การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

วิทยานิพนธ์

ของ

อรพรรณ อาญาเมือง

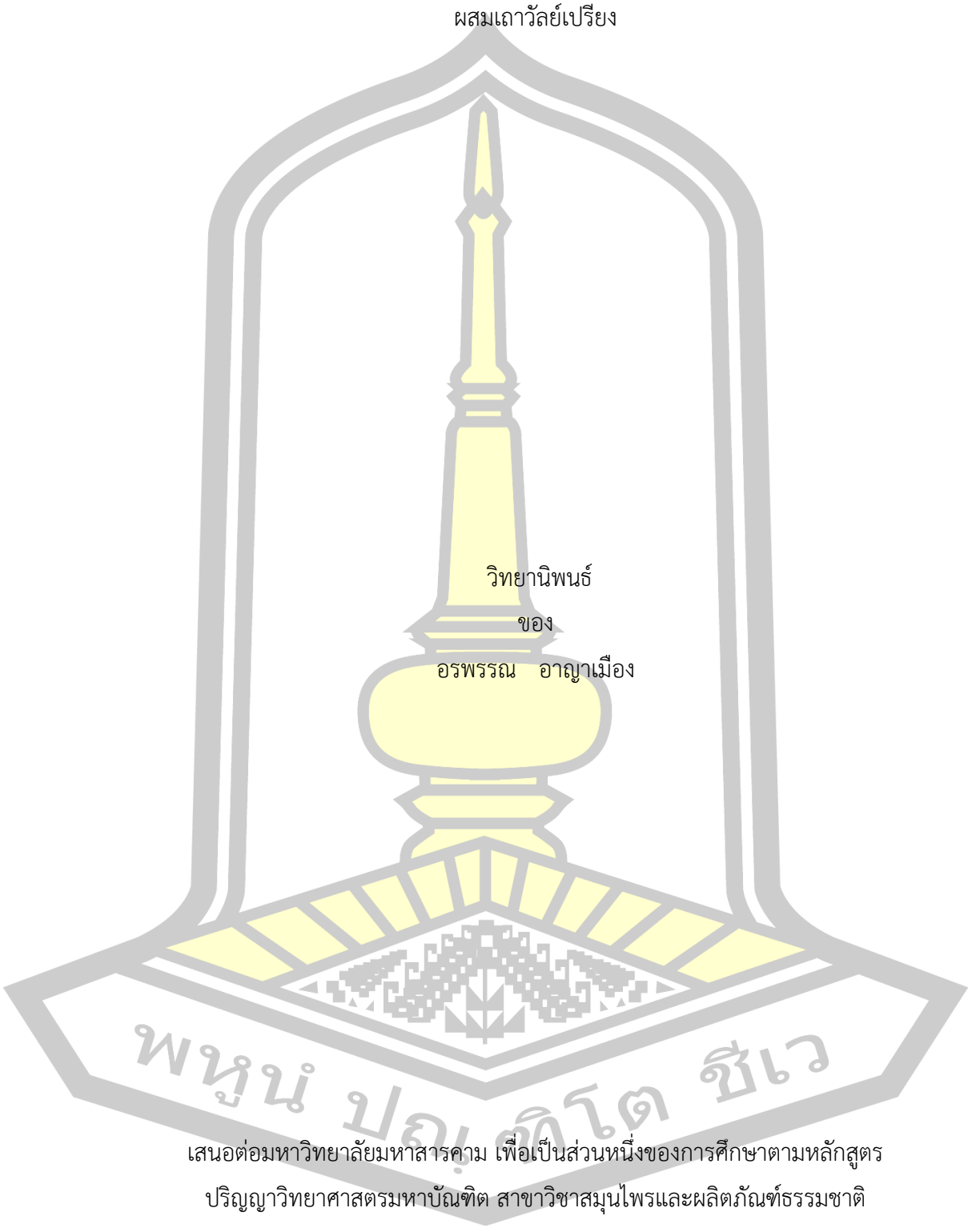
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง



วิทยานิพนธ์

ของ

อรพรรณ อาญาเมือง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Determination of Active Constituents, Anti-Inflammatory Activity and Development of Mixed-Thaowan-Priang Extract Creams

Orapan Aryamuang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Medicinal Plants and Natural Products)

May 2020

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวอรพรรณ อาญาเมือง แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. สมศักดิ์ นวลแก้ว)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. วนิดา ไทรชมภู)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. คัทลียา เมฆจรัสกุล)

.....กรรมการ
(ผศ. ดร. บรรลือ สังข์ทอง)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผศ. ดร. นาฏศจี นวลแก้ว)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พหูน ปญฺ ฑิโต ชีเว

.....	.....
(ผศ. ดร. ชนัตถา พลอยเลื่อมแสง)	(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์	คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

ผู้วิจัย อรพรรณ อาญาเมือง

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วนิดา ไทรชมภู
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คัทลียา เมฆจรัสกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** สมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

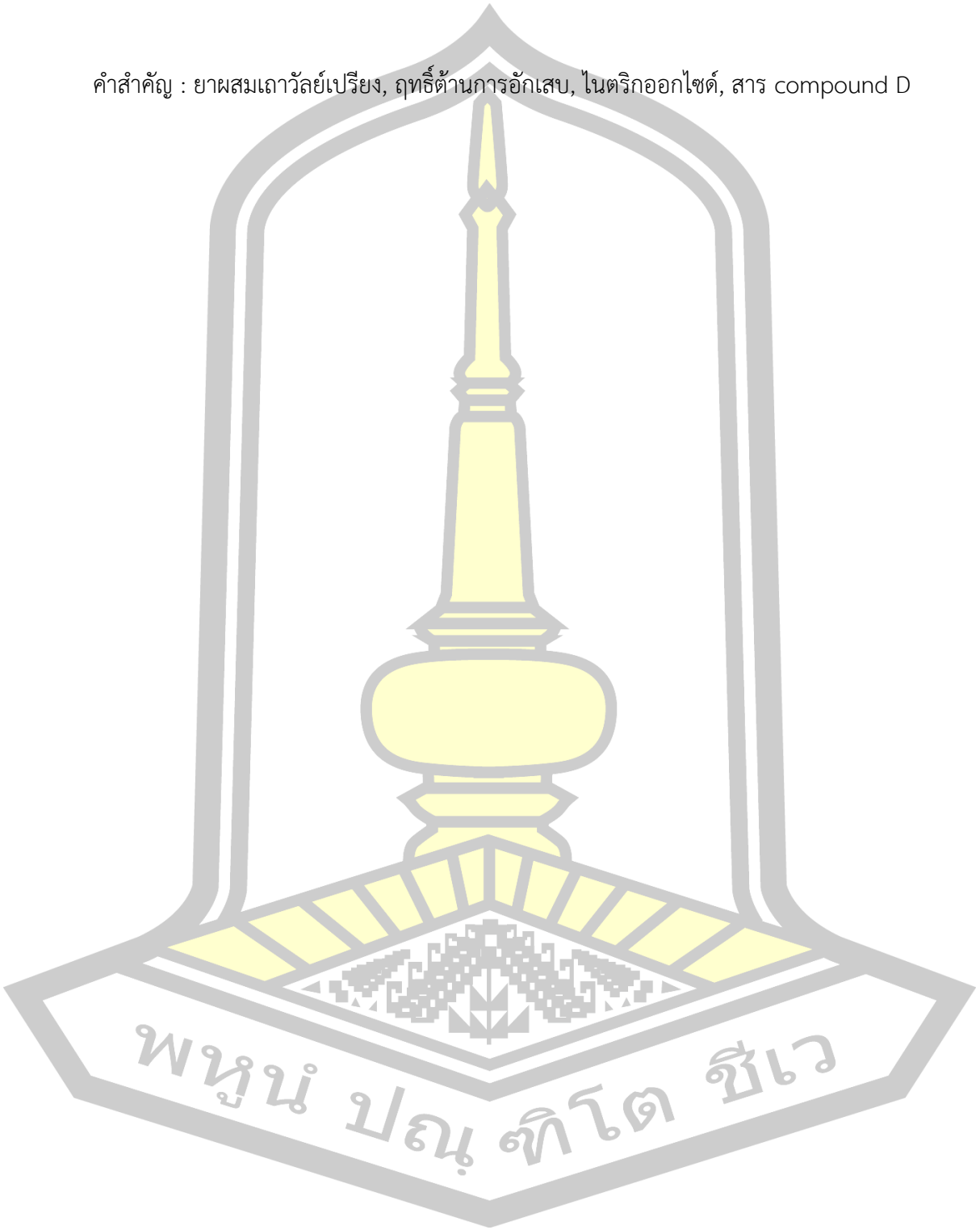
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2563

บทคัดย่อ

ยาผสมเถาวัลย์เปรียง ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง เหง้าไพล แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) และแก่นดูกหิน (มะดูก) เป็นยาใช้รับประทาน สรรพคุณเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย อาจพบอาการไม่พึงประสงค์คือ ปวดท้อง และควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่เป็นแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้น จึงสนใจในการพัฒนาตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงเป็นยาใช้ภายนอก การศึกษาครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งชี้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง ตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง (เถาวัลย์เปรียง : ไพล : ขันทองพยาบาท :มะดูก = 1 : 2 : 1 : 1) สารสกัดด้วย 50% และ 95% เอทานอลด้วยวิธีซอกห์เลต วิเคราะห์ปริมาณสาร compound D ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดด้วยวิธีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์ RAW 267.4 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอล มีปริมาณสาร compound D เท่ากับ 18.893±0.236 mg/g สารสกัด (ร้อยละ 1.889±0.236) และสารสกัดด้วย 95% มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัดด้วย 50% เอทานอล คือค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยประเมินความคงตัวหลังเตรียมตำรับครีมเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องพบว่า ตำรับมีเนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.97±0.02 และค่าความหนืด 52696.67±15.28 cP จากนั้นทำการประเมินความคงตัว หลังจากผ่านกระบวนการ heating – cooling method แล้วพบว่าเนื้อครีมเนียนยังละเอียด แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย มีความหนืดลดลง ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.62±0.02 และค่าความหนืด 50033.33±20.82 cP สรุป ตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงจากสารสกัดด้วย 95% เอทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และไม่มีพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัย

ทางคลินิกต่อไป

คำสำคัญ : ยาผสมเถาวัลย์เปรียง, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ไนตริกออกไซด์, สาร compound D



TITLE Determination of Active Constituents, Anti-Inflammatory Activity and Development of Mixed-Thaowan-Priang Extract Creams

AUTHOR Orapan Aryamuang

ADVISORS Assistant Professor Wanida Caichompoo , Ph.D.
Assistant Professor Catheleeya Mekjaruskul , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Medicinal Plants and Natural Products

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2020

ABSTRACT

The mixed-Thaowan-priang formula, which consists of 4 medicinal plants including *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *Zingiber cassumunar* Roxb. ,*Suregada multiflora* Baill. And *Siphonodon celastrineus* Griff. It has been traditionally used for relieving muscle pain. This medicinal herb formula is contraindicated such as stomach ache and be carefully used in patients with peptic ulcer. It is therefore interesting to develop the mixed-Thaowan-priang formula in a topical dosage form. This study aimed to determine the chemical markers, the anti-inflammatory activity, and development of the the mixed-Thaowan-priang extract creams. The mixed-Thaowan-priang formula was extracted with 50% and 95% ethanol using soxhlet extraction and which were analyzed by using HPLC. The anti-inflammatory activity of The mixed-Thaowan-priang formula was tested for its inhibitory effect against nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells macrophage. The cytotoxic effect of the formula was determined by using the MTT assay. The mixed-Thaowan-priang extract cream was developed. The results showed that the amount of compound D in 95% ethanolic extract was obtained higher than those of 50% ethanolic extract 18.893±0.236 mg/g extract (1.889±0.02%). The 95% ethanolic extract of the mixed-Thaowan-priang formula exhibited a pronounced anti-inflammatory activity with the IC_{50} of 40.08 ± 2.78 µg/mL. The 95% ethanolic extract possessed a more potent anti-inflammatory activity than that of the 50% ethanolic extract and with no cytotoxicity.

The result showed the development of the mixed-Thaowan-priang extract cream after evaluating the stability after fresh preparation at room temperature found that the formula had a creamy texture, smooth, creamy yellow, with good viscosity, did not separate with a pH value of 5.97±0.02 and 52696.67±15.28 cP. Then assess the stability after heating-cooling method, which that the formula is smooth but with a slightly darker yellow color with decrease viscosity, not cracking on the skin, had pH 5.62±0.02 and viscosity 50033.33±20.82 cP. Conclusions, the 95% ethanolic extract of the mixed-Thaowan-priang formula cream possessed a significant anti-inflammatory activity and no cytotoxicity in vivo but which is still required to investigate clinical study.

Keyword : The mixed-Thaowan-priang formula, anti-inflammatory activity, nitric oxide, compound D

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนระดับบัณฑิตศึกษา จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วนิดา ไทรชมภู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คัทลียา เมฆจรัสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ นวลแก้ว ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นาฏศจี นวลแก้ว กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บรรลือ สังข์ทอง กรรมการบัณฑิตศึกษาประจำคณะ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้การสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการดำเนินการวิจัย

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปวิตรา พูลบุตร ที่ให้คำแนะนำด้านบทความวิชาการ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและสนับสนุน วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้ให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ ในห้องปฏิบัติการ

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณ บิดา มารดา ผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน ตลอดจนคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยตั้งแต่เยาว์วัยจนถึงปัจจุบัน

อรพรรณ อาญาเมือง

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ซ

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญภาพประกอบ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 หลักการและเหตุผล 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย 3

1.4 ขอบเขตการวิจัย 4

1.5 กรอบแนวคิด 5

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ 6

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 7

2.1 โรคปวดกล้ามเนื้อ 7

2.2 ยาผสมเถาวัลย์เปรียง 13

2.3 การหาปริมาณสารสำคัญโดยใช้วิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) 27

2.4 การพัฒนาตำรับยาครีมและการทดสอบความคงตัว 33

2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ 34

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 37
3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ 37
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ 38
3.3 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย 39
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย 40
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล 47
บทที่ 4 ผลการวิจัย 48
4.1 การหาปริมาณสารที่สกัด 48
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 49
4.3 การจัดทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 51
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Nitric oxide 52
4.5 การพัฒนาตำรับครีมพื้น 54
4.6 การประเมินคุณภาพของตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียง 57
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 59
5.1 สรุปผล 59
5.2 การอภิปรายผล 61
5.3 ข้อเสนอแนะ 66
บรรณานุกรม 67
ภาคผนวก 71
ภาคผนวกที่ 1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารมาตรฐาน compound D ในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง 72
ภาคผนวกที่ 2 ตารางแสดงการวิเคราะห์หาปริมาณสาร compound D ในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง 73
ประวัติผู้เขียน 74

พหูน ปณ ฑิโต ชีเว

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร compound D 41

ตาราง 2 แสดงความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 42

ตาราง 3 ตำรับครีมพื้น สูตร A โดยมีส่วนประกอบและปริมาณในตำรับ 100 กรัม ดังนี้ 45

ตาราง 4 ตำรับครีมพื้น สูตร B โดยมีส่วนประกอบและปริมาณในตำรับ 100 กรัม ดังนี้ 46

ตาราง 5 แสดง %yield ของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 48

ตาราง 6 แสดงปริมาณสาร compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 51

ตาราง 7 แสดง % inhibition of NO production และค่าอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง (n=3) 53

ตาราง 8 แสดง % inhibition of NO production, IC_{50} (µg/mL) ของสารสกัด 95 % ของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงและ genistein และ % cell viability (n=3) 54

ตาราง 9 แสดงตำรับยาพื้นครีมทั้งหมด 6 สูตร 55

ตาราง 10 แสดงผลการประเมินการทดสอบความคงตัวของครีมพื้น 55

ตาราง 11 แสดงตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง 56

ตาราง 12 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง 57

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

สารบัญภาพประกอบ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด 5
ภาพประกอบ 2 แสดงส่วนเถาแห้งของต้นเถาวัลย์เปรียง 14
ภาพประกอบ 3 แสดงสูตรโครงสร้างของ 16
ภาพประกอบ 4 แสดงส่วนเหง้าแห้งของไพล 18
ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างของสารสำคัญกลุ่ม phenylbutenoid 20
ภาพประกอบ 6 แสดงส่วนแก่นของต้นขันทองพยาบาท 22
ภาพประกอบ 7 แสดงสูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม diterpenoids ที่พบในขันทองพยาบาท 23
ภาพประกอบ 8 แสดงส่วนแก่นแห้งของต้นมะดูก 25
ภาพประกอบ 9 แสดงสูตรโครงสร้างของกลุ่มสาร triterpenoids 26
ภาพประกอบ 10 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อหาค่า IC_{50} และ % Cell viability 44
ภาพประกอบ 11 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสาร compound D 49
ภาพประกอบ 12 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน compound D (A) สารสกัด 50% เอทานอล (B) และ 95% เอทานอล (C) ที่ Retention time ที่ 22.35 นาที 50
ภาพประกอบ 13 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 50% 52

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

สถานการณ์ปัญหาสุขภาพของคนไทยในปัจจุบันซึ่งพบเห็นโดยทั่วไปในสังคมเมือง พบว่ากลุ่มประชากรวัยทำงาน มีปัญหาโรคเกี่ยวกับการทำงานเป็นอย่างมากคือกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและเยื่อพังผืดหรืออีกชื่อหนึ่งคือ Myofascial Pain Syndrome (MPS) คือ อาการปวดที่กล้ามเนื้อลายที่เกิดจากการตึงของกล้ามเนื้อ และเกิดจากจุดกดเจ็บ (Trigger Points หรือ TrP) ในกล้ามเนื้อลายแต่ละมัด หรือเยื่อพังผืดขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร หากจุดกดเจ็บนี้รวมกันเรียกว่า Taut Bands เมื่อกดหรือถูกกระตุ้นลงไปจะมีความรู้สึกไวและปวดมากกว่ากล้ามเนื้อที่ไม่มี TrP และอาจมีอาการร้าวแบบมีแบบแผนเฉพาะ (Referred Pain) และพบอาการของระบบประสาทอัตโนมัติ (Autonomic Symptoms) ร่วมด้วย สามารถพบอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ชา วูบ แต่ไม่พบการอักเสบที่ชัดเจน หากอาการปวดอาการอย่างต่อเนื่องมากกว่า 3 เดือน เรียกว่า Chronic MPS จากการสำรวจการแพร่ระบาดพบว่าร้อยละ 30-80 ของประชากรสหรัฐอเมริกา และร้อยละ 18.7-85.1 ของประชากรในประเทศเยอรมันมีอาการปวดแบบ MPS สำหรับประเทศไทยพบว่าอุบัติการณ์แตกต่างกันไปตามพื้นที่การสำรวจ บางรายงานกล่าวว่า ร้อยละ 21 ของผู้ป่วยออร์โธปิดิกส์ทั่วไป และร้อยละ 30 ของผู้ป่วยในคลินิกเวชปฏิบัติทั่วไปมีอาการ MPS (สมาคมการศึกษาเรื่องความปวดแห่งประเทศไทย., 2552) ซึ่งส่วนใหญ่พบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชายช่วงวัยทำงาน มักเกิดในคนที่มีลักษณะงานที่ต้องอยู่ท่าใดท่าหนึ่งเป็นเวลานานโดยไม่หยุดพัก มีอิริยาบถที่ไม่ถูกต้องต่อเนื่องกัน ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวตลอดเวลาไม่มีความยืดหยุ่น เมื่อกล้ามเนื้อทำงานมากเกินไปกล้ามเนื้อเกิด TrP ทำให้ล้าง่าย เกิดเป็น Taut Bands สามารถคลำพบเป็นก้อนในกล้ามเนื้อ เกิดการคั่งค้างของของเสียในกล้ามเนื้อส่งผลให้รู้สึกปวด โดยสามารถปวดได้ตั้งแต่ระดับต่ำไปจนถึงปวดทรมานจนกระทบกับการดำรงชีวิต หากเป็นเรื้อรังอาจทำให้กล้ามเนื้อหดตึงเกิดความเจ็บปวดในบริเวณนั้น จนเกิดอาการบิดเบี้ยวก่อให้เกิดความผิดปกติทางโครงสร้าง การเคลื่อนไหวลดน้อยลงและเป็นผลเสียต่อการเคลื่อนไหวร่างกายและบุคลิกภาพของผู้ป่วย ทำให้โครงสร้างร่างกายขาดความสมดุลเนื่องจากการหดเกร็งดึงรั้งของกล้ามเนื้อส่วนต่างๆ เป็นอุปสรรคต่อการทำงานและการพัฒนาคุณภาพชีวิต และมีผลเสียต่อสุขภาพของผู้ป่วยในระยะยาว (จิราพร อื้อเทียน, 2546)

การรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อและเยื่อพังผืดสามารถรักษาได้ด้วยการรับประทานยา ทั้งยาแผนปัจจุบันและยาสมุนไพร เพื่อช่วยลดอาการปวดอักเสบของกล้ามเนื้อและช่วยคลายกล้ามเนื้อ

นอกจากนี้ยังมีการรักษาอื่นๆ ได้แก่ การฉีดยาที่จุดเจ็บ การฝังเข็ม การทำกายภาพบำบัด การนวดรักษา การทำกายบริหาร และการปรับพฤติกรรมท่าทางที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น

ปัญหาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อถือเป็นโรคที่มีต้นทุนการรักษาสูง เนื่องจากมีผู้ป่วยเป็นจำนวนมาก การดำเนินโรคเป็นไปในทางเฉียบพลันและเรื้อรัง รวมทั้งยาและเวชภัณฑ์ส่วนมากยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศและมีราคาแพง การให้การรักษาด้วยการรับประทานกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) นั้นต้องเสี่ยงกับภาวะแทรกซ้อนเนื่องจากการใช้ยาเป็นประจำเช่น ภาวะเลือดออกในกระเพาะอาหาร เป็นต้น (สมาคมการศึกษาเรื่องความปวดแห่งประเทศไทย., 2552) ดังนั้นหากมีการรักษาอื่นที่สามารถให้ประสิทธิผลในการรักษาไม่แตกต่างแต่มีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนน้อยกว่า มีต้นทุนที่ต่ำกว่า ก็นับว่าเป็นทางเลือกที่ดี

ในปัจจุบัน มีการใช้สมุนไพรหลายชนิดที่มีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อได้ดี โดยสามารถนำมาใช้เป็นยาใช้ภายในและยาใช้ภายนอกได้ ประกอบกับนโยบายทางสาธารณสุขในปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรด้วยศาสตร์การแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือกมากขึ้น ในบัญชียาจากสมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 ได้กำหนดสมุนไพรที่ใช้สำหรับรักษากลุ่มอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูกในกลุ่มสำหรับรับประทานจำนวน 6 รายการ ได้แก่ ยากษัยเส้น ยาแก้ลมอัมพฤกษ์ ยาธรณีสัณฑะฆาต ยาผสมโคคลาน ยาผสมเถาวัลย์เปรียง ยาสหัสธารา เป็นต้น และกลุ่มสำหรับใช้ภายนอกจำนวน 3 รายการ ได้แก่ ยาขี้ผึ้งไพล ยาประคบ ยาพริก เป็นต้น (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561)

ยาผสมเถาวัลย์เปรียง เป็นตำรับยาแผนไทยตำรับหนึ่งที่ยังคงนิยมใช้ในปัจจุบัน มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ซึ่งในบัญชียาจากสมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 ได้กำหนดสูตรตำรับออกเป็น 2 สูตรคือ ตำรับที่ 1 ในผงยา 100 กรัม ประกอบด้วย เถาวัลย์เปรียง เหง้าไพล แก่นดูกหิน (มะดูก) แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) หนักสิ่งละ 25 กรัม สูตรตำรับที่ 2 ในผงยา 100 กรัม ประกอบด้วย เหง้าไพล หนัก 40 กรัม เถาวัลย์เปรียง แก่นดูกหิน (มะดูก) แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) หนักสิ่งละ 20 กรัม รับประทานครั้งละ 900 มิลลิกรัม – 1.5 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที ทั้งนี้ยาสูตรดังกล่าวมีข้อห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์และควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่เป็นแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากเถาวัลย์เปรียงมีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยา NSAIDs อาจทำให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561)

จากรายงานการใช้ยาผสมเถาวัลย์เปรียงสำหรับรักษาผู้ป่วยที่มีอาการปวดกล้ามเนื้อในคลินิกแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลบุรีรัมย์ พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับยาผสมเถาวัลย์เปรียงรูปแบบยารับประทาน เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำตำรับยาดังกล่าวมาปรับเป็นยาใช้ภายนอก และจากการทบทวนเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงพบว่าสมุนไพรในตำรับซึ่งประกอบด้วยเถาวัลย์เปรียง มะดูก ขันทองพยาบาท และไพล

ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาที่แสดงว่าเถาวัลย์เปรียง และเหง้าไพลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการต้านอักเสบของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง รวมทั้งยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตำรับดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการหาปริมาณสารสำคัญ การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และการพัฒนาตำรับยาครีมผสมเถาวัลย์เปรียง โดยแบ่งออกเป็น ส่วนที่ 1 ศึกษาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง และส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง การศึกษาครั้งนี้จะทำให้ได้ตำรับครีมที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีคุณสมบัตินำไปใช้เป็นครีมสำหรับใช้ภายนอกเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยได้ ซึ่งสามารถนำครีมดังกล่าวไปทำการทดสอบทางคลินิกต่อไป เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการใช้ยาสมุนไพรเพิ่มขึ้น และเพิ่มทางเลือกในการรักษาอาการปวดเมื่อย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

1.2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

1.2.3 เพื่อพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีความคงตัวทางกายภาพ

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

สารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ที่มีปริมาณสารสำคัญที่สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ นำมาพัฒนาเป็นตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีความคงตัวทางกายภาพ

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองเพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง เพื่อนำมาพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงสูตร 2 ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิดคือ เถาวัลย์เปรียง ไพล ขันทองพยาบาท และมะดูก (อัตราส่วน 1:2:1:1) โดยทำการศึกษาที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563 ประกอบด้วย

1.4.1 หาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ได้แก่ สาร D (*E*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-en-2-ol จากไพล ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

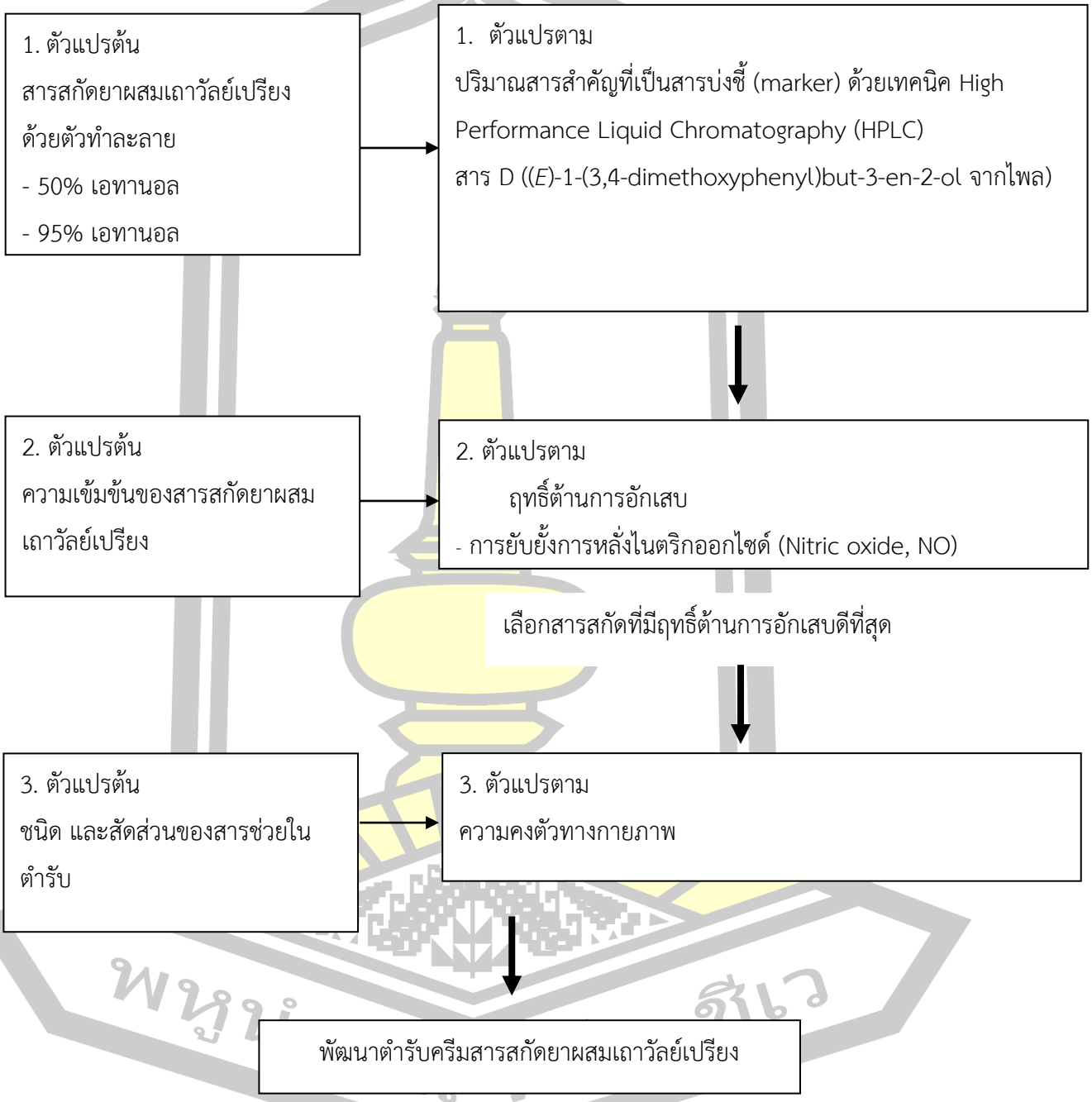
1.4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง โดยวิเคราะห์การยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO)

1.4.3 พัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว

1.5 กรอบแนวคิด

งานวิจัยในครั้งนี้ มีกรอบแนวคิดโดยรวมดังแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิด

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

1.6.2 ทราบผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

1.6.3 ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

1.6.4 ได้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในรูปแบบยาใช้ภายนอก สำหรับเป็นทางเลือกในการรักษาให้แก่ผู้ป่วยในกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อ

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.7.1 ยาผสมเถาวัลย์เปรียง ประกอบด้วย เถาวัลย์เปรียง ไพล ขันทองพยาบาท และมะดูก (อัตราส่วน 1 : 2 : 1 : 1)

1.7.2 ตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง หมายถึง ตำรับยาครีมจากสารสกัดเอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง

1.7.3 การอักเสบ หมายถึง กระบวนการการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อการบาดเจ็บจากสิ่งกระตุ้น มีอาการแสดงที่สำคัญของการอักเสบคือ ปวด บวม แดง ร้อน ซึ่งกระบวนการอักเสบที่มากเกินไปส่งผลให้เกิดอันตรายแก่เนื้อเยื่อ สามารถยับยั้งได้ด้วยยาต้านการอักเสบ

1.7.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ หมายถึง การทดสอบการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบ โดยสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบคือ lipopolysaccharide (LPS) ด้วยวิธี griess assay ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบ (% inhibition of NO production) จะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งหรือควบคุมสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบไม่ให้กระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบในร่างกาย

1.7.5 ค่า IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบได้ร้อยละ 50

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเรื่องการพัฒนาตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อนั้น ประกอบไปด้วยข้อมูลและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 โรคปวดกล้ามเนื้อ

2.2 ยาผสมเถาวัลย์เปรียง

2.3 การหาปริมาณสารสำคัญโดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC)

2.4 การพัฒนาตำรับยาครีมและการทดสอบความคงตัว

2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

2.1 โรคปวดกล้ามเนื้อ

โรคปวดกล้ามเนื้อ (สมาคมการศึกษาเรื่องความปวดแห่งประเทศไทย., 2552) จัดอยู่ในกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและเยื่อพังผืดมัยโอฟาสเชียล (Myofascial Pain Syndrome, MPS) หมายถึงกลุ่มอาการปวดร้าว (referred pain) และหรืออาการของระบบประสาทอิสระ (autonomic symptoms) อันเนื่องมาจาก trigger point(s) (TrP) ของกล้ามเนื้อ หรือเยื่อผังผืด โดยจำกัดอยู่บริเวณหนึ่งบริเวณใด (regional pain) ของร่างกาย ถ้าอาการต่างๆ ดำเนินอย่างต่อเนื่องหรือเกิดซ้ำอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน เรียกว่า chronic MPS

2.1.1 อุบัติการณ์ MPS เป็นสาเหตุของปัญหาปวดเรื้อรังที่พบบ่อยเป็นอันดับต้นๆ มักเกิดร่วมกับภาวะอื่นได้ อุบัติการณ์มีความแตกต่างกันในแต่ละการสำรวจ บางรายงานกล่าวว่าพบได้ถึง 21 % ของผู้ป่วยออร์โธปิดิกส์ทั่วไปและ 30% ในคลินิกเวชปฏิบัติทั่วไป

2.1.2 ลักษณะทางคลินิก มีอาการเด่นคือปวดร้าวเฉพาะส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกาย (regional pain) ความรุนแรงมีได้ตั้งแต่ปวด เล็กน้อยเพียงรำคาญจนถึงปวดรุนแรงทรมานอย่างมาก TrP ของกล้ามเนื้อแต่ละมัดจะมีลักษณะการปวดร้าวที่เฉพาะตัว ซึ่งมีความสำคัญในการค้นหาว่าอาการปวดเกิดจาก TrP ของกล้ามเนื้อมัดใด และอาการของระบบประสาทอิสระซึ่งพบร่วมได้บ่อย เช่น ชา เย็น เหน็บ หนาว หรืออาการแสดง เช่น ซีด ขนลุก เหงื่อออกตามบริเวณที่มีอาการปวดร้าวส่วน TrP บริเวณคออาจมีอาการมึนงง หูอื้อ ตาพร่าได้ การตรวจร่างกายคือการสัมผัสด้วยมือ โดยการกดคลายกล้ามเนื้อต้องพบ TrP ที่ก่ออาการ อันมีคุณสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญ 3 ประการคือ

2.1.2.1 เป็นจุดที่มีความไวสูง (hyperirritable spot) ไวต่ออาการปวดกว่าบริเวณใกล้เคียง

2.1.2.2 เป็นจุดที่สามารถกระตุ้นให้อาการต่างๆ แสดงออกชัดเจน (reproducible symptoms) ด้วยแรงกดหรือการแทงด้วยปลายเข็ม

2.1.2.3 TrP แต่ละจุดมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แต่มักจะเกิดร่วมกันเป็น กลุ่ม (cluster) ในกรณีที่ TrP อยู่ในกล้ามเนื้อที่ไม่ลึกเวลาคลำ จะรู้สึกได้ถึงความเป็นแถบตึง (taut band)

2.1.3 พยาธิกำเนิด

กลไกที่แท้จริงยังไม่ทราบชัดเจน ที่กล่าวถึงกันอย่างกว้างขวางในกรณีของ chronic MPS คือการผสมกันระหว่างความผิดปกติของ peripheral nociception กับ central sensitization เรียงลำดับเหตุการณ์โดยเริ่มต้นจากภาวะที่กล้ามเนื้อทำงานเกินกำลังจาก physical และ/หรือ psychosocial overload จนถึงจุดที่มี motor endplate ทำให้บกพร่องของพลังงานเป็นที่มาของการอธิบายภาวะอาการล้าง่ายของกล้ามเนื้อมัดที่มี TrP ทำให้เกิด Muscle contraction knot เป็น self-sustained contraction ที่ตรงตำแหน่งของ TrP จึง สามารถคลำได้เป็นลำหรือก้อน และทำให้พิสัยการเคลื่อนไหวน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่ามีการคั่งค้างของ waste products ที่ก่ออาการปวดหลายชนิด แต่ไม่พบ inflammatory-process cell ที่ชัดเจน Autonomic nervous dicturbance จากการกระตุ้นของสารคั่งค้างดังกล่าวเป็นที่มาของ autonomic symptoms ต่างๆ ในบริเวณนั้นๆ และตามมาด้วย Central sensitization ซึ่งจะทำให้ TrP มีความไวต่อการกระตุ้นมากขึ้น

2.1.4 การวินิจฉัย ตั้งอยู่บนพื้นฐานการวินิจฉัยทางคลินิกจากประวัติและตรวจร่างกายเป็นสำคัญคือ ประวัติของอาการปวดหรืออาการประสาทอิสระบริเวณใดบริเวณหนึ่ง ร่วมกับตรวจร่างกายที่กล้ามเนื้อ โดยการคลำ หรือกดด้วยนิ้วมือ จะต้องพบ TrP ที่สามารถแสดงอาการต่างๆ ที่ผู้ป่วยให้ประวัติได้ชัดเจน ถ้าอาการต่างๆ ดำเนินอย่างต่อเนื่องหรือเกิดซ้ำอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน เรียกว่า chronic MPS

MPS พบได้ทั้ง acute และ chronic forms ทั้ง primary และ secondary forms โดย Acute MPS มักจะมีประวัตินำมาของ sudden overload เช่น sprain, strain,หรือinjury ส่วนใหญ่อาการจะค่อยๆ ดีขึ้นเองตามลำดับจนหาย หรือถ้าไม่หาย การรักษาเฉพาะที่ที่ตำแหน่งของ TrP (TrP eradication) ด้วยวิธีต่างๆ มักจะได้ผลดีต่างกับกรณีของ Chronic MPS ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเรื่องที่มีปัจจัยเกื้อหนุนให้เรื้อรัง (perpetuating factors: PF) ปัจจัยต่างๆ ในที่นี้หมายถึงภาวะไม่ใช่โรค ในกรณีนี้เรียกว่า secondary MPS ซึ่ง PF แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ที่ควรทราบคือ

2.1.4.1 Physical PF ที่พบบ่อย ได้แก่ poor physical conditions, poor posture, repetitive microtrauma ที่คาบเกี่ยวกับพฤติกรรมการใช้กล้ามเนื้อมัดหรือกลุ่มนั้นอย่างซ้ำๆ จนเกิดภาวะ overload บ่อยครั้งคือกิจวัตรหรืองานที่ทำประจำ ซึ่งผู้ป่วยและแพทย์มักจะนึกไม่ถึง หลายรายจึงให้ประวัติว่าอาการเกิดขึ้นเองโดยไม่ได้ไปทำอะไรผิดปกติ ด้วยเหตุนี้การกลับมาของ TrP หลังจากการทำ TrP eradication จึงเป็นเรื่องที่ไม่ได้เกินความคาดหมาย

2.1.4.2 Psychological PF ที่พบบ่อย ได้แก่ ภาวะวิตกกังวล/เครียด (anxiety/stress), ท้อแท้/ ซึมเศร้า (despair/depress)

2.1.4.3. Systemic PF ที่พบบ่อยได้แก่ ภาวะ low normal vitamin B 1, 6, 12, folic acid และ vitamin C อาการที่พบบ่อยคือ เพลีย ชาปลายมือ ปลายเท้าเป็นครั้งคราว ภาวะ borderline hypothyroid อาการที่พบบ่อยคือ อ่อนล้า เฉื่อยชา หนาวง่าย ท้องผูก Chronic MPS อาจเกิดร่วมกับโรคอื่น (co-morbid) ที่พบบ่อย ได้แก่ osteoarthritis และ fibromyalgia

การตรวจค้นทางห้องปฏิบัติการ เพื่อวินิจฉัย MPS การตรวจค้นทางห้องปฏิบัติการไม่มีความจำเป็น เพราะที่ตำแหน่ง TrP จะไม่พบความผิดปกติที่ชัดเจนใดๆ จากการตรวจค้นทางห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่ทราบได้จากการซักประวัติและตรวจร่างกาย การตรวจค้นอาจมีความจำเป็นในกรณีที่สงสัยโรคอื่นหรือโรคร่วม (co-morbid) ต่างๆ ที่การตรวจค้นทางห้องปฏิบัติการช่วยในการวินิจฉัย เช่น รังสีวินิจฉัยในกรณี osteoarthritis

2.1.5 การประเมินปัญหา การประเมินปัญหาที่เหมาะสมทำให้ทราบถึงภาพรวมขนาดของปัญหา แนวทางการรักษา ตลอดจนแนวโน้มของการพยากรณ์โรค การประเมินปัญหา MPS จึงเป็นขั้นตอนที่มีความสสำคัญมาก โดยพื้นฐานควรประกอบ 3 สิ่งคือ

2.1.5.1 อาการปวด (pain severity) โดยประเมินเชิงปริมาณ (quantitative) มาตรวัดที่แนะนำ คือ numerical rating (NRS) โดยใช้ 11- point Liker scale (0 = ไม่ปวดเลย, 10 = ปวดมากที่สุด)

2.1.5.2 PF ประเมินจากประวัติอาการและการตรวจร่างกายทั้ง physical, psychological, และ systemic PF

2.1.5.3 ในกรณีเรื้อรังควรมองหา co-morbid ที่อาจเกิดร่วมโดยเฉพาะที่มีอาการใกล้เคียงกับ MPS เช่น inflammatory joint disease (เช่น osteoarthritis), radiculopathy, fibromyalgia

2.1.6 การวินิจฉัยแยกโรค MPS เป็นกลุ่มอาการที่นอกจากเลียนแบบโรคอื่นได้และยังอาจเกิดร่วมกับโรคอื่นๆ ได้ หลักการที่นำมาพิจารณาวินิจฉัยแยกโรคจึงต้องคำนึงถึงสี่ประเด็นหลักที่สำคัญเสมอ คือ

2.1.6.1 MPS เป็นกลุ่มอาการปวดที่สามารถเกิดได้ทั่วทุกบริเวณของร่างกาย การวินิจฉัยแยกโรค จึงต้องแยกจากโรคต่างๆ ที่สามารถก่อให้เกิดอาการปวดในบริเวณนั้น ๆ เช่น TrP ที่กล้ามเนื้อบ่า คอ และศีรษะก่อให้เกิดอาการปวดหัวจึงต้องวินิจฉัยแยกโรคกับ tension headache กับ migraine ส่วน TrP ที่กล้ามเนื้อหน้าอกด้านซ้ายทา ให้เจ็บหน้าอกจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องวินิจฉัยแยกโรคกับภาวะ angina pectoris

2.1.6.2 บริเวณที่มีอาการปวดอาจแคบหรือกว้างขึ้นอยู่กับ TrP ของกล้ามเนื้อแต่ละมัด ถ้าเป็น บริเวณแคบและใกล้ตำแหน่งของข้อต่อต้องแยกโรคกับภาวะ osteoarthritis, bursitis หรือ tendinitis ถ้ามีอาการเป็นบริเวณกว้างต้องแยกกับภาวะ neuralgia หรือ peripheral neuropathy

2.1.6.3 ในกรณีที่ TrP กระจายหลายบริเวณต้องแยกกับ widespread pain 1 เช่น fibromyalgia

2.1.6.4 Chronic MPS อาจเกิดร่วมกับ co-morbid ที่มีอาการคล้ายคลึงกันได้บ่อย เช่น osteoarthritis

2.1.7 การรักษา Chronic MPS เป็นภาวะที่มีการรักษาหลากหลายรูปแบบที่สุดภาวะหนึ่ง จากการขาดความเข้าใจในลักษณะของโรคและความสับสนในการวินิจฉัยแยกโรค เพื่อความชัดเจนจึงมีความจำเป็น เบื้องต้นที่จะต้องจำแนกให้ได้ว่าเป็น primary MPS, secondary MPS (TrP เกิดขึ้นจากการชักนำของ PF) หรือ chronic MPS ที่มี co-morbid (อาจมีมากกว่าหนึ่ง primary diseases) เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกการรักษาที่เหมาะสมกล่าวคือ การรักษา primary MPS ที่เป็นสาเหตุอาการปวดของผู้ป่วยโดยไม่มี PF ซึ่งพบได้น้อย ส่วนใหญ่สาเหตุที่ทำให้เกิดอาการเรื้อรังมาจากการมองข้ามในการวินิจฉัย ถ้าวินิจฉัยถูกต้อง การรักษาที่ TrP หรือ TrP eradication ทุกวิธี ได้ผลดี และไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในด้าน evidence-based ของแต่ละวิธีการรักษาที่เหมาะสมควรจะพิจารณากรรมวิธีที่ผู้ป่วยพึงพอใจและไม่มีข้อห้ามเป็นอันดับแรกๆ ส่วนการรักษาระยะยาวเพื่อป้องกันการเกิดซ้ำจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัยสามารถนำไปปฏิบัติได้เอง เข้าถึงได้ง่ายสอดคล้องกับวิถีชีวิตและคุ้มค่า เทคนิคการทำ TrP eradication ที่ได้รับความนิยมได้แก่

การยืดกล้ามเนื้อที่มี TrP (stretching) ยืดกล้ามเนื้อช้าๆ จนถึงจุดที่ตึงหรือเริ่มมีอาการปวดเล็กน้อย และค้างไว้ระยะเวลาหนึ่ง (prolong stretching) ข้อดีคือปลอดภัย สะดวกและสามารถทำได้เอง ถือเป็นมาตรฐานการรักษาพื้นฐานที่จะต้องทำในทุกราย โดยทั่วไปควรยืดกล้ามเนื้อค้าง ไว้นาน 20-30 วินาที ขณะยืดควรอยู่ในภาวะผ่อนคลายและจัดท่าทางให้มั่นคง ทำชุดละ 5-10 ครั้ง และแนะนำให้ทำอย่างน้อยวันละ 2 ชุด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นับเป็น 1 ชุด

การนวด (massage) นิยมนวดแบบกดจุด (acupressure) ส่วนการนวดแผนไทยจะครอบคลุมพื้นที่ได้ที่เป็นจุดเด่นคือ deep relaxation นวดไทยมีสองแบบคือ นวดไทยราช

สำนักซึ่งเน้น การกดจุดอย่างเดียว และนวดไทยแผนเชลยศักดิ์ที่มีการยืดดัดร่วมด้วย ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา TrP ได้เป็นอย่างดี แต่ต้องระวังหรือหลีกเลี่ยงในรายที่มีภาวะ mechanical instability การนวด ควรทำติดต่อกัน 6-12 ครั้ง ถือเป็น 1 ชุด

การทำกายภาพบำบัด (physical therapy) เป็นการรักษาที่มีองค์ประกอบหลายอย่างที่ช่วยรักษา TrP เช่น การประคบร้อน การ นวด การยืดกล้ามเนื้อ ส่วนใหญ่จะทำมากกว่าหนึ่งอย่าง ซึ่งการกายภาพบำบัด 2 สัปดาห์ถือเป็น 1 ชุด

การฝังเข็ม (acupuncture) ปลายเข็มจะทำให้ TrP คลายตัวด้วยกลไก mechanical disruption และพบว่าจุดฝังเข็ม มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับตำแหน่งของ TrP ที่พบบ่อยถึง 71% การฝังเข็ม 10 ครั้ง คือ 1 ชุด ส่วนการแทงเข็มที่ TrP (dry needling) เป็นอีกทางเลือกที่ใช้แทนการฝังเข็มได้

การฉีดยาที่ TrP (trigger point injection)เชื่อว่าผลการรักษา TrP ที่สำคัญมาจากการแทงเข็ม โดยที่สารหรือยาที่ใช้เป็นเพียงตัวเสริมสารที่นิยมใช้คือ ยาชาเฉพาะที่ ควรเลือกใช้ชนิดที่มีผล myotoxic น้อยและความเข้มข้นอยู่ในระดับที่ระงับการทำงานของ sensory fiber โดยไม่ยับยั้งการทำงานของ motor fiber เช่น 0.5 % bupivacaine หรือ 1% lidocaine ยาชาที่ใช้ต้องไม่มีส่วนผสมของ adrenaline ที่จะทำให้มีการหดตัวของเส้นเลือดบริเวณ TrP ปริมาณยาที่ใช้เฉลี่ย 0.5-2 มิลลิลิตร ต่อจุด ขึ้นอยู่กับขนาดของกล้ามเนื้อ แต่ต้องคำนึงถึงปริมาณสูงสุดในแต่ละครั้งที่ทำการรักษาหลายจุดเพื่อความปลอดภัย

Botulinum Toxin injection มีข้อบ่งชี้ในกรณี refractory TrP หรือ TrP ที่ตอบสนองต่อการทำ TrP eradication แต่ ผลที่ได้อยู่เพียงเวลาอันสั้นด้วยค่าใช้จ่ายที่สูงเพราะยาราคาแพงจึงสมควรอยู่ในดุลพินิจของผู้เชี่ยวชาญ

ยา (drugs) จนถึงปัจจุบันยังไม่มีหลักฐานว่ายาตัวใดสามารถทำให้ TrP คลายตัวจนหายไปได้แต่ยาก็มีความจำเป็นในกรณีต่างๆ เช่น ลดอาการปวดซึ่งเป็นการรักษาตามอาการในกรณีที่ปวดน้อยถึงปานกลางนิยม ใช้ยาแก้ปวดธรรมดา เช่น acetaminophen ส่วนใหญ่ใช้ในช่วยแรกของการทำ TrP eradication ซึ่งบางวิธีอาจมีอาการปวดหลังทำการรักษาได้ เช่น trigger point injection การฝังเข็ม และควรหลีกเลี่ยง aspirin เนื่องจากเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะ bleeding ของการทำ TrP eradication หลายวิธี ในกรณีที่ปวดปานกลางถึงรุนแรงอาจพิจารณาให้ยากลุ่ม tramadol และหลีกเลี่ยงการใช้ติดต่อเป็นเวลานาน ยาคลายกล้ามเนื้อ (muscle relaxants) ที่พบว่าแพทย์นิยมสั่งให้ผู้ป่วยยังไม่มีหลักฐานสนับสนุนว่าสามารถทำให้ TrP สลายหรือคลายตัวได้อีก ทั้งอาจทำให้ภาวะ overload ที่ TrP มากขึ้นจากการที่ยาไปมีผลที่กล้ามเนื้อปกติ (normal muscle) รอบๆ ให้คลายตัวผู้ป่วยบางรายจะรู้สึกถึงอาการที่มากขึ้นได้สำหรับรายที่ใช้แล้วอาการดีขึ้น มักจะเป็นในกรณีของ TrP ที่กล้ามเนื้อรอบๆ หรือใกล้เคียงมีการเกร็ง (muscle spasm) หรือความตึงตัว

