก็บรักษาตัวอย่างสมุนไพรทำให้เกิดความชื้นในสมุนไพรทำให้ค่าร้อยละที่ได้มีความแตกต่างกัน ส่วนค่าร้อยละของปริมาณ Total ash และ ปริมาณ Acid insoluble ash ของผู้วิจัยที่ได้ร้อยละมากกว่านั้น โดยเฉพาะค่าร้อยละ Acid insoluble ash จากแหล่งนครราชสีมา ที่สูงกว่าแหล่งอื่นๆ จึงไม่นำมาคิดเป็นค่าเฉลี่ยรวม อาจเนื่องมาจากเป็นสมุนไพรมีส่วนที่เป็น "physiological ash" หรืออาจเป็นเพราะมีการใช้ปุ๋ยเคมีในการปลูกทำให้ปริมาณเถ้ารวมเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนั้นอาจมาจากการปนเปื้อนของ "non-physiological ash" ที่ได้จากสารอนินทรีย์ เช่น ดิน หิน ทราย ซึ่งสารเหล่านี้ไม่สลายเมื่อมีการเผา เป็นต้น

5.2.2 รูปแบบ TLC fingerprints ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

การศึกษารูปแบบ TLC fingerprints พบว่าสารสกัดลูกใต้ใบ (*P. amarus*) จากต้น authentic samples มหาสารคาม (PA1) พบว่ามีสาร phyllanthin เป็นองค์ประกอบทางเคมี มี hRf เท่ากับ 11-13 ปรากฏแถบสีน้ำเงินอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Khatoon และคณะ (2006) แต่พบว่าค่า hRf ต่างกันคือ hRf เท่ากับ 9-11 และแถบสีฟ้า (bright blue) ในส่วนของตัวอย่างสารสกัดหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) จากต้นแหล่งมหาสารคาม (PU1) นั้นไม่พบสาร phyllanthin โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Hua Fang และคณะ (2007) ที่ทำการศึกษาแล้ว ไม่พบ hRf และแถบสีสาร phyllanthin ในสารสกัดจากหญ้าใต้ใบ แต่เนื่องจากการทำ TLC fingerprints ในครั้งนี้เป็นการใช้ต้นแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามเพียงแหล่งเดียวเท่านั้น จึงอาจจะยังสรุปไม่ได้ว่าหญ้าใต้ใบไม่พบสาร phyllanthin เพราะเมื่อนำต้นแท้หญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามไปหาปริมาณสาร phyllanthin ก็พบว่ามีสารดังกล่าวถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้อยก็ตาม

5.2.3 ผลการหาปริมาณสาร Phyllanthin ของสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบโดยใช้เทคนิค TLC densitometry

ผลการศึกษาของผู้วิจัยพบปริมาณสาร phyllanthin ของสารสกัดของลูกใต้ใบเฉลี่ย 0.133 mg คิดเป็นร้อยละ 0.533 (w/w) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า การศึกษาของ Sonia Vrema และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาหาปริมาณสาร phyllanthin จากลูกใต้ใบ *(P.amarus)* ในประเทศจีนด้วยวิธีการหมัก (maceration) เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีปริมาณสาร phyllanthin ของสารสกัดคิดเป็นร้อยละ 0.023 (w/w) ซึ่งพบน้อยกว่าการศึกษาของผู้วิจัย ปริมาณสารที่พบแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากแหล่งตัวอย่างของลูกใต้ใบที่ทำการศึกษาแตกต่างกัน

ส่วนสารสกัดของหญ้าใต้ใบ (*P. urinaria*) พบว่ามีปริมาณสาร phyllanthin ของสารสกัดเฉลี่ย 0.013 mg คิดเป็นร้อยละ 0.053 (w/w) ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าของลูกใต้ใบ นอกจากนั้นยังพบว่าไม่สอดคล้อง