(muscle tension) ร่วมอยู่ด้วยซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบได้ไม่น้อย ยาจะมีผลในการคลายและลดอาการของกล้ามเนื้อรอบๆ TrP แต่จะไม่สามารถทำให้ TrP คลายหรือหายไปได้ NSAIDs ก็เป็นอีกกลุ่มของยาที่ถูกใช้บ่อยในกรณี MPS แต่ผลที่ได้จะน้อยกว่าที่คาดหวังเนื่องมาจากที่ตำแหน่งของ TrP นั้นไม่พบ inflammatory-mediated cells ที่ชัดเจน แต่ยากลุ่มนี้อาจมีประโยชน์ในกรณีที่มี inflammatory joint diseases เป็น co-morbid ส่วน Steroids เป็นอีกกลุ่มยาที่นิยมนำมาใช้ในการฉีดที่ตำแหน่ง TrP โดยเชื่อว่าได้ผลดีกว่าการใช้ยาเฉพาะที่ในการลดอาการปวดและแก้ไขภาวะ fibrosis ที่ตำแหน่ง TrP แต่ไม่มีหลักฐานสนับสนุนจึงไม่แนะนำให้ใช้ เนื่องจากผลที่ได้ไม่คุ้มค่าต่อการเสี่ยงกับ local และ systemic side effects ของ steroid

การใช้รักษา PF บางอย่างเช่น vitamin, antidepressants และอาจใช้ anxiolytics เช่น clonazepam ในระยะสั้นตามความจำเป็น ส่วนการใช้รักษา co-morbid ตัวอย่างที่พบบ่อยคือ osteoarthritis และ neuropathic pain การรักษาแต่ละวิธีจะมีจุดเด่นและจุดด้อยรวมทั้งข้อควรระวังและข้อห้ามที่อาจมีความแตกต่างกันการรักษาในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการมากและซับซ้อนอาจจำเป็นต้องมีการผสมผสาน (mix and match) ของการรักษามากกว่าหนึ่งอย่างเพื่อความเหมาะสม ถ้าผลการรักษาด้วย TrP eradication 2-3 ชุด แล้วไม่ได้ผลดี มักจะเป็น secondary MPS ที่มีภาวะหรือปัจจัยชักนำ (PF) ซ่อนเร้นอยู่ ควรทำการค้นหาและถ้าพบก็ให้รักษาแบบ secondary MPS หรือถ้ามี co-morbid เป็นตัวกระตุ้นต้องรักษา co-morbid ร่วมกัน

ในส่วนของการรักษา secondary MPS นั้น Secondary MPS หมายถึง MPS อันเนื่องมาจากการชักนำของ PF การรักษาที่ TrP หรือ TrP eradication เป็นเพียงการรักษาตามอาการและมักจะได้ผลชั่วคราวเป็นเหมือนเกมรับ การรักษา เพื่อหวังผลระยะยาวที่เป็นเหมือนเกมรุกจะต้องมุ่งประเด็นที่การค้นหาและทำการแก้ไข PF ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่ม และอาจพบได้มากกว่าหนึ่งอย่างในผู้ป่วยบางรายการแก้ไข PF นั้นมีดังนี้

Physical PF ปัจจัยทางร่างกายของผู้ป่วยที่ทำให้ TrP อยู่ในสภาพที่ overload จนเกิด อาการได้บ่อยมักจะมีความคล้ายหรือใกล้เคียงกันในเกือบทุกรายคือ ท่าทางที่ไม่อยู่ในสมดุล (poor posture) แก้ไขโดยจัดสมดุลให้ร่างกายอยู่ในลักษณะที่เสียเปรียบเชิงกลน้อยสุด โดยใบหู หัวไหล่ ปมกระดูก Trochanter อยู่ในแนวเส้นดิ่งเดียวกันในท่านั่ง และอยู่ในแนวเส้นเดียวกับจุดกลางด้านข้างข้อเข่าในท่ายืน (good posture) ในทางปฏิบัติมีได้หลายวิธี เช่น การปรับท่าทาง การดัดแปลงอุปกรณ์เครื่องใช้ที่มีผลต่อท่าทางให้เหมาะสม ปรับสมดุลร่างกาย ด้วยโยคะส่วนที่เหมาะสมและนิยมในรายสูงอายุ อาจเป็นรำไม้พลองหรือรำมวยจีน การแก้ไขท่าทาง นอกจากมีผลในการรักษายังเป็นการเสริมบุคลิกภาพไปในตัว ในรายที่สมรรถภาพร่างกายไม่สมบูรณ์เพียงพอ (poor physical) แก้ไขโดยการออกกำลังกายสม่ำเสมอ นอกจากเป็นการรักษาแล้วยังเสริมภาพลักษณ์ได้อย่างดี ข้อควรระวังคือ อาการปวดอาจกำเริบขึ้นซึ่งมักเกิดจากออกกำลังมากเกิน

ความสามารถของร่างกาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องออกกำลังอย่างค่อยเป็นค่อยไปและคำนึงถึงสมรรถภาพของตนเองให้ดี

Psychological PF ที่สำคัญคือความวิตกกังวลจนอาจถึงท้อแท้ซึมเศร้าจากความ เรื้อรังของอาการที่ไม่ได้รับคำตอบที่ชัดเจน บ่อยครั้งที่หลายรายถูกเข้าใจว่าแกล้งหรือไม่ได้ปวดจริง ทั้งถูกคิดว่ามีอาการทางจิตใจเป็นสาเหตุหลักเนื่องจากอาการมักจะกำเริบหรือรุนแรงช่วงที่ทำงานมาก ซึ่งเป็นช่วงที่ปัจจัยกระตุ้นทางกายมาคู่กัน การวินิจฉัยที่เหมาะสมก็เพียงให้ผู้ป่วยสบายใจขึ้นและการอธิบายให้ข้อมูลที่ถูกต้องชัดเจน ให้ความเข้าใจตลอดจนแนะนำทางรักษา ให้กำลังใจและให้ความมั่นใจมีประโยชน์มาก สำหรับรายที่มีอาการรุนแรงอาจพิจารณาให้ anxiolytic หรือ antidepressant ในช่วงเริ่มการรักษาหรือช่วงที่มีปัจจัยเหล่านี้เข้ามาเกื้อหนุนอาการเป็นครั้งคราว

Systemic PF เป็นเรื่องที่ต้องนึกถึง โดยสอบถามหรือสังเกตจากอาการที่ผู้ป่วยบอกเล่าที่พบบ่อยคือ อาการอ่อนเพลียชาปลายมือปลายเท้าเป็นครั้งคราวให้นึกถึงภาวะ low normal level water soluble vitamins รักษาโดยการรับประทานวิตามินเสริม B1, 6, 12 และ folic acid ตลอดจน vitamin C หลังการรับประทานวิตามินเสริมอาการมักจะดีขึ้นภายใน 1-2 เดือน สำหรับรายที่มีอาการอ่อนล้า เฉื่อยชา หนาวง่าย ท้องผูก ให้นึกถึงภาวะ borderline hypothyroid ควรทำการยืนยันโดยส่งตรวจระดับฮอร์โมนก่อนถ้าจะมีการรับประทานวิตามินเสริมและควร ให้ในปริมาณเล็กน้อย

2.2 ยาผสมเถาวัลย์เปรียง

ยาผสมเถาวัลย์เปรียง เป็นยารับประทานสำหรับรักษาโรคกลุ่มอาการทางกล้ามเนื้อและกระดูก อยู่ในบัญชียาสมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติ ปี 2561 มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย สูตรตำรับที่ 1 ในผงยา 100 กรัม ประกอบด้วย เถาวัลย์เปรียง เหง้าไพล แก่นดูกหิน (มะดูก) แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) หนักสิ่งละ 25 กรัม สูตรตำรับที่ 2 ในผงยา 100 กรัม ประกอบด้วย เหง้าไพล หนัก 40 กรัม เถาวัลย์เปรียง แก่นดูกหิน (มะดูก) แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) หนักสิ่งละ 20 กรัม เพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ซึ่งขนาดและวิธีใช้คือ รับประทานครั้ง 900 มิลลิกรัม – 1.5 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที โดยมีข้อห้ามคือห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ และคำเตือนคือควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่เป็นแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากเถาวัลย์เปรียงมีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยาแก้ปวดในกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) อาจทำให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังอาจพบอาการไม่พึงประสงค์คือ ปวดท้อง ท้องผูก ปัสสาวะบ่อย คอแห้ง และใจสั่น (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561) จากทฤษฎีการแพทย์แผนไทยยาผสม

เถาวัลย์เปรียงตำรับนี้ประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด จึงทำให้มีรสยาและสรรพคุณรวมของตำรับคือรสเฝื่อนเอียนจากเถาวัลย์เปรียง ช่วยในการลดอาการปวดของกล้ามเนื้อและเส้นเอ็น รสเฝื่อนเมาจากแก่นขันทองพยาบาทและแก่นมะดูก ช่วยในการขับน้ำเหลืองเสีย ลดความร้อนที่เกิดจากการอักเสบ และรสร้อนจากเหง้าไพลช่วยในการกระจายลมในเส้น ลดอาการปวด ซึ่งจะมีสรรพคุณรวมของตำรับที่ครอบคลุมการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อได้มากกว่ายาเถาวัลย์เปรียงเดี่ยวเพียงตัวเดียว

จากข้อมูลข้างต้น จะพบว่ามีสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงจำนวน 4 ชนิด ดังนี้

2.2.1 เถาวัลย์เปรียง

ภาพประกอบ 2 แสดงส่วนเถาแห้งของต้นเถาวัลย์เปรียง

2.2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เถาวัลย์เปรียง ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Derris scandens* Benth. วงศ์ Leguminosae - Papilionoideae ชื่อสามัญคือ Jewel Vine มีชื่อท้องถิ่นอื่นๆ คือ เครือตาปลา เครือไหล (เชียงใหม่) เครือตับปลา (เลย) เถาตาปลา เครือเขาหนัง ย่านเหมาะ (นครราชสีมา) พานไสน (ชุมพร) เครือตาป่า เครือตับปลา เครือเขาหนัง เครือตาปลาโคก (หากเกิดบนบก) เครือตาปลาน้ำ (หากเกิดในที่ลุ่ม) (ภาคอีสาน) เถาวัลย์เปรียงขาว เถาวัลย์เปรียงแดง (ภาคกลาง) ย่านเหมาะ (ภาคใต้) เป็นต้น (นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ, 2547)

เถาวัลย์เปรียง จัดเป็นไม้เถาเลื้อยขนาดใหญ่ สามารถเลื้อยไปได้ไกลถึง 20 เมตร มีกิ่งเหนียวและทนทาน กิ่งแตกเถายืดยาวอย่างรวดเร็ว เถามักเลื้อยพาดพันตามต้นไม้ใหญ่ เถาแก่มีเนื้อไม้แข็ง เป็นสีน้ำตาลเข้มอมสีดำหรือแดง เถาใหญ่มักจะบิด เนื้อไม้เป็นสีออกน้ำตาลอ่อน ๆ มี

วงเป็นสีน้ำตาลไหม้คล้ายกับเถาต้นแดง (เนื้อไม้มีรสเฝื่อนและเอียน) ตามกิ่งอ่อนและยอดอ่อนมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกออกเรียงสลับกัน มีใบย่อย 4-8 ใบ ลักษณะของใบย่อยเป็นรูปรี ปลายใบเป็นรูปหอก โคนใบมน ขอบใบเรียบ หลังใบเรียบเป็นมันสีเขียวเข้ม ท้องใบเรียบ ดอก ออกดอกเป็นช่อตามซอกใบและปลายยอด ช่อดอกเป็นสีขาวห้อยลง ดอกเป็นสีขาวอมสีม่วงอ่อน คล้ายกับดอกถั่ว กลีบดอกมี 4 กลีบและมีขนาดไม่เท่ากัน ส่วนกลีบเลี้ยงดอกมีลักษณะเป็นรูปถ้วย สีม่วงแดง ผล ออกผลเป็นฝักแบน โคนฝักและปลายฝักมน ฝักเมื่อแก่เป็นสีน้ำตาลอ่อน ภายในฝักมีเมล็ดประมาณ 1-4 เมล็ด (เที่ยง บูรณธรรม., 2542)

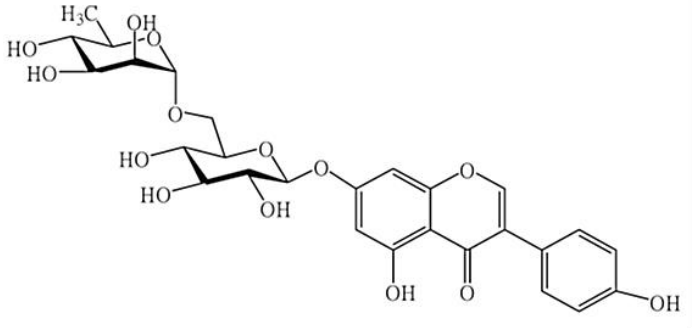
2.2.1.2 ประโยชน์ทางยา

ตำรายาไทย เถามีรสเฝื่อนเอียน ใช้ต้มรับประทานเป็นยาถ่ายเส้น ทำให้เส้นเอ็นอ่อนและหย่อนดี ช่วยรักษาเส้นเอ็นขอด เส้นเอ็นพิการ แก้อาการปวด ปวดเมื่อย ปวดหลัง ปวดเอว ปวดข้อ ข้ออักเสบ ช่วยรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม แก้อาการอักเสบของกล้ามเนื้อ หรือจะใช้เถานำมาหั่นตากแห้งคั่วชงน้ำกินต่างน้ำชาเป็นยา แก้อาการเมื่อยขบตามร่างกาย แก้อาการปวดเมื่อย แก้เหน็บชา (นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ, 2547)

2.2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี

จากการศึกษาองศ์ประกอบทางเคมีของเถาวัลย์เปรียงพบว่า มีสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนไกลโคไซด์ (isoflavone glycoside) คือ genistein 7-O-α -rhamnosyl (1$\longrightarrow$6) β –glucopyranoside แสดงในภาพประกอบที่ 3 (Laupattarakasem P., 2003) ส่วนอนุพันธ์ iso- prenyl isoflavones เช่น 3′-γ,γ-dimethyl-allylwighteone และ scandenin มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Sekine M.I., 1999) สารกลุ่ม prenylated isoflavone เช่น 5,7,4′-trihydroxy-6,3ûdiprenylisoflavone มีฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิด Trichophyton mentagrophytes scandenone และ scandenin มีฤทธิ์ยับยั้ง α –glucosidase นอกจากนี้ยังพบสารประเภทอื่นๆ ในลำต้นเช่น คูมาริน สเตียรอยด์และเทอพีนอยด์ (Rao, 1994)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว



ภาพประกอบ 3 แสดงสูตรโครงสร้างของ
genistein 7-O-α -rhamnosyl (1⟶6) β –glucopyranoside
(ประไพ วงศ์สินคงมั่น และคณะ, 2556)

2.2.1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาวิจัยเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ชีวภาพจากสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีสมรรถะสูงชนิด preparative และพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิกสเปกโทรสโคปีของสารที่แยกได้พบว่า สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ piscidic acid และ genistein 7-O -rhamnosyl (1⟶6)β-glucopyranoside โดยสาร piscidic acid มีรายงานว่ามีฤทธิ์ทำให้หลับ กล่อมประสาท ระงับอาการไอ ส่วนสาร genistein 7-Oα-rhamnosyl(1⟶6)β–glucopyranoside มีรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX พบว่าสารนี้สามารถยับยั้ง COX-1 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากโครมาโทรแกรมสมรรถนะสูง พบว่าสาร genistein 7-Oα-rhamnosyl(1⟶6) β–glucopyranoside เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดหยาบด้วย 50% เอทานอลของเถาวัลย์เปรียง ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวจึงมีประโยชน์ใช้เป็นสารบ่งชี้เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงได้ (ประไพ วงศ์สินคงมั่น และคณะ, 2556)

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนู พบว่าสารสกัดลำต้นเถาวัลย์เปรียงด้วยน้ำ นำมาทดสอบฤทธิ์ลดการอักเสบในหลอดทดลองโดยวัดการลดลงของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในแกรนูลซึ่งอยู่ภายในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ในระหว่างที่มีการอักเสบ MPO จะเคลื่อนที่ออกมา ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดน้ำลดการหลั่ง myeloperoxidase ได้ 88% โดยใช้ peritoneal leukocytes ของหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์วิสตาร์ ที่ถูกกระตุ้นให้อักเสบด้วย calcium ionosphore และสารสกัดน้ำมีผลยับยั้งการสังเคราะห์สารอิโคซานอยด์ (eicosanoid) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ได้แก่ leukotriene B4 สารสกัดน้ำยังลดการบวมที่

อุ้งเท้าหนูขาว สายพันธุ์ Sprague–Dawley เมื่อใช้คาราจีแนนเหนี่ยวนำการบวม โดยพบว่าสารสกัดน้ำขนาด 100 และ 500 mg/kg เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องหนู สามารถลดการบวมได้ 82 และ 91% ตามลำดับ (Laupattarakasem P., 2003)

จากนั้นมีการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับประสิทธิผลและผลข้างเคียงของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงเปรียบเทียบกับยามาตรฐานไดโคลฟีแนค (diclofenac) ในการรักษาผู้ป่วยอาการปวดหลังส่วนล่าง 2 กลุ่ม ที่โรงพยาบาลวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว กลุ่มหนึ่งจำนวน 37 ราย รับประทานสารสกัดเถาวัลย์เปรียงบรรจุแคปซูลซึ่งสกัดด้วย 50% เอทานอล ขนาด 200 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน และอีกกลุ่มหนึ่งจำนวน 33 ราย รับประทานยาไดโคลฟีแนคชนิดเม็ดขนาด 25 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาแสดงว่ากลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับสารสกัดเถาวัลย์เปรียงมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 7 ของการรักษา แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีรวมทั้งผลข้างเคียงใดๆ ส่วนผู้ป่วยที่ได้รับยาไดโคลฟีแนคนั้นตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีระดับอาการปวดลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 3 และวันที่ 7 ผลการศึกษานี้บ่งชี้ชัดว่าสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ให้รับประทานในขนาดวันละ 600 มิลลิกรัม นาน 7 วัน สามารถลดอาการปวดหลังส่วนล่างได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาไดโคลฟีแนคขนาดวันละ 75 มิลลิกรัม (ยุทธพงษ์ ศรีมงคล และคณะ, 2550)

จากการศึกษาการทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและวิเคราะห์อภิมานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเถาวัลย์เปรียงในการลดอาการปวด ผลการวิจัยพบงานวิจัยฉบับที่สอดคล้องกับเกณฑ์คัดเข้าทั้งหมดและทั้งหมดใช้ระเบียบวิธีวิจัยที่มีคุณภาพสูง โดยได้คะแนนตั้งแต่ 3 คะแนนขึ้นไป เมื่อประเมินตามเกณฑ์ของ Jadad และคณะ แต่ละการศึกษามีขนาดตัวอย่างตั้งแต่ 70-178 คน การศึกษาทั้งหมดเป็นการศึกษาในประเทศไทย โดยศึกษาในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อมและปวดหลังส่วนล่าง ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดจากเถาวัลย์เปรียงที่สกัดด้วย 50% เอทานอล มีประสิทธิภาพในด้านการลดอาการปวดไม่แตกต่างจากยากลุ่ม NSAIDs (ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย = 0.01; 95%CI=-0.13, 0.14) ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า ทั้งสองกลุ่มมีค่าทางห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกัน ในด้านการเกิดอาการไม่พึงประสงค์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (RR= -0.84; 95%CI=0.63,1.11) อาการไม่พึงประสงค์ที่พบมากที่สุดในทั้งสองกลุ่ม คือการระคายเคืองทางเดินอาหาร รองลงมาคือ อาการมึนงง และไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่รุนแรงจากทั้งสามการศึกษา การศึกษานี้เป็นข้อมูลสนับสนุนว่าเถาวัลย์เปรียงมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากยากลุ่ม NSAIDs ในการลดอาการปวด ซึ่งสามารถนำไปพิจารณาเป็นทางเลือกในการรักษาให้แก่ผู้ป่วยได้ (วิระพล ภิมาลย์, 2558)

2.2.1.5 การศึกษาทางพิษวิทยา

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดลำต้นด้วยเอทานอล 50% โดยให้หนูกินในขนาด 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (คิดเป็น 6,250 เท่า เปรียบเทียบกับขนาดรักษาในคน) และให้โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังหนู ในขนาด 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตรวจไม่พบอาการเป็นพิษ (กระทรวงสาธารณสุข, 2546)

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดหยาบของเถาวัลย์เปรียง ศึกษาพิษเรื้อรัง (6 เดือน) ของสารสกัดด้วย 50% เอทานอล ของเถาวัลย์เปรียง ในหนูขาว สายพันธุ์วิสตาร์ 4 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัวต่อเพศ กลุ่มควบคุมได้รับน้ำ 10 มล./น้ำหนักตัว 1 กก./ วัน ขณะที่หนูอีกสามกลุ่ม ได้รับสารสกัดในขนาด 6, 60 และ 600 มก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน หรือเทียบเท่าผงเถาวัลย์เปรียงแห้ง 0.03, 0.3 และ 3 กรัม /น้ำหนักตัว 1 กก./วัน หรือ 1, 10 และ 100 เท่า ของขนาดใช้ในคนต่อวัน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดของเถาวัลย์เปรียงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม หรือจุลพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด และไม่พบความผิดปกติใดๆ (Sriwanthana B, 2001)

2.2.2 ไพล

ภาพประกอบ 4 แสดงส่วนเหง้าแห้งของไพล

2.2.2.1 พฤกษศาสตร์ของไพล

ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Zingiber cassumunar* Roxb. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ชื่อท้องถิ่นอื่นๆคือ ปูลอย ปูเลย (ภาคเหนือ) ปูขมิ้น มิ้นสะล่าง (ไทยใหญ่-แม่ฮ่องสอน) ว่านไฟ (ภาคกลาง) ว่านปอบ (ภาคอีสาน)

ไพลเป็นไม้ล้มลุก สูง 0.7-1.5 เมตร มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า เปลือกสีน้ำตาลแกมเหลือง เหง้าสดมีเนื้อในสีเหลืองถึงเหลืองแกมเขียว ฉ่ำน้ำ มีกลิ่นหอมเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ประกอบด้วยกาบหรือโคนใบหุ้มซ้อนกันเป็นลำกลม สีเขียวเข้ม โคนกาบสีแดง ใบเดี่ยว เรียงสลับ ออกระนาบเดียว รูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 3.5-5.5 เซนติเมตร ยาว 18-35 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบมน หรือเว้ารูปหัวใจ ผิวใบเรียบ ขอบใบเรียบ ไม่มีก้านใบ มีขนนุ่มที่เส้นกลางใบด้านท้องใบ แผ่นใบบาง หลังใบสีเขียวเข้ม ท้องใบสีอ่อนกว่า กาบใบมีลิ้นใบ ดอกช่อเชิงลด รูปไข่หรือยาวรี หรือรูปกระสวย แทงจากเหง้าใต้ดิน ดอกกว้าง 4-5 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาว 15-30 เซนติเมตร ใบประดับจำนวนมากเรียงตัวเป็นระเบียบซ้อนกันแน่นคล้ายเกล็ดปลา มีขนประปราย ใบประดับย่อยม้วนหุ้มดอกย่อย ใบประดับมีสีแดงอมม่วง ขอบสีเขียว รูปเหมือนกลีบดอกบัว ข้างในใบประดับมีดอกย่อย 1 ดอก กลีบดอกเป็นหลอดเชื่อมติดกัน หลอดยาว 2.5 เซนติเมตร ส่วนปลายมี 3 กลีบ สีเหลืองนวล กลีบดอกบอบบาง เกสรเพศผู้ส่วนเป็นกลีบมี 3 หยัก สีขาวนวล หยักกลางขนาดใหญ่เป็นกลีบปาก รูปเกือบกลม เกสรเพศผู้ที่เป็นหมันมีสีเหลืองอมขาว ส่วนนี้มีขนาดใหญ่กว่ากลีบดอกและสวยสะดุดตา บริเวณกลางกลีบส่วนปลายจะเข้มกว่าเล็กน้อย หยักข้างมี 2 หยักติดกับกลีบปาก หรือหยักใหญ่ที่โคน เกสรเพศผู้ มีก้านสั้น อับเรณูสีเหลืองอ่อน มีส่วนปลายยื่นยาวออก เกสรเพศเมีย ยอดเกสรที่ส่วนปลายมีขนละเอียดสีขาว รังไข่ ค่อนข้างแบน มีขน ผลเป็นผลแห้ง รูปทรงกลม ขนาดเล็ก แก่แตก 3 พู เมล็ดรูปไข่กลม ผิวเป็นมัน สีดำ มีเมล็ดจำนวนมาก ลำต้นจะเหี่ยวแห้งไปในฤดูแล้ง และจะผลิต้นใหม่ในฤดูฝน (กลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ, 2543)