กับผลของรูปแบบ TLC fingerprints ที่ไม่พบ hRf และแถบสีตรงกับสารมาตรฐาน phyllanthin ซึ่งอาจเกิดจากการทำ TLC fingerprints ในครั้งนี้เป็นการใช้ต้นแท้ (authentic samples) ของหญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามเพียงแหล่งเดียวเท่านั้น จึงอาจจะยังสรุปไม่ได้ว่าหญ้าใต้ใบไม่พบสาร phyllanthin เพราะเมื่อนำต้นแท้หญ้าใต้ใบจากแหล่งจังหวัดมหาสารคามไปหาปริมาณสาร phyllanthin ก็พบว่ามีสารดังกล่าวถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้อยก็ตาม

สรุปจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ลูกใต้ใบมีปริมาณสาร phyllanthin แตกต่างกันกับหญ้าใต้ใบของต้นแท้ (authentic samples) ส่วนปริมาณสาร phyllanthin จากตัวอย่างสมุนไพรแห้งนั้นพบว่า เราไม่สามารถแยกชนิดของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบได้ เนื่องจากแหล่งที่มีจำหน่ายสมุนไพรแห้งในท้องตลาดยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นชื่อลูกใต้ใบหรือหญ้าใต้ใบ โดยแต่ละแหล่งจะระบุภายใต้ชื่อว่า สมุนไพรใต้ใบ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณสาร phyllanthin ของตัวอย่างสมุนไพรแห้งดังกล่าวก็มีปริมาณใกล้เคียงกับต้นแท้

5.3 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการทำวิจัย

1. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างของทั้งต้นแท้ (authentic samples) และตัวอย่างสมุนไพรแห้งให้เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 15 แหล่ง เพื่อจัดทำมาตรฐานสมุนไพรที่มีความสมบูรณ์มากขึ้น และเพื่อให้ได้ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสำคัญในลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบที่แม่นยำมากขึ้น

ข้อเสนอในการศึกษาครั้งถัดไป

1. เนื่องจากตัวอย่างแห้งจากร้านยาท้องตลาดไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นตัวอย่างจากลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบจึงควรศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อเปรียบเทียบระหว่างต้นแท้ (authentic samples) ของลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ เพื่อประโยชน์ในการนำสมุนไพรทั้ง 2 ต้นนี้มาใช้ทดแทนกันได้ และทำการศึกษาต่อไปเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาระหว่างต้นแท้ (authentic samples) และตัวอย่างสมุนไพรแห้งภายใต้ชื่อ สมุนไพรใต้ใบ เพื่อยืนยันการนำสมุนไพรที่มีจำน่ายในท้องตลาดมาใช้ในการรักษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ [2558] กรมวิทย์ฯจัดทำตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเพื่อส่งเสริมการผลิตให้มีคุณภาพ [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/news_detail.php?id=1089 [สืบค้นเมื่อ (วันที่ 21 ตุลาคม 2559)].

กรวิกา จารุพันธุ์ [2558] การจัดทำตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย [ออนไลน์]. ได้จาก http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/webroot/drug/PRODUCTS/pdf/ [สืบค้นเมื่อ (วันที่ 21 ตุลาคม 2559)].

จารีย์ บันสิทธิ์. (2534) เปรียบเทียบลักษณะพฤกษศาสตร์ของลูกใต้ใบ-หญ้าใต้ใบสกุล Phyllanthus ในภาคกลางของไทย. วารสารกรมวิทยาการแพทย์, *33(4),* 155-68.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ อุทัย โสธนะพันธุ์ และประไพ วงศ์สินมั่นคง.(2547) ทีแอลซี วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์คุณภาพเครื่องยาไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย.

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2551) คุณภาพเครื่องยาไทย : *จากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 560-61.

นวลน้อย จูฑะพงษ์. (2555) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกใต้ใบ 3 ชนิด (Pharmacological activities of three *Phyllanthus* species). รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา

นันทนา สิทธิชัย. (2547) มาตรฐานของสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย. วารสารสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล, ปีที่ 11(1), 21-32.

ภัสรา ชวประดิษฐ์ [2558] สถานการณ์การผลิตและการตลาดพืชสมุนไพร. [ออนไลน์]. ได้จาก: http:// www.agriman.doae.go.th/home/news2/JOB/318_58-032.pdf [สืบค้นเมื่อ (วันที่ 21 ตุลาคม 2559)].

มงคล คงเสน อัจฉรา นิยมเตชา วาฟาอ์ หาญณรงค์และพนม สุขจันทร์.(2556) การรวบรวมคุณสมบัติและประโยชน์ของต้นลูกใต้ใบ. วารสารประจำปีมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์, 153-63.

วิทยา บุญวรพัฒน์. (2554) สารานุกรมสมุนไพร-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ ส.พิจิตรการพิมพ์, 586-87.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540) สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ :โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์, 461-62.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ [2558] ยุทธศาสตร์การวิจัยรายประเด็นด้านการพัฒนาสมุนไพร (พ.ศ. 2556--2559) [ออนไลน์]. ได้จาก http://rdo.psu.ac.th/images/D2/budget/strategic_issues/55-59_9.pdf [สืบค้นเมื่อ (วันที่ 21 ตุลาคม 2559)].

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ[2553] ฐานข้อมูลสมุนไพรไทย [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/medplantdatabase/search_herbal.asp [สืบค้นเมื่อ (วันที่ 22 ตุลาคม 2559)].

อังคณา หิรัญ, สมทรง รักษ์เผ่า, สมจิตร์ เนียมสกุล และสุพรรณ จารุจงกลวงศ์. (2539) ประสิทธิผลของสมุนไพรลูกใต้ใบต่อการป้องกันไวรัสหัวเหลืองในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วารสารผลงานวิชาการดีเด่น กระทรวงสาธารณสุข, 11-20.

Adeneye, A. (2012) The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies. J. Ethnopharmacol, 144(3), 705-711.

Akin-Osanaiye C. B., Gabriel A. F. & Alebiosu R. A., (2011) Characterization and antimicrobial screening of ethyl oleate isolated from *Phyllanthus Amarus* (Schum and Thonn). Annals of Biological Research, 2(2), 298-305.

Alexandra K. Kiemer, Thomas Hartung, Christian Huber, Angelika M. Vollmar. (2003) *Phyllanthus amarus* has anti-inflammatory potential by inhibition of iNOS, COX-2, and cytokines via the NF-kappaB pathway. Journal of Hepatology, 38(3), 289–297

Alvari, A., Rafsanjani, M.S.O., Ahmed, F.J., Hejazi, M.S. and Abdin, M.Z.(2011) Rapid RP-HPLC technique for the determination of phyllanthin as bulk and its quantifi- cation in *Phyllanthus amarus* extract. International Journal of Phytomedicine. 3, 115-19.

Atul R. Chopade, F J. Sayyad. (2015) Pain Modulation by Lignans (Phyllanthin and Hypophyllanthin) and Tannin (Corilagin) Rich Extracts of *Phyllanthus amarus* in Carrageenan-induced Thermal and Mechanical Chronic Muscle Hyperalgesia. Phytother Res, 29(8), 1202-10.

Bharti Sarin, Nidhi Verma, Juan Pedro Martin, Aparajita Mohanty. (2014) An Overview of Important Ethnomedicinal Herbs of *Phyllanthus* Species: Present Status and Future Prospects. The Scientific World Journal Volume 2014, 1-12

Chirdchupunseree, H. and Pramyothin, Protective activity of phyllanthin in ethanol-treated primary culture of rat hepatocytes. Journal of Ethnopharma- cology. 128, 172-76.

Daniel Azubuike, Awomukwu.(2015) Identification of the Genus *Phyllanthus* (Family Phyllanthaceae) in Southern Nigeria using Comparative Systematic Morphological and Anatomical Studies of the Vegetative Organs. Global Journal of Science Frontier Research: C Biological Science Volume 15 Issue 2 .

Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. 2007. Thai Herbal Pharmacopoeia volumeII.Office of Notional Buddishm Press: Bangkok.

Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN, Ray C.(1968) Screening of Indian plants for biological activity: partI. Indain J Exp Biol, 232-47.

Edeoga, H. O., Omosun, G., Osuagwu, G. G. and Awomukwu, D. A. (2007). Anatomical Features of vegetative organs of *Phyllanthus* species . J. Environ &Ecology.,25 (3),548-53. 5.

Gruenwald J, Bredler T. & Jaenicke C. (2000) PDR for herbal medicines 2 nd ed. Montvale: Medical Economics Company, Inc. 91.

Islam A., Naskar S., Mazumder U. K., Gupta M. & Ghosal, S. (2008) Estrogenic Properties of Phyllanthin and Hypophyllanthin from *Phyllanthus amarus* against Carbofuran Induced Toxicity in Female Rats. Phamacologyonline, *3*, 1006-1016.

Jay Ram Patela, Priyanka Tripathib, Vikas Sharmaa, Nagendra Singh Chauhana, Vinod Kumar Dixita. (2011) Phyllanthus amarus: Ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review. Journal of Ethnopharmacology, *138*, 286– 313

Khatoon et al. (2006) Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species: Journal of Ethnopharmacology104 ,79–86.

Krithika, A.R., Verma, R.J.(2009).Ameliorative potential of *Phyllanthus amarus* against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. Acta Poloniae Pharmaceutical Drug Research 66, 579–583.

Lawson-Evi P., Eklu-Gadegbeku K., Agbonon A., Aklikokou K., Creppy E. & Gbeassor M (2011) Antidiabetic Activity of *Phyllanthus Amarus Schum* and Thonn (Euphabiaceae) on AlloxanInduce Diabetes in Male Wistar Rats. Journal of Applied Sciences, 11(16), 2968-2973.

Lee C. D., Ott M., Thyagarajan S. P., Shafritz D. A., Burk R. D. & Gupta S. (1996). *Phyllanthus amarus* down-regulates hepatitis B virus mRNA transcription and replication. Eur J Clin Invest, 26(12),1069-76.

Liu J., Lin H. & McIntosh H. (2011) Genus *Phyllanthus* for chronic hepatitis B virus infection: a systematic review. J Viral Hep, 8(5), 358-66.

Mesia LTK, Ngimbi NP, Chrimwami B.(2001) In-vitro antimalarial acitivity of Cassia occidentalis, Morinda Morindodies and *Phyllanthus niruri. Ann Trop Med Parasitol,95*(1),47-57.

Mokkhasmit M, Swatdimongkol K, Satrawaha P. (1971) Study on toxicity of Thai medicinal

plants. Bull Dept Med Sci.12(2/4),36-65.

Narendranathan M, Remla A, Mini PC, Satheesh P. (1999) A trial of *Phyllanthus amarus* in acute viral hepatitis. Trop Gastroenterol,20(4), 164-6.

Notka F, Meier G. & Wagner R. (2004) Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replicationin vitro and ex vivo. Antiviral Res, 64(2), 93-102.

Odetola A. A. & Akojenu S. M. (2000) Anti-diarrhoeal and gastro-intestinal potentials of the aqueous extract of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae). Afr J Med Med Sci., 29(2), 119-22.

Ott M., Thyagarajan S. P. & Gupta S. (1997). *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interruptinginteractions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. Eur J Clin Invest, 27(11),908-15.

Pramyothin P, Ngamtin C, Poungshompoo S, Chaichantipyuth C. Hepatoprotective activity of Phyllanthus amarus Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: in vitro and in vivo studies. J Ethnopharmacol. 2007 Nov 1;114(2):169-73.

P. Ketmongkhonsit. (2015) A validated TLC-image analysis method for detecting and quantifying bioactive phyllanthin in *Phyllanthus amarus* and commercial herbal drugs. Songklanakarin J. Sci. Technol. 37 (3), 319-26.