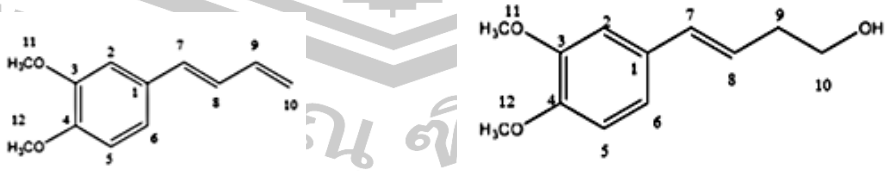
2.2.2.2 ประโยชน์ทางยา

ไพลเป็นว่านชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น มีการเรียกชื่อไพลแต่ละชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้ประโยชน์ ซึ่งจัดได้ว่าไพลเป็นสมุนไพรสำคัญของไทยอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากหมอพื้นบ้านหรือแพทย์แผนโบราณมีการนำไพลมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน ตามตำรายาไทย เหงาไพลมีสรรพคุณแกฟกช้ำ ปวด บวม อักเสบ เคล็ดขัดยอก ช่วยขับลม แกทองเดิน ช่วยขับระดู เป็นต้น ไพลมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียแถบประเทศอินเดีย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2542)

จากบัญชียาจากสมุนไพรที่มีการใช้ตามองค์ความรู้ดั้งเดิม ตามประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ปรากฏการใช้เหง้าไพล ในยารักษาอาการทางระบบทางเดินอาหาร ตำรับ “ยาประสะกานพลู” มีส่วนประกอบของไพลร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในตำรับ มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดท้อง จุกเสียด แน่นเฟ้อจากอาหารไม่ย่อย เนื่องจากธาตุไม่ปกติ และยารักษากลุ่มอาการทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ปรากฏตำรับ “ยาประสะไพล”มีไพลเป็นส่วนประกอบหลักร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในตำรับ ใช้ในสตรีที่ระดูมาไม่สม่ำเสมอ หรือมาน้อยกว่าปกติ และขับน้ำคาวปลาในสตรีหลังคลอดบุตร ตำรับ “ยาแก้ลมอัมพฤกษ์” มีส่วนประกอบของไพลร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในตำรับ มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดตามเส้นเอ็น กล้ามเนื้อ มือ เท้า ตึงหรือชา ตำรับ “ยาผสมเถาวัลย์เปรียง” มีส่วนประกอบของไพลร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในตำรับ มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561)

2.2.2.3 องค์ประกอบทางเคมี

ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์คือส่วนของลำต้นใต้ดินหรือเหง้า (rhizome) ใช้เป็นยาภายในและภายนอก ภายในเหง้าของไพลมีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งประกอบด้วย α-pinene, β-pinene subinene, myrcene, α-terpinene, limonene, γ-terpinene , ρ-cymene, terpinolene และ terpine-4-ol (Sciences., 1998) และเหง้าไพลยังมีสารสีเหลือง curcumin, β-sitosterol และสาร acyclohexene derivatives, naphtoquinones derivatives, butanoids derivatives ที่สำคัญคือสาร compound D หรือ (E)-4-(3,4- dimethoxyphenyl) but-3-en-l-ol และ DMPBD หรือ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene ดังแสดงในภาพประกอบที่ 5 ซึ่งใช้ในการรักษา อาการบวม ฟกช้ำ และเคล็ดยอก (สถาบันวิจัยสมุนไพร., 2551) นอกจากนี้ยังมีสาร cassumunarin A, B และ C ซึ่งเป็น complex curcuminoid ซึ่งมีฤทธิ์ Antioxidant แรงกว่าcurcumin (Jitoe A, 1994) และพบสารใหม่พวก phenylbutenoid dimmer คือ (+/-)-trans-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-[(E)- 3,4-dimethoxystyryl]cyclohex-1-ene โดยแยกได้จากส่วนของเหง้าไพล (Han A.R., Min H.Y., 2004)



DMPBD

compound D

ภาพประกอบ 5 แสดงสูตรโครงสร้างของสารสำคัญกลุ่ม phenylbutenoid (Kaewchoothong, 2009)

2.2.2.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) มีรายงานการต้านการอักเสบของสาร DMPBD จาก การศึกษาประสิทธิภาพในการลดอาการบวมของใบหูหนูขาว ซึ่งถูกเหนี่ยวนำโดยการทา ethyl pheylpropiolate (EPP), arachidonic acid (AA) และ 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) พบว่าสารสกัด DMPBD ที่ให้โดยการทาสามารถลดการบวมที่ใบหูของหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย EPP และ AA ได้ดีกว่า oxphenbutazone และ phenidone ตามลำดับ โดยประสิทธิภาพการออกฤทธิ์สูงสุดที่เวลา 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบ IC_{50} ของ TPA induce edema ที่เวลา 8 ชั่วโมง พบว่า DMPBD มีค่าเท่ากับ 660 pM/ear มีความแรงมากกว่า diclofenac มีค่าเท่ากับ 7,200 pM/ear ประมาณ 11 เท่า เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากการเหนี่ยวนำด้วย collagen, adenosine diphosphate (ADP), AA และ PAF พบว่า DMPBD ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย PAF ได้ดีที่สุด เชื่อว่า DMPBD มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยอาจออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งการทำงาน ของ cyclooxygenase และ lipoxygenase ของกระบวนการ AA metabolism โดยน่าจะมีฤทธิ์แรงกว่าในการยับยั้ง lipoxygenase pathway (รัตติมา จีนาพงษา, 2537) ส่วนสาร Compound D หรือ (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl) but-3-en-l-ol ได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของไพล โดยใช้สารสกัดจากเหง้าของไพลด้วย methanol, ether, n-hexane และน้ำทำการทดลองกับหนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำโดย carrageenan-induced edema และ acetic acid induce vascular permeability พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์เป็นทั้งต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และบรรเทาปวด (Ozaki Y., 1991)

การศึกษาทางคลินิกโดยการทดสอบประสิทธิภาพของครีมไพลจีซาล (ประกอบด้วยน้ำมันไพล 14%) จากผู้ป่วย 21 ราย พบว่าผู้ป่วย 10 ราย ที่ได้รับยาไพลจีซาล แสดงอาการบวมที่บริเวณข้อเท้าน้อยกว่ากลุ่มที่ใช้ยาหลอกในด้านการลดปวดนั้น แม้กลุ่มแรกจะรู้สึกปวดน้อยกว่ากลุ่มหลังอย่างมีนัยสำคัญ หลังจาก 4 วันแล้วก็ตาม แต่ใน 2 วันแรกจะมีการรับประทานยาแก้ปวด paracetamol น้อยกว่า นอกจากนี้กลุ่มแรกยังสามารถขยับข้อเท้าลงได้มากกว่ากลุ่มหลัง โดยผู้วิจัยสรุปว่ายาครีมที่เตรียมจากไพล (ไพลจีซาล) นี้มีสรรพคุณในการช่วยลดอาการอักเสบของข้อเท้าแพลงได้ (วิรุฬห์ เหล่าภัทรเกษม และคณะ, 1993)

ฤทธิ์ระคายเคืองผิวหนังและก่อให้เกิดอาการแพ้ที่ผิวหนัง (Skin irritation and sensitization) จากการศึกษาความปลอดภัยของไพลเจล 10 % w/v ด้วยวิธีที่แนะนำโดย OECD พบว่าไพลเจลอาจก่อให้เกิดอาการระคายเคืองได้เล็กน้อย แต่เมื่อทดสอบการระคายเคืองโดยวิธี mouse ear irritation test พบว่าไพลเจลไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองในหนูถีบจักร และไม่ก่อให้เกิดการแพ้เมื่อทดสอบด้วยวิธี Buehler test ในหนูตะเภา (วารุณี หาญพิทักษ์พงศ์, 2542)

2.2.3 ขันทองพยาบาท

ภาพประกอบ 6 แสดงส่วนแก่นของต้นขันทองพยาบาท

2.2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขันทองพยาบาท มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Suregada multiflora* (A.Juss) Baill. จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ชื่อท้องถิ่นอื่นๆ เช่น ดูกใส (อีสาน) ยางปลอก ยายปลวก ฮ่อสะพานควาย (แพร่ น่าน) ทุเรียนป่า ไฟ (ลำปาง) ป่าช้าหมอง ยายปลูก เป็นต้น (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542a)

ขันทองพยาบาท เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นมีความสูงประมาณ 7-13 เมตร ลำต้นตั้งตรง เป็นทรงพุ่มแน่นทึบ แตกกิ่งก้านค่อนข้างกลม กิ่งก้านอ่อนและห้อยลู่ลง ที่กิ่งจะมีขนรูปดาว เปลือกต้นเป็นสีน้ำตาลแก่และแตกเป็นร่องแบบตื้น ๆ ตามยาว เนื้อไม้เป็นสีขาว ใบหนาแข็งและดกทึบ โดยใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ ลักษณะของใบเป็นรูปหอกแกมรูปขอบขนาน ปลายใบแหลมหรือมน โคนใบแหลม ส่วนขอบใบจักเป็นซี่ฟัน ใบมีความกว้างประมาณ 3-8 เซนติเมตรและยาวประมาณ 9-22 เซนติเมตร เนื้อใบมีลักษณะหนาเหนียวคล้ายแผ่นหนัง หลังใบเรียบลื่นเป็นมัน ส่วนท้องใบเรียบและมีสีอ่อนกว่า ผิวใบด้านล่างมีต่อมสีเหลืองและมีขนเป็นรูปดาว มีเส้นใบข้าง 5-9 คู่ มีก้านใบยาวประมาณ 2-5 มิลลิเมตร ส่วนหูใบมีขนาดเล็กประมาณ 2 มิลลิเมตร แต่ละคู่เชื่อมกัน หลุดร่วงได้ง่าย และจะทิ้งแผลเป็นวงไว้ ดอกมีกลิ่นหอมสีเขียวอมสีเหลืองอ่อน ออกดอกเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ ขนาดประมาณ 0.8-1 เซนติเมตร ในช่อดอกจะมีดอกอยู่ประมาณ 5-10 ดอก อยู่ตรงข้ามกับใบ ดอกมีใบประดับลักษณะเป็นรูปหอกปลายแหลมยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร และกว้างประมาณ 0.7-0.8 มิลลิเมตร ส่วนดอกจะเป็นแบบแยกเพศแยกต้นและไม่มีกลีบดอก โดยดอกเพศผู้จะมีขนาดประมาณ 2.5 มิลลิเมตร และมีเกสรเพศผู้ประมาณ 35-60 ก้าน แต่ละอันจะมี

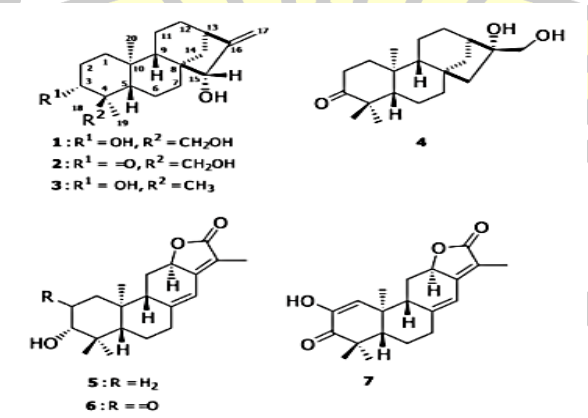
ต่อมอยู่ที่ฐาน ฐานรองดอกนูนพองออก และอาจพบเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันปะปนอยู่ด้วย ส่วนดอกเพศเมียจะมีลักษณะเหมือนกับดอกเพศผู้ แต่จะมีรังไข่เหนือวงกลีบ มีขนอยู่หนาแน่น มีรังไข่ 3 ช่อง รังไข่มีขนละเอียดและมีหมอนรองดอก มีก้านเกสรเพศเมีย 3 ก้าน ก้านดอกยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กลีบรองดอกหนามี 5 กลีบ โคนเชื่อมกันเล็กน้อยและขอบจักเป็นซี่ฟัน ผลมีลักษณะเกือบกลม ผิวผลเกลี้ยง มีขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนสีเหลืองอมส้ม แตกตามพู มีพู 3 พูและมีติ่งเล็ก ๆ อยู่ที่ยอด ภายในผลจะมีเมล็ดอยู่ประมาณ 3 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดประมาณ 7-8 มิลลิเมตร เมล็ดเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีเนื้อบาง ๆ สีขาวหุ้มเมล็ดอยู่ (นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ, 2547)

2.2.3.2 ประโยชน์ทางยา

ตามตำรายาไทย เปลือกต้นมีรสเมาเบื่อ ใช้เป็นยาบำรุงเหงือก ใช้รักษาเหงือกอักเสบ ทำให้ฟันทน เหงือกแข็งแรง เนื้อไม้มีรสเฝื่อนเมา ช่วยแก้ไข้ เนื้อไม้และเปลือกต้นใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนังทุกชนิด ผดผื่นคัน รักษาโรคเรื้อน กลากเกลื้อน รักษามะเร็ง มะเร็งคุดทะราดด้วยการใช้เปลือกต้นนำมาต้มแล้วพอกหรือตำคั้นเอาแต่น้ำนำมาใช้ทารักษาโรคผิวหนัง (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ และคณะ, 2549)

2.2.3.3 องค์ประกอบทางเคมี

เปลือกต้น พบสาร diterpenoids 7 ชนิด ได้แก่ suremulol C (1), suremulol D (2), entkaurene-3β (3),15β-diol, abbeokutone (4), helioscopinolide A (5), helioscopinolide C (6), helioscopinolide I (7) ดังแสดงในภาพประกอบที่ 7 ซึ่งพบว่า helioscopinolide A เป็นสารที่พบมากและมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบดีที่สุด (Tewtrakul et al., 2011)



ภาพประกอบ 7 แสดงสูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม diterpenoids ที่พบในขันทองพยาบาท

(Tewtrakul S, 2011)

2.2.3.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกลำต้นขันทองพยาบาท โดยใช้เซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ของหนู ซึ่งถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยสาร lipopolysaccharide (LPS) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนจากเปลือกลำต้นขันทองพยาบาท ออกฤทธิ์แรงในการยับยั้ง nitric oxide (NO) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.6 µg/ml และ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ helioscopinolide A แสดงฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้สูงที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 9.1 µM ตามด้วย helioscopinolide C และ suremulol D มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.5 และ 29.3 µM ตามลำดับ สาร helioscopinolide A มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง prostraglandin E2 (PGE2) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 46.3 µM ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ helioscopinolide A เกิดจากกลไกในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 mRNAทำให้การผลิต NO และพรอสตาแกลนดิน ที่เกี่ยวข้องในขบวนการอักเสบลดลง โดยการออกฤทธิ์ขึ้นกับขนาดของยา (Tewtrakul et al., 2011)

การศึกษาฤทธิ์แก้แพ้ของต้นขันทองพยาบาท โดยแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกต้นขันทองพยาบาทได้สารไดเทอร์ปีน 7 ชนิด คือ ent-16 -kaurene-3β,15β,18-triol, ent -3-oxo-16-kaurene-15β,18-diol, ent -16-kaurene-3β,15β-diol, abbeokutone, helioscopinolide A, helioscopinolide C และ helioscopinolide I นำสารแต่ละชนิดมาทดสอบฤทธิ์แก้แพ้ในหลอดทดลอง โดยดูผลการยับยั้งการปล่อยเอนไซม์ β-hexosaminidase (ในการแพ้แบบ hypersensitivity type I จะมีอาการของโรคเกิดเร็วในเวลาเป็นนาที หรือชั่วโมง ภายหลังได้รับแอนติเจนซึ่งจะเหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีชนิด IgE ไปจับกับรีเซฟเตอร์บน mast cell และมีการปล่อยเอนไซม์ β-Hexosaminidase ร่วมกับ histamine ที่เก็บไว้ใน mast cell ออกมา ส่งผลให้เกิดอาการแพ้) ผลการทดลองพบว่าสารทั้ง 7 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อยเอนไซม์ β-Hexosaminidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาเมื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการแพ้ ของเซลล์ RBL-2H3 โดยค่า IC_{50} มีค่าระหว่าง 22.5 - 42.2 µM โดยออกฤทธิ์ได้ดีกว่ายามาตรฐาน ketotifen fumarate (IC_{50} = 47.5 µM) (Cheenpracha S, 2006)

2.2.4 มะดูก

ภาพประกอบ 8 แสดงส่วนแก่นแห้งของต้นมะดูก

2.2.4.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะดูก ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Siphonodon celastrineus* Griff. อยู่ในวงศ์ Celastraceae ซึ่งชื่อท้องถิ่นอื่นๆ เช่น ยายปลวก (สุราษฎร์ธานี) ไม้มะดูก (คนเมือง) บั๊กโค้ก (เขมร-สุรินทร์) เป็นต้น

มะดูก เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ ลำต้นมีความสูงได้ประมาณ 20-35 เมตร แตกกิ่งก้านทึบ เรือนยอดมีลักษณะกลมทึบ เปลือกต้นเป็นสีเทาอมดำแตกเป็นร่องตามยาว เนื้อไม้เป็นสีเหลืองนวล ดังแสดงในภาพประกอบที่ 8 ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ลักษณะของใบเป็นรูปค่อนข้างรีหรือรูปขอบขนาน ปลายใบแหลม โคนใบสอบแถบเข้าหากัน ส่วนขอบใบเป็นหยักหรือจักเป็นซี่ฟันตื้น ๆ จักห่างหรือแทบมองเห็นไม่ชัด ใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-3.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-9 นิ้ว แผ่นใบค่อนข้างหนาคล้ายแผ่นหนัง ผิวใบด้านบนเป็นสีเขียวเข้ม เส้นแขนงใบมีข้างละ 6-10 เส้น ก้านใบยาวประมาณ 0.5-2 เซนติเมตร ใบอ่อนเป็นสีเขียวแก่ เมื่อแห้งแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกหรือสีเขียวอมเทา ดอกมะดูก ออกดอกเป็นช่อกระจุกตามซอกใบ มีประมาณ 2-3 ดอก ก้านช่อดอกยาวประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร ส่วนก้านดอกย่อยยาวประมาณ 5-11 มิลลิเมตร บางทีมีจุดสีน้ำตาลแดง ดอกเป็นสีขาวนวลหรือสีเหลืองอมส้ม กลีบดอกเป็นรูปไข่หรือรูปรี มี 5 กลีบ ซ้อนทับกัน มีขนาดกว้างประมาณ 1.7-2.5 มิลลิเมตร และยาวประมาณ 2.2-3.5 มิลลิเมตร ปลายกลีบมน ส่วนกลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ โคนกลีบเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นรูปไจหรือกึ่งกลม ค่อนข้างมน ยาวได้ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร กลางดอกมีเกสรเชื่อมติดกับกลีบดอกข้างใน ดอกมี

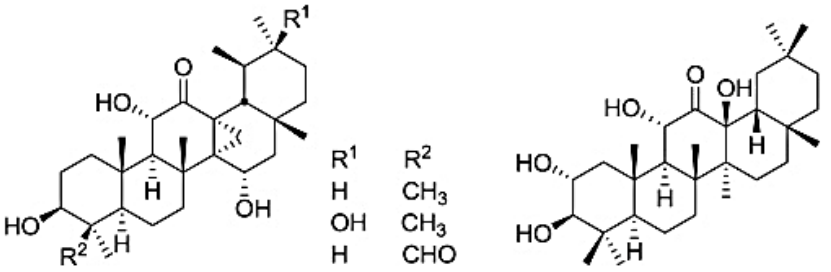
เกสรเพศผู้ 5 อัน ก้านเกสรเพศผู้แบน ยาวได้ประมาณ 1 มิลลิเมตร เชื่อมติดกันที่ครึ่งหนึ่งหรือใกล้ ๆ โคนดอก ผลมีลักษณะเป็นรูปกลมหรือรูปรี ผลมีขนาดกว้างประมาณ 1-2.5 นิ้ว และยาวประมาณ 1.5-3 นิ้ว ผลอ่อนเป็นสีเขียว เมื่อแก่หรือสุกเต็มที่แล้วจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ภายในมีเมล็ดรูปไข่หลายเมล็ด (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542b)

2.2.4.2 ประโยชน์ทางยา

ตามตำรายาไทย รากมะดูกมีรสมันเมา ใช้รับประทานเป็นยาบำรุงกระดูก ดับพิษในกระดูก ใช้เป็นยารักษาโรคผิวหนัง ผื่นคัน แก้ประดง น้ำเหลืองเสีย (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2549)

2.2.4.3 องค์ประกอบทางเคมี

การแยกสารสำคัญสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากต้นมะดูก พบสารในกลุ่ม triterpenes 24 ชนิด ที่เป็นอนุพันธ์ของ lupane, friedelanes, oleanane และ ursane และพบสารกลุ่ม sterols, fatty acid, sesquiterpene alkaloid และ glycerol derivative (Kaweetripob, 2013) พบสาร polyoxygenated triterpenes จำนวน 20 ชนิด ดังแสดงในภาพประกอบที่ 9 จากต้นมะดูก ประกอบไปด้วยโครงสร้างชนิด ursanes 19 ชนิด และ oleanane 1 ชนิด ซึ่งพบว่าสารในกลุ่ม ursanes 3 ชนิด เป็นสาร triterpenoids ที่หาได้ยาก มีโครงสร้างเป็น 13, 27-cyclopropane ring (Kaweetripob, 2016)



ภาพประกอบ 9 แสดงสูตรโครงสร้างของกลุ่มสาร triterpenoids
(Kaweetripob, 2013)

2.2.4.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา:

ไม่พบการศึกษาในส่วนฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบเพียงการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของมะดูก พบว่าการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง ของสารบริสุทธิ์ 27 ชนิด ที่แยกได้จากลำต้นมะดูก โดยใช้เซลล์มะเร็ง 6 ชนิด ที่แยกได้จากมนุษย์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ

human hepatocarcinoma (HepG2) เซลล์มะเร็งปอด human lung cancer (A549) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี human cholangiocarcinoma (Thai; HuCCA-1) เซลล์มะเร็งปากมดลูก human cervical carcinoma (HeLa) เซลล์มะเร็งเต้านม human breast cancer (MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว T-lymphoblast (MOLT-3) cell line ทดสอบด้วยวิธี MTT assay และ XTT assay พบว่าสารไตรเทอร์ปีน compound ที่ 21 ชื่อ 21β -hydroxy-3-oxo-2,3-secours-12-en-2-oic acid ออกฤทธิ์ดีในการยับยั้งเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว T-lymphoblast (MOLT-3) cell line โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.5 µM โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน etoposide มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.03± 0.009 µM (Kaweetripob, 2013)

จากการทบทวนวรรณกรรมสามารถสรุปได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบในตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ได้แก่ สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่พบในเถาวัลย์เปรียง ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไอโซฟลาโวนไกลโคไซด์ (isoflavone glycoside) คือ genistein 7-O-α -rhamnosyl (1⟶6) β–glucopyranoside ส่วนสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่พบในไพล สาร compound D หรือ (E)-4-(3,4- dimethoxyphenyl) but-3-en-2-ol และ DMPBD หรือ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene และสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่พบในขันทองพยาบาทคือ helioscopinolide A ส่วนในมะดูกไม่พบสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น

2.3 การหาปริมาณสารสำคัญโดยใช้วิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) (แม้น อมรสิทธิ์และคณะ, 2555)

การหาปริมาณสารสำคัญโดยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์กลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหยหรือกลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่ระเหยได้ปานกลางเป็นการวิเคราะห์แยกสารที่สนใจซึ่งละลายอยู่ในสารละลายผสม กระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่หรือเฟสนิ่ง (stationary phase) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งภายในคอลัมน์นิยมใช้ silicic acid หรือ silica gel เป็นโครงสร้างค้ำจุนและมีเฟสนิ่งที่เคลือบบนของแข็งเป็น น้ำ บัฟเฟอร์ กรดแก่ ด่างแก่ แอลกอฮอล์ ฯลฯ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นสารที่มีคุณสมบัติต่างจากเฟสนิ่งการใช้ HPLC ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ มีรายละเอียด ดังนี้

2.3.1 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) การตรวจสอบชนิดของสารว่าเป็นสารที่สนใจหรือไม่ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน มีการยืนยันชนิดของสารได้ 2 วิธี ได้แก่ การเปรียบเทียบค่า retention time (RT) กับสารมาตรฐาน โดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานต้องทำ

การวิเคราะห์ในสภาวะเดียวกัน ถ้าสารตัวอย่างและสารมาตรฐานมี RT เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารเดียวกันและอาจวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์และ/หรือเฟสเคลื่อนที่ และการเติมสารมาตรฐานเข้มข้นปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งเรียกว่าการ Spike ถ้าเป็นสารชนิดเดียวกันจะทำให้พื้นที่พีคหรือความสูงเพิ่มขึ้น

2.3.2 การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสามารถวัดปริมาณของสารได้โดยวัดความสูงของพีคหรือวัดพื้นที่พีคเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยการเตรียมกราฟมาตรฐานสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่

2.3.2.1 External standard method ใช้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3-5 ระดับความเข้มข้นนำมาวิเคราะห์แล้วเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับพื้นที่พีคหรือความสูงของพีค (แกนตั้ง)

2.3.2.2 Internal standard method เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างโดยการเติมสารมาตรฐานชนิดที่ไม่มีในตัวอย่างเรียกว่าสารมาตรฐานภายในลงในสารตัวอย่างและสารมาตรฐานในปริมาณที่เท่ากันนำมาวิเคราะห์และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกนนอน) กับอัตราส่วนพื้นที่พีคของสารมาตรฐานกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานภายใน (แกนตั้ง) การวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีนี้ให้ความแม่นยำและความเที่ยงตรงสูง โดยสารมาตรฐานภายในควรมีคุณสมบัติ คือเป็นสารที่ไม่มีในตัวอย่างและเป็นสารในกลุ่มเดียวกันมีคุณสมบัติคล้ายกันกับสารตัวอย่าง โดยที่ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารใดๆ ในคอลัมน์และสารละลายตัวชะ และให้ Retention time ใกล้เคียงกับพีคของตัวอย่างและแยกออกจากพีคของตัวอย่างอย่างชัดเจน

2.3.3 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC ประกอบด้วย

2.3.3.1 Mobile phase/solvent: ตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่างเป็นเฟสเคลื่อนที่มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่เฟสที่อยู่กับที่ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งกระบวนการแยกจะเกิดขึ้นภายในคอลัมน์ mobile phase ที่ใช้แยกโดยใช้ตัวทำละลาย สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือชนิดที่มีส่วนประกอบคงที่ (isocratic elution) และชนิดที่ใช้ตัวทำละลายสองหรือมากกว่าสองชนิดซึ่งมี polarity ไม่เท่ากัน (gradient elution) อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามโปรแกรมที่วางไว้

2.3.3.2 Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสเคลื่อนที่เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากการแยกสารใน HPLC ต้องอาศัยการไหลของเฟสเคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก ทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊ม (pump system) จึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านดังกล่าว ปั๊มที่ควรใช้ควรทำให้เกิดความดันได้สูงประมาณ 6000 psi (bs/in^2) และมี flow rate อยู่ในช่วงระหว่าง 0.1-10 mL/min)

2.3.3.3 Injector/autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้า ระบบ HPLC

2.3.3.4 Guard column เป็นคอลัมน์ที่นิยมใช้ต่อก่อนสารเข้า analytical column เพื่อช่วยยืดอายุการใช้งานของ analytical column เนื่องจาก guard column จะทำหน้าที่กรองอนุภาคหรือสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนมากับตัวทำละลายนอกจากนี้ guard column ยังใช้ในการทำให้เฟสเคลื่อนที่อิ่มตัวด้วยเฟสอยู่กับที่เพื่อลดการสูญเสียของตัวทำละลาย

2.3.3.5. Analytical column: ภายในบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล ทำให้เกิดกระบวนการแยกองค์ประกอบของสารที่สนใจ โดยกระบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่างเฟสที่เคลื่อนที่กับเฟสที่อยู่กับที่ โดย column นี้เป็นหัวใจของ HPLC ลักษณะมักจะเป็นท่อเรียบทำด้วย stainless steel อาจมีส่วนน้อยที่ทำด้วยแก้วมักมีความยาว 10-30 cm อาจเพิ่มความยาวของคอลัมน์ได้ โดยใช้คอลัมน์มากกว่า 1 อันต่อกัน เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4-10 mm วัสดุที่บรรจุในคอลัมน์มีขนาดอนุภาค 3, 5 และ 10 um

2.3.3.6 Detector: เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัด สัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก เครื่อง detector ที่นิยมใช้สำหรับ HPLC ได้แก่

2.3.3.6.1. Ultraviolet-visible Absorbance Detectors เป็นเครื่องที่นิยมใช้กันมากใน HPLC หลักการทำงานอาศัยการดูดกลืนของสารตัวอย่าง โดยจะประกอบด้วย flow through cell สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดย่อยคือ fixed-wavelength detectors ซึ่งสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ในบางช่วงคลื่น

2.3.3.6.2 Variable-wavelength Detectors เป็นเครื่องวัดที่สามารถเลือกวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ต้องการในช่วง ultraviolet และ visible

2.3.3.6.3. Diode Array Detectors ประกอบด้วย photodiode Array spectrophotometers หลายตัว เครื่องวัดนี้สามารถสแกน UV-Vis spectrum ได้รวดเร็วมาก และสามารถเปรียบเทียบ spectrum ที่เป็น 3 มิติ แสดงค่า absorbance ความยาวคลื่น โดยสามารถเปรียบเทียบ spectrum ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานได้

2.3.3.6.4 Detector ชนิดอื่นๆ นอกจากชนิดที่กล่าวมาแล้วข้างต้นยัง มี detectors ชนิดอื่นๆ อีกได้แก่ Fluorescence detector ซึ่งจะมีความจำเพาะกว่า UV-Vis absorbance detectors เนื่องจากสามารถตรวจวัดสารในปริมาณน้อยได้ Refractory Index detectors (RI detectors) เป็นเครื่องวัดแบบ Universal โดยวัดดัชนีหักเห (Refractive Index) ของสารละลายของส่วนประกอบต่างๆ ในเฟสเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับค่าดัชนีหักเหของเฟสเคลื่อนที่อย่างเดียว ดังนั้นเครื่องตรวจวัดนี้จึงใช้วัดปริมาณสรใดก็ได้ที่มีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

2.3.4 พารามิเตอร์ของ HPLC (Parameter of HPLC)

พารามิเตอร์ของ HPLC ส่วนใหญ่แล้วจะเกี่ยวข้องกับความสามารถของคอลัมน์ที่จะแยก สารสองชนิดออกจากกันโดยจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักๆ 3 ประการคือความแตกต่างของการหน่วย

เหนียว (Retention) ของสารบนคอลัมน์ ซึ่งเกิดจาก molecular forces ของสารชนิดต่างๆ จากนั้นคือความกว้างของพีคและประสิทธิภาพของระบบ ดังนั้นเพื่อที่จะอธิบายและหาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกสาร จึงจำเป็นต้องเข้าใจ พารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแยกของ HPLC โดยพารามิเตอร์ที่จำเป็นในการวิเคราะห์ HPLC ได้แก่

2.3.4.1 Partition ratio (Partition coefficient, K) เป็นค่าคงที่ที่อธิบายถึงการสมดุลของ การกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างเฟสทั้งสองเฟสคือเฟสอยู่กับที่และเฟสเคลื่อนที่ ค่า K หาได้จาก อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในเฟสเคลื่อนที่ภายหลังการกระจายตัวไประหว่างเฟสทั้งสองหรือ อัตราส่วนของเวลาอยู่ในเฟสอยู่กับที่กับเวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ โดยมีสมการดังต่อไปนี้

$K = C_s / C_m$ = ความเข้มข้นของสารในเฟสอยู่กับที่/ความเข้มข้นของสารในเฟส เคลื่อนที่หรือ

$K = t_s / t_m$ = เวลาที่สารอยู่ในเฟสอยู่กับที่/เวลาที่สารอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

สารแต่ละชนิดจะมีค่า K คงที่เฉพาะในแต่ละสภาวะการทดลองเท่านั้น โดยค่า K จะแปรผันตามอุณหภูมิของการทดลองและส่วนประกอบของเฟสเคลื่อนที่ แต่ไม่ขึ้นกับจำนวนสารที่นำมาทำการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งค่า K สามารถนำมาใช้งานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ได้แต่การวัดค่า K โดยตรงจะทำได้ยาก จึงไม่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารเนื่องจากมีพารามิเตอร์ตัวอื่นที่สามารถวัดได้โดยตรงและง่ายกว่าและสามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารได้เช่น retention time, corrected retention time, relative retention time เป็นต้น

2.3.4.2 Retention Time (t_R) เป็นระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่พาหรือชะล้างสารตัวอย่างผ่าน เฟสอยู่กับที่ คือเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนกระทั่งถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีค บนโครมาโทแกรม

T_R เป็นพารามิเตอร์ที่วัดหรือหาค่าได้ง่ายจากโครมาโทรแกรม สามารถใช้ในด้านการ วิเคราะห์คุณภาพ หรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร แต่เนื่องจากมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างใดอย่างหนึ่ง ของสภาวะการทดลองเช่นอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ส่วนผสมของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ หรือ ความดันที่ทำให้ค่า retention time ไม่คงที่ มีผลทำให้การพิสูจน์เอกลักษณ์ผิดพลาดได้ จึงนิยมใช้ พารามิเตอร์ตัวอื่นๆ เช่น corrected retention time และ relative retention time ซึ่งจะให้ผล แม่นยำและถูกต้องกว่า

2.3.4.3 Corrected retention time (t'_R) คือระยะเวลาตั้งแต่ตำแหน่งจุดยอดของพีกของ unretained compound ถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีคของสารตัวอย่างบนโครมาโทแกรม หรือ ระยะเวลาที่สารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ในเฟสเคลื่อนที่

$t'_R = t_R - t_0$ โดย

t_o = dead time or hold up time of unretained compound หรือระยะเวลาที่ unretained compound เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่หรือ column เวลาที่โมเลกุลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง

Unretained compound คือสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวบนเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) จะออกมาพร้อมกับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

ค่า t_0 หาได้หลายวิธี เช่นระยะเวลาตั้งแต่เริ่มฉีดสารจนถึงตำแหน่ง baseline drift หรือถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีคเฟสเคลื่อนที่ ในกรณีที่ไม่แน่ใจสามารถใช้ตัวทำละลายที่มีความ แรงอ่อนกว่าเฟสเคลื่อนที่ หรือสารละลายของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ ฉีดเข้าคอลัมน์ เช่นเดียวกับการฉีดสารละลายตัวอย่าง ค่า t_R ของสารจะมีค่าเท่ากับ t_0

2.3.4.4 Retention volume (V) เป็นปริมาตรทั้งหมดของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการชะล้าง หรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสเคลื่อนที่ โดยวัดจากตำแหน่งที่เริ่มฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์จนถึงตำแหน่งจุดยอดของพีคของสาร โดย V_R หาได้จาก

$V_R = Ft_R$

V_R = retention volume

F = อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (flow rate, mL/min)

t_R = retention time ของสารตัวอย่าง

2.3.4.5 Corrected retention volume (V'_R) คือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้การชะล้างหรือพาสารตัวอย่างออกจากเฟสอยู่กับที่ โดยวัดจากตำแหน่งจุดยอดพีค unretained compound จนถึงตำแหน่งจุดยอดของพีคสารตัวอย่าง หาค่าได้จาก

$V'_R = V_R - V_0 = Ft_0$

V_0 = dead volume หรือ void volume หรือปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ที่เคลื่อนที่ผ่านเฟสอยู่กับที่ หรือผ่านคอลัมน์จากปลายด้านหนึ่งไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง

2.3.4.6 Capacity factor (k') เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าสารตัวอย่างถูกหน่วงเหนี่ยวอยู่ใน คอลัมน์ได้ดีเพียงใด ขณะทำการแยกโดยวิธี isocratic elution โดยค่า k' นี้หาได้จาก corrected retention time ของสารที่วิเคราะห์ (t'_R) หารด้วยเวลาของสารที่ไม่ถูกหน่วงเหนี่ยวหรือเวลาที่เฟส เคลื่อนที่เคลื่อนผ่านคอลัมน์ (t_0) ดังนี้

$k' = (t_R - t_0) / t_0$

k' เป็นพารามิเตอร์ที่บอกถึงลักษณะการทำงานของคอลัมน์ ปัจจัยที่มีผลต่อค่า k' คือองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ เฟสอยู่กับที่ และอุณหภูมิของการทดลอง โดยทั่วไปค่า k' ของสาร ควรอยู่ระหว่าง 2-5 ทั้งนี้เพราะระยะเวลาที่ใช้และแยก (resolution) สมดุลกันดี และค่า k' ที่ เหมาะสมของการแยกสารที่ซับซ้อน (complex mixture) ควรมีค่าอยู่ระหว่าง $1 \leq k' \leq 16$ ค่า k'

บอกให้ทราบถึงเวลาที่สารถูก elute ออกมาจากคอลัมน์ บอกลักษณะของพีคกว้างหรือแคบการตรวจวัดยากหรือง่าย ความแรงของเฟสเคลื่อนที่แรงหรือก่อน ดังแสดงในตาราง 2.2 จากข้อมูลนี้สามารถนำมาปรับ ค่า k' ให้เหมาะสมเพื่อให้การแยกสารได้ดีที่สุด

2.3.4.7 Selectivity factor (separation factor, relative retention, ş) เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารสองชนิดที่อยู่ใกล้กันแยกออกจากกันดีเพียงใด การแยกออกจากกันนี้ขึ้นกับค่า retention time หรือค่า k' เท่านั้นโดยไม่คำนึงถึงความกว้างของพีคและค่านี้เกี่ยวข้องกับ relative partition coefficient หรืออัตราส่วนของ capacity ของสารสองชนิดที่มีพีคติดกันดังนี้

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = t'_{R2} / t'_{R1}$$

α = selectivity factor

k'_1 = ค่า capacity factor ของพีคแรก

k'_2 = ค่า capacity factor ของพีคที่สอง

t'_{R1} = corrected retention time ของพีคแรก

t'_{R2} = corrected retention time ของพีคที่สอง

ค่า Selectivity factor (α) เป็นค่าที่มีความสำคัญมาก คือเป็นตัวบอกให้ทราบว่า คอลัมน์หรือเฟสอยู่กับที่นั้นอยู่ในสภาวะที่มีการทำงานดีเพียงใด พื้นที่ผิวของเฟสอยู่กับที่และอุณหภูมิ ค่านี้นิยมใช้สำหรับงานด้านการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis)

2.3.4.8 Column efficiency คือประสิทธิภาพของคอลัมน์พิจารณาได้จากความกว้างของ พีคที่ถูก elute ออกมา ประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่ดี พีคแต่ละที่ถูก elute ออกมากจะมีฐานที่แคบและ แยกออกจากกันได้ ค่าที่ใช้วัดประสิทธิภาพของคอลัมน์คือ จำนวนเพลทของคอลัมน์ (Number of theoretical plate, N) และความสูงของเพลทแต่ละเพลทในคอลัมน์ (height equivalent to a theoretical plate, H หรือ HETP)

2.3.4.9 Resolution (R_s) เป้าหมายหรือจุดประสงค์ของการแยกสารโดยกระบวนการทาง โครมาโทกราฟี คือสามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ เพื่อที่จะหาปริมาณสารแต่ละชนิดและตรวจความบริสุทธิ์ สิ่งที่บอกให้ทราบว่าการแยกสารผสมนั้นดีหรือไม่ คือค่า R_s โดยค่านี้เป็นค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารที่อยู่ติดกันนั้นแยกออกจากกันได้ดีเพียงใด ซึ่งการแยกนี้จะต้องพิจารณาทั้งระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีคทั้งสอง คำนวณได้จากระยะห่างระหว่างตำแหน่งจุดสูงสุด ของพีคทั้งสองหารด้วยความกว้างเฉลี่ยของพีคทั้งสอง

2.4 การพัฒนาตำรับยาครีมและการทดสอบความคงตัว

2.4.1 ครีม

ครีมจัดเป็น Topical semi-solid preparation ชนิด multiphase ประกอบด้วย วัตภาคน้ำ วัตภาคน้ำมัน และตัวทำอิมัลชัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ครีมเป็นอิมัลชันกึ่งแข็งกึ่งเหลว สำหรับใช้ภายนอก ครีมจัดเป็นรูปแบบยาครีมที่เข้ากับ skin secretion ได้ดี ใช้เพื่อป้องกันรักษาผิวหนัง ใช้เพื่อรักษาหรือป้องกันโรคโดยเฉพาะบริเวณที่ไม่ต้องการ occlusive effect ครีม แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.4.1.1 ครีมชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) มีน้ำเป็นวัตภาคภายนอก ล้างน้ำออกง่าย ไม่เป็นมัน แทรกซึมเข้าผิวหนังได้ดี เมื่อทาครีมน้ำระเหยออกไปทำให้รู้สึกเย็น นิยมใช้มากทั้งในยาเตรียมและเครื่องสำอาง

2.4.1.2 ครีมชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o) มีน้ำมันเป็นวัตภาคภายนอกเป็นมันน้อยกว่าและล้างน้ำออกง่ายกว่าพื้นขี้ผึ้งชนิด oleaginous แต่กระจายบนผิวง่ายกว่ายาพื้นขี้ผึ้งชนิด oleaginous ป้องกันการเสียความชุ่มชื่นจากผิวหนังได้ดี

การเลือกครีมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่นคุณสมบัติของตัวยา จุดมุ่งหมายในการใช้ครีมและสภาพผิวหนัง เป็นต้น ครีมชนิด w/o ใช้ทาผิวหนังที่ฉีกขาดได้และใช้กับผิวหนังได้ดี (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ, 2547)

2.4.2 ส่วนประกอบของอิมัลชัน

ผลิตภัณฑ์รูปแบบอิมัลชัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ., 2540) มีส่วนประกอบหลัก 3 ส่วน คือ

2.4.2.1 วัฏภาคน้ำ (water phase) ได้แก่ น้ำและสารต่างๆ ซึ่งเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ละลายได้ในน้ำ อาจเป็นสารเพิ่มความหนืด เช่น acacia, magnesium aluminum silicate (veegum®), methylcellulose, carbopol สารฮิวเมกแตนต์เช่น glycerin, propylene glycol หรือ glycol ทั้งหลาย สารกันเสีย เช่น methylparaben, sodium benzoate สารลดแรงตึงผิว เช่น polysorbate, sodium lauryl sulphate สีที่ละลายน้ำ สารต้านออกซิเดชั่น เช่น sodium metabisulfite นอกจากนี้ อาจเป็นสารออกฤทธิ์อื่นที่ละลายน้ำได้เช่น cetylpyridium chloride, benzalkonium chloride เป็นต้น สารต่างๆเหล่านี้อาจเติมลงไปในวัฏภาคน้ำได้ทั้งสิ้น แล้วแต่ส่วนประกอบของสูตรในผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท

2.4.2.2 วัฏภาคน้ำมัน (Oil phase) ได้แก่ น้ำมันต่างๆ เช่น olive oil, mineral oil, castor oil ไขมัน เช่น stearyl alcohol, stearic acid, cetyl alcohol, lanolin ไขแข็ง เช่น bee wax, paraffin wax, carnauba wax, สีที่ละลายน้ำมัน น้ำหอมต่างๆ สารกันหืน เช่น

BHT, BHA สารลดแรงตึงผิวเช่น Span, Emulgin C 1000 หรือ สารออกฤทธิ์ต่างๆเช่น ฮอร์โมน วิตามิน เป็นต้น แล้วแต่ส่วนประกอบในสูตรของผลิตภัณฑ์แต่ละประเภทเช่นกัน

2.4.2.3 ตัวทำอิมัลชัน (Emulsifier) ได้แก่ สารลดแรงตึงผิว เช่น Tween, Span, sodium lauryl sulphate คอลลอยด์ที่ชอบน้ำ เช่น acacia, gelatin ของแข็งอนุภาคละเอียดเช่น bentonite, colloidal magnesium aluminium silicate เป็นต้น ตัวทำอิมัลชันเป็นตัวสำคัญในการผสมผสานให้วัฏภาคน้ำและน้ำมันเข้าเป็นเนื้อเดียวกันได้

2.4.3 การทดสอบความคงตัว ประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับ

การทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่ง โดยการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จากนั้นนำมาประเมินลักษณะทั่วไปของครีม จากนั้นสังเกตการแยกชั้น การเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น และค่า pH ซึ่งลักษณะครีมที่ดีนั้นจะมีคงตัว ไม่แยกชั้น เนื้อเนียน ซึมเข้าผิวได้ดี ซึ่งสามารถทำการทดสอบได้หลายวิธี เช่น

2.4.3.1 การทดสอบความคงตัวของตำรับทางกายภาพ

เป็นการสังเกตและทดสอบลักษณะเนื้อครีม กลิ่น สี ความหนืด ความซึมเข้าสู่ผิวหนัง และการแยกชั้นของตำรับ (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ, 2547)

2.4.3.2 การทดสอบความคงตัวของตำรับโดยวิธี Heating-cooling cycling method เป็นการประเมินการคงสภาพของครีม โดยการนำยาครีมโดยการนำยาครีมไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบสลับกันเช่นนี้ 5 รอบ จากนั้นสังเกตการณ์แยกชั้น (ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ, 2547)

2.4.3.3 การทดสอบความระคายเคืองของครีม

ทดสอบการระคายเคืองของตำรับครีม โดยการใช้แพตช์ของครีมที่จะทดสอบ ปิดลงบนผิวหนังปกติของผู้มารับการทดสอบ ทิ้งไว้ 1 คืน บันทึกความผิดปกติที่เกิดขึ้นเช่น อาการระคายเคือง การคัน บวม แดง อักเสบ เป็นต้น ซึ่ง 0 คะแนนแทนไม่มีอาการดังกล่าว และ 1 คะแนนแทนการมีอาการดังกล่าว (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ., 2540)

2.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) (วศพล ฉัตรเกตุ และคณะ, 2016) เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เกิดกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกจากร่างกาย ส่งเสริมเซลล์และเนื้อเยื่อให้เกิดการซ่อมแซม อย่างไรก็ตามการอักเสบที่มากเกินไปจากสารสื่อการอักเสบและอนุมูลอิสระ ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อในบริเวณที่บาดเจ็บทำงานผิดปกติไป

ได้ มากกว่านั้นกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (cadiovascular diseases) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน (diabetis) มะเร็ง (cancer) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (septic shock) โรคทางเดินอาหารอักเสบ (inflammatory bowel disease) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และโรคอักเสบต่างๆ เป็นต้น

Nitric oxide (NO) จัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางการอักเสบ NO สังเคราะห์ขึ้นจาก L-arginine และโมเลกุลของออกซิเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) โดย NO ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการอักเสบ เช่น การขยายตัวของหลอดเลือดเมื่อเกิดการบาดเจ็บ ภาวะหัวใจขาดเลือด เกิดการอักเสบแบบฉับพลัน และเรื้อรัง โดย NO ที่เพิ่มมากกว่าปกติจะทำปฏิกิริยากับ superoxide anion radical (O^{-}_{2}) เกิดเป็น peroxynitrite (ONOO) ที่มีฤทธิ์รุนแรงฆ่าจุลชีพได้และยังสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้ง NO เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์ ความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ของการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ที่มีความเสถียร การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5X10^{5}$ เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM ที่มี 4 mM L-glutamine 25 mM D-glucose และ 1 mM sodium pyruvate และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัด (50 µg/mL) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร (Srisook et al., 2011) หลังจากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM และคำนวณ % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัด โดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ใช้สาร aminoguanidine เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัด (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยชุดตรวจสอบ PGE_2 competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการทดสอบลงในไมโครเพลทที่เคลือบก้นหลุมด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody หลังจากนั้นเติม mouse anti-PGE_2 monoclonal antibody ลงในแต่ละหลุมและบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่เชื่อมกับเอนไซม์ horseradish peroxidase และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารตั้งต้น (hydrogen peroxide และ tetramethylbenzidine) ผสมให้เข้ากันดี และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดิน E_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่ทราบความเข้มข้นและใช้สารมาตรฐาน indomethacin เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2

ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบนั้นต้องมีการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยเพื่อดูความเป็นพิษของสารอักเสบซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ซึ่งสาร 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์ การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ($1.5X10^5$ เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (w/w) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัด (50 µg/ml) และ LPS (1 µg/ml) โดย LPS ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 500 µl ที่มีสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและละลายผลึก formazan ด้วย DMSO จำนวน 500 µl และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Versamax, Molecuar Devices, สหรัฐอเมริกา) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังสมการ ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ / ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม) X 100 (Buapool et al., 2013)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) โดยทำการหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงโดยใช้เทคนิค HPLC การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง และพัฒนาตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ในรูปแบบครีมและศึกษาความคงตัวของตำรับที่พัฒนาขึ้นรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

ส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

3.1 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

- เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Sartorius LE 2445, Germany)
- เครื่อง Rotary evaporator (Buchi V700, Switzerland)
- เครื่อง Hot air oven (Contherm thermotec 2000, Australia)
- เครื่อง HPLC (Hitachi, Japan)
- เครื่อง UV-Vis microplate reader (PowerWave Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, Inc)
- ตู้ CO_2 Incubator (Binder, Germany)
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- Cylinder
- กรวยกรอง
- ช้อนตักสาร
- Stirring rod
- Beaker

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

- ชุด Soxhlet apparatus
- Round bottom
- Stand และ O-ring
- Buchner funnel
- Vacuum pump
- Evaporating dish
- Water bath
- 96 well-plates

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ

- สาร compound D (สารมาตรฐานแยกโดย ผศ.ดร.สมศักดิ์ นวลแก้ว คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม)
- สาร genistein (Sigma-Aldrich, USA)
- Ethanol, Chemical grade (RCI Labscan, Australia)
- Methanol, Chemical grade (Merck, Germany)
- Acetic acid, glacial AR grade (Carlo Erba, Italy)
- Acetonitrile, HPLC grade (RCI Labscan, Australia)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

- 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole (MTT) (Invitrogen, USA)
- Phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)
- Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
- Penicillin (Gibco, USA)
- Streptomycin (Gibco, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)
- Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, USA)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (PanReac Applichem, USA)

- Griess reagent (1% N-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric) (Promega, USA))
- Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)
- Isopropanol (PanReac Applichem, USA)
- lipopolysaccharide (LPS) (Gibco, USA)

3.2.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

- Raw 264.7 cell line (ATCC® TIB-71™)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการตั้งตำรับครีม

- Cremophor RH 40 (K.Science center & medical)
- Mineral oil (C.P. drug center)
- Cetyl alcohol (C.P. drug center)
- Stearyl alcohol (ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด)
- Hard paraffin (K.Science center & medical)
- Isopropyl myristate (C.P. drug center)
- Carbopol 934 (K.Science center & medical)
- Triethanolamine (K.Science center & medical)
- Propylene glycol (C.P. drug center)
- White petrolatum (K.Science center & medical)
- Lanolin (K.Science center & medical)
- Bees wax (K.Science center & medical)
- Span 60 (K.Science center & medical)
- Methyl paraben (K.Science center & medical)
- Propyl paraben (K.Science center & medical)

3.3 สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างสมุนไพรแห้งในตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens*) เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) แก่นต้นขันทองพยาบาท (*Suregada multiflora*) และแก่นต้นมะดูก (*Siphonodon celastrineus*) ซื้อจากร้านเครื่องยาสมุนไพร จังหวัดพิจิตร นำ

ตัวอย่างพืชที่ได้มายืนยันความถูกต้องของพืช โดยเถาวัลย์เปรียงและเหง้าไพล นำมาเทียบกับเอกสารอ้างอิง Thai Herbal Pharmacopoeia, 2017 ส่วนแก่นต้นขันทองพยาบาท และแก่นต้นมะดูก นำมาเทียบกับเอกสารอ้างอิงสารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ) Concise Encyclopedia of Plants in Thailand) สำนักงานหอพรรณไม้ (สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2559) และตรวจสอบความถูกต้องโดย ผศ.ดร.วนิดา ไทรชมภู คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC

3.4.1.1 การเตรียมสารสกัดของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

(1) นำตัวอย่างสมุนไพรแห้งของตำรับ ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง ไพล ขันทองพยาบาท มะดูก ไปล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสมุนไพรแต่ละชนิดมาบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผ่านแร่งเบอร์ 60

(2) ชั่งผงยาสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับ ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง ไพล ขันทองพยาบาท มะดูก (อัตราส่วน 1:2:1:1) เถาวัลย์เปรียงน้ำหนัก 80 กรัม เหง้าไพลน้ำหนัก 160 กรัม แก่นขันทองพยาบาทน้ำหนัก 80 กรัม และแก่นมะดูกน้ำหนัก 80 กรัม น้ำหนักรวม 400 กรัม จำนวน 2 ชุด

(3) นำผงยาสมุนไพรของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง จำนวน 400 กรัม จำนวน 2 ชุด มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด ได้แก่ 50% เอทานอลและ 95% เอทานอล ด้วยวิธี soxhlet extraction เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(4) กรองสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงทั้ง 2 ตัวทำละลายด้วย 50% เอทานอล และ 95% เอทานอล ได้ด้วยการกรองผ่านสำลีและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารสกัดดังกล่าวไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และหลังจากนั้นนำมาทำให้แห้งโดยตั้งบน water bath ด้วยวิธี free evaporation จะได้สารสกัดหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำสารสกัดหยาบทั้ง 2 ชนิดนั้นเก็บในขวดแก้วสะอาดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(5) คำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield) ของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง จากสมการ

ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield) = (น้ำหนักหลังสกัด/น้ำหนักผงสมุนไพร) x 100

3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง (ดัดแปลงจาก (Department of Medical Sciences, 2018))

3.4.1.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน Compound D

(1) ชั่งน้ำหนักสารมาตรฐาน Compound D ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1 mg ละลายด้วย methanol ลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 mL ได้สารมาตรฐาน stock standard solution จะได้ความเข้มข้น 1 mg/mL

(2) ปิเปต stock standard solution มาเตรียมเป็นสารละลายของ compound D จำนวน 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 µg/mL นำสารละลายที่ได้กรองผ่าน Cellulose acetate syringe filter ขนาด 0.45 µm เก็บสารละลายที่กรองได้ไว้ในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันแสง จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ Phenomenex C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)

3.4.1.2.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

(1) ชั่งน้ำหนักสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1 mg ละลายด้วย methanol ลงใน microtube ขนาด 1.5 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 mL เพื่อเป็น sample solution จะได้ความเข้มข้น 1 mg/mL วิเคราะห์หาปริมาณสาร Compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยคำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟเพื่อคำนวณหาปริมาณสารจากสมการและปริมาณสาร Compound D (mg) ต่อสารสกัด 1 g

3.4.1.3.3 HPLC condition

ระบบ Solvent system ที่เหมาะสม คือ acetonitrile (A) และ 1% acetic acid ในน้ำ (v/v) (B) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ใช้ Detector คือ DAD ความยาวคลื่น 254 nm โดยความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร compound D

เวลา (นาที)	A (%)	B (%)
0	10	90
30	54	46
35	100	0
55	100	0
60	10	90
75	10	90

3.4.1.3 การจัดทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

นำสารสกัด 50% และ 95% ethanol ของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ HPLC condition ระบบ Solvent system ที่เหมาะสม คือ acetonitrile (A) และ 1% acetic acid ในน้ำ (v/v) (B), flow rate 1.0 mL/min ใช้ Detector คือ DAD ความยาวคลื่น 254 nm โดยความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 แสดงความเข้มข้นของเฟสเคลื่อนที่ที่เวลาต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

เวลา (นาที)	A (%)	B (%)
0	10	90
30	54	46
80	56	44
90	80	20
95	100	0
100	100	0
105	10	90
120	10	90

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

3.4.2.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธี Nitric oxide (ศุณิตา มากชูชิต และอรุณพร อิฐรัตน์, 2555)

(1) เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin และ 1% streptomycin ใน 96 well-plates จำนวนเซลล์ 1×10^5 cells/well ปริมาตร 100 µL บ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(2) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกจากหลุม เติม LPS (lipopolysaccharide) ความเข้มข้น 10 µg /ml ใน DMEM ปริมาตร 100 µL ลงในหลุมทดลอง (+

LPS) ที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ส่วนหลุมควบคุม (-LPS) เติม DMEM ปริมาตร 100 µL ลงไป

(3) เติม DMEM ปริมาตร 100 µL ลงในหลุม control media ทั้งหลุมทดลอง (+LPS) และหลุมควบคุม (-LPS)

(4) เติม 2% DMSO ใน DMEM ปริมาตร 100 µL ลงในหลุม control solvent ทั้งหลุมทดลอง (+LPS) และหลุมควบคุม (-LPS)

(5) เตรียม stock ของสารสกัดด้วย 50%, 95% ethanol ของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงและสาร genistein ลงใน eppendorf tube ขนาด 1 mL โดยละลายด้วย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL จากนั้นเตรียมสารสกัดด้วย 50% และ 95% ethanol ของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงและสาร genistein ในความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 10, 50, 100 µg/mL ลงใน eppendorf tube ขนาด 1 mL โดยละลายด้วย DMEM ลงในหลุมทั้งหลุมทดลอง (+LPS) และหลุมควบคุม (-LPS) หลุมละ 100 µL

(6) นำไปบ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37^0C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(7) ดูด supernatant แต่ละหลุมมา 50 µL ใส่ใน 96 well-plates อันใหม่ เติม Griess reagent หลุมละ 100 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm เพื่อหาค่าการยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ดังแสดงในภาพที่ 10

การคำนวณ % inhibition of NO production มีดังนี้

% inhibition = (control – sample / control) x 100

โดยที่ control คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS control media (or control solvent)] - [-LPS control media (or control solvent)] และ sample คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS sample] - [-LPS sample]

การคำนวณ % inhibition of NO production มีดังนี้

% inhibition = (control – sample / control) x 100

โดยที่ control: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS control media (or control solvent)] - [-LPS control media (or control solvent)]

sample: ค่าการดูดกลืนแสงของหลุม [+LPS sample] - [-LPS sample]

3.4.2.2 Cell viability

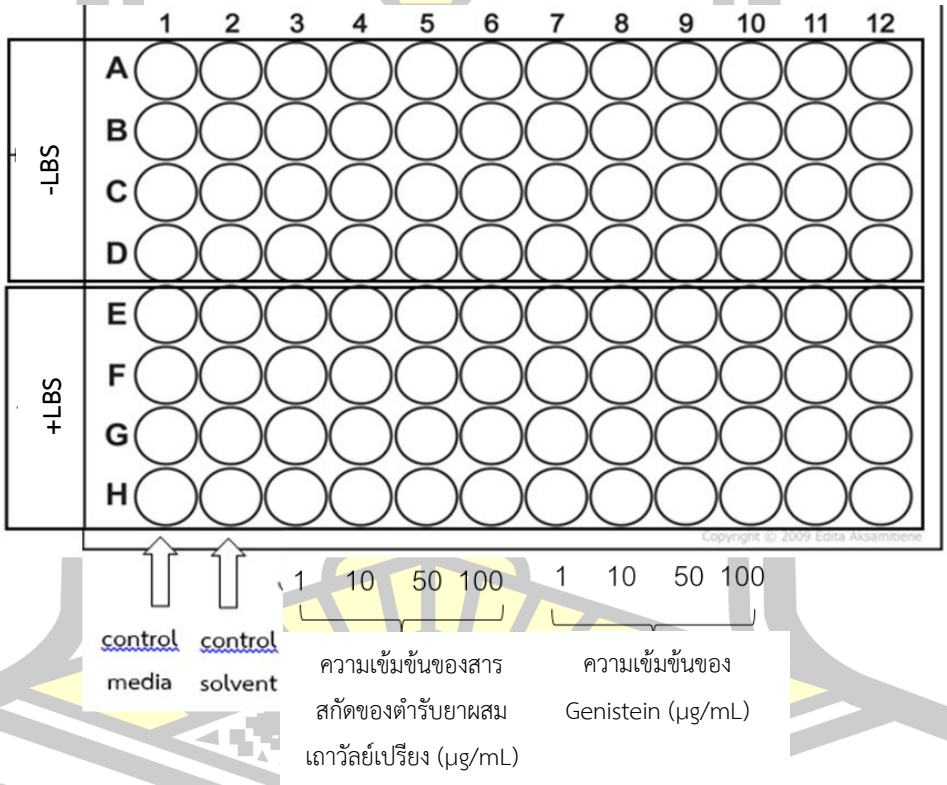
MTT เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจานวนความมีชีวิตรอดของเซลล์

(1) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยใช้วิธี Nitric oxide ในขั้นตอนข้อ (7) ใช้ส่วนของ supernatant ที่คงเหลืออยู่ใน plate ปริมาตรหลุมละ 150 µL เติม MTT ปริมาตร 10 µL เฉพาะหลุมควบคุม (– LPS) แล้วบ่มใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด supernatant ออก เติม 0.04 M HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm เพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ในรูป % cell viability

การคำนวณ % cell viability มีดังนี้

% cell viability = (sample / control) x 100

โดยที่ sample คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุม - LPS sample และ Control คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุม - LPS control media (or control solvent)



ภาพประกอบ 10 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อหาค่า IC_{50} และ % Cell viability

3.4.3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย 95% และ 50% เอทานอล นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีค่า

การยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide ดีที่สุดและไม่มีพิษต่อเซลล์ และทราบปริมาณสารสำคัญของตำรับที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ จนได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและปริมาณสารสำคัญที่เหมาะสม นำมาพัฒนาเป็นตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

3.4.3.1 การพัฒนาตำรับครีมพื้น

3.4.3.1.1 การพัฒนาตำรับครีมพื้น จำนวน 6 สูตรตำรับ ต่อจากนั้นจะคัดเลือกครีมพื้นที่จะนำไปพัฒนาเป็นตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงจากลักษณะทางกายภาพที่ได้เช่น สี กลิ่น ความเนียน การกระจายตัวบนผิวหนัง การดูดซึมเข้าสู่ผิว การวัดความหนืดและค่า pH ซึ่งตำรับครีมพื้นและส่วนประกอบในตำรับ สูตร A (ทำตำรับครีมโดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนจำนวน 3 ตำรับ) และสูตร B (ทำตำรับครีมโดยปรับเปลี่ยนสัดส่วนจำนวน 3 ตำรับ) แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตาราง 3 ตำรับครีมพื้น สูตร A โดยมีส่วนประกอบและปริมาณในตำรับ 100 กรัม ดังนี้

ส่วนประกอบในตำรับ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณสารตำรับสูตร A (กรัม)
Cetyl alcohol	oil phase/auxiliary emulsifier	3 - 5
Cremophor 40	emulsifier	5 - 10
Mineral oil	oil phase/emollient	3 - 5
Hard parafin	oil phase/stiffening agent	2 - 5
Triethanolamine	pH adjustment	0.1 – 0.5
Glycerin	water phase/humectant	3 - 5
Carbomer	water phase/thickener	0.1 – 0.5
Propylene glycol	water phase/solvent	3 - 5
Isopropyl myristate	oil phase/enhancer	5 - 10
Concentrate paraben	preservative	0.1 – 0.3
Purify water	water phase	60 - 70

ตาราง 4 ตำรับครีมพื้น สูตร B โดยมีส่วนประกอบและปริมาณในตำรับ 100 กรัม ดังนี้

ส่วนประกอบในตำรับ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณสารตำรับสูตร B (กรัม)
Cremophor 40	emulsifier	5 - 10
Mineral oil	oil phase/emollient	3 - 5
Hard parafin	oil phase/stiffening agent	2 - 5
Stearyl alcohol	oil phase/auxiliary emulsifier	0.1 – 0.5
Lanolin	oil phase/stiffening agent	5 - 10
Glycerin	water phase/humectant	3 - 5
Carbomer	water phase/thickener	0.2 – 0.5
Propylene glycol	water phase/solvent	3 - 5
Triethanolamine	pH adjustment	0.1 – 0.5
Concentrate paraben	preservative	0.1 – 0.3
Purify water	water phase	60 - 70

3.4.3.1.2 วิธีการเตรียมครีม

(1) โดยแบ่งสารออกเป็นสองกลุ่ม คือวัฏภาคน้ำและน้ำมัน เตรียมตำรับตามขั้นตอน โดยอุ่นวัฏภาคน้ำและน้ำมันให้มีอุณหภูมิ 75 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

(2) เทวัตภาคน้ำมันลงในวัตภาคน้ำให้เป็นสายพร้อมคนตลอดเวลาด้วยแท่งแก้วคนสารจนเนื้อครีมเริ่มแข็ง

(3) เมื่ออุณหภูมิลดลงประมาณ 40 องซาเซลเซียส เติมสารออกฤทธิ์คือสารสกัดของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยนำมาละลายด้วย propylene glycol และเติม Concentrate paraben ลงในตำรับ จากนั้นคนต่อเนื่องจนเนื้อครีมเข้ากันได้ดี จะได้ยาครีมพื้น

3.4.3.2 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของครีมตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

การทดสอบความคงตัวของยาครีมพื้น โดยนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้บรรจุลงในภาชนะ นำไปทดสอบโดยวิธี Heating-cooling cycle ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบทั้งหมด 6 รอบแล้วเลือกตำรับครีมที่มีความคงตัวที่สุดหลังการทดสอบ

การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของครีมตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยวัดคุณสมบัติดังนี้

(1) ทดสอบลักษณะทางกายภาพด้วยลักษณะของ สี กลิ่น การแยกชั้น การหดตัวของเนื้อครีมเนื่องจากของเหลวบางส่วนไหลออกมาจากเนื้อครีม (syneresis)

(2) ทดสอบความเป็นกรดและด่างของตำรับ วัดโดยใช้ pH meter ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

(3) ความหนืด วัดความหนืดของผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้ โดยใช้เครื่องมือวัดความหนืด Brookfield viscometer มีหน่วยเป็น cP (mPa.s)

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์และประมวลผลข้อมูล ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปช่วยในการคำนวณทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS สถิติที่ใช้ประกอบด้วย

3.5.1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง แสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยรายงานค่า % inhibition of NO production) และ IC_{50} และค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) แสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และวิเคราะห์หาความแตกต่างของฤทธิ์ต้านการอักเสบระหว่างตัวทำละลายสองชนิดคือสารสกัด 50% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงและ 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง โดยใช้สถิติ independent *t*-test

3.5.3 การคัดเลือกสูตรตำรับพิจารณาจากคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้น คุณสมบัติของครีมตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง แสดงผลของค่า pH และความหนืดด้วยค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ซึ่งวิเคราะห์หาความแตกต่างของคุณสมบัติของครีมตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงหลังเตรียมเสร็จและหลังผ่าน Heating-cooling cycle โดยใช้สถิติ paired *t*-test

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study) โดยทำการหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงโดยใช้เทคนิค HPLC การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง และพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงและศึกษาความคงตัวของตำรับที่พัฒนาขึ้นรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

ส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

ส่วนที่ 1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC

4.1 การหาปริมาณสารที่สกัด

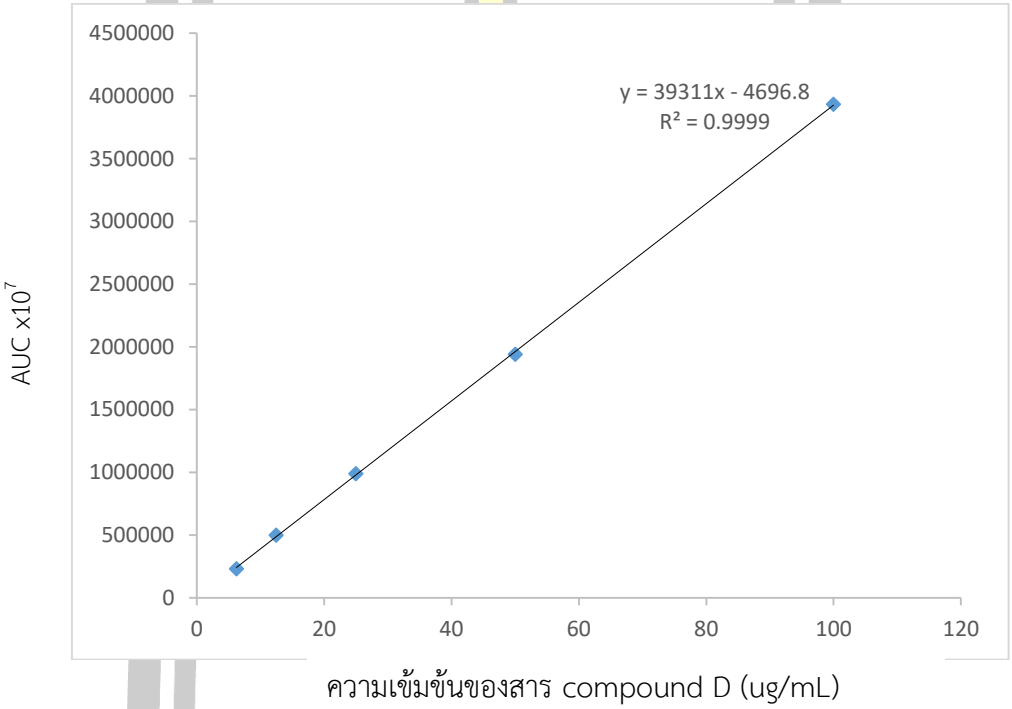
การสกัดสารสำคัญจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยวิธี soxhlet ด้วยตัวทำละลาย 50% และ 95% มีร้อยละของสารสกัด (the percentage of yield) เท่ากับ 10.43 และ 11.27 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 แล้วนำสารสกัดดังกล่าวไปหาปริมาณสารบ่งชี้และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อไป

ตาราง 5 แสดง %yield ของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

Extract	Content (g)	%yield (%w/w)
50% ethanol	41.69	10.43
95% ethanol	45.06	11.27

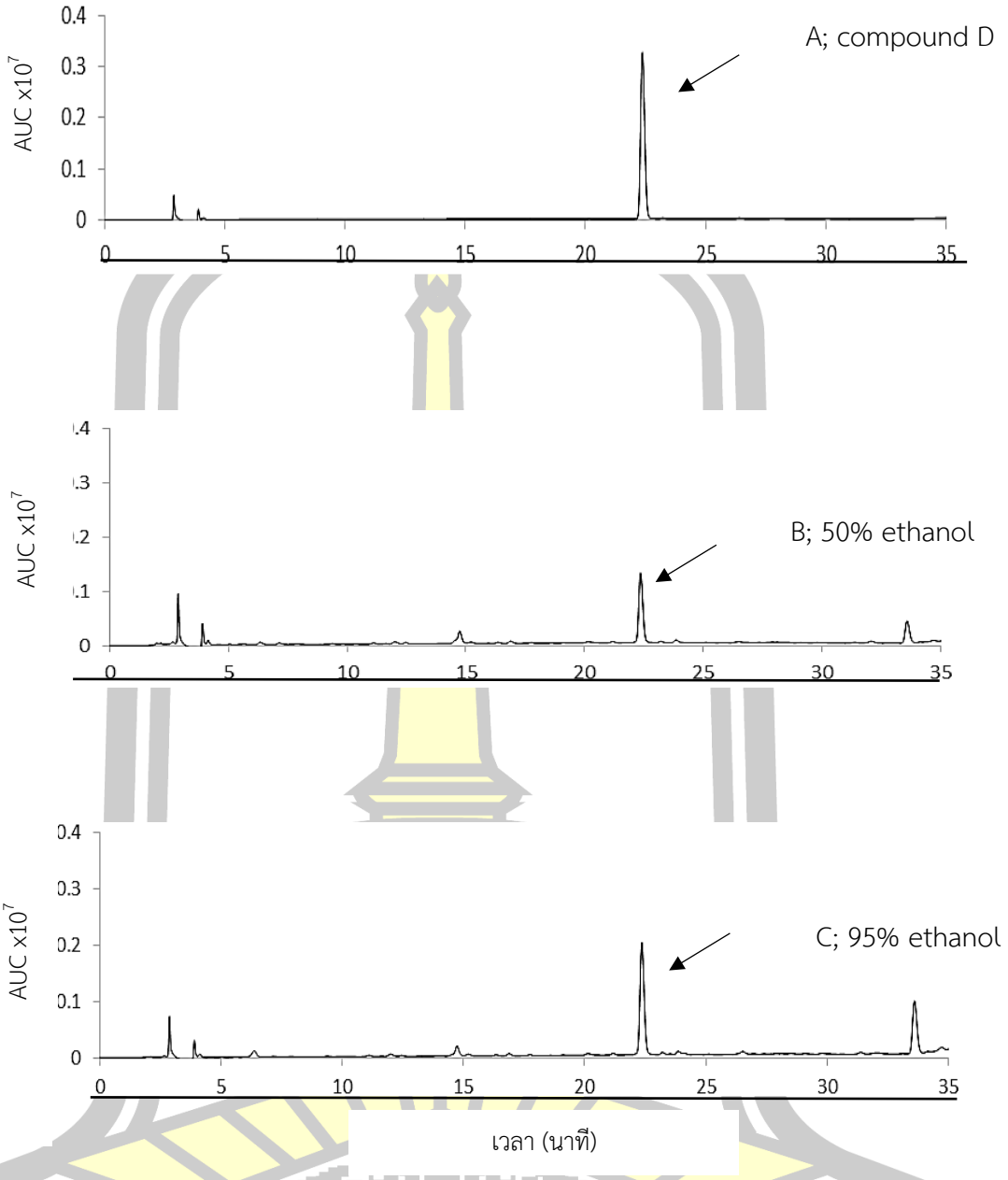
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร compound D จากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสาร compound ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL และพื้นที่ใต้กราฟด้วย HPLC พบว่าได้กราฟเส้นตรงและสมการความสัมพันธ์ y = 39311x + 4696.8, R^2 = 0.9999 ดังภาพประกอบที่ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสาร compound D

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร Compound D จากสารสกัด 50% และ 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงพบว่า เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่า ปริมาณสาร compound D ต่อ 1 กรัมสารสกัด เท่ากับ 13.094±0.202 mg คิดเป็นร้อยละ 1.309±0.020 และ 18.893±0.236 mg คิดเป็นร้อยละ 1.889±0.024 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพแสดงโครมาโตแกรม ในภาพประกอบที่ 12



ภาพประกอบ 12 แสดงโครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน compound D (A) สารสกัด 50% เอทานอล (B) และ 95% เอทานอล (C) ที่ Retention time ที่ 22.35 นาที

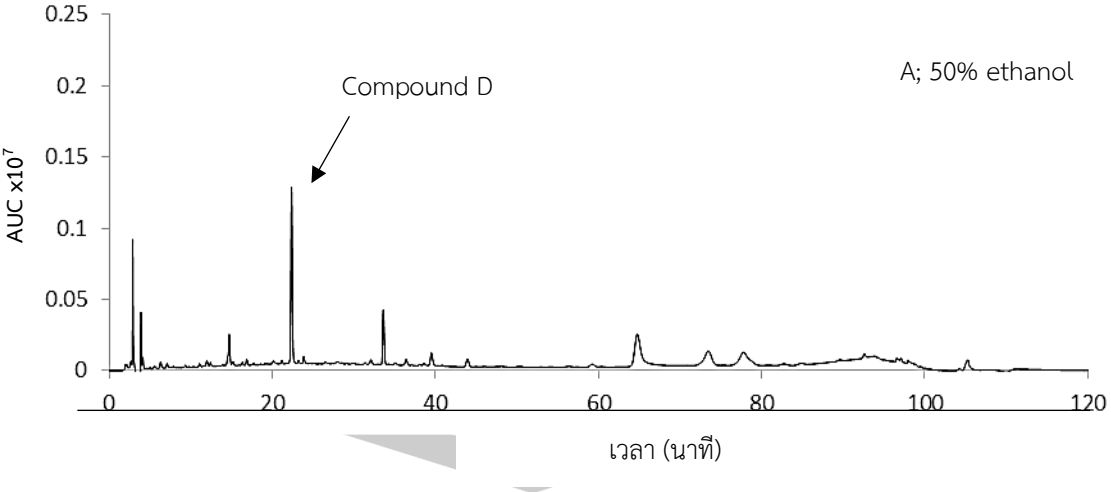
ตาราง 6 แสดงปริมาณสาร compound D ในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

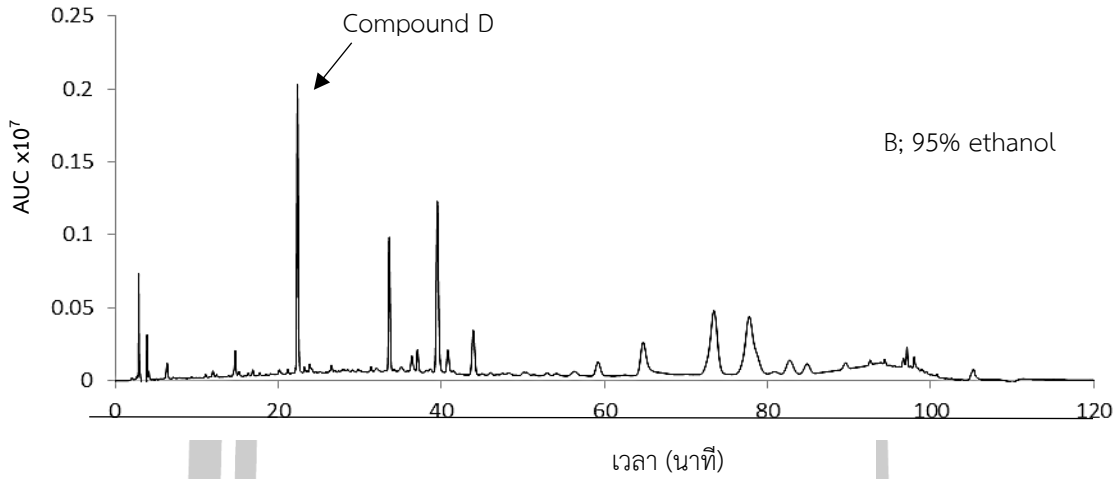
Extract	Content	
	(mg/g extract, mean±S.D.)	(% w/w, mean±S.D.)
50% ethanol	13.094±0.202	1.309±0.020
95% ethanol	18.893±0.236	1.889±0.024

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งชี้ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง คือ compound D จากไพลพบว่า ตำรับที่สกัดด้วย 50% เอทานอลมีปริมาณสารบ่งชี้คือ compound D น้อยกว่า ตำรับที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 6

4.3 การจัดทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

การจัดทำโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงโดยใช้ระบบ Solvent system ที่เหมาะสม คือ acetonitrile และ 1% acetic acid ในน้ำ (v/v), flow rate 1.0 mL/min ใช้ Detector คือ UV ความยาวคลื่น 254 nm เป็นเวลา 120 นาที ซึ่งการศึกษาครั้งในใช้สารบ่งชี้ คือ compound D จากไพล ดังแสดงในภาพประกอบที่ 13





ภาพประกอบ 13 แสดงโครมาโตแกรมของสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง 50% เอทานอล (A) และ 95% เอทานอล (B) ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ซึ่งแสดงโครมาโตแกรมของสารบ่งชี้ของตำรับ คือ compound D ที่ retention time ที่ 22.35 นาที

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Nitric oxide

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี nitric oxide (NO) นำสารสกัด 50% และ 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์ RAW 264.7 (macrophage cell) โดยวัดความสามารถของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง ในการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นค่า % inhibition of NO production และ IC_{50} ตรวจสอบยืนยันฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ของสารสกัดว่าไม่ได้เกิดจากตายของเซลล์โดยการวัดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยเทคนิค MTT รายงานเป็นค่าการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ซึ่งต้องมากกว่าร้อยละ 70

ผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้น 100 และ 50 µg/mL สารสกัด 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด ค่าการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นค่า % inhibition of NO production เท่ากับ 90.42±2.46 และ 50.80±2.38 ตามลำดับ ส่วนสารสกัด 50% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีค่า % inhibition of NO production เท่ากับ 56.64±2.33 และ 38.58± 6.61 โดยสารสกัดทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่แต่ละความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตาราง 7 แสดง % inhibition of NO production และค่าอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง (n=3)

Extract	Conc. (µg/mL)	% inhibition of NO	% cell viability
50% ethanol	100	56.64±2.33[a]	95.56±15.78
	50	38.58±6.61[b]	105.37±12.04
95% ethanol	100	90.42±2.46[a]*	113.10±11.88
	50	50.80±2.38[b]	121.27±5.53

*a, b เปรียบเทียบระหว่าง 2 ความเข้มข้นของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด โดยใช้สถิติ *t*-test ($p<0.05$)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นดังกล่าว พบว่าค่า % inhibition of NO production ของสารสกัด 95 % เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ที่ดีที่สุด โดยสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70) ซึ่งผลการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 2 ความเข้มข้น คือ 100 และ 50 µg/mL พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีความแตกต่างกันของ % inhibition of NO production กับสารสกัดด้วย 50% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงในความเข้มข้นทุกระดับที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จึงนำมาทดสอบหาค่า IC_{50} ซึ่งผลการทดสอบพบว่า สารสกัด 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด ค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL เมื่อเทียบกับ สาร genistein ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.48±2.34 µg/mL โดยสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70) แสดงผลในตารางที่ 8

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

ตาราง 8 แสดง % inhibition of NO production, IC_{50} (µg/mL) ของสารสกัด 95 % ของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงและ genistein และ % cell viability (n=3)

Samples	Concentrations (µg/mL)	% inhibition of NO	IC_{50} (µg/mL)	% cell viability
95% ethanol	1	5.25±2.49		98.31±5.64
	10	14.98±3.48		100.64±4.29
	50	57.21±2.33	40.08±2.78	101.31±8.29
	100	90.64±1.33		103.47±8.16
Genistein	1	8.32±0.77		104.90±6.83
	10	26.95±2.97		105.46±5.22
	25	52.05±3.13	23.48±2.34*	108.80±8.27
	50	71.87±1.51		105.64±5.99

*$p<0.05$ significant as compared between two groups using *t*-test.

ส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

4.5 การพัฒนาตำรับครีมพื้น

โดยพัฒนาตำรับครีมพื้นทั้งหมด 6 ตำรับ โดยแบ่งออกเป็น สูตร A 3 ตำรับ คือ A-1, A-2, A-3 และ สูตร B 3 ตำรับ คือ B-1, B-2, B-3 ซึ่งมีรายละเอียดส่วนประกอบของแต่ละสูตร แสดงในตารางที่ 9 และผลการประเมินการทดสอบความคงตัวของครีมพื้น แสดงในตารางที่ 10

พหุน ปณฺ ฑิโต ชีเว

ตาราง 9 แสดงตำรับยาพื้นครีมทั้งหมด 6 สูตร

Ingredients	ปริมาณสาร (g)					
	A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3
Cetyl alcohol	4	5	5	-	-	-
Cremophor 40	6	6	8	6	8	10
Mineral oil	3	5	4	4	3	3
Hard parafin	2.5	3	4	3	4	2
Stearyl alcohol	-	-	-	6	5	6
Lanolin	-	-	-	7	6	5
Triethanolamine	0.2	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2
Isopropyl myristate	7	5	8	-	-	-
Glycerin	4	3	5	3	4	3
Carbomer	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2	0.2
Propylene glycol	3	3.5	5	3.5	3.5	4.5
Conc. paraben	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Purify water	70	69	60	67	66	66

ตาราง 10 แสดงผลการประเมินการทดสอบความคงตัวของครีมพื้น

ตำรับ	สภาวะทดสอบ		
	ลักษณะครีมหลังเตรียมเสร็จ	pH	ความหนืด (cP)
A -1	เนื้อครีมเนียน ค่อนข้างหนืด	6.25±0.03	62123±20.82
A - 2	เนื้อครีมเนียน ความหนืดเหมาะสม	5.97±0.02	52696.67±15.28
A - 3	เนื้อครีมหนืดมาก ซึมยาก	7.02±0.06	65133.33±30.55
B - 1	เนื้อครีมมันวาว หนืดเล็กน้อย	6.12±0.04	59023.33±15.28
B - 2	เนื้อครีมมันวาว ซึมเข้าผิวค่อนข้างยาก	5.99±0.02	61143±15.28
B - 3	เนื้อครีมมันวาว ไม่หนืด	5.45±0.06	48733.33±16.07

จากการประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับยาครีมพื้นทั้ง 6 ตำรับ พบว่ายาครีมพื้นตำรับที่ A-2 มีลักษณะที่ดีที่สุด คือเนื้อครีมเนียน มี pH เท่ากับ 5.97±0.02 และมีความหนืดเท่ากับ 52696.67±15.28 จึงเลือกครีมพื้นตำรับที่ A-2 มาใช้ในการพัฒนาตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียง

โดยแนวทางการพัฒนาตำรับครีมดังกล่าวเลือกจากสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เหมาะสม จึงเลือกสารสกัดด้วย 95% เอทานอลที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL และไม่มีพิษต่อเซลล์ มีการวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งชี้ในตำรับ ได้แก่ สาร compound D จากไพลพบว่า มีปริมาณเท่ากับ 18.893±0.236 mg/g สารสกัด การพัฒนาตำรับครีมได้ใส่สารสกัดด้วย 95% เอทานอล เป็น active ingredient คำนวณจากฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยให้ใส่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL คิดเป็น 80.16 µg/mL เมื่อคิดเป็นร้อยละ 0.008 ของตำรับ ซึ่งในการพัฒนาตำรับครีมได้ใส่สารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย 95% เอทานอล เป็น active ingredient ร้อยละ 0.1 ของตำรับ (ความเข้มข้นมากกว่า 2 เท่าของค่า IC_{50}) ดังแสดงในตารางที่ 11 จากนั้นนำมาประเมินคุณภาพ โดยทดสอบความคงตัว

ตาราง 11 แสดงตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

ingredients	ปริมาณ (g)
สารสกัด 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง	0.1%
Cetyl alcohol	5
Cremophor 40	6
Mineral oil	5
Hard parafin	3
Triethanolamine	0.1
Isopropyl myristate	5
Glycerin	3
Carbomer	0.2
Propylene glycol	3.5
Conc. paraben	0.2
Purify water	69

4.6 การประเมินคุณภาพของตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียง

การทดสอบความคงตัวของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง ในขณะที่เตรียมครีมเสร็จเปรียบเทียบกันกับเมื่อผ่านสภาวะเร่ง คือการทำ heating - cooling cycle จากนั้นประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี กลิ่น ความเนียน ความรู้สึกเมื่อทาผิว ความหนืด การแยกชั้นของตำรับ และการทดสอบความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของตำรับ ดังแสดงผลในตารางที่ 12

ผลการประเมินความคงตัว หลังเตรียมตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงเสร็จ ที่อุณหภูมิห้องพบว่า ครีมมีเนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.97±0.02 และค่าความหนืด 52696.67±15.28 cP จากนั้นทำการประเมินความคงตัว หลังจากผ่านกระบวนการ heating – cooling cycle 6 รอบ (n=3) แล้วพบว่าเนื้อครีมเนียนยังละเอียด แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย มีความหนืดลดลง ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.62±0.02 และค่าความหนืด 50033.33±20.82 cP

ตาราง 12 แสดงความคงตัวทางกายภาพของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

เกณฑ์การประเมิน	**สภาวะทดสอบ**	
	ลักษณะครีมหลังเตรียมเสร็จ	ลักษณะครีมหลังผ่าน Heating – Cooling cycle
ลักษณะเนื้อครีม	เนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ	เนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย มีความหนืดลดลงเล็กน้อย
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
ความติดผิว	กระจายบนผิวหนังได้ดี	กระจายบนผิวหนังได้ดี
ความเหนียวเหนอะหนะ	ไม่เหนียวเหนอะหนะ	ไม่เหนียวเหนอะหนะ
ความรู้สึกเมื่อทา	ผิวชุ่มชื้น	ผิวชุ่มชื้น
pH	5.97±0.02	5.62±0.02
ความหนืด (cP)	52696.67±15.28	50033.33±20.82

ผลการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง การประเมินความคงตัวหลังเตรียมตำรับครีมเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องพบว่า ตำรับมีเนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.97±0.02 และค่าความหนืด 52696.67±15.28 cP จากนั้นทำการประเมินความคงตัว หลังจากผ่านกระบวนการ heating – cooling cycle 6 รอบ พบว่าเนื้อครีมเนียนละเอียด แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย มีความหนืดลดลงเล็กน้อย ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.62±0.02 และค่าความหนืด 50033.33±20.82 cP การประเมินความคงตัวที่สภาวะหลังเตรียมตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบกันกับสภาวะหลังจากผ่านกระบวนการเร่งคือ heating – cooling cycle พบว่าค่าความหนืดและค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

พหุน ปณฺฑิโต ชีเว

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงโดยใช้เทคนิค HPLC) การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง และพัฒนาตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ในรูปแบบครีมและศึกษาความคงตัวของตำรับที่พัฒนาขึ้น รายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค HPLC

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

ส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

5.1 สรุปผล

ส่วนที่ 1 การหาปริมาณสารสำคัญที่เป็นสารบ่งชี้ (marker) ของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งชี้ในสารสกัดด้วย 50% และ 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง สูตร 2 (เถาวัลย์เปรียง : ไพล : ขันทองพยาบาท : มะดูก เท่ากับ 1 : 2 : 1 : 1) ด้วยวิธี soxhlet extraction ใช้สาร compound D จากไพล พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีปริมาณสาร compound D 18.893±0.236 mg/g สารสกัด (ร้อยละ 1.889±0.024) ซึ่งมากกว่าตำรับยาที่สกัดด้วย 50% เอทานอลของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง

ส่วนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) ผลการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้น 100 และ 50 µg/mL สารสกัด 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัด 50% เอทานอล โดย

ค่าการยับยั้งการสร้าง Nitric oxide ในเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย lipopolysaccharide (LPS) รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นค่า % inhibition of NO production เท่ากับ 90.42±2.46 % และ 50.80±2.38% ตามลำดับ ส่วนสารสกัด 50% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีค่า % inhibition of NO production เท่ากับ 56.64±2.33% และ 38.58±6.61% โดยสารสกัดทั้ง 2 ตัวอย่าง ที่แต่ละความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70) ซึ่งผลการทดสอบทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 2 ความเข้มข้น คือ 100 และ 50 µg/mL พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง มีความแตกต่างกันของ % inhibition of NO production กับ สารสกัดด้วย 50% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงในความเข้มข้นทุกระดับที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากนั้นจึงทดสอบหาค่า IC_{50} ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารสกัด 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับสาร genistein ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.48±2.34 µg/mL โดยสารสกัดทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70)

ส่วนที่ 3 การพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง และทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพ

แนวทางการพัฒนาตำรับครีม โดยเลือกจากสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและสอดคล้องกับปริมาณสารสำคัญที่เหมาะสมที่สุด จึงเลือกสารสกัดด้วย 95% เอทานอลที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL และไม่มีพิษต่อเซลล์ โดยปริมาณสารบ่งชี้ในตำรับ คือ สาร Compound D เท่ากับ 18.893±0.236 mg/g สารสกัด จากนั้นนำสารสกัดด้วย 95% เอทานอล ซึ่งเป็น active ingredient ใส่ในตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง ปริมาณร้อยละ 0.1 ของตำรับ (ความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของค่า IC_{50})

ผลการพัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง การประเมินความคงตัวหลังเตรียมตำรับครีมเสร็จที่อุณหภูมิห้อง พบว่าตำรับมีเนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.97±0.02 และค่าความหนืด 52696.67±15.28 cP จากนั้นทำการประเมินความคงตัว หลังจากผ่านสภาวะเร่งคือกระบวนการ heating – cooling cycle 6 รอบ พบว่าเนื้อครีมเนียนละเอียด แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย มีความหนืดลดลงเล็กน้อย ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.62±0.02 และค่าความหนืด 50033.33±20.82 cP การประเมินความคงตัวของครีม ขณะหลังเตรียมตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบกันกับหลังผ่านสภาวะเร่งคือกระบวนการ heating – cooling cycle พบว่าค่าความหนืดและค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

5.2 การอภิปรายผล

ตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง เป็นตำรับยาในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ เถาวัลย์เปรียง เหง้าไพล แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) และแก่นดูกหิน (มะดูก) ขนาดรับประทานครั้งละ 900 มิลลิกรัม – 1.5 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารทันที ซึ่งคลินิกแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลบุรีรัมย์ ใช้ตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง ในการรักษาผู้ป่วยที่มีอาการปวดกล้ามเนื้อ ตำรับนี้มีข้อห้ามใช้ในหญิงตั้งครรภ์ อาจพบอาการไม่พึงประสงค์คือ ปวดท้อง ท้องผูก ปัสสาวะบ่อย คอแห้ง และใจสั่น และควรระวังการใช้ในผู้ป่วยที่เป็นแผลในกระเพาะอาหารเนื่องจากเถาวัลย์เปรียงมีกลไกออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยา NSAIDs อาจทำให้เกิดการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร (คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ, 2561) จากข้อมูลดังกล่าว การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ภายนอกของสารสกัดจากตำรับยานี้ เมื่อพิจารณาสรรพคุณรวมของตำรับคือ รสเฝื่อนเอียนจากเถาวัลย์เปรียง และรสร้อนจากเหง้าไพลช่วยบรรเทาอาการปวดเมื่อยร่างกาย ส่วนรสเฝื่อนเมาจากแก่นขันทองพยาบาทและแก่นมะดูกช่วยในการขับน้ำเหลืองเสีย ลดความร้อนที่เกิดจากการอักเสบ ตำรับนี้จึงมีสรรพคุณที่ครอบคลุมการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อได้มากกว่ายาเถาวัลย์เปรียงเดี่ยวเพียงตัวเดียว อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและสารออกฤทธิ์ที่สอดคล้องกับสรรพคุณของตำรับ การศึกษานี้เลือกสูตรตำรับที่ 2 ประกอบด้วย เถาวัลย์เปรียง : เหง้าไพล : แก่นดูกใส (ขันทองพยาบาท) : แก่นดูกหิน (มะดูก) อัตราส่วน 1 : 2 : 1 : 1 เนื่องจากในสูตรที่ 2 นี้มีสัดส่วนไพลเป็นจำนวน 2 เท่าของสมุนไพรอื่นในตำรับ จากสรรพคุณของไพลที่แก้ฟกช้ำและแก้เคล็ดบวมและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบอีกด้วยจึงเหมาะสมที่จะนำสูตรนี้มาพัฒนาเป็นตำรับครีม เพื่อใช้ทาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย

จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง แต่พบรายงานวิจัยของสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ ได้แก่ ฤทธิ์การต้านการอักเสบในเถาวัลย์เปรียงโดยมีสาร genistein 7-O-α -rhamnosyl (1→6) β – glucopyranoside เป็นสารสำคัญ สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีมากในเหง้าไพลคือ สาร Compound D หรือ (E)-4-(3,4- dimethoxyphenyl) but-3-en-l-ol และ DMPBD หรือ (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene ส่วนในขันทองพยาบาทคือ helioscopinolide A เป็นต้น ซึ่งจากผลการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสมุนไพรเดี่ยวในตำรับที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบข้างต้น จึงได้วิเคราะห์ตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงซึ่งในบัญชียาจากสมุนไพรตามบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ.2561 ได้กำหนดสูตรตำรับออกเป็น 2 สูตร โดยสูตรที่ 2 จะมีปริมาณไพลเป็น 2 เท่า ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้

เลือกสูตรที่ 2 มาใช้ในการพัฒนาตำรับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณสารบ่งชี้ในสารสกัด พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีปริมาณสาร compound D เท่ากับ 18.893±0.236 mg/g สารสกัด (ร้อยละ 1.889±0.236) ซึ่งมากกว่าตำรับยาที่สกัดด้วย 50% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียง และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบที่พบว่าสารสกัดด้วย 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด จึงวิเคราะห์ได้ว่าสารบ่งชี้หลักในสารสกัดตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงคือ compound D จากไพล

การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวทำละลาย 50% และ 95% เอทานอล ซึ่งสอดคล้องกับการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสาร genistein, genistein 7-O-α -rhamnosyl-(1→6)-β –glucopyranoside ด้วยวิธี soxhlet extration (ประไพ และคณะ, 2556) นิยมใช้สกัดได้แก่ เอทานอล เมทานอล และน้ำ และจากการศึกษาเรื่องการสกัดและวิเคราะห์สารสำคัญออกฤทธิ์ในเถาวัลย์เปรียง (วทันยา, 2563) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพร (Intouch, 2014) พบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลของไพล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.33 µg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งไนตริก ออกไซด์ค่อนข้างดี ด้วยข้อมูลสนับสนุนข้างต้น จึงเลือกใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายสำหรับเตรียมสารสกัดในการพัฒนาครีมตำรับสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงครั้งนี้ และการใช้เอทานอลในการสกัดทำให้เกิดสารตกค้างน้อยและมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้เมทานอล

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงได้ระบุสารบ่งชี้ (chemical maker) ของตำรับคือ สาร compound D ที่พบในไพล โดยเลือกจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ (active compound) ที่สอดคล้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคือ ฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีจากไพล (Kaewchoothong, 2009) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดด้วย 95% เอทานอลมีปริมาณสาร compound D คิดเป็นร้อยละ 1.889±0.236 ของสารสกัดในตำรับ ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าตำรับที่สกัดด้วย 50% เอทานอล จากการศึกษาการเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไพลสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย (ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา, 2012) พบว่าไพลมีหลายสาย พันธุ์ที่พบได้ในแต่ละภูมิภาค มีความแตกต่างกันมากกว่า 30 สายพันธุ์ โดยนำผงไพลมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ด้วยวิธี sonication ซึ่งพบสารสำคัญในไพลคือ สาร compound D มีปริมาณสารคิดเป็นระหว่างร้อยละ 0.25 ถึง 0.92 แต่ด้วยความแตกต่างกันของวิธีการสกัดและตัวทำละลายทำให้ได้ปริมาณสารที่แตกต่างกัน เพราะฉะนั้นจากการวิเคราะห์ปริมาณสารบ่งชี้คือ สาร compound D ในตำรับสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงครั้งนี้พบว่ามีปริมาณมากกว่าการศึกษาของ ดร.ประสาน และคณะ ดังนั้น ตำรับสารสกัดด้วย 95% เอทานอลจึงมีปริมาณสารบ่งชี้ที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดของตำรับโดยใช้เซลล์ RAW 264.7 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาให้เซลล์สัมผัสกับ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้ง nitric oxide และ prostagrandin E_2 เป็นต้น ดังนั้นการยับยั้งการผลิต nitric oxide จึงถูกใช้เป็นดัชนีที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบ ผลการศึกษาพบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบเบื้องต้นพบว่าค่า % inhibition of NO production ของสารสกัด 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ที่ดีกว่าสารสกัด 50% เอทานอล จึงนำมาทดสอบหาค่า IC_{50} พบว่า สารสกัด 95% เอทานอลของยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL โดยการศึกษาครั้งนี้ได้นำสารมาตรฐาน genistein เป็นสารที่พบในเถาวัลย์เปรียงมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่าสาร genistein มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.48±2.34 µg/mL โดยสารตัวอย่างทั้งสองที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (% cell viability > 70) ซึ่งจากการศึกษา ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ genistein (Mari, 2007) พบว่า genistein เป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีกลไกการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ ส่งผลให้การสร้างไนตริกออกไซด์ลดลง แต่การศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้นำสารมาตรฐานที่เป็น positive control มาทดสอบร่วมด้วย ยกตัวอย่างเช่น diclofenac, indomethacin, aspirin เป็นต้น หากจะเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิด (สารสกัด 95% เอทานอล และ genistein) กับสาร positive control เช่น indomethacin เมื่อพิจารณาจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ฤทธิ์การต้านการอักเสบของตำรับยาประสะเปราะใหญ่ โดยใช้ indomethacin ซึ่งเป็น positive control ในเซลล์ RAW 264.7 ค่า IC_{50} เท่ากับ 8.95 µg/mL (ศุณิตา, 2555) ซึ่งค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดพบว่ามีค่า IC_{50} สูงกว่าเมื่อเทียบกับ indomethacin

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทยของตำรับที่มีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเดี่ยวในตำรับ เช่น สาร compound D จากเหง้าไพล (Kaewchoothong, 2009) ทดสอบการยับยั้ง NO ในเซลล์ macrophage มีค่า IC_{50} เท่ากับ 211.1 µM และจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเถาวัลย์เปรียงด้วย 50% เอทานอล (ประไพ, 2556) พบสาร genistein 7-O-α –rhamnosyl-(1→6) β –glucopyranoside ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-1 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.0 µg/mL และจากนั้นมีการศึกษาทางคลินิกเกี่ยวกับประสิทธิผลและผลข้างเคียงของสารสกัดเถาวัลย์เปรียบเปรียบเทียบกับยามาตรฐานไดโคลฟีแนค (diclofenac) ในการรักษาผู้ป่วยอาการปวดหลังส่วนล่างสารสกัดเถาวัลย์เปรียงที่ให้รับประทานในขนาดวันละ 600 มิลลิกรัม นาน 7 วัน สามารถลดอาการปวดหลังส่วนล่างได้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาไดโคลฟีแนค ขนาดวันละ 75 มิลลิกรัม (ยุทธพงษ์ ศรีมงคล และคณะ, 2550)

ส่วนสาร helioscopinolide A จากแก่นขันทองพยาบาทมีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้สูงที่สุดที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 9.1 µM ตามด้วย helioscopinolide C และ suremulol D มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.5 และ 29.3 µM ตามลำดับ (Tewtrakul et al., 2011) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าการใช้สารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงซึ่งมีส่วนประกอบของสมุนไพรเดี่ยว 3 ชนิดในตำรับที่ออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้สอดคล้องกับทฤษฎีการพิจารณาสยาและสรรพคุณยาทางแพทย์แผนไทย คือพิจารณาสรรพคุณรวมของตำรับคือ รสเฝื่อนเอียนจากเถาวัลย์เปรียง และรสร้อนจากเหง้าไพลช่วยกระจายวาตะที่กำเริบ ขับลม กระจายเลือดไปยังทั่วร่างกาย ทำให้เลือดจึงไหลเวียนได้ดีขึ้น รักษาอาการเคล็ดขัดยอก ฟกช้ำบวม ส่วนรสเฝื่อนเมาจากแก่นขันทองพยาบาทและแก่นมะดูกช่วยในการขับน้ำเหลืองเสีย ลดความร้อนที่เกิดจากการอักเสบ สรรพคุณรวมของตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียง จะมีรสร้อน เมาเบื่อ จะช่วยในการลดอาการปวดกล้ามเนื้อ ลดความร้อนจากความปวดที่ทำให้เกิดการอักเสบ ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวยาตำรับนี้จึงมีสรรพคุณที่ครอบคลุมการรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อได้มากกว่ายาเดี่ยวเพียงตัวเดียว แต่ทั้งนี้ในควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเสริมฤทธิ์กันของยาในตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย

การพัฒนาตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีและสอดคล้องกับปริมาณสารสำคัญซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่เหมาะสมที่สุดจึงเลือก สารสกัดด้วย 95% เอทานอลที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL และไม่มีพิษต่อเซลล์ ที่มีปริมาณสารบ่งชี้ในตำรับ ได้แก่ สาร compound D เท่ากับ 1.889±0.236 mg/g สารสกัด การพัฒนาตำรับครีมโดยใส่สารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย 95% เอทานอล เป็น active ingredient คิดเป็นร้อยละ 0.1 ของตำรับ (2 เท่าของค่า IC_{50}) ผลการประเมินความคงตัวหลังเตรียมตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องพบว่า ครีมมีเนื้อครีมเนียนละเอียด สีเหลืองนวล มีความหนืดพอเหมาะ ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.97±0.02 และค่าความหนืด 52696.67±15.28 cP และความคงตัวหลังจากผ่านกระบวนการ heating – cooling cycle พบว่าเนื้อครีมเนียนยังละเอียด แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย กลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง มีความหนืดลดลง ไม่แยกชั้น กระจายบนผิวหนังได้ดี มีค่า pH 5.62±0.02 และค่าความหนืด 50033.33±20.82 cP การประเมินความคงตัวที่สภาวะหลังเตรียมตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงเสร็จทันทีที่อุณหภูมิห้องเปรียบเทียบกันกับสภาวะหลังจากผ่านกระบวนการ heating – cooling cycle พบว่าค่าความหนืดและค่า pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งอาจเกิดจากในสภาวะเร่งที่ใช้ทดสอบความคงตัวอาจทำให้สารบางตัวในตำรับเปลี่ยนแปลงทำให้มีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของตำรับมีค่าลดลง ซึ่งจากการทบทวนวรรณกรรม เรื่อง การพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงสำหรับใช้ภายนอก (จิราวรรณ์, 2563) พบว่าตำรับเจล จากสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีค่า pH ประมาณเท่ากับ 4.16 - 4.55 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้การที่ค่า pH

ของตำรับเป็นกรดมากขึ้น อาจจะเกิดจากในขณะการพัฒนาตำรับครีม เมื่อโปรย carbopol 940 แล้วตีให้เข้ากันกับน้ำ จากนั้นเติม Triethanolamine ทำให้เกิดการก่อเจล เจลจะพองตัวเต็มที่ ค่า pH ประมาณเท่ากับ 6.5 แต่เมื่อใส่สารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงลงไปแล้วทำให้ pH ที่ได้เปลี่ยนไป เนื่องจากสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงมีค่า pH อยู่ในช่วงประมาณ 5.5-6.5 (กรดอ่อน) ส่งผลทำให้ค่า pH ของตำรับลดลงและเมื่อผ่านสภาวะเร่ง อาจส่งผลให้ pH ของตำรับลดลงอีก และอาจส่งผลให้ค่าความหนืดลดลงด้วย ประกอบกับในขณะที่เตรียมครีมอากาศค่อนข้างร้อน อาจส่งผลต่อความคงตัวของครีมได้ แต่อย่างไรก็ตามค่า pH ที่เหมาะสมกับผิวหนังมนุษย์ต้องมีค่าใกล้เคียง 5.5 (Ananthapadmanabhan, 2019) ซึ่งจากค่า pH ของตำรับครีมยาผสมเถาวัลย์เปรียงในขณะที่เตรียมครีมเสร็จและหลังจากที่ผ่านสภาวะเร่งแล้ว ก็ยังมีค่าใกล้เคียงกับ pH ที่เหมาะสมกับผิวหนังมนุษย์

การพัฒนาตำรับครีมได้ใส่สารสกัดด้วย 95% เอทานอล เป็น active ingredient คำนวณจากฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยให้ใส่ความเข้มข้น 2 เท่าของค่า IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL คิดเป็น 80.16 µg/mL เมื่อคิดเป็นร้อยละ 0.008 ของตำรับ ซึ่งในการพัฒนาตำรับครีมได้ใส่สารสกัดจากตำรับยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย 95% เอทานอล เป็น active ingredient ร้อยละ 0.1 ของตำรับ (คิดเป็นปริมาณ 1 mg ต่อน้ำหนักครีม 1 g) ถึงแม้ว่าในตำรับจะใส่ active ingredient ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 2 เท่าของค่า IC_{50} จริงแต่เป็นค่าของฤทธิ์การต้านการอักเสบที่ได้จากการทดลองในเซลล์ จึงควรมีการทดสอบทางคลินิกเพิ่มเติม เช่น การซึมผ่านโดยใช้เครื่อง Franz diffusion cells การทดสอบการระคายเคือง การประเมินความพึงพอใจ การประเมินประสิทธิภาพในการลดอาการปวด เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาการพัฒนาครีมนวดเท้าจากน้ำมันไพลสำหรับผู้ป่วยโรคเส้นประสาทเบาหวานเพื่อวัดผลลัพธ์ทางคลินิกในการบรรเทาอาการชาและปวดที่เท้า (ณัทญา ตัณฑนะเทวินทร์, 2011) พบว่าในการพัฒนาตำรับใส่น้ำมันไพลซึ่งเป็น active ingredient ในปริมาณร้อยละ 1 ของตำรับ ซึ่งมีการทดสอบทางคลินิกพบว่าตำรับครีมที่ได้มีความสามารถในการบรรเทาอาการชาและปวดที่เท้าได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ใส่ active ingredient ปริมาณน้อยเนื่องจากสีของสารสกัดเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผู้วิจัยได้ทำการทดลองใส่สารสกัดปริมาณร้อยละ 1 แล้ว พบว่าสีของตำรับครีมที่ได้เป็นสีน้ำตาล ดูไม่น่าใช้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงใส่สารสกัดปริมาณร้อยละ 0.1 ของตำรับ จึงได้ตำรับครีมสีเหลืองนวล แต่เพื่อเพิ่มความมั่นใจในประสิทธิภาพของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงเพื่อลดการอักเสบและบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ โดยควรพิจารณาใส่ active ingredient เพิ่มร้อยละ 1-2 ของตำรับ ทั้งนี้ควรมีการทดสอบการคงตัวของตำรับควบคู่ไปด้วย

สรุปการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงจากสารสกัดด้วย 95% เอทานอลที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่เหมาะสม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 40.08±2.78 µg/mL และไม่มีพิษต่อเซลล์ นอกจากนั้นยังมีการควบคุมคุณภาพของตำรับด้วยสารบ่งชี้ที่สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากผลการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลสนับสนุนการนำตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงไปศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อต่อไป

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบเพิ่มเติมในวิธีที่แตกต่างกันเพื่อเป็นการยืนยันผลทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

5.3.2 วิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์อื่นๆ ในตำรับเพิ่มเติม เช่น genistein 7-O-α -rhamnosyl (1➔6) β –glucopyranoside จากเถาวัลย์เปรียง, สาร DMPBD จากไพล เป็นต้น

5.3.3 การศึกษาประเมินคุณภาพของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องความคงตัวทางเคมี การทดสอบความพึงพอใจ การระคายเคือง เป็นต้น

5.3.4 ควรศึกษาเพื่อยืนยันศึกษาประสิทธิผลทางคลินิกของตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงเพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อต่อไป

5.3.5 ควรศึกษาเพื่อยืนยันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างยาในตำรับครีมสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข, ก. (2546). ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยา ของสถาบันวิจัยสมุนไพร. *ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยา* (1st ed.). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา.

กลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ, ก. (2543). คู่มือการปลูกพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ / กลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร. *คู่มือการปลูกพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ / กลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร* (2nd ed.). กรุงเทพฯ: กลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร.

คณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ. (2561). บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561. *บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2561* (p. 256). กรุงเทพฯ.

จิราพร อื้อเทียน. (2546). *Factors related to low back pain prevention among home-based seamstresses*. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชยันต์ พิเชียรสุนทรและคณะ. (2547). Semi-solid Preparation. *คณาเภสัช*. กรุงเทพ: อมรินทร์.

ณัทญา ตัณฑนะเทวินทร์. (2011). *การพัฒนาครีมนวดเท้าจากน้ำมันไพลสำหรับผู้ป่วยโรคเส้นประสาทเหตุเบาหวานเพื่อวัดผลลัพธ์ทางคลินิกในการบรรเทาอาการชาและปวดที่เท้า*. Mahasarakham University.

ดร.นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ. (2547). ขันทองพยาบาท (Khan Thong Phayabat). *หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1* (p. 61). กรุงเทพฯ.

ดร.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา. (2012). *การเปรียบเทียบทางพฤกษเคมี และการหาปริมาณสารสำคัญในไพลสายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย*.

เที่ยงบูรณธรรม., ว. (2542). เถาวัลย์เปรียง. *หนังสือพจนานุกรมสมุนไพรไทย* (5th ed., pp. 349–350). กรุงเทพฯ.

นันทวัน บุณยะประภัศร, (2542). ไพล. *สมุนไพร : ไม้พื้นบ้าน เล่ม 3*. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด.

นิจศิริ เรืองรังษี และคณะ. (2547). เถาวัลย์เปรียง (Thao Wan Priang). *หนังสือสมุนไพรไทย เล่ม 1* (p. 139). กรุงเทพฯ: บี เฮลตี้.

ประไพ วงศ์สินคงมั่น และคณะ. (2556). องค์ประกองทางเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ของสารสกัดเถาวัลย์เปรียง. *วารสารการแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือก*, *11*(3), 267–279.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. (2540). ครีม. *อิมัลชั่นทางเครื่องสำอาง*. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. (2549). มะดูก. *หนังสือสมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคเหนือ.* (p. 152).

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ และคณะ. (2549). ขันทองพยาบาท. *หนังสือสมุนไพรในอุทยานแห่งชาติภาคกลาง* (p. 77). นนทบุรี: ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย.

แม้น อมรสิทธิ์และคณะ. (2555). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ* (2nd ed., pp. 397–405, 430–431, 435). กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.

ยุทธพงษ์ ศรีมงคล และคณะ. (2550). การเปรียบเทียบสรรพคุณของสารสกัดเถาวัลย์เปรียงกับไดโคลฟีแนคเป็นยาบรรเทาอาการปวดหลังส่วนล่าง. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*, *5*(1), 17–23.

รัตติมา จีนาพงษา. (2537). *ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัด DMPBD จากไพล*. มหาวิทยาลัยมหิดล.

วทันยา ประเสริฐรุ่งเรือง. (2563). *การสกัดและการวิเคราะห์สารสำคัญออกฤทธิ์ในเถาวัลย์เปรียง*. Mahasarakham University.

วศพล ฉัตรเกตุ และคณะ. (2016). ฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของเหง้าว่านเปรี้ยว. *RSU National Research Conference 2016*.

วารุณี หาญพิทักษ์พงศ์. (2542). *การศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของไพลเจล*. มหาวิทยาลัยมหิดล.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542a). ขันทองพยาบาท. *หนังสือพจนานุกรมสมุนไพรไทย* (5th ed., pp. 101–102). กรุงเทพฯ: รวมสาส์น.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542b). มะดูก. *หนังสือพจนานุกรมสมุนไพรไทย* (5th ed., pp. 612–613).

วิระพล ภิมาลย์, และคณะ (2558). การทบทวนวรรณกรรมอย่างเป็นระบบและการวิเคราะห์อภิมานประสิทธิภาพในการลดอาการปวดของเถาวัลย์เปรียง. *วารสารเภสัชกรรมไทย*, *7*(1), 54–62.

วิรุฬห์ เหล่าภัทรเกษม และคณะ. (1993). ความสัมฤทธิ์ผล ของครีมสมุนไพรไพล (ไพลจีซาล) ในการรักษาข้อเท้าแพลง. *Srinagarind Med. J*, *8*(3), 159–164.

ศุณิตา มากชูชิต และ อรุณพร อิฐรัตน์. (2555). ฤทธิ์ต้านการแพ้และต้านการอักเสบของตำรับยาประสะเปราะใหญ่. *การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. (2551). ไพล. ข้อมูลมาตรฐานสมุนไพร (THP).

สมาคมการศึกษาเรื่องความปวดแห่งประเทศไทย. (2552). แนวทางเวชปฏิบัติกลุ่มอาการปวดเรื้อรังระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ Myofascial Pain Syndrome Fibromyalgia. (pp. 1–12). กรุงเทพฯ: บริษัท อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พลับติ้ง จำกัด (มหาชน).

สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์

พืช. (2559). *สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ) เฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ทรงเจริญพระชนมายุ 60 พรรษา*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

อัจฉริยวงศ์เมธี, จ., & ศรีมงคล, ร. (2563). *การพัฒนาตำรับเจลจากยาผสมเถาวัลย์เปรียงสำหรับใช้ภายนอก (Development of gel preparation from the mixtures of Derris scandens extract as an analgesic topical drug)*. Mahasarakham University.

Ananthapadmanabhan KP, Moore DJ, Subramanyan K, et al. (2019). Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing.

Cheenpracha S. (2006). Potential anti-allergic ent-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. *Phytochemistry*, *67*, 2630–2634.

Department of Medical Sciences, M. of P. H. (2018). *Thai herbal pharmacopoeia 2018*.

Han A.R., Min H.Y. and T. W. (2004). A new cytotoxic phenylbutenoid dimmer from rhizomes of *Zingiber cassumunar*. *Planta Med.*, *70*(11), 1095-1097.

Intouch Sakpakdeejaroen, Sunita Makchuchit, A. I. (2014). Nitric oxide inhibitory activity of herbal extract formulae for anti-inflammation. *Thammasat Medical Journal*, *14*(1).

Jitoe A, M. T. and M. T. (1994). Novel antioxidants, cassumumarin A, B and C from *Zingiber cassumunar*. *Tetrahedron*, *35*(7), 981–984.

Kaewchoothong, A. (2009). *Preparation and quality control of Zingiber cassumunar extract with high-yielded anti-inflammatory active compounds.*

Kaweetripob. (2013). Lupane, friedelane, oleanane, and ursane triterpenes from the stem of *Siphonodon celastrineus* Griff. *Phytochemistry*, *96*, 404–417. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.027

Kaweetripob. (2016). Polyoxygenated ursane and oleanane triterpenes from *Siphonodon celastrineus*. *Phytochemistry*, *129*, 58–67. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.07.006

Laupattarakasem P. (2003). An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacology*, *85*, 207–215.

Mari Hamalainen, Riina Nieminen, Pia Vuorela, M. H. and E. M. (2007). Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein Inhibit

STAT-1 and NF-KB Activations, Whereas Flavone, Isorhamnetin, Naringenin, and Pelargonidin Inhibit only NF-KB Activation along with Their Inhibitory Effect on i. *Mediators of Inflammation*.

Ozaki Y. (1991). Anti-inflammatory effect of *Zingiber cassumunar* Roxb and its active principles. *Chem Pharm Bull*, *39*(9), 2353–2356.

Rao. (1994). Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry*, *37*(1), 267–269. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85038-0

Sciences., D. of M. (1998). Thai Herbal Pharmacopoeia. In *Thai Herbal Pharmacopoeia* (p. 140). Nontahburi: Ministry of Public Health.

Sekine M.I. (1999). Six diprenylisoflavones, derrisisoflavones A-F, from *Derris scandens*. *Phytochemistry*, *52*(1), 87–94. Retrieved from https://eurekamag.com/research/003/273/003273316.php

Sriwanthana B, C. P. (2001). In vitro effect of *Derris scandens* on normal lymphocyte proliferation and its activities on natural killer cells in normals and HIV-1 infected patients. *J Ethnopharmacology*, *76*, 125–129.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Cheenpracha, S., Yodsaoue, O., Ponglimanont, C., & Karalai, C. (2011). Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E_2 releases. *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(1), 63–66. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.09.003

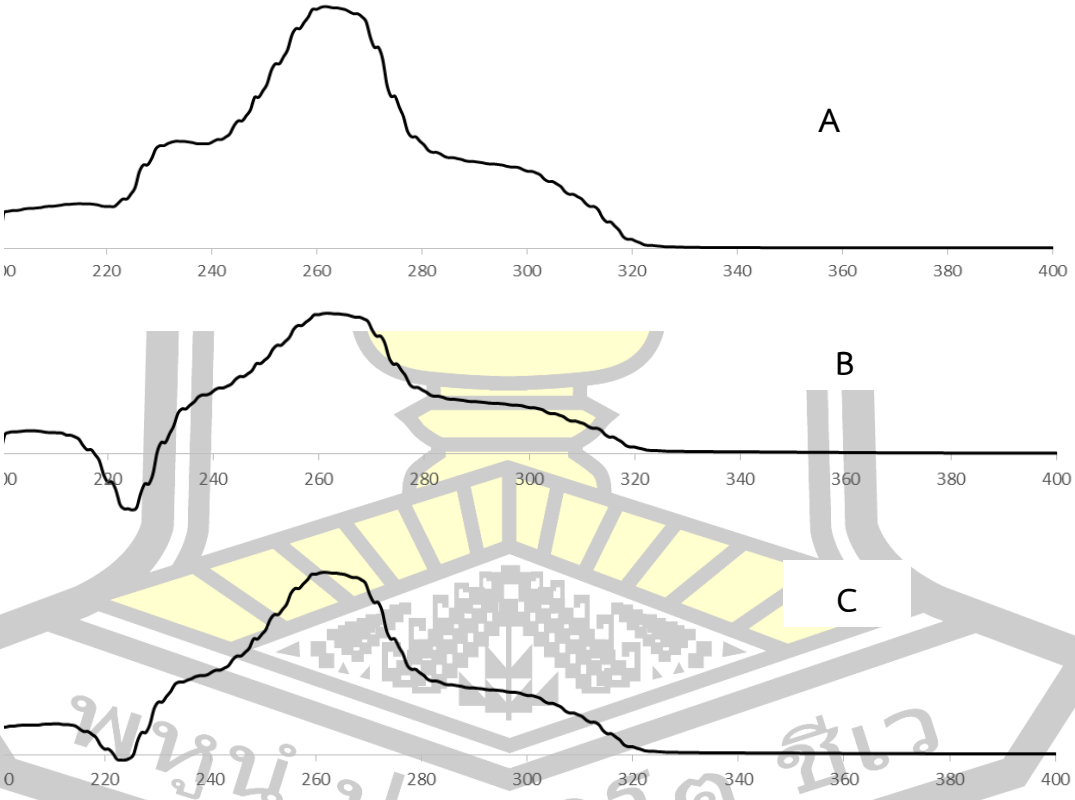
Tewtrakul S. (2011). Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E_2 releases. *J Ethnopharmacology*, *133*, 63–66.

พหุน ปณ ฑิโต ชีเว

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารมาตรฐาน compound D ในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ compound D ในเถาวัลย์เปรียง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ acetonitrile และ 1 % acetic acid อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร พบว่า peak ของสาร compound D มี retention time ประมาณ 22.35 นาที และเมื่อพิจารณา retention time ของแต่ละ peak ที่ปรากฏบนโครมาโตแกรมของสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง จะพบว่า peak คาดว่าจะเป็น compound D มี retention time ประมาณ 22.35 นาที จากนั้น พิจารณาลักษณะสเปกตรัมของสารดังกล่าว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานพบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่จุดเดียวกันคือ 260 นาโนเมตร ได้ลักษณะสเปกตรัม ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพประกอบภาคผนวกที่ 1



ภาพประกอบภาคผนวกที่ 1 แสดงลักษณะการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารมาตรฐานcompound D (A) เปรียบเทียบกับสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียงด้วย 50 % (B) และ 95 % เอทานอล (C)

ภาคผนวกที่ 2 ตารางแสดงการวิเคราะห์หาปริมาณสาร compound D ในสารสกัดยาผสมเถาวัลย์เปรียง

ตัวอย่าง Conc. 1 mg/ml	peak area 1	peak area 2	peak area 3	peak area mean	คำนวณปริมาณสารจากสมการ y = 39311x - 4696.8	ปริมาณสาร com D (มิลลิกรัม) จากสารตัวอย่าง 1 กรัม	(% w/w, mean±S.D.)
50% EtOH	773,987	762,448	750,357	762,264	19.510	13.160±0.230	1.316±0.023
95% EtOH	1,201,792	1,174,027	1,197,515	1,191,111	30.419	18.893±0.236	1.889±0.024

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวอรพรรณ อาญาเมือง
วันเกิด	วันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดบุรีรัมย์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 109 หมู่ 16 ตำบลสวายจีก อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31000
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	แพทย์แผนไทยปฏิบัติการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงพยาบาลบุรีรัมย์ เลขที่ 1 ตำบลในเมือง อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ รหัสไปรษณีย์ 31000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2546 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม จังหวัดบุรีรัมย์ พ.ศ. 2551 ปริญญาแพทย์แผนไทยประยุกต์บัณฑิต สาขาวิชาแพทย์แผนไทยประยุกต์ มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2563 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนิสิตบัณฑิตศึกษา คณะเภสัชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2562

พหูน ปณฺฑิโต ชีเว