Rajeshkumar NV, Joy KL, Kuttan G, Ramsewak RS, Nair MG, Kuttan R. (2002) Antitumour and anticarcinogenic activity of *Phyllanthus amarus* extract. *Journal of* Ethnopharmacology, *81*(1), 17-22.

Rao MV, Alice KM. (2001) Contraceptive effects of *Phyllanthus amarus* in female mice. Phytother Res, *15*, 265-7.

Rao MV, Shah KD, Rajani M. (1997) Contraceptive effects of *Phyllanthus amarus* extract in the male mouse (Mus musculus). Phytother Res,11(8), 594-6.

Raphael K. R. & Kuttan R. (2003) Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. *J.* Ethnopharmacol, *87*(2-3), 193-97.

Thabrew MR, Hughes RD. (1996) Phytogenic agents in the therapy of liver disease. Phytother Res , 10(6),461-7

Toyin YF, Stephen M, Michael AF, Udoka EO.(2008) Hepato protective potentials of Phyllanthus amarus against ethanol-induced oxidative stress in rats. Food Chem Toxicol. , 46.2658–64.

Thamlikitkul V, Wasuwat S, Kanchanapee P. (1991) Efficacy of *Phyllanthus amarus* for eradication of hepatitis B virus in chronic carriers. J Med Ass Thailand,74(9),381-5.

Wongnavia M., Thaina P., Bumrungvong N., Rattanapirun P., Nituangjarat A., Muso A. & Prasartthong V.(2006) The protective potential and possible mechanism of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. aqueous extract on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Songklanakarin J Sci Technol,28(3), 551-561.

Xia Y, Luo H, Liu JP, Gluud C.(2013) Phyllanthus species versus antiviral drugs for chronic hepatitis B virus infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*

Xin-Hua W., Chang-Qing L., Xing-Bo G. & Lin-Chun F. (2001). A comparative study of *Phyllanthus amarus* compound and interferon in the treatment of chronic viral hepatitis B. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 32(1), 140-142.

Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. (2007) The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-β-d-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. Journal of Ethnopharmacology, 110, 555-8

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเปรียบเทียบปริมาณสาร phyllanthin ในสารสกัดลูกใต้ใบและหญ้าใต้ใบ

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

	Type	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Phyllanthin (mg)	PA	3	10.5	15
	PU	3	10.5	6
combined		6	21	21

unadjusted variance 5.25

adjustment for ties 0.00

---

adjusted variance 5.25

Ho: phyllanthin(group==PA) = phyllanthin(group==PU)

z = 1.964

Prob > |z| = 0.0495

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

	Type	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Phyllanthin (mg)	PA	9	72	99
	PU	6	48	21
combined		15	120	120

unadjusted variance 72.00

adjustment for ties 0.00

---

adjusted variance 72.00

Ho: phyllanthin(group==PA) = phyllanthin(group==PU)

z = 3.182

Prob > |z| = 0.0015

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล นายสุทธิศักดิ์ ทีทา
วันเกิด วันจันทร์ ที่ 13 กันยายน พ.ศ.2536
สถานที่เกิด อำเภอพล จังหวัดขอนแก่น
สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 52 หมู่ 8 ตำบลแคนเหนือ อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น 40110
ตำแหน่งหน้าที่การงาน นิสิตเภสัชศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2554 สำเร็จการศึกษา มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนบ้านไผ่ อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น
พ.ศ.2560 ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม

ชื่อ ชื่อสกุล นายสันติภาพ พงษ์อานาม
วันเกิด วันพุธ ที่ 16 กันยายน 2535
สถานที่เกิด เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน เลขที่ 57/4 หมู่ 2 ตำบลหัวรอ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน นิสิตเภสัชศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2554 สำเร็จการศึกษา มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาภาคเหนือ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
พ.ศ. 2560 ปัจจุบันกำลังศึกษาอยู่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม