

การพัฒนาอีเมลเจลกระท่อมและฤทธิ์ยับยั้ง
การผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

พิชาพัชร ฐิตินอภิมพงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการแพทย์แผนไทยดุขฎฐิบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

THE DEVELOPMENT OF KRATOM EMULGEL AND PRODUCTION INHIBITION OF INFLAMMATORY MEDIATORS

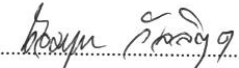
PICHAPAT THITITANAAPIPONG

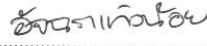
A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements
for Doctor of Thai Traditional Medicine
Program in Thai Traditional Pharmacy
Academic Year 2025
Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาอิมัลเจลกระท่อมเพื่อใช้บรรเทาอาการอักเสบและปวด

ชื่อนักศึกษา นางสาวพิชาพัชร ฐิติธนนภิกษณ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..........ประธานกรรมการที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.อ้อมบุญ วัลลิสิต)

..........กรรมการที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

..........กรรมการที่ปรึกษา
(ดร.จันทนา ยะหัวผาย)

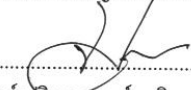
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาการแพทย์แผนไทยดุขฎีบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

..........คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล สารวงศ์)

..........อธิการบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คณกร สว่างเจริญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..........ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภญ.ปองทิพย์ สิตธิสาร)

..........กรรมการ
(ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญญาพงษ์ เจริญทรัพย์)

..........กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไฉน น้อยแสง)

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาอิมัลเจลกระท่อมและฤทธิ์ยับยั้งการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
ชื่อผู้วิจัย	พิชาพัชร ฐิติธนนภิกษณ์
สาขาวิชา	เภสัชกรรมไทย
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อัมมบุญ วลิสุต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.จันทนา ยะหัวฝาย
ปีการศึกษา	2568

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองที่ครอบคลุมหลายด้านได้แก่ ด้านเคมี ด้านชีวภาพและด้านผลิตภัณฑ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม 2) พัฒนาระบบที่แอลซีเพื่อการตรวจสอบด้านคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่องรังคเลขฉิวบางสมรรถนะสูง (HPTLC) 3) พัฒนาวิธีแยกมีทราไจนีนจากสารสกัดกระท่อม 4) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 5) ศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบโดยวัดการยับยั้งการผลิตสารสื่อการอักเสบของสารสกัดกระท่อม 6) พัฒนารับผลิตภัณฑ์อิมัลเจลที่มีสารสกัดกระท่อม 7) ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของอิมัลเจลกระท่อม

ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 285.50 ± 1.67 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 358.97 ± 0.98 มิลลิกรัม เควอซิทินสมมูลต่อกรัมสารสกัดสูงกว่ารายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ระบบที่แอลซีใหม่ที่ปรับความเป็นต่างของคลอโรฟอร์มในเฟสเคลื่อนที่ด้วย 0.2 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำมาผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 99 : 5 มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์มีทราไจนีนทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ได้วิธีการแยกสารมีทราไจนีนด้วยการผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียว โดยใช้ตัวอย่างที่จะนำมาแยกเป็นสารสกัดด้วยเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ ปรับสมรรถนะของเฟสคงที่ และใช้ระบบเฟสเคลื่อนที่ใหม่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์ม 95 มิลลิลิตร ต่อ 5 มิลลิลิตรของเมทานอลที่มี 0.1 นอร์มอลโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเก็บมีทราไจนีนที่แยกได้ในรูปเกล็ดฟอกเครตนำไปยืนยันโครงสร้างด้วย NMR, IR และ MS สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อมด้วยวิธี DPPH assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมด้วยวิธี ABTS⁺ assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.762 ± 0.33 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด และด้วยวิธี FRAP assay มีค่าเท่ากับ 5211.44 ± 9.366 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (LPS) พบว่าสารมาตรฐานมีทราไจนีนในความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 76.02 เปอร์เซ็นต์

อินเตอร์ลิวคิน 6 ได้ 28.70 เปอร์เซ็นต์ และพรอสตาแกลนดินอี 2 ได้ 6.62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ สารสกัดใบกระท่อมในความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ ได้ 79.16 เปอร์เซ็นต์ และ IL-6 ได้ 35.64 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบการผลิตสารสื่อ การอักเสบในเซลล์มาโครฟาจที่ได้รับสาร LPS เพียงอย่างเดียวโดยสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์แรงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำสารสกัด กระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ไปพัฒนาเป็นอิมัลเจล โดยได้อัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างสามองค์ประกอบในการเกิดไมโครอิมัลชันคือ วัฏภาคน้ำมันต่อ ส่วนผสมสารลดแรงตึงผิว และน้ำ เท่ากับ 6:2:2 ใส่สารสกัดกระท่อมร้อยละ 1 และสารก่อเจลร้อยละ 7.41 ได้ต้นแบบอิมัลเจล ที่มีความเสถียรมีอายุการเก็บรักษาได้สองปี

คำสำคัญ: กระท่อม ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ รงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง อิมัลเจล

Title	The development of Kratom emulgel and production inhibition of inflammatory mediators
Author	Pichapat Thititanaapipong
Program	Thai Traditional Pharmacy
Major Advisor	Associate Professor Dr.Omboon Vallisuta
Co-advisor	Assistant Professor Dr.Atchara Kaewnoi
Co-advisor	Dr.Jantana Yahuafai
Academic Year	2025

ABSTRACT

This study is an experimental research project encompassing chemical, biological, and product development aspects. Its objectives were to: 1. determine the total phenolic content and total flavonoid content; 2. develop a TLC system for qualitative and quantitative analysis using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC); 3. develop a method for isolating mitragynine from kratom extract; 4. investigate the antioxidant activity; 5. evaluate the anti-inflammatory activity by measuring the inhibition of inflammatory mediators produced from kratom extracts; 6. formulate an emulgel containing kratom extract; and 7. assess the physical stability of the kratom emulgel.

The results showed that the 95% ethanol kratom extract exhibited a total phenolic content of 285.50 ± 1.67 mg gallic acid equivalent per gram of extract and a total flavonoid content of 358.97 ± 0.98 mg quercetin equivalent per gram of extract, which were higher than previously reported values. A new TLC system was developed by alkalinizing chloroform in the mobile phase with 0.2 N sodium hydroxide, followed by mixing with methanol at a ratio of 99:5, which was suitable for both qualitative and quantitative analysis of mitragynine. A one-step column chromatography method was successfully established for isolating mitragynine by using 40% ethanolic extract as the loading sample, optimizing the stationary phase performance, and applying a new mobile phase consisting of 95 mL chloroform and 5 mL methanol containing 0.1 N sodium hydroxide. The isolated mitragynine was collected as picrate salt and confirmed by NMR, IR, and MS analyses. For antioxidant activity, the kratom extract demonstrated an IC_{50} of 7.39 ± 0.49 μ g/ μ L in the DPPH assay, an IC_{50} equivalent to 17.762 ± 0.33 mg ascorbic acid equivalent per gram extract in the ABTS^{•+} assay, and a FRAP value of 5211.44 ± 9.366 mM Fe²⁺ equivalent per gram extract, consistent with

its high phenolic and flavonoid contents. The anti-inflammatory activity was evaluated in Raw 264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). At a concentration of 80 µg/mL, the mitragynine standard reduced the production of nitric oxide by 76.02 %, interleukin-6 (IL-6) by 28.70 %, and prostaglandin E₂ (PGE₂) by 6.62 %. In contrast, the kratom leaf extract at 200 µg/mL significantly reduced nitric oxide production by 79.16 % and IL-6 by 35.64 % compared with macrophages treated with LPS alone. The extract obtained using 95% ethanol exhibited stronger anti-inflammatory activity than the 40 % ethanolic extract. Therefore, the 95% ethanolic extract was selected for emulgel development. The optimal microemulsion system consisted of an oil phase, surfactant mixture, and aqueous phase in a ratio of 6:2:2, incorporating 1 % kratom extract and 7.41 % gelling agent, resulting in a stable emulgel prototype with a shelf life of two years.

Keywords: Mitragyna Speciosa, Antioxidant, Anti-Inflammatory, HPTLC, Emulgel

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จากการได้รับความเมตตา ช่วยเหลือ และการเอาใจใส่ อย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.อ้อมบุญ วัลลิสุต อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรา แก้วน้อย ดร.จันทนา ยะหัวฝาย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่าน ที่ช่วยให้คำชี้แนะ แก้ไขข้อบกพร่องอันทรงคุณค่า ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภญ.อรภา สกุลพาณิชย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และความอนุเคราะห์ การใช้เครื่องรณรงค์เลขฉิวบางสมรรถนะสูง ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภก.ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภก.อินทัช ศักดิ์ภักดีเจริญ ที่ให้ความกรุณา แนะนำเรื่องการทำไมโครอิมัลชัน ขอขอบคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาใช้เวลาอันมีค่า เพื่อทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ หน่วยงานและห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาควิชา การแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต งานวิจัยคลินิกและนวัตกรรม กลุ่มงานวิจัยและประเมินเทคโนโลยี สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่เอื้อเพื่อ สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ตลอดจนบุคลากรที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการ ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูล จนทำให้งานวิจัยสำเร็จสมบูรณ์

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ทุกคนในครอบครัว เพื่อนร่วมงาน เพื่อนร่วมหลักสูตร เพื่อนต่างมหาวิทยาลัยทุกท่าน สำหรับมิตรภาพที่ดี รวมถึงการสนับสนุนในทุก ๆ ด้านตลอดช่วงระยะเวลาที่ได้ศึกษาภายในรั้วของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาแห่งนี้

พิชาพัชร จูติธนอภิพงษ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
คำถามการวิจัย.....	2
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	3
สมมติฐานการวิจัย.....	3
ขอบเขตการศึกษา.....	3
คำจำกัดความในการศึกษา.....	4
กรอบแนวคิดในการศึกษา.....	5
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
พืชกระท่อม.....	6
การสกัดอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม.....	11
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา.....	12
การอักเสบ (Inflammation).....	14
ระบบนำส่งยาใหม่ ไมโครอิมัลชัน และอิมัลเจล.....	16
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
บทสรุป.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.....	21
สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.....	22
เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ.....	23
การตรวจสอบตามข้อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (THP).....	23
การศึกษาด้านเคมี.....	29
การศึกษาด้านชีวภาพ.....	36
การศึกษาด้านผลิตภัณฑ์.....	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	45
การตรวจสอบวัตถุดิบตามข้อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (THP).....	45
ผลการศึกษาด้านเคมี.....	50
การศึกษาด้านชีวภาพ.....	70
ผลการศึกษาด้านผลิตภัณฑ์.....	78
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	86
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	86
ข้อเสนอแนะ.....	105
บรรณานุกรม.....	107
ภาคผนวก.....	118
ภาคผนวก ก การเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7.....	119
ภาคผนวก ข การสกัดมึนทราจินด้วยวิธีการคอลัมน์โครมาโตกราฟี.....	121
ภาคผนวก ค สำเนาประกาศนียบัตรภาษาอังกฤษ ผลการสอบ/CEFR.....	124
ภาคผนวก ง มาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia 2021.....	126
ภาคผนวก จ แบบตอบรับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ.....	131
ประวัติผู้วิจัย.....	135

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง..... 6
2.2	ตัวอย่างโครงสร้าง alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม..... 9
2.3	กลไกของการอักเสบ..... 14
2.4	ตัวอย่างแผนภาพวิทยาศาสตร์ภาคเตรียมของไมโครอิมัลชันที่มีองค์ประกอบ สี่ชนิด..... 17
3.1	แสดงการแยกมิทราไจนีนจากสารสกัดใบกระท่อมด้วย 40 % เอทานอล..... 33
3.2	แผนภาพวิทยาศาสตร์ภาคเตรียมของไมโครอิมัลชัน..... 42
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง ของสารมาตรฐาน Gallic acid..... 51
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง ของสารมาตรฐาน Quercetin..... 52
4.3	ค่า R _f ของมิทราไจนีนและสารสกัด 40 % EtOH ภายใต้แสง UV 254 นาโนเมตร..... 53
4.4	ค่า R _f ของมิทราไจนีนและสารสกัด 40 % EtOH ภายใต้แสง UV 366 นาโนเมตร..... 54
4.5	HPTLC โคโรมาโตแกรมภายใต้แสง UV 254 nm ของสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัดกระท่อม..... 55
4.6	ลักษณะภายใต้ UV 254 nm ของสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัด กระท่อมที่สกัดด้วย 40% เอทานอล..... 55
4.7	TLC โคโรมาโตแกรมของสารชะล้างจากคอลัมน์..... 56
4.8	สูตรโครงสร้างของโมเลกุลมิทราไจนีนพิกเครต..... 57
4.9	สเปกตรัม ¹ H-NMR ของมิทราไจนีนพิกเครตและโครงสร้างของโมเลกุล..... 58
4.10	IR spectrum ของมิทราไจนีนและโครงสร้างของโมเลกุล..... 60
4.11	MALDI mass spectrum ของมิทราไจนีนพิกเครตใน Linear mode..... 61
4.12	MALDI mass spectrum ของมิทราไจนีนพิกเครตใน Spiral mode..... 62
4.13	MALDI mass spectrum ของมิทราไจนีนพิกเครตใน matrix of α -cyano -4-hydroxy-cinnamic acid (CCA)..... 63
4.14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน มิทราไจนีน..... 65
4.15	โคโรมาโตแกรมของสารมาตรฐานมิทราไจนีนความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร..... 65
4.16	โคโรมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 40 % ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร..... 66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.17 โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร.....	66
4.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน มิทราไจนีน.....	67
4.19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % radical scavenging ของสารสกัดกระท่อม FD 95 %.....	70
4.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการยับยั้ง ของสารมาตรฐาน Ascorbic acid.....	71
4.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง ของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate.....	72
4.22 กราฟมาตรฐานของไนไตรท์.....	75
4.23 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานมิทราไจนีน.....	79
4.24 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % กลุ่มควบคุม.....	79
4.25 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้อุณหภูมิสูง.....	79
4.26 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะกรด.....	80
4.27 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะต่าง.....	80
4.28 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะ ออกซิเดชัน.....	81
4.29 การเกิดอิมัลชันโดยโปรแกรม Triplot.....	82
4.30 ขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันเบส.....	83
4.31 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันเบส.....	83
4.32 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดกระท่อม.....	84
4.33 อิมัลเจลเบสและอิมัลเจลกระท่อม FD 95 %.....	85
5.1 แสดงสูตรโครงสร้างของโมเลกุลมิทราไจนีน.....	94
5.2 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนีน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความอยู่รอดของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7.....	100
5.3 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนีน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์ มาโครฟาจ Raw 264.7.....	101
5.4 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนีน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7.....	102

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
5.5	ผลของสารมาตรฐานมิตราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ TNF- α ในเซลล์ มาโครฟาจ Raw 264.7.....	103
5.6	ผลของสารมาตรฐานมิตราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่ง PGE2 ในเซลล์ มาโครฟาจ Raw 264.7.....	103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารที่พบในใบกระท่อม.....	9
3.1	ส่วนประกอบของตำรับอิมัลเจลกระท่อม.....	43
4.1	ร้อยละของปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้า และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของกระท่อม.....	45
4.2	ผลการวิเคราะห์กลุ่มสารพฤษเคมีของกระท่อม.....	46
4.3	ร้อยละของสารสกัดหยาบใบกระท่อมก้านแดงด้วยตัวทำละลาย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และผ่านการทำแห้งด้วยความเย็น.....	51
4.4	แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม.....	52
4.5	แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	53
4.6	แสดง chemical shift ของโปรตอนในมิทราไจนีนพิกเครต.....	59
4.7	แสดงพื้นที่ใต้กราฟกับปริมาณความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิทราไจนีนและมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อม (FD 40 % และ FD 95 %) ด้วยวิธี HPLC (THP 2021).....	64
4.8	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของสารมิทราไจนีน (AU) จากการทดลอง (n=3).....	68
4.9	ผลการวิเคราะห์ความถูกต้อง (Accuracy) ด้วย HPTLC.....	68
4.10	การวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intraday Precision) ด้วย HPTLC..	69
4.11	การวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวัน ติดต่อกัน 3 วัน (Interday Precision) ด้วย HPTLC.....	69
4.12	ปริมาณมิทราไจนีนต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ).....	69
4.13	ปริมาณมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH ด้วยวิธี HPTLC.....	70
4.14	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี DPPH radical scavenging.....	71
4.15	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี ABTS radical cation decolorization assay.....	72
4.16	แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay.....	72
4.17	เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	73
4.18	การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	74
4.19	การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระท่อม FD 40 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.20	การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin 6 ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนินและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	76
4.21	การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ TNF- α ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนินและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	77
4.22	การยับยั้งการหลั่ง PGE2 ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนินและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ....	78
4.23	ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลเจลกระท่อม FD 95 % ก่อนและหลัง Freeze-thaw cycle จำนวน 6 รอบ.....	84
5.1	เกณฑ์มาตรฐานของใบกระท่อม.....	87
5.2	การตรวจสอบกลุ่มสารพฤษเคมีจากใบกระท่อม.....	88
5.3	เปรียบเทียบร้อยละผลผลิตและวิธีการสกัดใบกระท่อม.....	89
5.4	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม.....	90
5.5	เปรียบเทียบระบบเฟสเคลื่อนที่สำหรับแยกมิทราไจนินด้วย TLC.....	91
5.6	เปรียบเทียบ Chemical Shift ของโปรตอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของมิทราไจนินและมิทราไจนินพิกเครต.....	93
5.7	สรุปเอกลักษณ์ของ Mitragynine Picrate ด้วย FT-IR.....	95
5.8	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Mitragynine Picrate ด้วย MALDI-MS.....	96
5.9	ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มิทราไจนินในสารสกัดกระท่อมด้วย HPTLC.....	98
5.10	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, DPPH and FRAP assays ของสารสกัดกระท่อม FD 95 %.....	99

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปี พ.ศ. 2563 พบว่า ประชากรไทย มีชั่วโมงการทำงานเต็มเวลาจำนวน 37.42 ล้านคน ส่วนใหญ่ทำงานมากกว่า 35 ชั่วโมงต่อสัปดาห์ หรือประมาณร้อยละ 85.7 ของคนมีงานทำทั้งหมด (สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจและสังคม, 2563) ลักษณะการทำงานที่ยาวนาน หรืออิริยาบถที่ผิดสุขลักษณะ ทำให้เกิดอาการปวดกล้ามเนื้อบริเวณแกนกลางของร่างกาย ได้แก่ บริเวณคอ หลัง และก้น พบได้ร้อยละ 6.3 ของประชากรไทย หรือร้อยละ 36 ของอาการปวดระบบกระดูกและกล้ามเนื้อ โดยเฉลี่ยพบในเพศหญิงอายุ 31-50 ปีมากกว่าเพศชาย (สุพรรณิการังษีวิลา และคณะ, 2558) จากการสำรวจผู้ป่วยที่ไม่ต้องนอนพักรักษาในสถานพยาบาล พ.ศ. 2560 ของประชากรไทย เกี่ยวกับการเจ็บป่วย หรือรู้สึกไม่สบายเกี่ยวกับอาการปวดหลัง หรือปวดกล้ามเนื้อ มีจำนวนร้อยละ 12.1 จัดอยู่ในลำดับที่ 3 รองลงมาจากความเป็นหวัดและโรคเรื้อรัง (สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจและสังคม, 2560) เมื่อเกิดปัญหาทางด้านสุขภาพดังกล่าวจะใช้วิธีการรักษาด้วยการแพทย์ทางเลือก เช่น การฝังเข็ม การนวด การประคบ หรือ การรักษาด้วยการแพทย์แผนปัจจุบัน เช่น การรับประทานยาแก้ปวดหรือการทำกายภาพบำบัด นอกจากนี้การบรรเทาอาการปวดด้วยตนเองก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการดูแลสุขภาพ เช่น การยืดเหยียดกล้ามเนื้อการใช้ยาทาภายนอก เนื่องจากไม่เสียเวลาในการเดินทางและเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพน้อยกว่า การใช้สมุนไพรในการบรรเทาอาการปวดจึงกำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน

กระถ่อมเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Rubiaceae กลุ่มเดียวกับต้นกาแฟ ซึ่งในปัจจุบันพืชสกุล (Genus) มิทราไจนิน (Mitragnyna) มีทั้งหมด 10 ชนิด (Species) พบในทวีปแอฟริกา 4 ชนิด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 6 ชนิด ในประเทศไทยและประเทศมาเลเซีย ชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ *Mitragnyna speciosa* (Korth) (สถาบันสำรวจและติดตามการปลูกพืชเสพติด สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม, 2561) โดยองค์ประกอบหลักของใบกระถ่อมที่มีฤทธิ์ลดปวดที่พบคือ มิทราไจนิน สำหรับในประเทศไทยพืชกระถ่อมได้รับการปลดออกจากสถานะยาเสพติด มาเป็นพืชที่ประชาชนสามารถปลูกเพื่อการบริโภค และขายได้วันที่ 24 ส.ค. 2564 ซึ่งเดิมประชาชนในท้องถิ่นภาคใต้ มักปลูกไว้หลังบ้านประมาณ 1-2 ต้น เพื่อใช้แบบวิถีชาวบ้านที่เน้นการบรรเทาอาการปวดเมื่อย และลดความอ่อนล้าจากการทำงาน ผู้อำนวยการสถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โดยนายแพทย์จักรกรูร เผือกคง เปิดเผยว่า พืชกระถ่อมมีสรรพคุณแก้อาการปวดเมื่อยตามร่างกาย แก้อาการท้องเสีย ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด มีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาทส่วนกลาง (ข่าวไทยพีบีเอส, สิงหาคม 2564)

ปัจจุบันพบว่า กระถ่อมยังคงเป็นยาที่ใช้รักษาโรคทั้งยาเดี่ยวและยาตำรับมากกว่า 100 ประเภท (ธนัช นาคะพันธ์ และคณะ, 2559) โดยหมอพื้นบ้านจะใช้พืชกระถ่อม 2 แบบในการรักษาโรค แบบแรก คือ ใช้กระถ่อมแบบเดี่ยว แก้กุ่มอาการปวดเมื่อย ปวดกล้ามเนื้อ กระดูก เอ็น

ข้อ โดยใช้เป็นใบสด จำนวน 1-2 ใบ รูดก้านใบออก เคี้ยวใบสด กลืนเฉพาะน้ำ คลายกากใบทิ้ง แล้ว ต้มน้ำเปล่าตาม ทั้งนี้ ก้านใบและใบของกระท่อม ไม่สามารถย่อยได้ หากกลืนเข้าไปจะทำให้ติดค้าง อยู่ภายในลำไส้แต่สำหรับคนไม่ยากเคี้ยว สามารถใช้วิธีต้มดื่ม โดยต้มน้ำให้เดือด จากนั้นใส่ใบ กระท่อม แล้วต้มต่ออีกประมาณครึ่งชั่วโมง นำมาดื่ม เข้าครึ่งแก้ว-เย็นครึ่งแก้ว (นิวัติ แก้วประดับ, 2018) ทั้งนี้ ไม่แนะนำให้ให้นำน้ำกระท่อมไปผสมกับยาแผนปัจจุบันในสูตร 4 คุณ 100 เพราะเป็นการ ใช้ผิดประเภท แบบที่สอง คือ ใช้กระท่อมแบบตำรับยา โดยใช้ร่วมกับยาอื่น ๆ แก้อาการปวดตาม ร่างกาย กระดูก เอ็น ข้อ คล้ายกล้ามเนื้อ รักษาโรคทางเดินอาหาร โดยเฉพาะท้องเสีย มีมูกเลือด ซึ่ง กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก อยู่ระหว่างฟื้นฟูตำรับยา (ชาวไทยพีเอส, 2564)

ถึงแม้ว่าการใช้ส่วนใหญ่จะเป็นในรูปแบบของการกินแต่ในทางปฏิบัติพบว่ามีการใช้ สารสกัดแอลกอฮอล์ของใบกระท่อมภายนอกในลักษณะยาทาหรือยาพ่น เพื่อบรรเทาอาการปวดข้อ เข้า ลดอาการปวด บวม คลายกล้ามเนื้อ บรรเทาอาการฟกช้ำ (พระขวัญชัย อคฺชโย, 2565)

จากข้อมูลข้างต้นทำให้การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกระท่อมเพื่อบรรเทาอาการอักเสบและ ปวดจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกระท่อมที่ใช้ระบบ การนำส่งยาแบบใหม่ ในรูปผลิตภัณฑ์อิมัลเจลจากสารสกัดใบกระท่อมที่มีคุณภาพเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ สะดวกใช้สำหรับภายนอก เพื่อบรรเทาอาการอักเสบและปวด อีกทั้งเป็นการเพิ่มแนวทางในการดูแล สุขภาพด้วยตนเองเมื่อเกิดการเจ็บป่วยทั้งนี้มีการนำตำรับยาภายนอกที่ใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ในการรักษา อาการที่เกี่ยวข้องกับการปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออักเสบ โดยมีใบกระท่อมเป็นหลักอย่างน้อย 4 ตำรับ (พระขวัญชัย อคฺชโย, 2565)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์อิมัลเจลจากกระท่อมเพื่อใช้ภายนอก จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเนื่องจาก เป็นรูปแบบที่ช่วยเพิ่มการดูดซึมทางผิวหนัง ย่อมให้ผลดีกว่าใช้สารสกัดแอลกอฮอล์แบบพื้นบ้านที่ไม่ม่ การควบคุมคุณภาพ ดังนั้นการตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบของ สารสกัดใบกระท่อม ตลอดจนการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หัตถาเจินจากสารสกัดกระท่อมจะให้ข้อมูล สนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์อิมัลเจลจากกระท่อม ให้มีความสะดวกในการใช้และมีประสิทธิภาพ ยิ่งขึ้น

คำถามการวิจัย

1. สารสกัดใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบได้หรือไม่
2. วิธีการควบคุมคุณภาพสารสกัดจากใบกระท่อมให้ได้มาตรฐาน
3. ร้อยละส่วนประกอบที่เหมาะสมของไมโครอิมัลชันกระท่อม
4. ตำรับอิมัลเจลกระท่อมมีความคงตัวทางกายภาพหรือไม่

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม
2. พัฒนาระบบที่แอลซีเพื่อการตรวจสอบด้านคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่องรังคเลขผิว

บางสมรรถนะสูง (HPTLC)

3. พัฒนาวิธีการแยกมีทราเจนีนจากสารสกัดกระท่อม
4. ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
5. ศึกษาฤทธิ์การต้านอักเสบโดยวัดการยับยั้งการผลิตสารสื่อการอักเสบของสารสกัด

กระท่อม

6. พัฒนารับผลิตภัณฑ์อิมัลเจลที่มีสารสกัดกระท่อม
7. ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของอิมัลเจลกระท่อม

สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงสามารถต้านการอักเสบได้

ขอบเขตการศึกษา

แบ่งออกเป็น 4 ด้าน ดังนี้

1. การตรวจสอบเอกลักษณ์
 - ตรวจสอบชื่อพฤกษศาสตร์โดยพืชรหัสพืช
 - วิเคราะห์ตามข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพรไทย Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2021
2. ด้านเคมี
 - การเตรียมสารสกัด - วิเคราะห์ปริมาณ Total Phenolic (TPC) และ Total Flavonoid (TFC)
 - พัฒนาระบบ TLC เพื่อการตรวจสอบ (Qualitative TLC Analysis)
 - แยกมีทราเจนีนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)
 - พัฒนาวิธีควบคุมคุณภาพสารสกัด (Quantitative TLC Analysis, HPTLC)
3. ด้านชีวภาพ
 - ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
 - ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ
4. ด้านผลิตภัณฑ์
 - ทดสอบความคงตัวของสารสกัดภายใต้สภาวะเครียด
 - พัฒนารับไมโครอิมัลชันและอิมัลเจล
 - ทดสอบความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

คำจำกัดความในการศึกษา

1. ใบกระท่อม คือ ใบกระท่อมชนิดก้านใบสีแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil.

2. Standardized Extract คือ สารสกัดหายาจากใบกระท่อมที่มีการควบคุมคุณภาพด้วยการตรวจสอบเอกลักษณ์โดยใช้มิทราไจนีนเป็น Marker และใช้การวิเคราะห์ที่มีการทดสอบความถูกต้อง (Method Validation)

3. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion) เป็นรูปแบบหนึ่งของระบบนำส่งยา มีลักษณะโปร่งใส เนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคภายในเล็กมาก ประมาณ 10–100 นาโนเมตร (0.01 - 0.75 ไมครอน) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า หนึ่งในสี่ของความยาวคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (Visible Light) จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง แสงจึงสามารถทะลุ ผ่านได้ทำให้ดูโปร่งใส หยตของวัฏภาคภายใน มีลักษณะกลม ถูกล้อมรอบด้วยฟิล์มของตัวทำอิมัลชัน มีทั้ง ชนิด O/W และ W/O (วลัยลักษณ์ พรพล และประสาน ตั้งยีนยงวัฒนา, 2563)

4. เจล (Gel) เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ใหม่ขึ้นกว่าเดิม โดยมีการกักเก็บสารไว้ในอนุภาคคอลลอยด์ เจลสามารถปลดปล่อยยาได้เร็วกว่าผลิตภัณฑ์ที่เป็นขี้ผึ้งและครีม (Haneefa et al., 2013)

5. อิมัลเจล (Emulgel) เป็นการนำเอาอิมัลชันมารวมกับสารก่อกเจลเพื่อกักเก็บสารที่ชอบไขมัน (Lipophilic Drug) กักเก็บไว้ในระบบ O/W มีข้อดีหลายประการ เช่น ไขมัน กระจายตัวง่าย ล้างออกง่าย ให้ความชุ่มชื้น ไม่ติดบนผิวหนัง ละลายน้ำ เก็บไว้ได้นาน และใส (Haneefa et al., 2013)

6. HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) เป็นวิธีวิเคราะห์สมุนไพรที่มีการระบุไว้ใน เกสซ์ตำรับของอเมริกาและยุโรปคือ United States Pharmacopoeia (USP 38/ NF33 1st Supplement) และ European Pharmacopoeia (Ph.Eur.9.0) ใช้เครื่องมือในการใส่ตัวอย่างลงบนแผ่นเป็นแถบสารทำให้ลดการขยายของแถบสาร (band broadening) จึงมีการแยกของแถบสารได้ดีกว่าการหยดสาร มีเครื่องมือบันทึกภาพ และโปรแกรมช่วยในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผล สามารถทำการวิเคราะห์ตัวอย่างพร้อมกันได้ 18 ตัวอย่าง ในแผ่นเดียวกัน เนื่องจากใช้แผ่น HPTLC ขนาด 10 x 20 เซนติเมตร จึงลดเวลาในการวิเคราะห์และค่าใช้จ่าย (วันชัย ดีเอกนามกุล, 2564)

7. การอักเสบ คือ ปฏิกิริยาของร่างกายที่ตอบสนองต่อตัวกระตุ้นทำให้ร่างกายได้รับบาดเจ็บเกิดการอักเสบ โดยร่างกายจะตอบสนองเพื่อลด และ/หรือจำกัดการบาดเจ็บไม่ให้ลุกลามซึ่งผลจากการอักเสบจะมี 4 ข้อ คือ ปวด (pain) บวม (Swelling) แดง (Redness) และร้อน (Heat) กระบวนการอักเสบแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ การอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute Inflammation) การอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic Inflammation) (Hannooddee., 2022)

กรอบแนวคิดในการศึกษา

ปัจจัยนำเข้า	กระบวนการศึกษา	ผลลัพธ์
1. เครื่องยา ตัวอย่างสมุนไพรใบกระท่อม	- พิสูจน์เอกลักษณ์โดยจัดทำตัวอย่างพรรณไม้ส่งพิพิธภัณฑ์พืชเพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ - วิเคราะห์ตามข้อกำหนด THP	- ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ ได้เลขทะเบียนจากพิพิธภัณฑ์พืช - ได้ข้อมูลตามข้อกำหนด THP
2. ผงใบกระท่อม	- ทำการสกัดผงใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอลนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น	- ได้ร้อยละของผลผลิต (percent yield) ของสารสกัดใบกระท่อม
3. สารสกัดใบกระท่อม	- แยกสารมีทราไจนิน - พัฒนาริธีควบคุมคุณภาพของสารสกัด ด้วย HPTLC - ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านอักเสบของ สารสกัดในหลอดทดลอง - ทดสอบสภาพที่เหมาะสมต่อความคงตัวของสารสกัด - พัฒนาสูตรไมโครอิมัลชัน	- ได้สารใช้ในการควบคุมคุณภาพ - ได้วิธีควบคุมคุณภาพสารสกัดที่เหมาะสม - ได้ค่า IC₅₀ ของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระและต้านอักเสบ - ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมผลิตภัณฑ์ - ได้ไมโครอิมัลชันที่มีความคงตัว
4. ไมโครอิมัลชัน	- พัฒนาสูตรตำรับอิมัลเจลที่มีสารสกัดกระท่อมที่เหมาะสม	- ได้อิมัลเจลสารสกัดกระท่อมที่มีความคงตัวทางกายภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบกระท่อมในด้านต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบ
2. ได้วิธีควบคุมคุณภาพสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี HPTLC
3. ได้ผลิตภัณฑ์อิมัลเจลที่มีสารสกัดใบกระท่อมสำหรับใช้ภายนอก
4. ได้ข้อมูลสนับสนุนการใช้สารสกัดใบกระท่อม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. พืชกระท่อม
2. การสกัดอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม
3. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา
4. การอักเสบ (Inflammation)
5. ระบบนำส่งยาใหม่ ไมโครอิมัลชัน และอิมัลเจล
6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชกระท่อม

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระท่อม (Kratom) เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. โดยทั่วไปพืชกระท่อมเป็นไม้ยืนต้น ขนาดใหญ่ปานกลาง ความสูงประมาณ 15-30 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียว ลักษณะของใบเป็นรูปไข่แกมขอบขนาน เรียงตัวเป็นคู่ตรงข้ามกัน แผ่นใบมีขนาดกว้างประมาณ 5-10 เซนติเมตร ยาวประมาณ 8-14 เซนติเมตร พืชกระท่อมที่พบทั่วไปมีชนิดก้านแดงและก้านเขียว หูใบเป็นรูปหอก อยู่ระหว่างก้านใบ (interpertiar stipule) ลักษณะของดอก มีสีขาวอมเหลือง เป็นช่อตื้นกลม ขนาด 3-5 เซนติเมตร แต่ละช่อมีดอกย่อยประมาณ 70-80 ดอก ชนิดของดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ ออกที่ปลายกิ่ง ผลมี ลักษณะเป็นแคปซูล ภายในมีเมล็ดอัดแน่น ซึ่งลักษณะของเมล็ดมีลักษณะแบน (flat seed) พืชกระท่อมมีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย มาลายู จนถึง เกาะนิวกินี ซึ่งชื่อที่ใช้เรียกพืชกระท่อม นั้น จะขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ เช่น ทางภาคใต้เรียกพืชกระท่อม ว่า “ท่อม” ภาคกลางเรียกว่า “อีถ่าง” ประเทศมาเลเซียเรียกว่า “เปี้ยะ” หรือ “เคอตุม” เป็นต้น(โอภาส กุริวรรณ์, 2560)



ภาพที่ 2.1 ใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง
ที่มา : พิชทรัพย์ ฐิติธนอภิพงษ์, 2565

การตรวจพืชกระท่อม สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การตรวจลักษณะภายนอก (macroscopic examination) ดูรูปร่างของใบ หูใบ เส้นใบ แต่ถ้าอยู่ในรูปผงยาสามารถตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) โดยจะพบองค์ประกอบที่เป็นส่วนของใบ เช่น palisade parenchyma, spongy parenchyma, epidermis, paracytic stomata, non-glandular trichome, prism crystal เป็นต้น (Kowalczyk et al., 2013)

2. แหล่งที่พบ ในประเทศไทยพบได้ที่ภาคกลางคือ ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา ลพบุรี กาญจนบุรี ภาคเหนือ เช่น สุโขทัย อุตรดิตถ์ พิชณุโลก แต่จะพบมากในป่าธรรมชาติบริเวณภาคใต้ เช่น สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ตรัง สตูล พัทลุง สงขลา ยะลา ปัตตานี นราธิวาส ชุมพร (โอภาส ภิรมย์, 2560; กองควบคุมวัตถุเสพติด, 2564) และยังเป็นพืชพื้นเมืองของอินโดนีเซีย มาเลเซีย เกาะสุมาตรา บาหลี และบอร์เนียว ในมาเลเซียมีทั้งก้านใบแดงและเขียวเช่นกัน ส่วนในบอร์เนียวมีชนิดก้านใบขาว (Boffa et al., 2018)

3. การใช้กระท่อมในภูมิปัญญาไทย (พระมหาขวัญชัย อดิคุชโย, 2565) มีบันทึกในตำราแพทย์แผนไทย ตัวอย่างเช่น

3.1 ตำราคัมภีร์แพทย์แผนโบราณของขุนโสภิตบรรณลักษณ์ (อำพัน กิตติขจร) ตำรับยาที่มีพืชกระท่อมเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ยาหนุมานจองถนน ปิตมหาสมุทร ยาแก้บิด ลงเป็นเลือด ยาแก้บิดหัวลูก ยาประสะกาฬแดง ยาประสะกระท่อม ยาทำให้อุดผื่น และยาเหลืองกระท่อม

3.2 ประมวลศิลาจารึกว่าด้วยวิธีสวด บิด เลือดเน่า ศิลาจารึกแผ่นที่ 28 ตำรับยาที่มีพืชกระท่อมเป็นส่วนประกอบคือ ยาแก้บิดลงเลือด

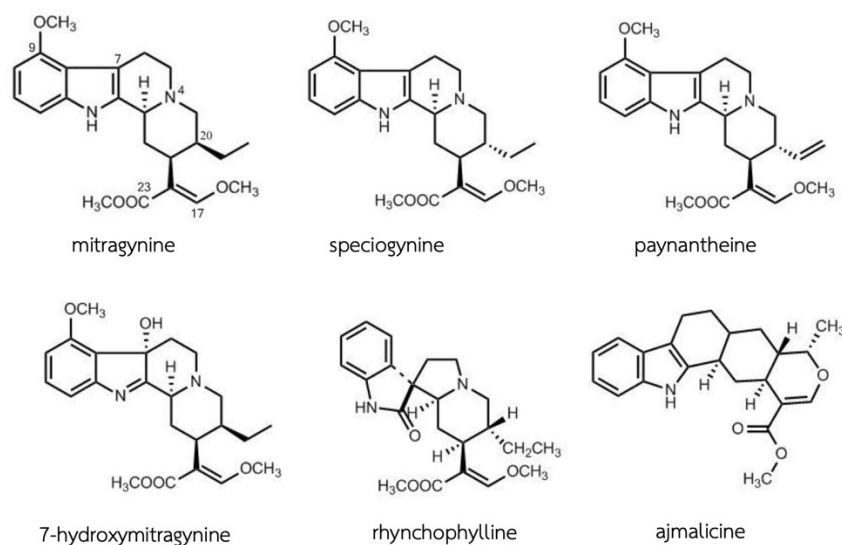
3.3 ประมวลตำรับยาอโรคยาศาล วัดป่ากุดฉนวนอุทุมพร ตำรับยาที่มีพืชกระท่อมเป็นส่วนประกอบคือ ยาเหลืองกระท่อม

จากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากกระท่อมในการรักษาโรคของหมอพื้นบ้าน พบว่า ส่วนที่ใช้ประโยชน์มากที่สุดคือใบกระท่อมซึ่งมีทั้งหมด 101 รายการ มักใช้เป็นยาเดี่ยว 65 รายการ ยาตำรับ 43 รายการ วิธีการปรุงยา คือการต้มกับน้ำแล้วดื่ม 54 รายการ การใช้ใบสดเคี้ยวแล้วกลืนเอาแต่น้ำ 33 รายการ การพอก 10 รายการ การสูบเอาควัน 2 รายการ ใช้ทาภายนอก 1 รายการ การใช้กระท่อมเป็นยาเดี่ยวมี 2 ลักษณะ คือ ใช้กระท่อมสดเพียงอย่างเดียว เพื่อการรักษาอาการท้องร่วง ร้อยละ 31.58 และใช้กระท่อมสดผสมกับน้ำกระสายยา เช่น น้ำตาลทรายแดง เกลือ เหล้าขาว น้ำผึ้ง เพื่อใช้แก้ไอ ร้อยละ 40.74 ใช้แก้ปวด ร้อยละ 29.63 จะเห็นได้ว่าหมอพื้นบ้านใช้กระท่อมสดเป็นยาเดี่ยวและยาตำรับในการรักษาอาการปวด อาการท้องร่วง และใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากเมื่อรับประทานใบกระท่อม สารมัทราจินีมีผลต่อการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบในลำไส้เล็ก ทำให้การบีบตัวของลำไส้เล็กลดลง จึงทำให้อาการปวดท้องดีขึ้น (ธนัช นาคะพันธ์ และคณะ, 2559) จากการศึกษาข้อมูลการใช้กระท่อมของหมอพื้นบ้าน แถบ 14 จังหวัดภาคใต้ ห้าอันดับแรกที่หมอพื้นบ้านเลือกใช้พืชกระท่อมมาเป็นยารักษาโรค คือ โรคท้องร่วง ร้อยละ 67.4 โรคเบาหวาน ร้อยละ 63.3 โรคปวดเมื่อย ร้อยละ 32.7 แก้ไอ ร้อยละ 26.5 ขับพยาธิ แก้ปวดท้องนอนไม่หลับ ร้อยละ 14 ตามลำดับ (จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560)

พระมหาขวัญชัย วัดศรีวังค์ จังหวัดชุมพร ได้รวบรวมตำรับที่ใช้กระท่อมเดี่ยวหรือร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ 50 ตำรับ ที่ใช้ในการรักษาโรคดังกล่าวข้างต้น โดยมี 4 ตำรับที่เกี่ยวข้องกับการใช้ภายนอกเพื่อบรรเทาอาการปวดข้อเข่า ปวดกระดูก ปวดบวมและคลายกล้ามเนื้อ อาการบวม ฟกช้ำ และอักเสบ ได้แก่ ตำรับที่ 30, 39, 40 และ 44 โดยการป้อนสมุนไพรสดกับสุราขาวใช้พ่น หรือทาบริเวณที่มีอาการ ตำรับที่ 39 และ 40 ซึ่งใช้แก้ปวดบวมและคลายกล้ามเนื้อ มีเพียงกระท่อมเป็นตัวยา ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตำรับที่ 30 นอกจากใบกระท่อม 60 กรัม มีใบกระดุกไก่ดำและใบกระดุกขาวอย่างละ 60 กรัม และสุราขาว 1 ลิตร ตำรับที่ 44 ซึ่งใช้แก้ อาการบวม ฟกช้ำและอักเสบจากเกาท์ มีเพียงผักเสี้ยนผี และใบกระท่อมสดอย่างละ 60 กรัม และสุราขาว 50 มิลลิลิตร (พระมหาขวัญชัย อคฺชโย, 2565)

4. องค์ประกอบทางเคมี การศึกษาสารสำคัญในกระท่อมได้เริ่มมาตั้งแต่ปีค.ศ. 1921 โดยสามารถแยกอัลคาลอยด์ มิทราไจนีนจากใบกระท่อม *Mitragyna speciosa* และ mitraversine จากกระท่อมใบเล็ก *M. parvifolia* (Field, 1921) มิทราไจนีนจัดเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่ม indole alkaloid โดยคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 มีกลุ่ม methoxy จับอยู่ (Joshi et al., 1963) มิทราไจนีนเป็นอินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloids) ชนิด corynanthe มีสูตรโมเลกุล $C_{23}H_{30}O_4N_2$ มวลโมเลกุล 398.503 กรัม ต่อโมล เรียกชื่อ ตามลักษณะโครงสร้างคือ 9-methoxy-corynantheidine ลักษณะเป็นผงสีขาว (white amorphous powder) ละลายได้ในตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม และกรดอะซิติก จุดเดือด (boiling point) ประมาณ 230-240 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว (melting point) ประมาณ 110-115.6 องศาเซลเซียส ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร ในประเทศไทยมีการสกัดแยกอัลคาลอยด์จากใบกระท่อมสดได้ 10 ชนิด ได้แก่ Mitragynine, Paynantheine, Speciogynine, Mitraciliatine, Ajmalicine, Isotropodine, Mitraphylline และ Tetrahydroalitonine (นิวัติ แก้วประดับ, 2533) และ 7-hydroxymitragynine (Ponglux et al., 1994) สำหรับกิ่ง เปลือกต้น เปลือกราก ผล พบสารสำคัญกลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น ciliaphylline, isocorynoxine, rhynchociline, corynoxine (จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560) หลังจากการแยกมิทราไจนีนได้ในปี ค.ศ. 1921 ต่อมานักวิทยาศาสตร์ประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์มิทราไจนีน ทำให้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ด้วย 1H -NMR และ ^{13}C -NMR (Takayama et al., 2002) จากนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการวิเคราะห์มิทราไจนีนจากน้ำต้มใบกระท่อมด้วยเทคนิค Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ปรากฏพีคของมิทราไจนีนที่เวลา (Retention time: RT) 16.5 นาที โดยมี mass spectrum คือ 186, 199, 214, 383 และ 397 (Chan et al., 2005)

สารเคมีที่พบในพืชกระท่อมนอกจากสารกลุ่ม indole alkaloids ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหญ่ ยังมีสารกลุ่มอื่น ได้แก่ flavonoids, triterpenes, phenolic compounds เป็นต้น (ตารางที่ 2.1) ซึ่งอาจมีผลร่วมในการออกฤทธิ์



ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างโครงสร้าง alkaloid ที่พบในพืชกระท่อม
ที่มา : จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560

ตารางที่ 2.1 สารที่พบในใบกระท่อม (ดัดแปลงจาก จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560)

กลุ่มสาร	ชื่อสาร
alkaloid	ajmalicine; akuammigine; angustine; corynantheidine; corynantheidaline; corynantheidalinic acid; corynoxine; corynoxine B; hirsutine; hirsutine; isocorynoxine; isomitraphylline; isomitrafoline; isospeciofoline; isorhynchophylline; isocorynantheidine; javaphylline; mitraciliatine; mitrafoline; mitragynalinic acid; mitragynine oxindole mitrajavine; mitraphylline; mitrasulgynine; mitragynaline; mitragynine; mitralactonal; paynantheine; speciociliatine; speciofoline; speciogynine; 3- isoajmalicine; 3,4,5,6-tetradehydromitragynine; 7 α - hydroxy-7H-mitragynine; 3-dehydro-mitragynine
flavonoid	apigenin; apigenin-7-O-rhamnoglucoside; astragalin; cosmosiin; hyperoside; kaempferol; quercetin; quercitrin; quercetin-3-galactoside-7-rhamnoside; rutin; (-)-epicatechin
phenolic	caffeic acid; chlorogenic acid
triterpene	ursolic acid; oleanolic acid

5. การควบคุมตามกฎหมาย (กองควบคุมวัตถุเสพติด, 2564)

ปี พ.ศ. 2486 ประเทศไทยเป็นประเทศแรกที่ประกาศควบคุมการใช้พืชกระท่อม โดยตราพระราชบัญญัติพืชกระท่อม พ.ศ. 2486 ระบุห้ามปลูกและครอบครอง รวมทั้งห้ามจำหน่าย และเสพใบกระท่อม

ปี พ.ศ. 2522 กระท่อมเป็นพืชเสพติดให้โทษประเภท 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522

ปี พ.ศ. 2564 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ (ฉบับที่ 8) พ.ศ.2564 และประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2564 เป็นการกำหนดยกเลิกพืชกระท่อมจากการเป็นยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่วันที่ 24 สิงหาคม 2564 เป็นต้นไป ซึ่งจะมีผลให้พืชกระท่อมไม่ถูกควบคุมเป็นยาเสพติดให้โทษ โดยกระทรวงยุติธรรมได้มีการยกร่างพระราชบัญญัติพืชกระท่อม เพื่อควบคุมพืชกระท่อม เป็นการเฉพาะ ซึ่งขณะนี้อยู่ระหว่างรอลงพระปรมาภิไธย ทั้งนี้การนำพืชกระท่อมมาแปรรูปหรือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหรือเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์สมุนไพร ยา อาหาร เครื่องสำอาง ผู้ผลิตจะต้องดำเนินการตามกฎหมายที่เกี่ยวข้องของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ด้วย

การควบคุมในต่างประเทศ สหประชาชาติ (UN) ยังมิได้มีการประกาศควบคุมพืชกระท่อมในบัญชีรายชื่อยาเสพติดหรือวัตถุออกฤทธิ์ตามอนุสัญญาระหว่างประเทศ แต่จาก World drug report 2013 ของสำนักงานควบคุมยาเสพติดและอาชญากรรมแห่งสหประชาชาติ (UNODC) ได้มีการขอความร่วมมือให้ประเทศสมาชิกเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์ของสารออกฤทธิ์ตัวใหม่ ๆ ซึ่งมีพืชกระท่อมรวมอยู่ด้วย ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่าประเทศในยุโรป เช่น เดนมาร์ก ลัตเวีย ลิทัวเนีย โปแลนด์ โรมาเนีย สวีเดน มีการควบคุมพืชกระท่อม สารมิตราไจนีนและ 7-hydroxymitragynine สำหรับออสเตรเลีย พม่า รวมถึงไทย มีการควบคุมพืชกระท่อมภายใต้กฎหมายที่เกี่ยวข้องกับยาเสพติด ส่วนนิวซีแลนด์ ควบคุมพืชกระท่อม และสารมิตราไจนีนภายใต้กฎหมาย Medicines Amendment Regulations จาก World drug report 2013 ของสำนักงานควบคุมยาเสพติดและอาชญากรรมแห่งสหประชาชาติ (UNODC) ให้ข้อมูลการแพร่ระบาดของพืชกระท่อมว่า พืชกระท่อมมีการใช้อย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และมีการรายงานการใช้ในประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งในปี ค.ศ. 2011 ยุโรปเริ่มการมีขายพืชกระท่อมทางอินเทอร์เน็ตอย่างแพร่หลาย

6. พืชในสกุลเดียวกับกระท่อม

สถาบันสำรวจและติดตามการปลูกพืชเสพติด สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม (2561) ได้ศึกษาสายพันธุ์ของพืชกระท่อมโดยจำแนกตามภูมิภาค คือ แอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่ง African species ได้แก่ *M. inermis* (Africana), *M. stipulosa*, *M. ciliata*, และ *M. Rubostipulata* ส่วน South-East Asia species ได้แก่ *M. speciosa* (กระท่อม), *M. hirsuta* (กระท่อมโคก), *M. tubulosa*, *M. diversifolia* (กระท่อมนา, กระท่อมนา), *M. parvifolia* (กระท่อมใบเล็ก), และ *M. rotundifolia* (กระท่อมเนิน, กระท่อมหนู)

การสกัดอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม

เมื่อนำใบกระท่อมสด 1 กิโลกรัม อบแห้งที่ 45-50 องศาเซลเซียส 3 วัน นำไปบดด้วยเครื่องปั่น ได้น้ำหนักผงแห้ง 297 กรัม นำไปเข้าซอกซ์เลต (Soxhlet) ทำการขจัดไขมันออก (defat) ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (40-60 องศาเซลเซียส) (petroleum ether) 4 ลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หลังจากนั้นให้นำผงที่เอาไขมันออกแล้ว (defatted powder) ไปทำให้แห้ง สกัดด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 4 ลิตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำมากรองและระเหยแห้ง นำสารสกัดคลอโรฟอร์มไปแยกโดยวิธี Flash Chromatography (Still et al., 1978) สารมีทราไจนีนออกมาในส่วนที่ใช้เฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตต (hexane - ethyl acetate) อัตราส่วน 80:20 ปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) แบ่งมา 100 มิลลิลิตร นำไปล้างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (3 x 100 มิลลิลิตร ทั้งส่วนนี้) ส่วนที่เหลือนำไประเหยจะได้สารสกัดหยาบที่มีมีทราไจนีน (crude mitragynine) ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการละลาย สารสกัดนี้ 0.80 กรัม ในเมทานอล ด้วยปริมาตรน้อยที่สุด นำไปเติมลงในสารละลายอิมตัวของกรดพิกริก (picric acid) ในเมทานอล 5 มิลลิลิตร ขูดล้างหลอดเพื่อช่วยในการตกผลึก นำไปแช่ตู้เย็น 20 นาที จะได้ผลึกสีส้มของมีทราไจนีนพิกเครต (mitragynine picrate) (Beng et al., 2011)

นอกจากวิธีข้างต้นแล้วยังมีวิธีอื่น ๆ ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์จากใบกระท่อมได้ เช่น การสกัดด้วย Kinetic maceration ที่อุณหภูมิห้องโดยการใส่ผงกระท่อม 50 กรัม ลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) (1 ลิตร) เติมนเมทานอลร้อนน้ำ (MeOH/H₂O) 500 มิลลิลิตร อัตราส่วน 1:1 กวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผ่าน Buchner funnel และระเหยตัวทำละลายเติมสารละลายสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M NH₄OH) จนได้ pH 9 แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) ระเหยตัวทำละลายออกไป ทำให้ได้สารสกัดเบส นำไปละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (0.1 N HCl) ให้ได้ pH = 3 และล้างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (3 ครั้ง) แล้วเติมสารละลาย 0.1 M NH₄OH ลงในสารละลายกรด จนได้ pH 9 จะเกิดการตกตะกอนของอัลคาลอยด์ กรองเก็บตะกอนด้วย sintered glass filter (Boffa et al., 2018)

สีของก้านใบและเส้นใบมีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ ทำให้แบ่งกระท่อมออกได้เป็นอย่างน้อย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไทยก้านแดง มาเลย์ก้านแดง บาหลีก้านแดง บอร์เนียวก้านขาว และมาเลย์ก้านเขียว เมื่อทำการสกัดอัลคาลอยด์และวิเคราะห์ชนิดของอัลคาลอยด์ในสายพันธุ์ทั้ง 5 พบว่า บาหลีก้านแดงมีอัลคาลอยด์ 24 ชนิด ในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ มี 11 ชนิด ไทยก้านแดง บาหลีก้านแดง มาเลย์ก้านเขียว และบอร์เนียวก้านขาว มีมีทราไจนีนมากกว่า paynantheine ในขณะที่ มาเลย์ก้านแดง มี paynantheine มากกว่า ส่วนมาเลย์ก้านเขียวมีร้อยละของสารสกัด 1.04 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นมีทราไจนีน 59.7 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณจาก HPLC chromatogram) ปริมาณอัลคาลอยด์ในใบ 9.86 มิลลิกรัมต่อกรัม ในไทยก้านแดงมีร้อยละของสารสกัด 1.03 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ปริมาณอัลคาลอยด์ในสารสกัดเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 84.7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก มีมีทราไจนีน 44 เปอร์เซ็นต์ (คำนวณจาก HPLC chromatogram) และปริมาณอัลคาลอยด์ในใบ 8.76 มิลลิกรัมต่อกรัม (Boffa et al., 2018)

การสกัดมิตราไจนีนจากใบกระท่อม สามารถทำให้มีความบริสุทธิ์สูงได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสารสกัดไปผ่านคอลัมน์ (column) แล้วตกผลึกด้วยสารละลายอิ่มตัวของ picric acid ในเมทานอล (Beng et al, 2011)

ในไทยมีการศึกษาปริมาณมิตราไจนีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่างๆที่มีการปลูกในประเทศไทยด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ปริมาณมิตราไจนีนที่สกัดได้อยู่ในช่วง 1.391 มิลลิกรัมต่อกรัมถึง 7.810 มิลลิกรัมต่อกรัมของใบกระท่อมแห้ง (นราพงศ์ บุรมรา, 2554)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

มิตราไจนีนมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางหรือมีฤทธิ์ในการลดการติ่งตัว (tone) และความแรง (amplitude) ของการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (Watanabe et al, 1997) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความแรงในการออกฤทธิ์ อาจแปรเปลี่ยนได้ตามการผันแปรของสัดส่วนของอัลคาลอยด์ ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ อายุ และสายพันธุ์ ฤทธิ์แก้ปวดและการออกฤทธิ์ ต่อจิตประสาทเกี่ยวข้องกับมิตราไจนีน และ 7-hydroxymitragynine (Boffa et al., 2018) ผลการทดลองใน isolated ileum ของหนู guinea pig แสดงว่ามิตราไจนีนให้ผลเช่นเดียวกับ morphine แต่น้อยกว่าประมาณ 4 เท่า แต่สาร 7-hydroxy mitragynine กลับมีความแรงมากกว่า morphine 10 เท่า (Kitajima et al, 2006) โดยที่มิตราไจนีนมีผลต่อระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) โดยเฉพาะส่วน medulla นอกจากนี้ มิตราไจนีน ยังมีฤทธิ์แก้ปวด (antinociceptive effect) โดยผ่าน opioid receptor ในสมอง (Thongpradichote et al, 1998) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ มิตราไจนีน และ 7-hydroxy mitragynine ที่มีผลต่อระบบประสาทและมีฤทธิ์แก้ปวด พบว่าออกฤทธิ์โดยผ่านการจับกับ μ opioid receptor (Kruegel et al, 2016) หมู่ methoxy ที่ตำแหน่งที่ 9 จัดเป็นหมู่ที่สำคัญต่อการจับกับ opioid receptor และ หมู่ α -hydroxyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 (7-hydroxy-mitragynine) จะทำให้การจับกับ opioid receptor เพิ่มขึ้น (Takayama 2004; Liu et al. 2010) ฤทธิ์แก้ปวดของสารมิตราไจนีน ยังเป็นผลเนื่องจากการลดระดับของสัญญาณ การเจ็บปวดไปยังสมอง ผ่านระบบ noradrenergic system และ serotonergic system (Matsumoto et al., 1996) นอกจากนี้ยังเพิ่มระดับของสารสื่อประสาท ได้แก่ serotonin, noradrenaline และ dopamine จึงทำให้สารมิตราไจนีนมีคุณสมบัติด้านการซึมเศร้าได้ (antidepressant effect) (Farah Idayu et al., 2011) การศึกษาฤทธิ์ของมิตราไจนีนกับ Codeine ในขนาดที่เท่ากัน เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของแอลคาลอยด์ทั้งสองชนิด พบว่ามิตราไจนีนไม่ทำให้เกิดการอาเจียน หายใจลำบาก ไม่มีอาการ ตีดยาซึ่งแตกต่างจากการเสพฝิ่น เพราะการเสพฝิ่น จะทำให้เกิดการตีดยาได้ (สถาบันสำรวจและติดตามการปลูกพืชเสพติด, 2561)

รายงานการศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบของสารสกัดเมทานอลของกระท่อม ในความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูด้วย carrageenan (carrageenan-induced paw edema) พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบภายใน 3 ชั่วโมงแรก หลังจากหนูได้รับสารสกัด โดยคาดว่าจะมีผลยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ ในกระบวนการอักเสบผ่านวิถี arachidonic acid เพิ่มการทำงานของระบบ

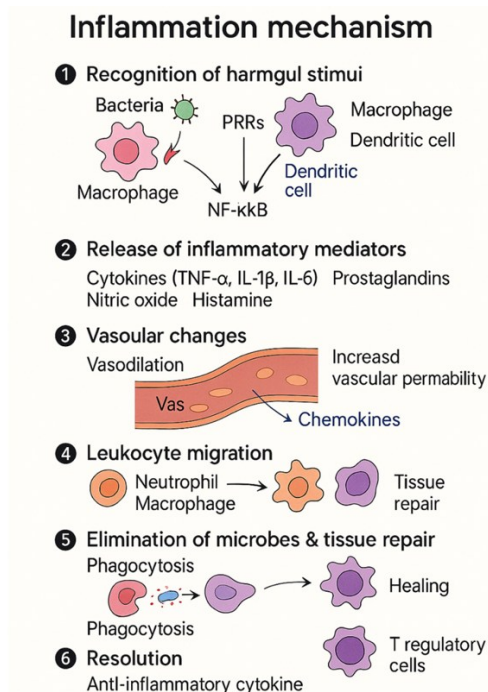
ภูมิต้านทาน และกระตุ้นกระบวนการสมานแผล (Shaik et al., 2009) สารสกัดใบกระท่อมสายพันธุ์ มาเลย์ก้านเขียวด้วยเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี มิทราไจนิน 59.7 เปอร์เซ็นต์ ในอัลคาลอยด์รวม เมื่อนำสารสกัดนี้ในขนาดที่มีมิทราไจนิน 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไปป้อนหนูทดลอง ทดสอบด้วย hot plate และ การฉีดยา carrageenan เข้าอุ้งเท้าหนูพบว่ามิทราไจนิน แก่ปวดและแก้อักเสบได้ (Boffa et al., 2018) การทดลองในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 พบว่าสารมิทราไจนิน มีผลยับยั้ง การแสดงออกของยีน cyclooxygenase-2 (COX-2) และ prostaglandin E2 (PGE2) แต่ไม่มีผล ต่อการทำงานของ COX-1 (Utar et al., 2011)

สารสกัดเอทานอลของใบกระท่อม เมื่อนำไปทดสอบการระงับปวดในหนูทดลอง (mice) ด้วย hot plate และ tail flick test ด้วยการให้ทางปากในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า มิทราไจนินเทียบเท่ากับการฉีดยา morphine 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แม้จะมีการเริ่มต้นของการออกฤทธิ์ (onset of action) และช่วงเวลาที่ออกฤทธิ์ (duration of action) นานกว่าและสั้นกว่า morphine แต่สารสกัดน้ำในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่มีฤทธิ์ระงับปวด เนื่องจากมีปริมาณมิทราไจนิน น้อย สารสกัดทั้งหมดจากน้ำ เมทานอล เอทานอล และเอทิลอะซิเตต พบว่า มิทราไจนินไม่เป็นพิษ ต่อเซลล์ทั้งสองชนิดที่ทำการทดสอบ สารสกัดใบกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณมิทราไจนิน และฟลาโวนอยด์รวมสูง มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาแก้ปวดที่มีประสิทธิภาพ (effective analgesic) (Goh et al., 2021)

การศึกษาครั้งแรกเกี่ยวกับผลต่อระบบประสาทของสารมิทราไจนิน พบในรายงาน ของ Grewal (1932a) ซึ่งทำการทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่ามิทราไจนินมีผลกระตุ้นระบบประสาท เช่นเดียวกับโคเคน ต่อมาได้มี การทดลองกับอาสาสมัครชาย 5 คน ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน แต่พบว่า มิทราไจนินอะซิเตต (mitragynine acetate) ขนาด 50 มิลลิกรัม ทำให้คลื่นไส้และอาเจียน (Grewal 1932b; Jansen and Prast, 1988) ผลการวิจัยนี้แตกต่างจาก รายงานการใช้ใบกระท่อม ในกลุ่มชายวัยกลางคน 30 คน ที่ทำงานหนัก และกินใบกระท่อมสดเป็นเวลานานกว่า 5 ปี โดยรูปแบบใช้คือ เคี้ยว และรับประทานผงใบกระท่อมร่วมกับดีเกลือ (เพื่อลดอาการท้องผูก) การเคี้ยวใบปริมาณน้อย (2-3 ใบต่อครั้ง) ความถี่ 3-10 ครั้งต่อวัน สามารถกระตุ้นการทำงาน และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานได้ โดยผลกระตุ้นจะเกิดขึ้นภายใน 5-10 นาที อาการไม่พึงประสงค์ ที่พบ ได้แก่ ปากแห้ง ท้องผูก ผิวดำคล้ำ เบื่ออาหาร และน้ำหนักลด (Suwanlert, 1975) จากข้อมูล ที่พบอาจสรุปได้ว่า ผู้ที่ใช้ใบกระท่อมเป็นประจำมีแนวโน้มที่จะเกิดภาวะทนต่อฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ ในกระท่อม (tolerance) ทำให้สามารถรับสารเคมีเหล่านี้ได้ดีกว่าผู้ที่ไม่เคยใช้มาก่อน ส่งผลให้อาการ ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้นน้อยกว่า ดังนั้น ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรพิจารณาใช้สารสกัดกระท่อม มากกว่าการใช้มิทราไจนินบริสุทธิ์ เพียงอย่างเดียว เนื่องจากสารสกัดเข้มข้นยังคงมีองค์ประกอบ ธรรมชาติอื่น ๆ ที่อาจช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์ และทำให้ร่างกายตอบสนองได้ดีกว่า (จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560)

การอักเสบ (Inflammation)

การอักเสบเป็นกระบวนการของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเพื่อป้องกันร่างกายจากการบาดเจ็บ ติดเชื้อ โดยมีอาการหลักคือ ปวด (pain) บวม (swelling) แดง (redness) และร้อน (heat) ซึ่งความรุนแรงของการอักเสบขึ้นอยู่กับตัวกระตุ้นที่ทำให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบ



ภาพที่ 2.3 กลไกของการอักเสบ ดัดแปลงจาก Hseu et al., 2005

สิ่งกระตุ้นที่เกิดการอักเสบ ได้แก่

1. Mechanical Stimulus เช่น การเกิดการกระทบกระเทือน
2. Chemical Stimulus ได้แก่ สารเคมีต่าง ๆ ยา หรือ Toxin
3. Infection Stimulus ได้แก่ เชื้อโรคต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา

กระบวนการอักเสบแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ (Hannooddee, 2022; Zhang J-M et al, 2007)

1. การอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) เป็นการเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีระยะเวลาเป็นนาที่หรือวินาทีหลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและคงอยู่ประมาณ 2 ถึง 3 วัน แต่มักไม่เกินหนึ่งสัปดาห์ การอักเสบแบบเฉียบพลันช่วยในการกำจัดเชื้อโรคซึ่งเป็นผลดีแก่ร่างกาย ลักษณะสำคัญคือ มีของเหลวประกอบด้วยโปรตีนจากพลาสมาและเม็ดเลือดขาวเข้ามายังบริเวณที่อักเสบ เมื่อเกิดการอักเสบ อาการปวด บวม แดง ร้อน อวัยวะส่วนนั้นจะเสียการทำงานมีการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนเลือด เกิดการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด และมีเม็ดเลือดขาว neutrophil เข้ามายังบริเวณอักเสบ เพื่อกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งมีการกระตุ้นให้สร้างและหลั่ง inflammatory mediators

2. การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ร่างกายเกิดการอักเสบเป็นเวลานาน อาจเป็นระยะเวลาเป็นสัปดาห์ หรือเป็นเดือน ลักษณะ สำคัญของการอักเสบเรื้อรัง คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อพังผืดขึ้น (fibrosis) มีการสร้างหลอดเลือดขึ้นจำนวนมาก และพบเซลล์อักเสบชนิด macrophages และ lymphocytes ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ และเกี่ยวข้องกับการปล่อยสารสื่อกลางทางเคมี (chemical mediators) ที่สำคัญ ได้แก่ ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide), prostaglandins และ cytokines (Hseu et al., 2005) ถ้าร่างกายเกิดกระบวนการอักเสบเรื้อรัง อาจนำไปสู่การเกิดโรคต่าง ๆ ได้เช่น เบาหวาน ความจำเสื่อม โรคหัวใจ หรือมะเร็ง (Tian et al. 2022; Mantovani et al., 2008)

ดังนั้น การอักเสบ จึงเป็นกระบวนการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ช่อมแซมส่วนที่ถูกทำลาย การอักเสบทำให้หลอดเลือดขยายตัว เกิดรูรั่วของเซลล์ ทำให้มีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ เช่น Prostaglandins (PGs), Nitric oxide (NO), Tumor necrosis factor (TNF- α), cytokines (IL-1, IL-6) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะกระตุ้นเซลล์ประสาทส่วนปลายในบริเวณที่บาดเจ็บและในระบบประสาทส่วนกลางทำให้ร่างกายมีความรู้สึกเจ็บปวดเกิดขึ้น

1. กลไกการเกิดความเจ็บปวดประกอบด้วย 3 ประการ

1.1 สิ่งกระตุ้นความเจ็บปวด แบ่งเป็น 3 ประเภท

1.1.1 สิ่งกระตุ้นเชิงกล ได้แก่ การทำลายเนื้อเยื่อจากการบาดเจ็บ ผ่าตัด

1.1.2 การบวมจากการอักเสบ การอุดตันของหลอดเลือดและการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ

1.1.3 กระตุ้นอุณหภูมิ ได้แก่ ความร้อน ความเย็น และกระแสไฟฟ้าในการอักเสบ เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายจะมีการหลั่งสาร Prostaglandin เป็นผลให้เนื้อเยื่อไวต่อความเจ็บปวดง่ายขึ้น และมีการหลั่งสารไซโตไคน์ เช่น TNF- α , IL-1, IL-6 มีส่วนสำคัญทำให้เกิดความเจ็บปวดในช่วงที่เกิดการอักเสบ

1.2 ตัวรับความรู้สึกสามารถรับรู้สิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย

1.3 วิธีประสาทนำความรู้สึกประกอบด้วย โยประสาทเอ เบต้า (A beta fiber) โยประสาทเอเดลต้า (A delta fiber) โยประสาทซี (C fiber) โดยเส้นใยประสาทเอเดลต้า และเส้นใยประสาทซี จะรับสัญญาณความเจ็บปวดจากระบบประสาทส่วนปลายส่งผ่านตัวรับความรู้สึกปวด (nociceptors) ไปยังบริเวณ dorsal horn ของไขสันหลัง (spinal cord) โดยบริเวณไขสันหลังจะมีเซลล์ substantial gelatinosa (SG cell) ทำหน้าที่ควบคุมการปิด หรือเปิดประตูไขสันหลัง ซึ่งหากสัญญาณความปวดถูกส่งเข้าสู่สมอง ร่างกายของมนุษย์ก็จะสามารถรับรู้ความรู้สึกปวดได้

2. สารสื่อกลางในการอักเสบ (Inflammatory mediator)

2.1 ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตจากกระบวนการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งมีทั้งหมด 3 isoforms ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) ในสภาวะปกติ ไนตริกออกไซด์ถูกผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ nNOS และ eNOS ซึ่งจะมีปริมาณไม่มาก แต่ระหว่างอักเสบจากการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา และไวรัส ไนตริกออกไซด์

จะถูกผลิตออกมามาก โดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคต่างๆ เช่น ภาวะการอักเสบเรื้อรัง อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน ภาวะหลอดเลือดแข็ง และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่มากขึ้นนี้สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดเป็น peroxynitrite (ONOO-) ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้อย่างรุนแรง โดยทำลายสารพันธุกรรม (DNA) และโปรตีน (Sautebin, 2000)

2.2 Prostaglandin (PGE2) เป็นสารสื่ออักเสบที่ทำให้เกิด vascular permeability และการขยายของหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นและกระตุ้นการเจ็บปวด (Ricciotti, E and FitzGerald, G. A., 2011)

2.3 Cytokines ไซโตไคน์ เป็นโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ Mononuclear phagocytes ไซโตไคน์ มีหลายชนิดเช่น IL-1, IL-6 ทำหน้าที่กระตุ้น T เซลล์ และ B เซลล์ มายังบริเวณที่เกิดการอักเสบ ทำให้เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังและไซโตไคน์ที่เกิดจากการอักเสบนั้นส่วนใหญ่ผลิตโดยมาโครฟาจที่ถูกกระตุ้น และเกี่ยวข้องกับการควบคุมปฏิกิริยาการอักเสบ มีหลักฐานมากมายที่แสดงว่าไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น IL-1 β , IL-6 และ TNF- α มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการของความเจ็บปวดทางพยาธิวิทยา (Medzhitov, 2008)

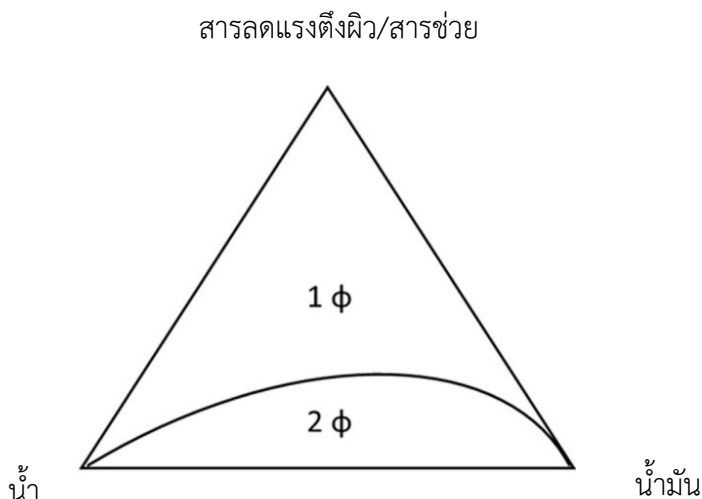
ระบบนำส่งยาใหม่ ไมโครอิมัลชัน และอิมัลเจล

ไมโครอิมัลชันเป็นลักษณะของรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเกิดสารละลายใส (transparent) เป็นเนื้อเดียว (homogeneous) มีความเสถียรทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) ได้จากการผสมส่วนประกอบที่เหมาะสมของ น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในปริมาณมาก และอาจต้องใช้ สารช่วยลดแรงตึงผิว (cosurfactant) รวมด้วย สารที่ละลายน้ำ (Aqueous materials) จะเป็นสารที่อยู่ในวัฏภาคน้ำของอิมัลชัน คือน้ำและแอลกอฮอล์ ส่วนวัฏภาคน้ำมันในอิมัลชัน เช่น Light liquid paraffin (7.5%), Propylene glycol (3-5%), Isopropyl myristate (7-7.5%), Isopropyl stearate (7-7.5%), Isopropyl palmitate (7-7.5%) เป็นต้น สำหรับสารเชื่อมวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน (Surfactants /Emulsifiers) ทำให้เกิดอิมัลชันและทำให้ระบบเสถียร มีอายุได้หลายเดือน หรือหลายปี เช่น Polyethylene glycol 40 stearate, Sorbitan monooleate (Span 80), Polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80), Stearic acid และ Sodium stearate เป็นต้น ในบางครั้งอาจเพิ่มสารช่วยนำพาสารสู่ผิวหนัง (Permeation enhancers) เช่น Oleic acid (1%), Lecithin (5%), Urea (10%), Isopropyl myristate (5%), Linoleic acid (5%), Menthol (5%), Clove oil (8%) และ Cinnamon (8%) เป็นต้น

ปรากฏการณ์ไมโครอิมัลชันมีรายงานครั้งแรกในปี 1943 ต่อมาในปี 1959 จึงมีการพิสูจน์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนว่ามีลักษณะของอิมัลชันเล็ก ๆ นี้จริง จึงตั้งชื่อรูปแบบผลิตภัณฑ์นี้ว่า “microemulsions” (Montenegro et al., 2016)

การทำให้เกิดไมโครอิมัลชันจะต้องสร้างระบบที่มีโครงสร้างขนาดเล็กซึ่งประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่บริเวณรอยต่อระหว่างวัฏภาคน้ำและน้ำมัน ระบบคอลลอยด์นี้เกิดขึ้นได้เฉพาะช่วงแคบ ๆ ของส่วนผสม ระหว่างสารลดแรงตึงผิว น้ำมัน และน้ำ ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ

ของสารละลายในส่วนผสมต่าง ๆ และส่วนประกอบของส่วนผสม แทนได้ด้วยแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudo-ternary phase diagram) โดยมุมหนึ่งแทนส่วนผสมของ surfactant/co-surfactant มุมหนึ่งแทน water/drug หรืออีกมุมหนึ่ง oil/drug ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวยา บริเวณที่อยู่นอกขอบเขตของ ไมโครอิมัลชัน มีปริมาณสารลดแรงตึงผิวน้อยเกินไปที่จะทำให้เกิดสารละลายที่เป็นเนื้อเดียว จึงเป็นบริเวณที่มีได้หลายเฟส (multiple phases system) (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมของไมโครอิมัลชันที่มีองค์ประกอบสี่ชนิด
(1 ϕ): one phase; (2 ϕ): two phases (ดัดแปลงจาก Montenegro et al., 2016)

การเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญในการเกิดไมโครอิมัลชัน ซึ่งพิจารณาได้จากค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ค่านี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ชอบไขมัน ในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว สำหรับสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB 3-6 มักจะช่วยให้เกิดระบบ W/O ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB 8-18 มักจะช่วยให้เกิดระบบ O/W ในด้านเภสัชกรรมนิยมใช้วัฏภาคน้ำมันที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ชนิดโซ่กลาง (medium chain triglycerides) และเอสเทอร์ของกรดไขมัน เช่น isopropyl myristate, isopropyl palmitate, ethyl หรือ methyl esters ของ lauric, myristic และ oleic acid (Montenegro et al., 2016)

ตัวอย่างการใช้ระบบไมโครอิมัลชันเพื่อการนำส่งยาที่ดีขึ้น เช่น 8-Methoxsalen เป็นยาที่ใช้ภายนอกรักษาโรคสะเก็ดเงิน มีรายงานว่า การใช้ระบบนำส่งยา 8-Methoxsalen โดยใช้ไมโครอิมัลชัน 6 ตำรับ สามารถเพิ่มการซึมผ่านเข้าผิวหนังได้ 1.9-4.5 เท่าเมื่อเทียบกับ IPM และมีการระคายเคืองในผิวหนังเพิ่มขึ้น 1.5-4.5 เท่า (Baroli et al., 2000)

เจล (Gel) เป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นเพื่อกักเก็บสารที่ชอบน้ำหรือชอบไขมันจำนวนมากไว้ในเครือข่ายของคอลลอยด์ ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของเจลสามารถปลดปล่อยตัวยาได้ดีกว่าซีฟิงหรือครีม เมื่อนำเจลและอิมัลชันมารวมกันจึงเกิดเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ใหม่ เรียกว่าอิมัลเจล (Emulgel) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีคือ thixotropic, ไม่เป็นมัน (greaseless), เคลื่อนย้าย, ล้างออกง่าย, ให้ความชุ่มชื้น, ไม่ติดสี (non-staining), ละลายน้ำ, เก็บได้นาน (longer shelf life), เป็นมิตร

กับสิ่งแวดล้อม และโปร่งใสจึงน่าใช้ ตัวยาที่ชอบไขมันสามารถนำไปเก็บในวัฏภาคน้ำมันแล้วนำไปกระจายในวัฏภาคน้ำ ทำให้ได้อิมัลชันชนิด oil in water (O/W) สารก่อเจล (Gelling agents) ช่วยเพิ่มความข้นของผลิตภัณฑ์และช่วยการกระจายตัวให้สม่ำเสมอ เช่น Carbopol 934 (0.5-2%), Carbopol 940 (0.5-2%), HPMC 2910 (2.5%), HPMC (3.5%) และ Sodium CMC (1%) เป็นต้น เมื่อใส่สารก่อเจลในอิมัลชันจะได้อิมัลเจล ด้วยระบบเครือข่ายภายในจึงทำให้อิมัลเจลสามารถกักเก็บตัวยาได้มากกว่ารูปแบบอื่น ๆ ส่วนประกอบของอิมัลเจล ได้แก่ (Haneefa et al., 2013)

อิมัลเจลเป็นรูปแบบที่นิยมมาใช้กับสารสกัดสมุนไพรมากขึ้น เช่น มีการพัฒนาอิมัลเจลจากสารสกัดชิงด้วย acetone ได้เป็นไมโครอิมัลชันชนิด oil in water โดยใช้ครีมอฟอร์ อาร์เอช 40 (Cremophor RH 40) และคาร์โบพอล 940 (Carbopol 940) ที่ผสมสารสกัดชิง 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูสูงที่สุด (Praditbongkotch, 2009) การพัฒนาอิมัลเจลจากสารสกัดมะหาดด้วย Tea tree oil และ Tween 20 โดยมีอัตราส่วน Tween 20 : tea tree oil : น้ำ เป็น 6 : 3 : 1, หรือ 5 : 3 : 2, และ 6 : 1 : 3 (นิจิตา พงศ์ฉบับนภา และคณะ, 2558) การพัฒนาไมโครอิมัลชันของน้ำมันมหาจักรโดยใช้ Tween 80 : Mahajak oil ผสม Peppermint oil (อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก) : น้ำในอัตราส่วน 6 : 1 : 3 และ 6 : 2 : 2 และ 5 : 4 : 1 ให้ไมโครอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาค 12.60 นาโนเมตร 16.70 นาโนเมตร และ 19.90 นาโนเมตร ตามลำดับ (วลัยลักษณ์ พรผล และ ประสาน ตั้งยีนยงวัฒนา, 2563)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาเรื่องพืชกระท่อมกับการดูแลสุขภาพของคนไทย พบว่าสารมัทราไจนีนเป็นสารออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท ช่วยทำให้ร่างกายกระปรี้กระเปร่าผู้ใช้แรงงานจึงนิยมเคี้ยวใบกระท่อมขณะทำงานกลางแจ้ง นอกจากนี้มีบันทึกแสดงว่าแพทย์พื้นบ้านทางภาคใต้นำมาใช้เป็นยารักษาอาการท้องร่วงมีกระท่อมเป็นส่วนประกอบในตำรับ ซึ่งประกอบด้วยเปลือกต้นกระท่อม เปลือกต้นสะเดา เปลือกต้นมะขาม อย่างละ 50 กรัม หัวแก้มันชัน หัวแก่กระทือ อย่างละ 1 หัวนำไปคั่วไฟพอสุก แล้วตำรวมกับน้ำปูนใสกับน้ำธรรมดาอย่างละเท่า ๆ กัน รับประทานครั้งละ 2-3 ช้อนแกง เมื่อหายจึงหยุดรับประทาน มีการใช้รักษาโรคเบาหวาน ในตำรับประกอบด้วยใบกระท่อม หญ้าหนวดแมว ไม้ค้อนตีนหมา อย่างละเท่ากัน ตำลงในน้ำ 3 ส่วน เคี้ยวให้เหลือ 1 ส่วน ต้มครั้งละ 1 ช้อนโต๊ะ วันละ 2 เวลา เข้ากับเย็น มีการใช้เพื่อบรรเทาอาการปวดเมื่อย ในตำรับยาประกอบด้วยเถาวัลย์เปรียง มะค่าไก่ มะแว้งต้น มะแว้งเครือ เถาโคคลาน เถาสังวาลพระอินทร์ หญ้าหนู ต้นผักเสี้ยนผี แก่นขี้เหล็ก ใบมะกา อย่างละ 1 ส่วน เนื้อในฝักราชพฤกษ์ 5 ฝัก ใบกระท่อม 2 ส่วน เถากำแพงเจ็ดชั้น 3 ส่วน ตำรับประทาน วันละ 2 ครั้งก่อนอาหาร เข้า-เย็น ครั้งละ 1 ถ้วย กาแฟ อย่างไรก็ตามการใช้พืชกระท่อมเกินขนาด อาจส่งผลให้หัวใจเต้นเร็ว และนอนไม่หลับ (อานวย ธีรรัตน์ศรีสกุล, 2565)

การรับประทานใบกระท่อมประมาณ 1-5 กรัม หรือประมาณ 1-3 ใบสด มีฤทธิ์กระตุ้น และอาจทำให้เกิดอาการกระสับกระส่าย การรับประทานใบกระท่อมสดประมาณ 5-15 กรัม หรือประมาณ 3-9 ใบสด จะทำให้เหงื่อซึม แก้วปวด ในกรณีที่เกิดพิษเฉียบพลันจะเกิดจากการได้รับประทาน ใบกระท่อมมากกว่า 15 กรัม จะทำให้เกิดอาการกระสับกระส่าย สับสน เหงื่อออก คลื่นไส้ อาเจียน ใจสั่น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการรับประทานกระท่อมแล้วทำให้เสียชีวิต (วุฒิเชษฐ รุ่งเรือง, 2563)

กระท่อมสามารถใช้ภายนอกในรูปแบบตำรับ และยาเดี่ยว ซึ่งพระมหากษัตริย์ วัดคีรีวงศ์ จังหวัดชุมพร ได้รวบรวมไว้มี 4 ตำรับ เพื่อบรรเทาอาการปวดข้อเข่า ปวดกระดูก ปวดบวมและคลาย กล้ามเนื้อ อาการบวม ฟกช้ำและอักเสบ ได้แก่ ตำรับที่ 30, 39, 40 และ 44 โดยการปั่นสมุนไพรสด กับสุราขาวใช้พ่นหรือทาบริเวณที่มีอาการ ตำรับที่ 39 และ 40 ซึ่งใช้แก้ปวดบวมและคลายกล้ามเนื้อ มีกระท่อมเป็นตัวยา ในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตำรับที่ 30 มีส่วนประกอบของใบกระท่อม ใบกระท่อมตากแห้ง ใบกระท่อมขาว อย่างละ 60 กรัม และสุราขาว 1 ลิตร มีกระท่อมเป็นตัวยาในปริมาณ ร้อยละ 6 ตำรับที่ 44 ใช้พอกแก้อาการบวม ฟกช้ำ และอักเสบจากเกาท์ ประกอบด้วยผักเสี้ยนผี ใบกระท่อมสด อย่างละ 60 กรัม และสุราขาว 50 มิลลิลิตร (พระมหากษัตริย์ อคคชโย, 2565)

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 430 เมื่อวันที่ 5 มกราคม 2565 เรื่อง ผลิตภัณฑ์จาก อาหารที่มีส่วนประกอบของพืชกระท่อม กำหนดให้ทั้งต้นของพืชกระท่อม และสารสกัดจากกระท่อม เป็นอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้าหรือจำหน่าย โดยมีข้อยกเว้นคือต้องได้รับการประเมินความปลอดภัย ตามเงื่อนไขของประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องอาหารใหม่ หรือที่ผลิตเพื่อการส่งออก เท่านั้น (พระราชบัญญัติอาหาร, 2565) ซึ่งสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กองผลิตภัณฑ์ สมุนไพร ได้ประกาศคำแนะนำการพัฒนาและขออนุญาตผลิตภัณฑ์สมุนไพรประเภทผลิตภัณฑ์ สมุนไพรเพื่อสุขภาพ น้ำใบกระท่อม ไว้ว่าขนาดรับประทานน้ำใบกระท่อมต้องมีปริมาณมิทราเจนีน ไม่เกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อวัน มีข้อห้ามใช้ในผู้ป่วยที่ใช้ยาเมตาบอไลซึมผ่านเอนไซม์ cytochrome P450 เช่น กลุ่มยาที่ต้านการแข็งตัวของเลือด ยาที่ออกฤทธิ์ต่อจิต และประสาท ยาระงับปวดกลุ่มโอปิออยด์ ผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ และหลอดเลือด ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ป่วยจิตเวชที่มีภาวะนอนไม่หลับ ผู้ที่มีความ ผิดปกติของตับ และไต หญิงตั้งครรภ์ หญิงให้นมบุตร เยาวชนอายุต่ำกว่า 18 ปี ผู้ที่มีภาวะไตร่อยด เป็นพิษ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร, 2565)

บทสรุป

มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงว่าสารสกัดกระท่อม และสารสำคัญมิทราเจนีนล้วนมีฤทธิ์ระงับ ปวด ต้านการอักเสบในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (*in vitro* and *in vivo*) การใช้จริง ในกลุ่มคนทำงานหนัก โดยการใช้ในลักษณะสารสกัดให้ผลดีกว่าใช้สารเดี่ยว นอกจากนี้ใบกระท่อม ยังมีสารกลุ่มอื่นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น flavonoid, phenolic acid และ triterpenoid จึงสนับสนุน การใช้ในลักษณะสารสกัดหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ในรูปของสุราขาว ซึ่งมีเพียงก้านของใบกระท่อมก้านแดงในความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้ภายนอกบำบัดอาการ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออีกด้วย ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาใบกระท่อมก้านแดงซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นในภาคใต้ ของประเทศไทยและเป็นที่ยอมรับ

การใช้กระท่อมเป็นยาภายนอกในยาแผนไทยและยาพื้นบ้าน เป็นการแสดงให้เห็นว่ากระท่อมมีประสิทธิภาพตามที่บ้านทีกไว้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการพัฒนาตำรับกระท่อมที่มีประสิทธิภาพ ทั้งทางกายภาพและชีวภาพ รวมทั้งความคงตัวของผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้สะดวก ง่ายในการพกพาและการเก็บรักษา ผู้วิจัยจึงประสงค์พัฒนาสารสกัดกระท่อมในรูปแบบไมโครอิมัลชัน และอิมัลเจล ซึ่งมีการใช้ทางเภสัชกรรมอย่างแพร่หลายเพื่อเพิ่มการละลายของตัวยา การนำส่งยาที่สามารถเพิ่ม การดูดซึมยาผ่านผนังเมมเบรน และผิวหนังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการเอาชนะการเป็นตัวกั้นของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม เพื่อเพิ่มการแทรกผ่านของตัวยา ทำให้สารสำคัญเข้าสู่ผิวหนังได้ดีกว่าสารละลายธรรมดาในรูปแบบดั้งเดิม ส่งผลต่อการช่วยเพิ่มสภาพพร้อมใช้ทางชีวภาพ (Kantarci et al., 2007)

สารมิตราไจนีนมีราคาแพงมาก ดังนั้นจึงต้องทำการสกัดจากใบกระท่อมและเปรียบเทียบกับความบริสุทธิ์กับ Mitragynine standard เพื่อนำสารมิตราไจนีนที่แยกได้ไปใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่ได้มาตรฐาน (validated method) ด้วยเครื่อง HPTLC Densitometer (CAMAG, Switzerland) เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ standardised extract ต่อไป ซึ่งวิธีนี้ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดกระท่อมมาก่อน จากนั้นสร้างแผนภาพภูมิภาคไตรภาคเทียมเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างภูมิภาคน้ำ ภูมิภาคน้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว ในการเกิดไมโครอิมัลชัน เมื่อได้ระบบแล้วจึงใส่สารสกัด แล้วทำเป็นอิมัลเจลที่มีสารสกัดกระท่อม 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมสารก่อเจลที่เหมาะสม ทดสอบความคงตัว หาขนาดอนุภาค ค่าศักย์ไฟฟ้า ซึ่งการทำอิมัลเจลที่มีไมโครอิมัลชันใส่สารสกัดของกระท่อมยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยด้วยการสกัด สารสกัดหยาบจากใบกระท่อม ทำการหาผลผลิต ร้อยละของสารสกัด ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay ศึกษาการต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตสารสื่อการอักเสบในหลอดทดลอง ควบคุมคุณภาพ สารสกัดจากใบกระท่อมด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ศึกษาความคงตัวของร่างกายภาพ ของผลิตภัณฑ์ สารสกัดจากใบกระท่อม จากนั้นนำมาพัฒนาไมโครอิมัลชันและอิมัลเจลที่มีสารสกัดใบกระท่อม เพื่อใช้ภายนอก โดยมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. กระดาษกรอง (whatman filter paper) เบอร์ 1
2. กระดาษลิตมัส (litmus paper pH 1-14)
3. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 และ 50 ml
4. กรวยกรอง (funnel) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm, 10 cm
5. กรวยแยก (separatory funnel) ขนาด 100, 250 ml
6. ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 500 และ 1000 ml
7. ขวดแก้วสีชา (bottle amber glass) ขนาด 150 และ 2500 ml
8. ขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 5, 10, 25, 50, 100, 500 และ 1000 ml
9. ขวดรูปชมพู่ (conical flask) ขนาด 250 และ 500 ml
10. ช้อนตักสาร (spatula) เบอร์ 2
11. ถ้วยระเหยสาร (evaporating dish) ขนาด 100 ml
12. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100 และ 500 ml
13. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 10 และ 15 ml
14. หลอดหยดสาร (dropper) ขนาด 10 ml
15. แท่งคนสาร (stirring rod) ขนาด 15 และ 20 cm
16. แผ่น TLC (Merck, 105554 silica gel F₂₅₄)
17. ไมโครปิเปตทิป (micropipette tips) Expellplus ขนาดไซส์ L
18. แผ่น HTLC (Merck, 105729 silica gel F₂₅₄)
19. Cell scraper (Corning, USA)
20. Glass column (40 x 500 mm)
21. Hemacytometer (Brand, Germany)
22. Silica gel column chromatography (Merck, 9385)
23. Spraying apparatus

24. TLC tank (Switzerland, CAMAG)
25. T-25 Tissue Culture flasks (Corning, USA)
26. 96 and 24 multi-well plate (Corning, USA)

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. สารมาตรฐาน mitragynine 95.4% (ChromaDex, USA)
2. Absolute ethanol (Sigma aldrich®)
3. Acetic acid (Merck, A.R. grade, USA)
4. Ammonia solution (28%) (J.T. Baker, USA)
5. Antibiotic/antimycin (Gibco, USA)
6. Autoclave (ALP, Japan)
7. Autopipette (Transferpette digital, Germany)
8. Bismuth subnitrate (Glenthams, Germany)
9. Chloroform (Sigma aldrich®)
10. Dichloromethane (Sigma aldrich®)
11. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)
12. Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Gibco, USA)
13. Ethanol 95% (Sigma aldrich®)
14. Ethyl acetate (Sigma aldrich®)
15. Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)
16. Griess reagent (Promega, USA.)
17. Hexane (B&J, ACS grade)
18. Iodine (Sigma aldrich®)
19. Lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-aldrich, Germany)
20. Luminex® reagent kits (Merck Millipore, Merck group, Darmstadt, Germany)
21. Methanol (Merck, A.R. grade, USA)
22. Nitric assay kit (Promega, USA)
23. Petroleum ether (Merck, A.R. grade, USA)
24. Picric acid (Chemical, USA)
25. Potassium iodide (KemAus™, Australia)
26. RAW 264.7 cells (American Type Culture Collection, USA)
27. Sodium sulfate (anhydrous) (Sigma aldrich®)

เครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. ตู้บลมร้อน (UNE 500 Memmert, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (MS204S Mettler Toledo, Switzerland)
3. เครื่องโซนิเคเตอร์ (Elma, Germany)
4. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco, USA)
5. เครื่องบดยา (Huangcheng, China)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Clay Adams) (Boeco centrifuge, Germany)
7. เครื่องผสมสารเคมี (vortex mixer) (Scientific Industries, USA)
8. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary evaporator) (Heidolph, Germany)
9. Biohazard laminar flow hood (Thermo Scientific MSC-Advantage, USA)
10. CO₂ Incubator (Benchmark, USA)
11. ELISA microplate reader (infinite M 200 Pro Tecan, Austria)
12. Homogenizer (D-500 Wiggins, Germany)
13. HPLC (Thermo Scientific Ultimate 3000, Germany)
14. HPTLC densitometer (CAMAG, Switzerland)
15. Light microscope (Nikon, USA)
16. Microplate reader (Perkin Elmer®, Em Sight 3400), (TECAN, USA)
17. UV-Visible spectrophotometer (Uvitec, UK)
18. Water bath (Mettmert, Germany)

การตรวจสอบตามข้อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (THP)

1. การเก็บตัวอย่างพืช

กระถ่อมสามารถแยกชนิดจากลักษณะของใบ ได้เป็นพันธุ์ก้านแดง แดงกวา และยักษ์ใหญ่ ซึ่งกระถ่อมพันธุ์ก้านแดงมีลักษณะเด่นชัดที่ก้านใบ เส้นกลางใบ และยอดอ่อนซึ่งมีสีแดงต่างจากพันธุ์อื่นซึ่งมีสีเขียว นอกจากนี้ใบกระถ่อมพันธุ์ก้านแดงจะเขียวเข้มกว่าพันธุ์อื่น (จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, 2560) เลือกเก็บใบกระถ่อมพันธุ์ก้านแดงที่มีความสมบูรณ์จากจังหวัดชุมพร ในช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2565 นำมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง เอาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำไปบดด้วยเครื่องบดยา แล้วนำผงกระถ่อมมาร้อนผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ 60 เก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง

2. การเก็บตัวอย่างพันธุ์ไม้ (Herbarium specimen)

นำแผ่นอัดพันธุ์ไม้ขนาดประมาณ 30x45 เซนติเมตร 1 แผ่น วางไว้ชั้นล่างสุด จากนั้นนำกระดาดลูกฟูก 1 แผ่นมาวาง แล้วนำกระดาดหนังสือพิมพ์ 4 คู่ พับครึ่งมาวางทับ เลือกกิ่งของต้นกระถ่อมที่มีมดหรือแมลงประกอบของใบ และดอกที่มีความสมบูรณ์ ใช้กรรไกรตัดกิ่งไม้ตัดแต่งให้กิ่งของต้นกระถ่อมพอดีกับกระดาดหนังสือพิมพ์ เรียงใบให้มีลักษณะคว่ำบ้าง หงายบ้าง เพื่อให้เห็นลักษณะของใบทั้ง 2 ด้าน นำกระดาดหนังสือพิมพ์ 4 คู่พับครึ่งวางทับ แล้วจึงนำกระดาดลูกฟูกวางทับตามด้วยแผ่นอัดพันธุ์ไม้ 1 แผ่น รัดให้แน่นด้วยเชือก จากนั้นนำไปตากแดด หรือนำไปอบด้วย

ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อพันธุ์ไม้แห้งดีแล้ว นำมาอบน้ำยากันแมลงประกอบด้วยฟีนอล (Phenol) 20 มิลลิลิตร เมอร์คิวริกคลอไรด์ 75 กรัม เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำน้ำยาเทลงในอ่างเคลือบ ใช้ปากคืบ คืบตัวอย่างพันธุ์ไม้ลงไปแช่ในน้ำยาประมาณ 1 นาที จากนั้นคืบพันธุ์ไม้มาวางบนกระดาษซับ นำมาอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำพันธุ์ไม้ที่แห้งสนิทแล้วมาติดกาวที่ประกอบด้วยกัมอาราบิก (Gum Arabic) 300 กรัม กัมทรากาแคนท์ (gum tragacanth) 50 กรัม แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัม ไธมอล (Thymol) 1 กรัม น้ำ 1,000 มิลลิลิตร การทำกาวให้น้ำกัมอาราบิก มาละลายกับน้ำ 500 มิลลิลิตร นำไปตั้งไฟอ่อน คนจนละลาย เมื่อละลายหมดกรอง 1 ครั้ง พักไว้ นำกัมทรากาแคนท์ผสมกับแป้งมันสำปะหลังให้เข้ากัน เทลงในกัมอาราบิกที่กรองแล้ว นำมาตั้งไฟอ่อน ๆ หมั่นคนตลอดเวลา เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร เติม thymol ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เย็น จึงนำมาติดพันธุ์ไม้ ลงบนกระดาษสีขาวชนิด 300 กรัม (กาญจนา สาลีดีด, 2551) ขนาด 11.5x16.5 นิ้ว ติดป้ายบันทึกข้อมูลในตัวอย่างพันธุ์ไม้ เมื่อกาวแห้งดีแล้วนำมาเย็บให้เรียบร้อย แล้วนำตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งส่งพิพิธภัณฑ์สมุนไพรมหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์และการแพทย์ทางเลือก

3. การวิเคราะห์ตามข้อกำหนดตำรายามาตรฐานสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2564)

3.1 คุณสมบัติทาง physico-chemical

3.1.1 ปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล การวิเคราะห์ปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอลมีขั้นตอนดังนี้

1) ชั่งผงยาอย่างแม่นยำ น้ำหนัก 5 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีจุลปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร

2) เติมตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร ให้ท่วมผงยา ปิดจุลขวดให้สนิท เขย่าอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลานาน 6 ชั่วโมง และตั้งทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง

3) กรองผ่านกระดาษกรอง และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตร จากนั้นแบ่งสิ่งสกัดปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในถ้วยระเหยแห้งที่ผ่านการอบแห้ง และชั่งน้ำหนักไว้อย่างแม่นยำ

4) นำไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ และนำสิ่งสกัดที่แห้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลายระเหยหมด ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก

5) อบที่ 105 องศาเซลเซียส ต่ออีก 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก

6) ทำซ้ำข้อที่ 5 จนได้น้ำหนักคงที่ โดยให้มีความต่างน้ำหนักไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวอย่างที่นำมา

7) คำนวณหาปริมาณสิ่งสกัดในเอทานอล เป็นร้อยละของน้ำหนักสิ่งสกัดต่อน้ำหนักผงยา

3.1.2 ปริมาณเถ้ารวม (Total ash) ปริมาณเถ้ารวม เป็นค่าที่บ่งถึงเถ้าของสารอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรมีขั้นตอนดังนี้

1) นำถ้วยทนความร้อนที่อบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักไว้อย่างแม่นยำ

2) ชั่งผงยาอย่างแม่นยำ น้ำหนัก 2-3 กรัม ใส่ในถ้วยทนความร้อนตามข้อ 1

3) ควรเผาบนเตาแผ่นร้อนให้หมดควันก่อน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาโดยค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิจนถึง 450 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าขาว นำออกจากเตาเผาแล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและเถ้าที่เหลือในถ้วย

4) เผาต่อไปอีก 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและเถ้าที่เหลือในถ้วย

5) ทำซ้ำข้อที่ 4 จนได้น้ำหนักคงที่ โดยให้มีความต่างน้ำหนักไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวอย่างที่นำมา

6) กรณีที่เถ้าไม่ขาว ให้นำเถ้ามาล้างด้วยน้ำร้อน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองชนิดไรเถ้า อบตะกอนพร้อมกระดาษกรองและน้ำล้างเถ้าให้แห้ง แล้วใส่ลงในถ้วยทนความร้อน ทำซ้ำข้อ 3- 5

7) คำนวณปริมาณเถ้ารวม เป็นร้อยละของน้ำหนักเถ้าต่อน้ำหนักผงยา

3.1.3 ปริมาณเถ้าไม่ละลายในกรด (Acid insoluble ash)

เป็นค่าที่บ่งถึงเถ้าของสารอนินทรีย์ ซึ่งเป็นเถ้าของสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่ปนมากับสมุนไพร เช่น ดิน, กรวด และทราย การหาปริมาณเถ้าไม่ละลายในกรด มีขั้นตอนดังนี้

1) เติมกรดเกลือเจือจาง 25 มิลลิลิตร ลงในเถ้าที่ได้จากการวิเคราะห์เถ้ารวมทั้งหมดและให้ความร้อนบนหม้ออังไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที

2) กรองด้วยกระดาษกรองชนิดไรเถ้า และล้างตะกอนเถ้าที่ได้ด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด

3) อบตะกอนพร้อมกระดาษกรองชนิดไรเถ้าให้แห้งแล้วใส่ลงในถ้วยทนความร้อนที่ทราบน้ำหนักอย่างแม่นยำ

4) นำไปเผาที่ 450 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและเถ้าที่เหลือในถ้วย

5) เผาต่อไปอีก 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและเถ้าที่เหลือในถ้วย

6) ทำซ้ำข้อที่ 5 จนได้น้ำหนักคงที่ โดยให้มีความต่างน้ำหนัก ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวอย่างที่นำมา

7) คำนวณปริมาณเถ้าไม่ละลายในกรดเป็นร้อยละของน้ำหนักเถ้าต่อน้ำหนักผงยา

3.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นหายไปเมื่ออบแห้ง (Loss on drying) มีขั้นตอนดังนี้

1) นำถ้วยทนความร้อนที่อบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักไว้อย่างแม่นยำ

- 2) ชั่งผงยาอย่างแม่นยำ น้ำหนัก 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยทนความร้อนตามข้อ 1 โดยเกลี่ยให้ผงยากระจายตัวสม่ำเสมอ สูงไม่เกิน 10 มิลลิเมตร
 - 3) อบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
 - 4) ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและผงยาที่อยู่ในถ้วย
 - 5) อบต่อในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส อีก 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักถ้วยทนความร้อนและผงยาที่อยู่ในถ้วย
 - 6) ทำซ้ำข้อที่ 1.4.5 จนได้น้ำหนักคงที่ โดยให้มีความต่างของน้ำหนักไม่เกิน 2.5 มิลลิกรัมต่อกรัมของตัวอย่างที่นำมา
 - 7) คำนวณปริมาณความชื้น เป็นร้อยละของน้ำหนักน้ำต่อน้ำหนักผงยา
- 3.1.5 สิ่งปนเปื้อน (Foreign matter) นำผงกระท่อม 100 กรัม แผลออกเป็นผิวบาง ๆ เลือกสิ่งปนเปื้อนออกด้วยมือ ชั่งหาน้ำหนัก โดยใช้สูตร (3.1)

$$\% \text{ Foreign matter} = \frac{W_2}{W_1} \times 100 \quad (1)$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ

W_2 = น้ำหนักสิ่งแปลกปลอมที่แยกได้

3.2 การตรวจสอบทางด้านพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นและการศึกษา TLC fingerprint จากสารสกัดกระท่อม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล

3.2.1 การเตรียมสารสกัดกระท่อม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ชั่งผงกระท่อม บดละเอียด 50 กรัม เติมเอทานอล 500 มิลลิลิตร ใช้วิธีการสกัดแบบหมัก (Maceration) 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น จึงชั่งน้ำหนักของสารสกัด (crude extracts)

3.2.2 การตรวจสอบด้านพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นของใบกระท่อม (Ayoola et al., 2008; Siddiqui et al., 2009; นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ, 2544) ทำการตรวจสอบกลุ่มสารพิษเคมีต่าง ๆ ในใบกระท่อม ดังนี้

- 1) การทดสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinone) ชั่งผงกระท่อมมา 500 มิลลิกรัม เติม 0.5 นอร์มอล โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (0.5 N KOH) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 1 มิลลิลิตร ต้ม 10 นาที นำมากรอง เก็บของเหลวที่ผ่านการกรองแล้ว (filtrate) เติมกรดอะซิติกบริสุทธิ์ (glacial CH_3COOH) แล้วนำมาสกัดด้วยเบนซีน (C_6H_6) 10 มิลลิลิตร เก็บชั้นสารสกัด เบนซีนแล้วนำมาเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (NH_4OH T.S.) หากมีสารแอนทราควิโนนจะเกิดสีชมพูในชั้นล่าง (Modified Borntrager's)

- 2) การทดสอบแลคโตนไกลโคไซด์ (Lactone glycoside) ชั่งผงกระท่อมมา 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ใส่ น้ำลงไปให้พอชื้น แล้วปิดปากหลอดด้วยกระดาษชุบสารละลายที่มี โซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (20% NaOH) ไปอังบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

5 นาที จากนั้นนำกระดาษกรองไปส่องภายใต้แสง UV long wave สังเกตการเรืองแสง ในส่วนของผงกระท่อมที่อยู่ในหลอดทดลองให้เติม 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 15 นาที นำมากรองสารสกัดแล้วนำไประเหยแอลกอฮอล์ออก นำส่วนของสารสกัดที่ได้มาหยด (spot) บนกระดาษกรองที่ชุบสารละลายที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปสังเกตการเรืองแสงภายใต้ UV long wave

3) การทดสอบไซยาโนติกไกลโคไซด์ (Cyanotic glycoside) ชั่งผงกระท่อม 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำให้ขึ้นพอควร หยดคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) จำนวน 1-2 หยด ปิดปาก หลอดทดลองด้วยจุกคอร์กที่มีกระดาษกรองที่ชุบด้วยสารละลายกรดพิคริก (sodium picrate paper) แขนงอยู่ นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิ สังเกตสีที่ได้

4) การทดสอบหาซาโปนิน (saponin) ชั่งผงกระท่อม 500 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำร้อน 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเขย่าแรง ๆ 10 วินาที จากนั้นจึงนำมารองเก็บของเหลวที่ผ่านการกรองแล้ว นำมาใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ 10 วินาที สังเกตฟองที่เกิดขึ้น ถ้ามีฟอง ให้หยด 2 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (2N HCl) 1 หยด หากมีซาโปนินฟองจะยังคงอยู่

5) การทดสอบหาฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชั่งผงกระท่อมจำนวน 80 กรัม หมักในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน แล้วนำมารอง ปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้มา 5 กรัม นำไประเหยแอลกอฮอล์ออกให้แห้ง แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก 1 มิลลิลิตร และริบบิ้นแมกนีเซียม (Mg-Ribbon) หากพบฟลาโวนอยด์ จะเกิดสีชมพู เติมออกทานอล (Octanol) เพื่อดูการละลายของสีที่เกิดขึ้น หากเป็นไกลโคไซด์ จะอยู่ในชั้นน้ำ หากเป็นอะกลัยโคนจะอยู่ในชั้นออกทานอล

6) การทดสอบหาแทนนินและสารประกอบโพลีฟีนอล (Tannins and Polyphenolic compounds) ชั่งผงกระท่อม 80 กรัม หมักในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมารอง ปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้แบ่งออกเป็น 10 ส่วน โดยนำสารสกัด 3 ส่วน มาระเหยแอลกอฮอล์ออกให้แห้ง จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น (H_2O) จำนวน 20 มิลลิลิตร แล้วหยดด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จำนวน 3 หยด จะได้สารละลาย (Soln.) ช้อน กรองเก็บของเหลวที่ผ่านการกรองแล้ว (filtrate) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ใส่ในหลอดทดลองอย่างละเท่า ๆ กัน หลอดทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม หลอดทดลองที่ 2 เติมเจลาติน (Gelatin) และหลอดทดลองที่ 3 เติมเจลาตินซอลต์ (Gelatin salt) หากมีแทนนิน หลอดที่ 2 และ 3 จะขุ่น จากนั้นนำสารสกัดที่เหลือมาระเหยแอลกอฮอล์ออกให้ปริมาตรลดลงครึ่งหนึ่ง จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นให้เท่ากับปริมาตรของแอลกอฮอล์ที่ระเหยออกไป แล้วเติม 10 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 3 หยด นำมากรองเก็บของเหลวแบ่งใส่ในหลอดทดลอง 5 ส่วนเท่า ๆ กัน โดยหลอดทดลองที่ 4 เติมเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) หลอดทดลองที่ 5 เติมโบรมีนวอเตอร์ (Bromine water) หลอดทดลองที่ 6 เติม Fomalin-HCl และหลอดทดลองที่ 7 เติม Lime water โดยหลอดที่ 5-7 จะบ่งชี้ชนิดของแทนนิน และหลอดที่ 4 บ่งชี้ว่ามีสารฟีนอลิก

7) การทดสอบหาอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ชั่งผงกระพุ่ม 80 กรัม หมักในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรอง ปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้มาซึ่งจำนวน 25 กรัม นำมาระเหยแอลกอฮอล์ออกให้แห้ง แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 15 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำสารสกัดที่ได้ 10 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำให้เป็นต่างด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (conc. NH_4OH) แล้วนำมาใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง เก็บสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์ม นำสารสกัดที่ได้หยดบนกระดาษกรอง ฟันด้วยน้ำยา ดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff spray reagent) หากพบอัลคาลอยด์จะเปลี่ยนเป็นสีส้ม ส่วนที่ 2 นำสารสกัด 5 มิลลิลิตร มาทดสอบด้วยวิธี Precipitation test กับ Alkaloidal reagent โดยสารทดสอบดราเจนดอร์ฟ จะได้ตะกอนสีส้ม สารทดสอบ Hager จะได้ตะกอนสีเหลือง สารทดสอบ Marme จะได้ตะกอนสีขาว สารทดสอบ Tannic acid จะได้ตะกอนสีขาว สารทดสอบ Wagner จะได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง

8) การทดสอบหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) ชั่งผงกระพุ่มจำนวน 80 กรัม หมักในเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรอง ปรับปริมาตรของสารสกัดให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม : 1 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้มาซึ่งจำนวน 20 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม 10 เปอร์เซ็นต์ เลด (II) อะซิเตท (10% Lead acetate) 50 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 15 นาที จากนั้นกรองเก็บสารสกัดนำไปใส่ในกรวยแยกขนาด 250 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เก็บสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์มแล้วเติมโซเดียมซัลเฟต (anh. Na_2SO_4) เพื่อกำจัดน้ำออกไป นำสารสกัดที่ได้มาระเหยคลอโรฟอร์มออกให้เหลือ 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดที่ได้มาแบ่งออกเป็น 3 ส่วน เพื่อทดสอบหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ด้วยวิธี Kedde's, Keller-killiani's และ Liebermann Burchard's การทดสอบด้วยวิธี Kedde's เพื่อตรวจสอบ unsaturated lactone moiety นำสารสกัดที่ได้ (conc. CHCl_3 ext.) 2 มิลลิลิตร มาใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วนำไประเหยให้เกือบแห้งด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิแล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติม Kedde's 0.5 มิลลิลิตร และหยดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 1 นอร์มอล (N NaOH) 3 หยด หากมีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงชมพูหรือม่วงน้ำเงิน การทดสอบด้วยวิธี Keller-killiani's เพื่อตรวจสอบส่วนประกอบของน้ำตาลที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (2-deoxy sugar) นำสารสกัดคลอโรฟอร์มเข้มข้น 3 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลอง เติมนิเออร์ริกคลอไรด์ รีเอเจนต์ (FeCl_3 reagent) 3 มิลลิลิตร แล้วเทกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) ลงข้าง ๆ หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร สังเกตสีตรงรอยต่อในหลอดทดลอง การทดสอบด้วยวิธี Liebermann Burchard's เพื่อตรวจสอบหาสเตียรอยด์นิวเคลียส (steroid nucleus) นำสารสกัดที่ได้ (conc. CHCl_3 ext.) 2 มิลลิลิตร มาใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วนำไประเหยให้เกือบแห้งด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ หยดอะซิติกแอนไฮไดรด์ (Acetic anhydride) 3 หยด แล้ว หยดด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 1 หยด หากพบสเตียรอยด์จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว

การศึกษาด้านเคมี

1. การเตรียมสารสกัดแบบแช่หมัก (Maceration)

1.1 นำตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร เทใส่ลงในผงกระท่อม 200 กรัม อัตราส่วน 1: 10 โดยมวลต่อปริมาตร หมักทิ้งไว้ 7 วัน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ปิดฝาพอแน่น คนสารละลายทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เพื่อให้ตัวทำละลายและผงกระท่อมเข้ากัน และเพื่อให้ตัวทำละลายดึงสารสำคัญออกจากผงกระท่อมมากที่สุด

1.2 นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

1.3 นำสารสกัดที่ได้จากการกรอง มาจำกัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ภายใต้ความดัน 190 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการหมุน 60 รอบต่อนาที

1.4 ทำให้แห้งด้วยการแช่แข็ง ซึ่งน้ำหนักที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาผลผลิตร้อยละ (% Yield) ของสารสกัดหยาบโดยคำนวณ ดังสมการที่ 2

$$\text{ผลผลิตร้อยละ} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของสารที่ใช้ในการสกัด (กรัม)}} \times 100 \quad (2)$$

2. การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Chewchinda et al., 2019)

หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดกระท่อม (95% EtOH) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ฟอลิน-ซิโอแคลตู (เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10) ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วนำมาเติมโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณค่าที่ได้ในรูปของมิลลิกรัม กรดแกลลิกเทียบเท่าต่อกรัม สารสกัด (gallic acid equivalent, GAE/g extract)

3. การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Sithisarn et al., 2015)

หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี aluminium chloride method โดยเตรียมสารมาตรฐานเคอควิทิน (quercetin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางความเข้มข้นให้ได้ 10, 20, 30, 40 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดกระท่อม (95% EtOH) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติมด้วย 2 เปอร์เซ็นต์อะลูมิเนียมคลอไรด์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอทานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณค่าที่ได้ในรูปของมิลลิกรัมเคอควิทินเทียบเท่าต่อกรัม สารสกัด (quercetin equivalent, QE/g extract)

4. การพัฒนาระบบ Thin-layer chromatography เพื่อการตรวจสอบมิตราไจนีน

วิธีการทำ Thin-layer chromatography

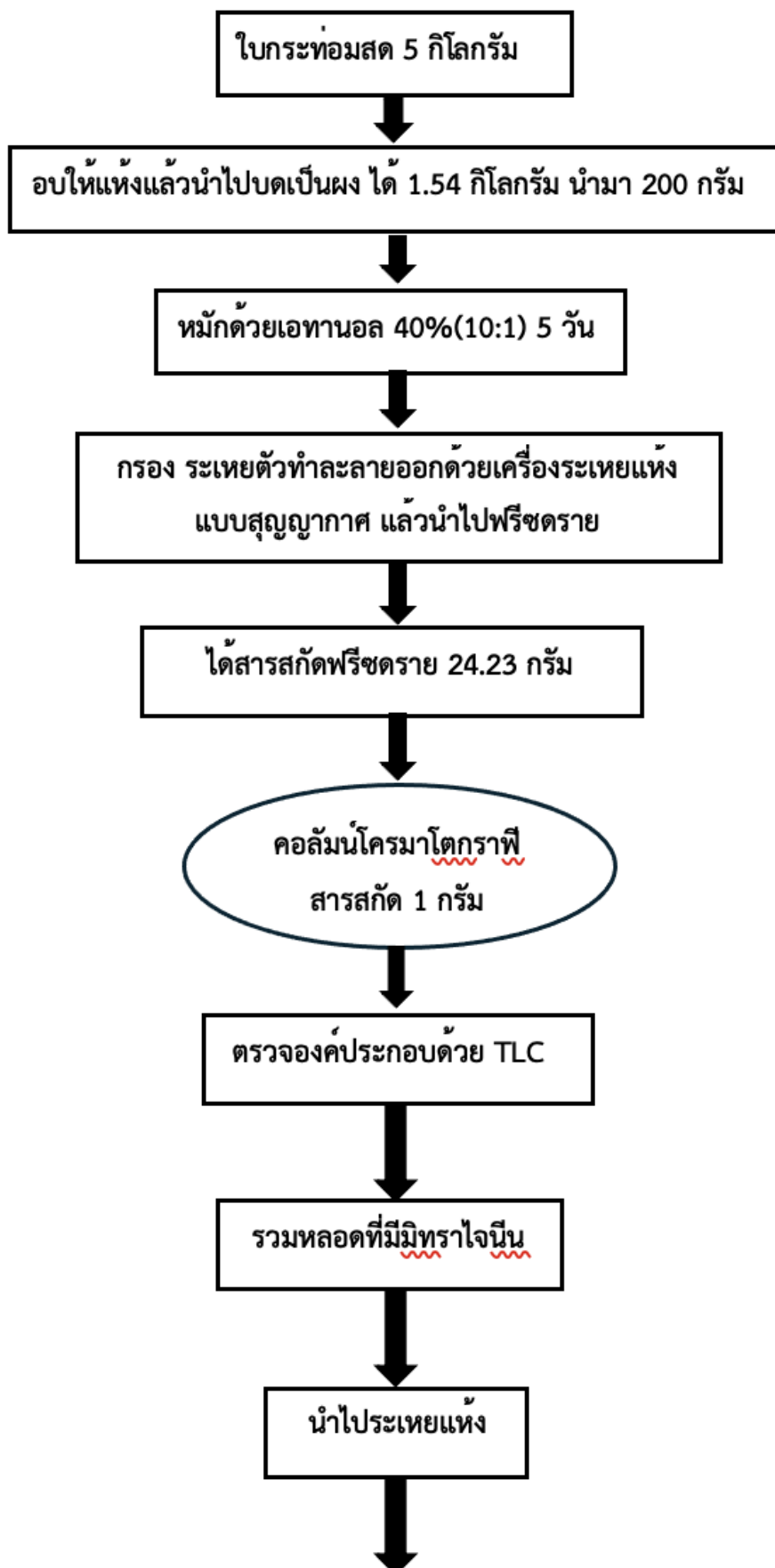
- 1) ละลายสารสกัดหยาบใบกระท่อม 10 มิลลิกรัม ด้วยคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร
- 2) หยดสารละลายจากข้อ 1 ลงบนแผ่น TLC ด้วย capillary ห่างจากขอบด้านล่าง 10 มิลลิเมตร
- 3) เตรียมเฟสเคลื่อนที่ โดยมีส่วนผสมของ Solvent A และ Solvent B = 99 : 5
Solvent A = CHCl_3 99 mL + 1 mL NaOH 0.2 N in MeOH , Solvent B = MeOH) ใส่แผ่น TLC ลงในแท่งค์ ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่บนแผ่น TLC 70 มิลลิเมตร แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกมาวางทิ้งไว้ให้แห้ง
- 4) ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ภายใต้แสงปกติ (White light แสง Short Wave UV (254 นาโนเมตร) และแสง Long Wave UV (365 นาโนเมตร) ตรวจเช็คว่ามีสารอัลคาลอยด์อยู่หรือไม่ ด้วยการ Spray dragendorff's ลงบนแผ่น TLC
- 5) คำนวณค่า R_f เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่าง ๆ (ตัวดูดซับ, ตัวทำละลายและความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด โดยใช้สมการ 3 (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ, 2551)

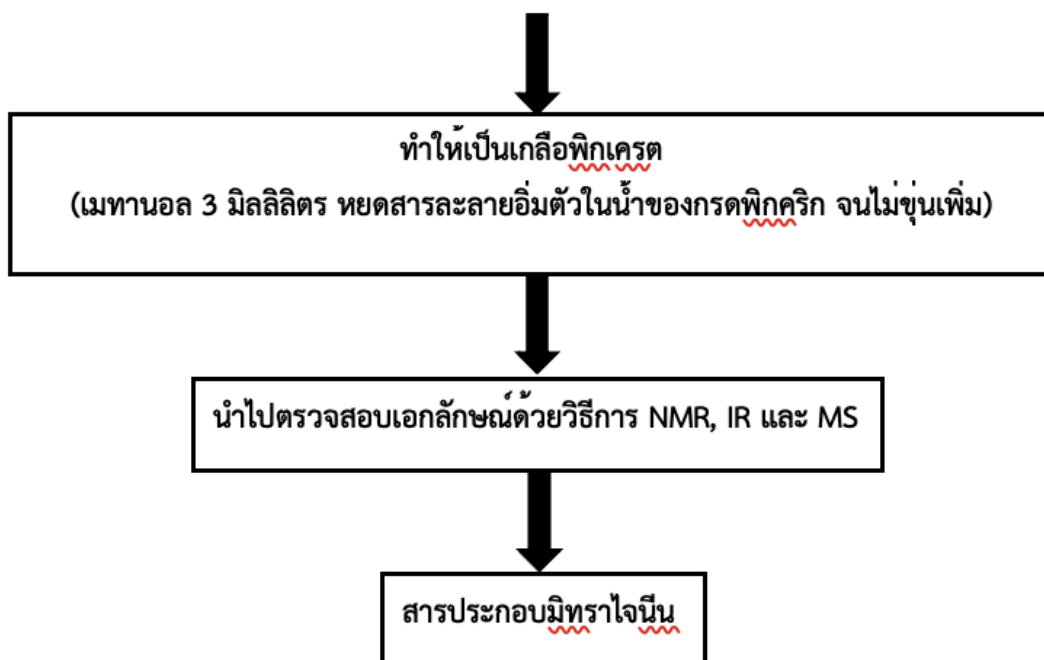
$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad (3)$$

5. การแยกมิตราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยใช้คอลัมน์แก้วขนาด 4 x 40 เซนติเมตร ที่มีแผ่นกรองด้านล่างพร้อมวาล์วเทฟลอนเพื่อควบคุมการไหลสำหรับเฟสคงที่ใช้ซิลิกาเจลชนิด 9385 ที่มีขนาด 40-63 ไมครอนในการแยกสาร (Still et al, 1978) จากการทดลองพบว่าต้องทำให้ซิลิกาเจลมีสมรรถนะ (activity) ระดับ 5 (Luanratana, et al, 1982) เพื่อลดอำนาจในการดูดซับสาร โดยชั่งมา 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักซิลิกา) คนให้ทั่ว ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และใช้เฟสเคลื่อนที่ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยการเตรียม 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนผสมนี้ 5 มิลลิลิตร ผสมกับคลอโรฟอร์ม 95 มิลลิลิตร ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่รวม 600 มิลลิลิตร นำไปเตรียมซิลิกาเจลในคอลัมน์แก้ว โดยเปิดวาล์วด้านล่างให้เฟสเคลื่อนที่ไหลออกได้ ลดการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ และช่วยให้ซิลิกาเจลอัดตัวเป็นแท่งเปิดวาล์วไว้จนได้ขนาดของแท่งคงที่ ประมาณ 11.5 เซนติเมตร จึงปิดวาล์วค่อย ๆ โรยทรายทะเลสีขาว (white sea sand) ลงบนคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ให้ได้ความสูงของแถบทราย 0.5 เซนติเมตร ปิดทับหน้าทรายด้วยแผ่นวงกลมสำลีบริสุทธิ์ นำตัวอย่างสารสกัดเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ 1 กรัม ที่ผสมกับ 2.5 กรัม ของซิลิกาเจล 9385 โรยลงบนแผ่นสำลีที่วางทับบนแถบทรายเหนือคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ค่อย ๆ เติมเฟสเคลื่อนที่ผ่านกรวยแก้วก้านยาวปลายแตะกับผนังคอลัมน์เพื่อให้ตัวทำละลายไหลลงไปตามด้านข้างคอลัมน์แก้วอย่างช้า ๆ ในปริมาณที่เพียงพอต่อการชะตัวอย่างลงสู่แถบทรายและเคลื่อนลงแท่งคอลัมน์ (column bed) จากนั้นเติมเฟสเคลื่อนที่และทำการชะล้าง (elute) ด้วยอัตราการใช้ 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 นาที เก็บสารชะล้าง (eluate)

ด้วยหลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 60 หลอด ตรวจสอบประกอบในหลอดโดยการ
ใช้ TLC เก็บส่วนที่มีทราเจนิน นำไปประเหยตัวทำละลายออก เก็บในรูปของเกลือฟิเกรตโดยใช้
เมทานอล 3 มิลลิลิตร หยดสารละลายอิมัตวในน้ำของกรดฟิเกรต จนไม่ชุ่มเพิ่ม นำไปวัด
จุดหลอมเหลว แล้วพิสูจน์โครงสร้างด้วย ^1H NMR, IR, MS





ภาพที่ 3.1 แสดงการแยกมิทราไจนีนจากสารสกัดใบกระท่อมด้วย 40 % เอทานอล

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของมิทราไจนีนฟิกเครต

1) วิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) (NMR Proton และ Carbon) ซึ่งสารมิทราไจนีนฟิกเครต 5 มิลลิกรัม นำมาละลายในตัวทำละลายดีวเทอโรคลอโรฟอร์ม (CDCl_3) นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ascend TM600/Avance III HD

2) วิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) นำมิทราไจนีนฟิกเครต 5 มิลลิกรัม มาเตรียมเป็น KBr pellet แล้วนำไปวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเครื่อง Invenio S Fourier Transform Infrared Spectrometer

3) วิเคราะห์ด้วยวิธี Mass spectrometry นำมิทราไจนีนฟิกเครต 5 มิลลิกรัม มาหามวลโมเลกุล ด้วยเครื่อง MALDI-TOF Mass Spectrometer ที่มีเทคโนโลยี SpiralTOF™ (JEOL JMS-S3000, JEOL, USA) โดยใช้โหมด สไปรัล (Spiral mode) และใช้สาร α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid เป็นเมทริกซ์ ทำหน้าที่เป็นตัวกลางช่วยรับพลังงานจากเลเซอร์ แล้วถ่ายเทประจุและพลังงานไปยังโมเลกุลของสารมิทราไจนีนฟิกเครตที่ต้องการวิเคราะห์

7. การหาปริมาณมิทราไจนีนด้วย HPLC ตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2021 Supplement 2023

ซึ่งสารมาตรฐานมิทราไจนีน 1 มิลลิกรัม ละลายด้วยตัวทำละลาย (เมทานอล : 0.1% acetic acid อัตราส่วน 8:2) ในขวดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิทราไจนีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 60, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองความละเอียด 0.45 ไมครอน

ซังสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) 5 มิลลิกรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย (เมทานอล : 0.1% acetic acid อัตราส่วน 8:2) ได้ความเข้มข้นของสารสกัดกระท่อม 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และซังสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 2.5 มิลลิกรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย (เมทานอล : 0.1% acetic acid อัตราส่วน 8:2) ได้ความเข้มข้นของสารสกัดกระท่อม 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองความละเอียด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC Method โดยใช้คอลัมน์ C₁₈ ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาดคอลัมน์ 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร เตรียม Buffer โดยการชั่ง ammonium acetate 1.54 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glacial acetic acid ปรับ pH ให้เป็น 6 หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เตรียมวฏภาคเคลื่อนที่ โดยใช้ Buffer ต่อ acetonitrile ในอัตราส่วน 35:65 มิลลิลิตร ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของวฏภาคเคลื่อนที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ความยาวคลื่นที่ UV 225 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

8. การตรวจสอบความถูกต้องในวิธีวิเคราะห์ปริมาณมิทราไจนีนด้วย HPTLC

วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จำเป็นต้องได้รับการประเมินว่ามีความเหมาะสม สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้ถูกต้อง แม่นยำ เชื่อถือได้ตามวัตถุประสงค์ Parameters ที่ควรพิจารณาในการทำ method validation (สุภาณี ดวงธีรปรีชา, 2561) ได้แก่

8.1 ความจำเพาะ (Specificity)

Specificity หมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการตรวจวัด สารเป้าหมาย (mitragynine) โดยไม่ถูกรบกวนจากสารอื่นในสารสกัด (matrix) ในงานนี้ได้ ทำการทดสอบความจำเพาะโดยการฉีดสารมาตรฐานมิทราไจนีน เพื่อหาค่า R_f และฉีดสารสกัดกระท่อม วิเคราะห์ค่า R_f ของมิทราไจนีนในสารสกัดและดูการแยก (resolution) จากสารอื่น ๆ

8.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ความเป็นเส้นตรง คือ ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการให้สัญญาณ ตอบสนอง (พื้นที่พีค, AU) ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณของสารมาตรฐานภายในช่วง ความเข้มข้นที่กำหนด โดยใช้สารมาตรฐานมิทราไจนีน ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงบนแผ่น TLC ในปริมาตร 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ การประเมิน linearity ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง คำนวณหา regression line โดยวิธี least squares ให้ x คือปริมาณ (ng/spot) และ y คือสัญญาณ AU ใช้สมการเชิงเส้น $y = mx + b$ คำนวณค่า m (slope) และ b (intercept)

8.2.1 ช่วงระดับความเข้มข้นต่ำสุดและสูงสุด (Range) ที่วิธีวิเคราะห์นั้นมีค่า linearity, accuracy และ precision ที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์ที่กำหนด ในงานวิเคราะห์ควรให้ครอบคลุมช่วง 80-120 เปอร์เซ็นต์ ของ test concentration ซังสารมาตรฐานมิทราไจนีน 1 มิลลิกรัม ในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิทราไจนีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงบนแผ่น TLC ในปริมาตร 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละระดับความเข้มข้น นำค่าพื้นที่พีค (peak area) ที่ได้มาวิเคราะห์หาความเป็นเส้นตรงด้วยวิธีถดถอยเชิงเส้นแบบ least squares และพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r หรือ r²) ควบคู่กับ

ค่าความแม่นยำ (precision; %RSD) และค่าความเที่ยง (accuracy; %recovery) ในแต่ละระดับความเข้มข้น โดยกำหนดให้ค่าที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ที่ค่า $r^2 \geq 0.99$

8.2.2 ความถูกต้อง (Accuracy) คือความใกล้เคียงระหว่างค่าที่วัดได้ (Measured) กับค่าจริงหรือค่าที่เติมลงไป (True vs Added) ซึ่งประเมินโดยการเติมสารมาตรฐาน ลงในตัวอย่าง (spiking) แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% Recovery) ตามสมการ 4

$$\% \text{ Recovery} = (C_{\text{measured}} / C_{\text{added}}) \times 100 \quad (4)$$

ผสมสารละลายสารมาตรฐานมัทราไจนีน (200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2, 6 และ 14 ไมโครลิตร กับสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) 2 ไมโครลิตร แล้วใส่ส่วนผสมนี้ทั้งหมด (4, 8 และ 16 ไมโครลิตร) ลงบนแผ่น TLC รวมทั้งสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC เพื่อเป็น blank แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารมัทราไจนีนด้วยเครื่อง HPTLC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (9 determinations) เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ (measured results) กับค่าความเป็นจริง (theoretically expected results) แล้วคำนวณเป็นค่าร้อยละการกลับคืน (percent recovery)

8.2.3 ความเที่ยง (Precision) คือ ความสามารถของวิธีในการให้ผล วิเคราะห์ซ้ำที่ใกล้เคียงกัน โดยประเมินจากร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ซึ่งคำนวณจาก $\% \text{ RSD} = (\text{SD} / \text{Mean}) \times 100$ แบ่งเป็น

Intraday Precision หรือ Repeatability คือการแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ซ้ำที่ทำในสภาวะเดียวกันในวันเดียวกัน

Interday Precision คือการแสดงความแม่นยำของการวิเคราะห์ชุดการวิเคราะห์ที่ทำซ้ำ 3 วัน ต่อเนื่องกัน

ในงานนี้ได้พิจารณา Precision ของสัญญาณจากมาตรฐานมัทราไจนีนจาก TLC (รวม 9 determinations) แล้วคำนวณ Mean, SD และ % RSD

8.2.4 Detection limit หรือ Limit of detection (LOD) คือ ค่าขีดจำกัดการตรวจพบคำนวณตามแนวทางของ ICH Q2(R1) โดยใช้ความชันของเส้นมาตรฐาน (m) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเส้นตรง (σ , Standard Error) ตามสมการ $\text{LOD} = 3.3\sigma / m$ โดยคำนวณจากกราฟเส้นตรง

8.2.5 Quantitation limit หรือ Limit of quantitation (LOQ) คือขีดจำกัดการหาปริมาณ หรือปริมาณต่ำสุดของสารที่วิเคราะห์ได้ ตามสมการ $\text{LOQ} = 10\sigma / m$ โดยคำนวณจากกราฟเส้นตรง

9. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) โดยวิธี High Performance Thin layer chromatography (HPTLC) ของสารสกัดเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ของใบกระท่อม โดยใช้ TLC system ดังนี้

Adsorbent = Silca gel F₂₅₄ , Alufolien (Merck)

Solvent A = CHCl₃ 99 mL + 1 mL NaOH 0.2 N in MeOH

Solvent B = MeOH

Mobile phase = Solvent A : B (99 : 5)

Tank saturation = 30 นาที

Detection = UV 254 นาโนเมตร

เตรียมสารมาตรฐานมัทราไจเนน โดยการชั่งสารละลายมาตรฐานมัทราไจเนน 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 5 มิลลิตร มีความเข้มข้นเท่ากับ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเตรียม ตัวอย่างสารสกัดใบกระท่อม โดยนำผงใบกระท่อม 2 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิตร นำไปโชนิกเตต 30 นาที โดยไม่ใช้ความร้อน นำสารสกัดที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิตรนำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 2.3 มิลลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิตร ปรับปริมาตรโดยการเติมตัวทำละลายเอทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 2.7 มิลลิตร มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

ตั้งพารามิเตอร์เครื่อง Linomat 5 ผ่านโปรแกรม HPTLC Software vision CATS โดยตั้งค่า Y ที่ 10 มิลลิเมตร จากขอบล่างของแผ่น TLC ความยาว (length) ของแถบตัวอย่างที่ฉีด ลงบนแผ่น (วัดตามแนวนอน) เท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร ค่า X ตำแหน่งแรก ตั้งที่ 20 มิลลิเมตร ค่าระยะห่างระหว่างแถบ (distance) ตัวอย่างแต่ละแถบบนแผ่น TLC เท่ากับ 11.4 มิลลิเมตร ค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง Scanner 4 กำหนดให้ความเร็วในการสแกน (Scanning speed) อยู่ที่ 40 มิลลิเมตรต่อวินาที ค่าความละเอียดของการอ่านข้อมูลของเครื่องสแกน (Data resolution) อยู่ที่ 200 ไมโครเมตรต่อ การสแกน ขนาดช่อง (Slit) กำหนดที่ 8×0.2 มิลลิเมตร เตรียมแผ่น วิเคราะห์โดยพ่นสารละลาย มัทราไจเนน ลงบนแผ่น TLC (Silica gel 60F₂₅₄ ขนาด 20×10 เซนติเมตร) ใส่ลงในแผ่น TLC ปริมาตร 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครลิตร ทำ 2 ซ้ำ นำสารสกัด ที่ได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ทำ 3 ซ้ำ ใส่ลงในแผ่น TLC เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 70 มิลลิเมตร จึงนำแผ่น TLC ออกมาวางทิ้งไว้ให้แห้ง ความยาวคลื่นที่ใช้วัด คือ 254 นาโนเมตร

การศึกษาด้านชีวภาพ

1. การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบหรือตรวจวัดความสามารถ ในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ด้วยสารสกัด จากพืช อาศัยสมบัติของการเปลี่ยนแปลงสีของอนุมูลอิสระ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารสกัดหรือ สารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ในพืช สามารถตรวจวัดได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตร โฟโตมิเตอร์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ใช้ระยะเวลาสั้น และให้ผลการทดลองที่สม่ำเสมอ DPPH หรือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร ตำแหน่งที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ อยู่ที่อะตอมของไนโตรเจน (nitrogen-centered radical) DPPH สามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะในเมทานอล สารละลายที่ได้มีสีม่วง และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ระหว่าง ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nanometer) DPPH ยังสามารถละลายได้ในตัวทำละลาย อินทรีย์ เช่น เอทิลแอซีเตต (ethyl acetate) และโทลูอีน (toluene) แต่ความคงตัวของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนไป ควรตรวจดูค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดว่ายังอยู่ที่ความยาวคลื่นดังกล่าวหรือไม่

ดังนั้นในการเตรียมสารละลาย DPPH ในตัวทำละลายบางชนิด จำเป็นต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้ ส่วนสารละลาย DPPH ในเมทานอลนั้นมีความคงตัวในระดับหนึ่ง สามารถเตรียมแบบเข้มข้นและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ในตู้เย็น) ได้หลายวัน เมื่อต้องการใช้จะนำสารละลายเข้มข้นนั้นออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเจือจางด้วยเมทานอล ความเข้มข้นที่นิยมใช้คือ 5×10^{-4} โมลาร์ (Molar : M) ซึ่งต้องนำมาเจือจางด้วยเมทานอลในอัตราส่วน 1 : 4 คือ สารละลาย DPPH 1 ส่วน ผสมกับ เมทานอล 4 ส่วนโดยปริมาตร ความเข้มข้นที่เจือจางแล้วคือ 1×10^{-4} โมลาร์ หรือ 0.1 มิลลิโมลาร์ (mM) ที่ความเข้มข้นนี้จะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร (nm) ประมาณ 1.0 หน่วย (ประสาร สวัสดิ์ชิตัง, 2561)

1.1 เตรียมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ ในเมทานอล สาร DPPH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 394.32 เตรียม DPPH จำนวน 250 มิลลิเมตร โดยชั่ง DPPH 0.0493 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอล ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

1.2 เจือจางสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ ให้ได้ 1×10^{-4} โมลาร์ หรือ 0.1 มิลลิโมลาร์ ด้วยการนำสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 5×10^{-4} โมลาร์ 1 ส่วน ผสมกับ เมทานอล 4 ส่วน

1.3 เตรียมสารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ โทรลอคซ์ (trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) โดยเตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 6 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล โทรลอคซ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 250.29 ชั่งโทรลอคซ์จำนวน 0.015 กรัม ละลาย ในเมทานอล 10 มิลลิลิตร เจือจางให้ความเข้มข้นลดลงด้วยเมทานอล จนถึงความเข้มข้น 0.08125 มิลลิโมลาร์

1.4 เตรียมสารอ้างอิง (reference compound) นำวิตามินซี ความเข้มข้นที่ 5 มิลลิโมลาร์ เจือจางลงไปครึ่งหนึ่งจนถึงความเข้มข้น 0.3125 มิลลิโมลาร์

1.5 การทดสอบ

1.5.1 ปิเปตต์สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

1.5.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบกระท่อม (95% EtOH) ใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้น 1.56, 3.12, 6.25, 12.50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารสกัดกระท่อมปริมาตร 80 ไมโครลิตร มาเติม สารละลาย methanolic DPPH ความเข้มข้น $152 \mu\text{M}$ ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (ทำ 3 ซ้ำ) นำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณตามสมการที่ 5 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแสดง ในค่า IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) โดยคำนวณจากกราฟเส้นตรงระหว่าง % inhibition และความเข้มข้น (ศุภรัตน์ ดวนใหญ่ และคณะ, 2564)

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_c - A_{bc}) - (A_s - A_{bs})}{A_c - A_{bc}} \times 100 \quad (5)$$

โดยที่ A_c = absorbance of control
 A_{bc} = absorbance of blank control
 A_s = absorbance of sample
 A_{bs} = absorbance of blank sample

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay (สุชาติ มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558; พิชทรัพย์ ฐิติธนอภิพงษ์ และคณะ, 2568)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการเตรียมสารละลาย 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS^{•+}) ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ นำสารละลาย ABTS^{•+} กับสารละลายโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟตผสมกันในอัตราส่วน 1:0.5 ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} โดยใช้เอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงช่วง 0.7±0.02 ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร แล้วเตรียมสารละลายของสารสกัดใบกระพ้อมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้สารละลายของสารสกัดกระพ้อมปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยแสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (mg ascorbic acid equivalent/g extract)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay (สุชาติ มานอก และปวีณา ลิ้มเจริญ, 2558; พิชทรัพย์ ฐิติธนอภิพงษ์ และคณะ, 2568)

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการเตรียมสารละลาย FRAP reagent ผสมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใน 40 ไมโครโมลาร์ ของกรดไฮโดรคลอริกอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นเตรียมสารละลายของสารสกัดกระพ้อม (95 % EtOH) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ปิเปตสารสกัดกระพ้อมปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม FRAP reagent ปริมาตร 180 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย แล้วตั้งทิ้งไว้ 4 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลอง 3 ครั้ง แล้วนำมาคำนวณค่าการดูดกลืนแสง ดังสมการที่ 6 โดยแสดงค่าที่ได้ในรูปแบบมิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mM FeSO₄ equivalent/g extract)

$$\text{FRAP (mMFe}^{2+}\text{eq./g extract)} = \frac{\text{mMFe}^{2+}\text{ จากกราฟ} \times \text{ml ตัวอย่าง}}{\text{g สารสกัด}} \quad (6)$$

4. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและปวดของสารสกัดกระท่อม (40% และ 95% EtOH)

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Nattha et al., 2021)

นำเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 ความชื้น 80-90 เปอร์เซ็นต์ sub-culture ทุก 3 วัน

4.2 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกระท่อมและสารมึนเมาของเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay (วรวิทย์ จันท์สุวรรณ และคณะ, 2564)

ทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ด้วยวิธี MTT assay นำเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เซลล์ จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารมาตรฐานมึนเมา ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดกระท่อม (95% และ 40 % EtOH) ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกลุ่มควบคุมได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM อย่างเดียว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม MTT ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดูดส่วนน้ำออกให้หมดทุกหลุม แล้วเติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟออร์มาซาน หาค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ได้ดังสมการที่ 7

การคำนวณเซลล์ที่รอดชีวิต

$$\% \text{ cell viability} = (\text{OD กลุ่มทดสอบ} / \text{OD กลุ่ม control}) \times 100 \quad (7)$$

4.3 ฤทธิ์ด้านการอักเสบของมึนเมาและสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ต่อการหลั่ง NO

ทดสอบการต้านการอักเสบเตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐานมึนเมา ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดกระท่อมที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ Dexamethasone ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุมต่อ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารมาตรฐานมึนเมาที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร และสารสกัดกระท่อมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5, 25,

50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Lipopolysaccharide ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 12 ไมโครลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพียงอย่างเดียว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการตรวจวัดปริมาณของ NO ที่สร้างขึ้นจากเซลล์มาโครฟาจในรูปของไนไตรท์ (nitrite) โดยนำส่วนน้ำของอาหารเลี้ยงเซลล์ มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader เปรียบเทียบ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มที่ได้รับสัปดาห์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM (การทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครึ่งทำ 3 ซ้ำ) โดยคำนวณหาปริมาณของไนไตรท์ จากกราฟมาตรฐานของไนไตรท์ (Park et al., 2014 ; Ohgami et al., 2003)

4.4 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ต่อการหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) IL-6, TNF- α และ PGE2

ทดสอบการด้านการอักเสบเตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิตราไจนิน ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดกระเทียม (95 % EtOH) ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม มาเลี้ยงในถาดเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM นำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่สารมาตรฐานมิตราไจนินที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร และสารสกัดกระเทียมที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มี CO₂ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Lipopolysaccharide ที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร 12 ไมโครลิตร โดยกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เพียงอย่างเดียว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเฉพาะส่วนน้ำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ Luminex® reagent kits โดยมีวิธีการดังนี้ คือ ใช้เม็ดแม่เหล็กที่เคลือบแอนติบอดีจับกับตัวอย่างส่วนน้ำ 25 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของแผ่น 96 หลุม จากนั้นทำการบ่มบนเครื่องเขย่าแม่เหล็กที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นทำการล้างเม็ดแม่เหล็กด้วยบัฟเฟอร์ที่ให้มาพร้อมกับชุดน้ำยา ตรวจ Luminex® จำนวน 3 ครั้ง และเติมแอนติบอดีตรวจจับ ทำการบ่มต่ออีก 60 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด และเติมสาร streptavidin-phycoerythrin นำไปบ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างอีกสองครั้ง และเติม สาร sheath fluid หลังจากนั้นทำการวัดระดับไซโตไคน์ IL-6, TNF- α และ PGE2 ด้วยเครื่อง xMAP® INTELLIFLEX โดยคำนวณความเข้มข้น (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ของระดับไซโตไคน์ IL-6, TNF- α และ PGE2 จากกราฟมาตรฐาน

การศึกษาด้านผลิตภัณฑ์

1. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับตาม Thai FDA guideline (จุไรรัตน์ รักราทิน, 2547)

เป็นการทดสอบในสภาวะเครียด (forced degradation study or stress test) ก่อนการตั้งตำรับ เพื่อทดสอบว่าสารสกัดสมุนไพรที่จะนำมาพัฒนาเป็นตำรับมีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะที่แตกต่างกันอย่างไร โดยใช้ HPLC ในการตรวจสอบมีทราเจนีน ใช้คอลัมน์ C₁₈ ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาดคอลัมน์ 4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร ใช้เมทานอล ต่อน้ำ ต่อกกรดอะซิติก (95:4:1 มิลลิลิตร) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 10 ไมโครลิตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ตรวจจับสัญญาณที่ความยาวคลื่น UV 254 นาโนเมตร โดยมีวิธีการเตรียมสารสกัดที่จะนำมาทดสอบดังต่อไปนี้

1.1 กลุ่มควบคุม นำสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เทลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 1,000 ไมโครลิตร เติมนเมทานอลจนครบปริมาตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.2 ผลจากความร้อน นำสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เทลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมนเมทานอลจนครบปริมาตร นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 5 นาที และกรองผ่านตัวกรองเมมเบรน 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณมีทราเจนีนด้วยเทคนิค HPLC

1.3 ผลจากสภาวะกรด นำสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เทลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอล เติมนเมทานอลจนครบปริมาตร นำไปโซนิเคตเป็นเวลา 5 นาที และกรองผ่านตัวกรองเมมเบรน 0.45 ไมครอน นำไปวิเคราะห์ปริมาณ มีทราเจนีนด้วยเทคนิค HPLC

1.4 ผลจากสภาวะด่าง นำสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เทลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงทำให้เป็นกลางด้วย 2 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก เติมนเมทานอลจนครบปริมาตร แล้วนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 5 นาที กรองผ่านตัวกรองเมมเบรน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

1.5 ออกซิเดชัน นำสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร เทลงในขวดปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมนอร์มอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 500 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จึงเติมนเมทานอลจนครบปริมาตร จากนั้นนำไปโซนิเคตเป็นเวลา 5 นาที และกรองผ่านตัวกรองเมมเบรน 0.45 ไมครอน วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

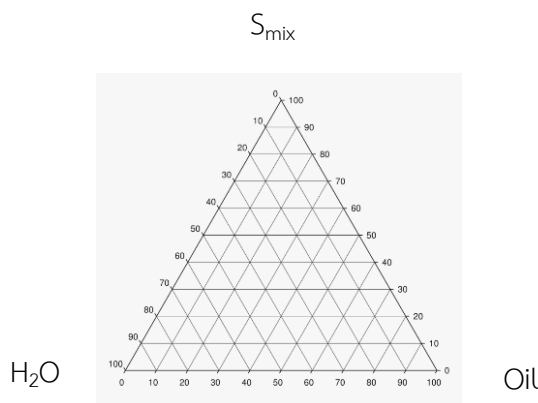
2. วิธีการเตรียมไมโครอิมัลชันสารสกัดกระท่อม

2.1 เลือกวัตถุน้ำมันที่ละลายสารสกัดกระท่อมได้ดีที่สุด (Khunt et al., 2012) โดยเปรียบเทียบการละลายของสารสกัดกระท่อมในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ใน Isopropylmyristate, propylene glycol (Mohammed Haneefa et al, 2013) และ Propylene Glycol Monocaprylate (Silva et al., 2013) เพื่อหาวัตถุน้ำมันที่ละลายสารสกัดกระท่อมได้ดีที่สุด

2.2 Surfactant mixture (S_{mix}) ใช้ส่วนผสม Polyglycerl-4-Capate: Isopentylidol : Ethoxydiglycol (1:1:1) ที่ให้ค่า HLB 13.1-14.4 (Silva et al., 2013) ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 8-20 เหมาะสมในการใช้เตรียมไมโครอิมัลชันชนิด O/W ของสาร lipophilic (Lawrence and Rees., 2012)

2.3 หาอัตราส่วนระหว่าง S_{mix} และวัตถุน้ำมันจากข้อ 1 โดยใช้อัตราส่วน oil : S_{mix} 0.1:0.9, 0.2:0.8, 0.3:0.7, 0.4:0.8, 0.5:0.5, 0.6:0.4, 0.7:0.3, 0.8:0.2 และ 0.9:0.1 น้ำหนักรวมเท่ากับ 1 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex สังเกตด้วยตาเปล่า บันทึกความใสและความขุ่นของแต่ละตัวอย่าง เลือกอัตราส่วนที่ให้ความใสไปทดสอบต่อไป

2.4 สร้าง Pseudoternary phase diagram (ภาพที่ 3.2) โดยการไตเตรตส่วนผสมจากข้อ 3 กับน้ำ จะได้สัดส่วน S_{mix} ต่อวัตถุน้ำมันและน้ำ ที่ให้ไมโครอิมัลชันเบส เลือกอัตราส่วนที่ให้ความใส นำไปวัดขนาดอนุภาค (Particle Size) ด้วยเครื่อง Nanoplus-3 (Micrometrics Instrument Corporation, USA)



ภาพที่ 3.2 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคของไมโครอิมัลชัน

2.5 ผสมสารสกัดกระท่อมลงในวัตถุน้ำมันจากข้อ 1 หาอัตราส่วนที่เหมาะสมโดยผสม oil กับ S_{mix} ในอัตราส่วน 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2 และ 9 : 1 แล้วไตเตรตกับน้ำ หาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชัน โดยนำ S_{mix} : วัตถุน้ำมัน มาไตเตรตกับน้ำ ได้อัตราส่วนที่ดีที่สุดของ S_{mix} : วัตถุน้ำมัน : น้ำ ทำการบันทึกปริมาณน้ำที่ใช้ลงใน ternary phase diagram โดยใช้โปรแกรม Triplot เพื่อหาบริเวณที่เกิด isotropic liquid และนำไมโครอิมัลชันที่ได้ไปวัดขนาดอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่อง Nanoplus-3 (Micrometrics Instrument Corporation, USA) โดยนำไมโครอิมัลชันที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำ กลั่น 25 เท่า จากนั้นเทลงในคิวเวตต์ (cuvette) และทำการวัดขนาดอนุภาคที่อุณหภูมิ

25 องศาเซลเซียส ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา โดยเติมไมโครอิมัลชันที่เจือจางข้างต้น 1 มิลลิลิตร ลงไปในเซลล์สำหรับวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา ด้วยเครื่อง Nanoplus-3 โหมดการวัดค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของตำรับอิมัลเจลกระท่อม

ลำดับที่	ส่วนประกอบ	ปริมาณ (mg)		หน้าที่ของสารในตำรับ
		เจลเบส	ตำรับอิมัลเจล	
Part 1				
1	Kratom Extract (FD 95 %)	-	100	Active ingredient
2	Propylene Glycol Dicaprylate	500	500	Oil
Part 2				
1	Polyglyceryl-4-Capate	1700	1700	Surfactant
2	Isopentyl diol	1700	1700	Surfactant
3	Ethoxydiglycol	1700	1700	Co- Surfactant
Part 3				
1	Disodium EDTA	2	2	Chelating agent
2	Deionized Water	4300	4200	Solvent
Part 4				
1	Aminomethyl propanol	0.005	0.008	pH adjuster
2	Phenoxyethanol	98	98	Preservative
Total weight (g)		10	10	
Part 5				
1	Poloxamer 407	500	500	Thickener
2	Carbomer	300	300	Thickener

3. การเตรียมอิมัลเจลกระท่อม

3.1 เตรียม part 1 โดยนำ Kratom Extract (95 % EtOH) และ Propylene Glycol Dicaprylate มาชั่งตามน้ำหนักที่ระบุในตารางที่ 3.1 ใส่ลงในบีกเกอร์ ผสมให้เข้ากันบน Hot plate กวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง

3.2 นำ part 2 ได้แก่ Polyglyceryl-4-Capate, Isopentylidol และ Ethoxydiglycol มาชั่งตามน้ำหนักที่ระบุในตารางที่ 3.1 อัตราส่วน 1: 1: 1 ผสมให้เข้ากันบน Hot plate กวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง

3.3 นำสารที่เตรียมได้จากข้อ 1 เทลงในข้อ 2 มาผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสาร

3.4 นำ part 3 Disodium EDTA และ Deionized Water มาชั่งตามน้ำหนักที่ระบุในตารางที่ 3.1 ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแก้ว จากนั้นจึงนำไปเทลงส่วนผสมในข้อ 3

3.5 หลังจากที่ได้ผสมสาร part 1-3 เข้าด้วยกันเรียบร้อยแล้ว จึงใช้ไมโครปิเปต นำ part 4 ได้แก่ Aminomethyl propanol และ Phenoxyethanol ตามปริมาตรที่ระบุในตารางที่ 3.1 ผสมลงไป ใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารผสมให้เข้ากัน ประมาณ 1 ชั่วโมง

3.6 เมื่อได้ไมโครอิมัลชันสารสกัดกระท่อมเรียบร้อยแล้ว นำ part 5 มาชั่ง ค่อย ๆ โปริ Poloxamer 407 ลงในอิมัลชันสารสกัดกระท่อมที่ได้ โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนสารที่ความเร็วระดับ 6 ให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว จากนั้นจึงค่อย ๆ โปริ Carbomer ลงไป ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว โดยใช้ความเร็วระดับ 7 ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จึงนำอิมัลเจลกระท่อมบรรจุลงในหลอดพลาสติกใส

4. การทดสอบความคงตัวของอิมัลเจลกระท่อม (อริญญา มโนสร้อย, 2533)

นำอิมัลเจลกระท่อมมาประเมินลักษณะทางกายภาพด้วยวิธี Freeze-thaw cycle จำนวน 6 รอบ ประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพเบื้องต้น คือ ลักษณะทั่วไป ได้แก่ สี, ค่าความเป็นกรด - ด่าง, การแยกชั้น และความหนืด โดยชั่งอิมัลเจลกระท่อม 30 กรัม ใส่ในภาชนะทำการทดสอบดังนี้

4.1 ทดสอบความคงสภาพของค่า pH โดยการใช้เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) ก่อนการทดสอบความคงสภาพของ Freeze-thaw cycle เพื่อวัดค่ากรด-ด่าง บันทึกผล แล้วนำมาประเมินผล (n=3)

4.2 ทดสอบความคงสภาพของความหนืดของอิมัลเจล โดยการใช้เครื่องวัดค่าความหนืดแบบด้านการหมุน (Brookfield Viscometer) ที่ความเร็ว 0.6 รอบต่อนาที (RPM) ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนการทดสอบความคงสภาพของ Freeze-thaw cycle เพื่อวัดค่าความหนืดบันทึกผลแล้วนำมาประเมินผล (n=3)

4.3 ทดสอบความคงสภาพโดยการปั่นเหวี่ยงการเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วง โดยการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ณ อุณหภูมิห้อง ก่อนการทดสอบความคงสภาพของ Freeze-thaw cycle เพื่อสังเกตการแยกชั้น บันทึกผลแล้วนำมาประเมินผล (n=3)

4.4 ทดสอบความคงสภาพของอิมัลเจลกระท่อมด้วย Freeze-thaw cycle โดยการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อีก 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6 รอบ แล้วนำมาประเมินผล (n=3)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการหาผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay ฤทธิ์การต้านอักเสบ ด้วยวิธียับยั้งการผลิตสารสื่อการอักเสบในหลอดทดลอง การควบคุมคุณภาพสารสกัดจากใบกระท่อม ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พัฒนาสูตรไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดกระท่อม และอิมัลเจลกระท่อม ตลอดจนความคงตัวของกายภาพของอิมัลเจลกระท่อม โดยมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

การตรวจสอบวัตถุดิบตามข้อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (THP)

เลือกใบเพสลาดกระท่อมพันธุ์ก้านแดง จากอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร ตรวจพิสูจน์ ชื่อวิทยาศาสตร์ กระท่อม *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil. โดยพิพิธภัณฑสถานสมุนไพรการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกตัวอย่างใบกระท่อมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ถูกเก็บไว้ที่หมายเลข TTM no.0005467

1. ผลการวิเคราะห์ตามข้อกำหนดของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2021)

ปริมาณสารสกัดเอทานอลของผงใบกระท่อมที่ผ่านการทำแห้งด้วยความเย็นได้ร้อยละ 22.67 ± 0.61 ปริมาณเถ้าของผงใบกระท่อม (% Total ash) ร้อยละ 9.10 ± 0.09 ค่าของเถ้าจากผงใบกระท่อมที่ไม่ละลายในกรด (% Acid insoluble ash) มีค่า 0.7 ± 0.03 โดยน้ำหนัก ปริมาณความชื้นที่หายไปของผงใบกระท่อมเมื่อนำไประเหยแห้ง (% Loss on drying) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส มีค่าร้อยละปริมาณความชื้นจากผงกระท่อมเท่ากับ 8.64 ± 0.28 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ร้อยละของปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้า และปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดของกระท่อม

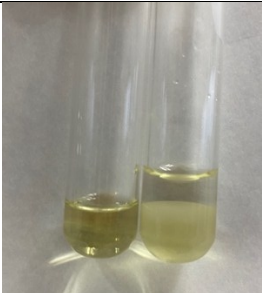
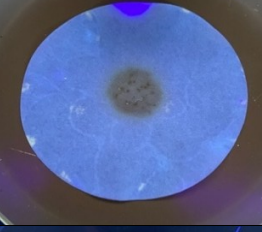
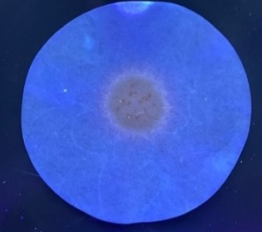
การวิเคราะห์	ร้อยละของน้ำหนัก			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย $\pm$
ปริมาณความชื้น	8.987	8.505	8.511	8.67 ± 0.28
ปริมาณเถ้า	9.062	9.201	9.027	9.10 ± 0.09
ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	0.671	0.693	0.732	0.70 ± 0.03

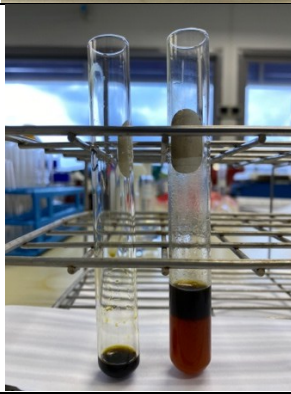
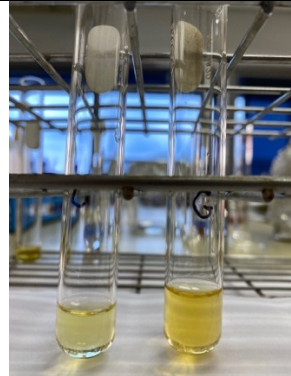
2. ผลการตรวจสอบกลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

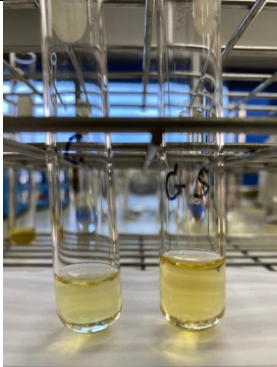
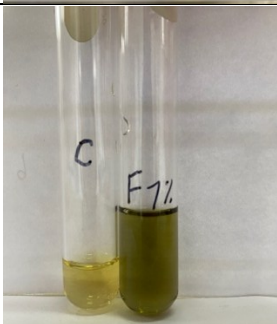
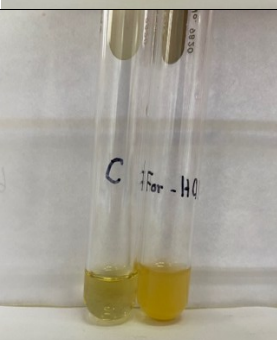
ตรวจสอบกลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้น 8 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มแอนทราควิโนน (Anthraquinone) กลุ่มแลคโตนไกลโคไซด์ (Lactone glycoside) ไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ (Cyanotic glycoside) ซาโปนิน (saponin) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) แทนนิน และสารประกอบโพลีฟีนอล (Tannins and Polyphenolic compounds) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) และกลุ่ม

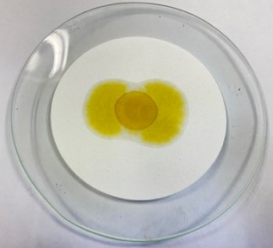
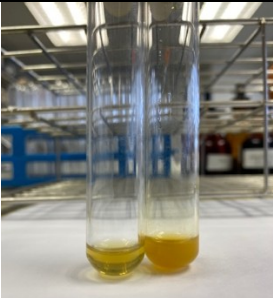
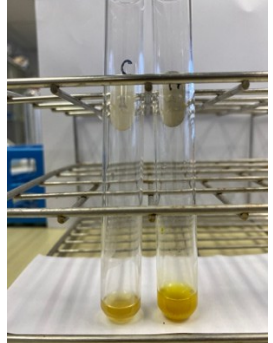
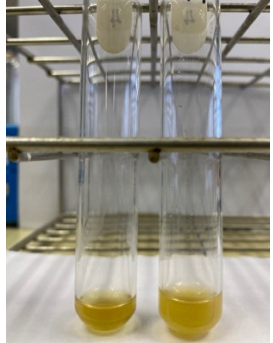
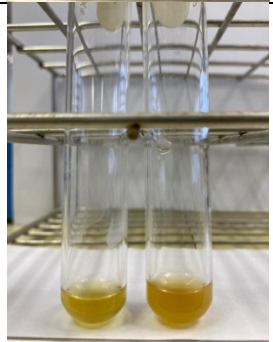
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอนด้วยวิธีดัดแปลงจาก (Ayoola et al., 2008), (Siddiqui et al., 2009) และ (นพมาศ สุวรรณเจริญนนท์ และคณะ, 2544) ผลจากการตรวจสอบทางด้านพิษเคมีเบื้องต้นของกระท่อมพบสารพิษเคมี 2 กลุ่ม คือ สารกลุ่มอัลคาลอยด์ และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 4.2)

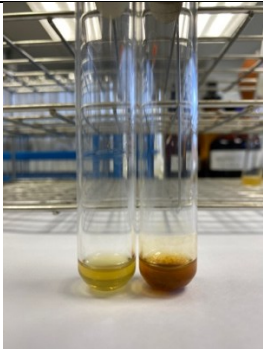
ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์กลุ่มสารพิษเคมีของกระท่อม

กลุ่มสารสำคัญ	ภาพประกอบ	ผลการตรวจสอบ	ผลที่ได้
การตรวจสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนน		ไม่เกิดสีชมพูในชั้นต่าง	ไม่มีสารกลุ่มแอนทราควิโนน
การตรวจสอบสารกลุ่มแลคโตนไกลโคไซด์		UV long wave 365 nm ไม่พบการเรืองแสง	ไม่มีสารกลุ่มแลคโตนไกลโคไซด์
		UV long wave 254 nm non-volatile lactone ไม่มีการเรืองแสง	ไม่มีสารกลุ่มแลคโตนไกลโคไซด์
		UV long wave 365 nm non-volatile lactone มีการเรืองแสงสีขาวที่ขอบ	มีสารกลุ่มแลคโตนไกลโคไซด์

กลุ่มสารสำคัญ	ภาพประกอบ	ผลการตรวจสอบ	ผลที่ได้
การตรวจสอบสาร กลุ่มไซยาโนจีนิก ไกลโคไซด์		กระดาศกรองที่ซึบด้วย สารละลายกรดพิคริก ไม่มีการเปลี่ยนสี	ไม่มีสารกลุ่ม ไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์
การตรวจสอบสาร กลุ่มซาโปนิน		ไม่มีฟองเกิดขึ้น	ไม่มีสารกลุ่มซาโปนิน
การตรวจสอบสาร กลุ่มฟลาโวนอยด์		เกิดสีแดงเข้ม	มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์
การตรวจสอบสารกลุ่ม แทนนินและ สารประกอบ โพลีฟีนอล		ทดสอบกับ Gelatin ไม่เกิดตะกอนขาวขุ่น	ไม่มีสารกลุ่มแทนนิน

กลุ่มสารสำคัญ	ภาพประกอบ	ผลการตรวจสอบ	ผลที่ได้
		ทดสอบกับ Gelatin salt ไม่เกิดตะกอนขาวขุ่น	ไม่มีสารกลุ่มแทนนิน
		ทดสอบกับ FeCl_3 มีสีเขียว	มีสารกลุ่มฟีนอลิก
		ทดสอบกับ Bromine water ไม่เกิดตะกอนเบาสีอ่อน	ไม่มีสารกลุ่มแทนนิน
		ทดสอบกับ Fomalin-HCl ไม่เกิดตะกอนสีแดง	ไม่มีสารกลุ่มแทนนิน
		ทดสอบกับ Lime water ไม่เกิดตะกอนสีเหลือง น้ำเงินเทา	ไม่มีสารกลุ่มแทนนิน

กลุ่มสารสำคัญ	ภาพประกอบ	ผลการตรวจสอบ	ผลที่ได้
การตรวจสอบสาร กลุ่มอัลคาลอยด์		ทดสอบกับ Dragendorff spray reagent ได้สีส้ม	มีอัลคาลอยด์
		ทดสอบกับ Dragendorff reagent เกิดตะกอนสีส้ม	มีอัลคาลอยด์
		ทดสอบกับ Hager reagent เกิดตะกอนสีเหลือง	มีอัลคาลอยด์
		ทดสอบกับ Marme reagent เกิดตะกอนสีขาว	มีอัลคาลอยด์
		ทดสอบกับ Tannic acid reagent เกิดตะกอนสีขาว	มีอัลคาลอยด์

กลุ่มสารสำคัญ	ภาพประกอบ	ผลการตรวจสอบ	ผลที่ได้
		ใช้สารทดสอบ Wagner เกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง	มีอัลคาลอยด์
การตรวจสอบสาร กลุ่ม คาร์ดิแอกไกลโคไซด์		ทดสอบกับ Kedde's ไม่เกิดสีม่วง	ไม่มี Lactone ring
		ทดสอบกับ Keller-Killiani's ไม่เกิดวงแหวนสีน้ำตาล	ไม่มี Deoxy sugar
		ทดสอบกับ Liebermann Burchard's ได้สีเขียว	มี Steroid nucleus

ผลการศึกษาด้านเคมี

1. การสกัดแบบแช่หมัก (Maceration)

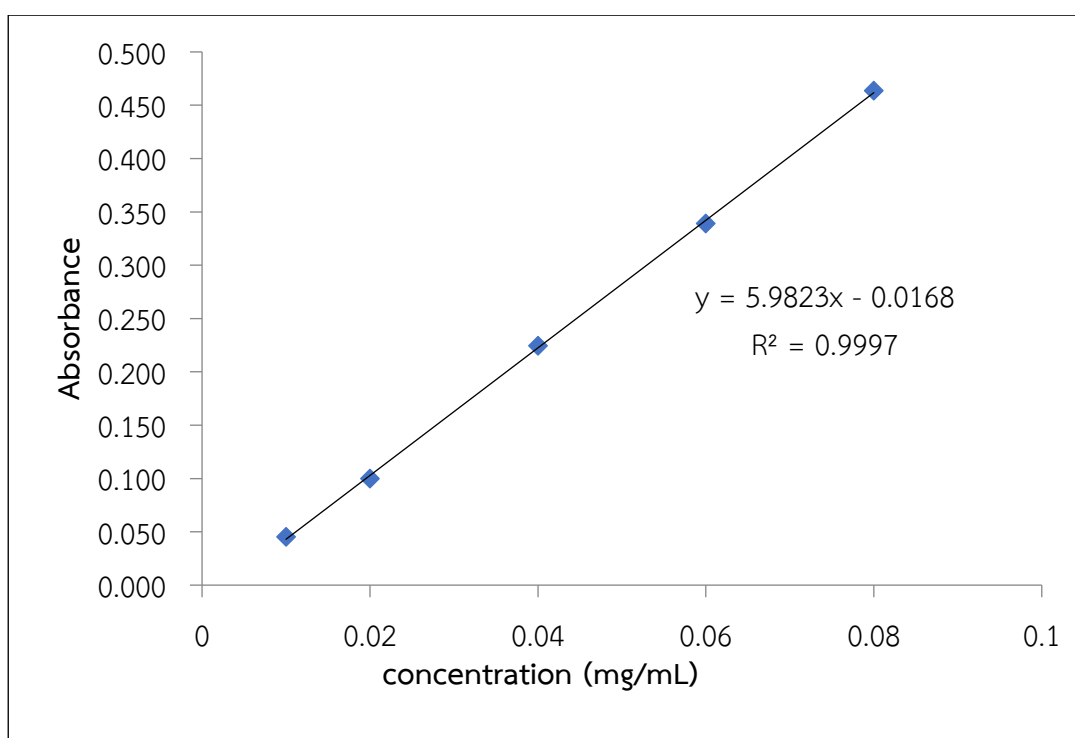
สกัดใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนตัวทำละลายต่อผงยา 1:10 ทำซ้ำ 3 ครั้ง ลักษณะของสารสกัดที่ได้มีสีเขียวเข้ม นำไปทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze dried, FD 95%) ได้ร้อยละ 22.67 ± 0.61 (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ร้อยละของสารสกัดหยาบใบกระท่อมก้านแดงด้วยตัวทำละลาย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และผ่านการทำแห้งด้วยความเย็น

ครั้งที่	น้ำหนักของผงใบกระท่อม (g)	น้ำหนักของสารสกัดหยาบ (g)	ร้อยละของผลผลิต (%w/w)	เฉลี่ย $\pm$
1	200	44.72	22.36	22.67 $\pm$ 0.61
2	200	46.74	23.37	
3	200	44.56	22.28	

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

2.1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่พบในสารสกัดกระท่อม FD 95 % เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ($R^2=0.9997$) สมการเส้นตรงที่ได้มีค่าเท่ากับ ($y=5.9823x - 0.0168$) (ภาพที่ 4.1) ผลการทดสอบพบปริมาณสารฟีนอลิกรวม 285.50 ± 1.67 mg GAE/g extract (ตารางที่ 4.4)

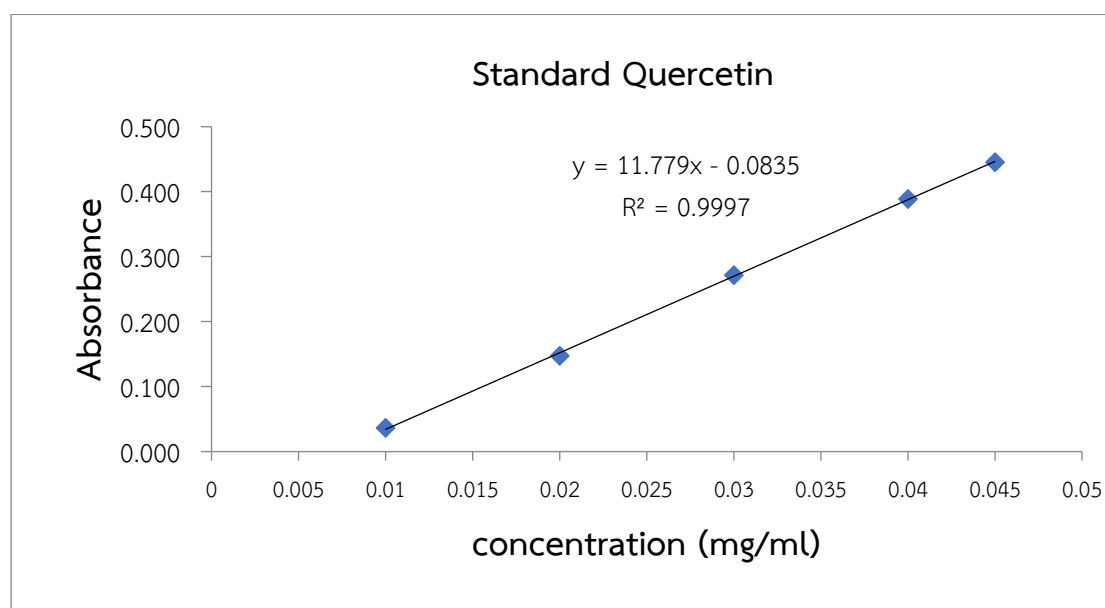


ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic content, TPC) ของสารสกัดกระเทียม FD 95 %

สารสกัด	TPC (mg GAE/g of Extract)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดกระเทียม FD 95 %	283.83	287.18	285.50	285.50 ±1.67

2.2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสกัดกระเทียม FD 95 % เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอซีทิน ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการการสร้างกราฟมาตรฐาน ($R^2=0.9997$) สมการเส้นตรงที่ได้มีค่าเท่ากับ ($y=11.779x - 0.0835$) (ภาพที่ 4.2) พบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ 358.97 ± 0.98 mg QE/g extract (ตารางที่ 4.5)



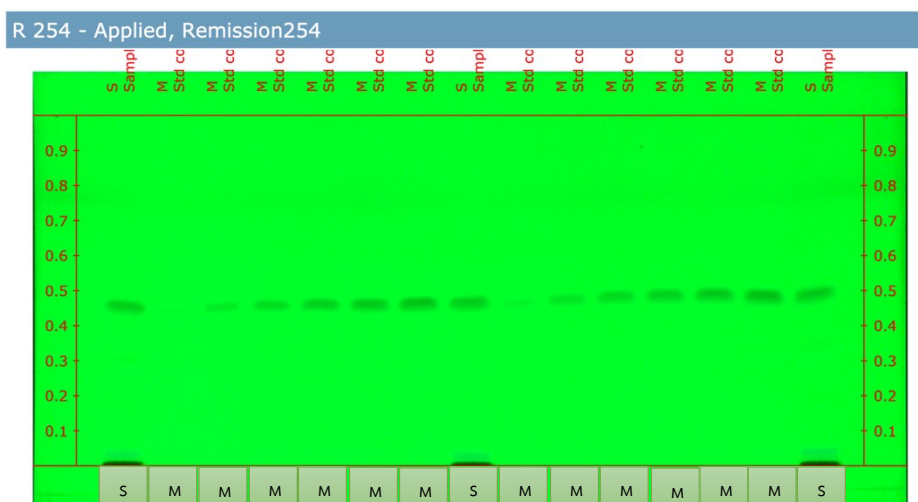
ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น
กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Quercetin

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content, TFC) ของสารสกัดกระท่อม FD 95 %

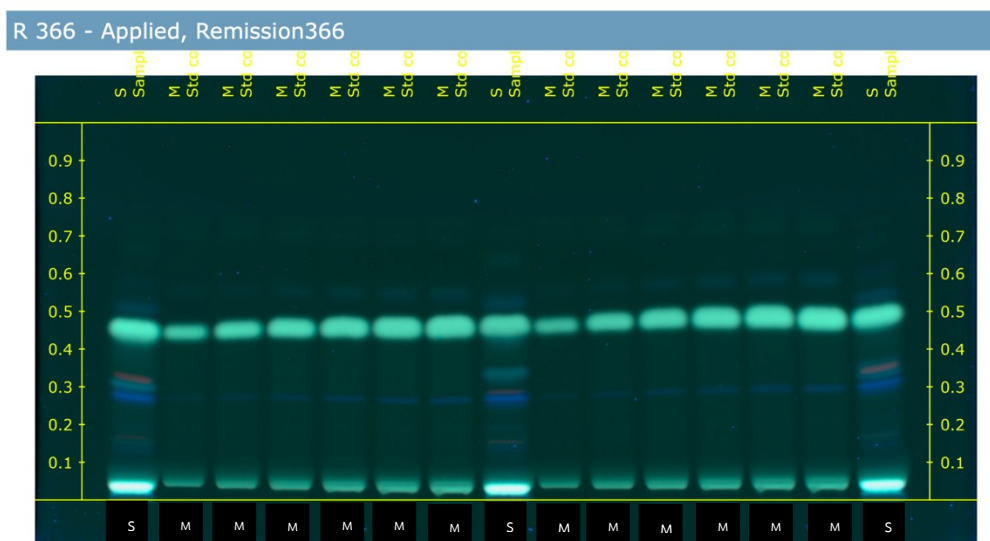
สารสกัด	TFC (mg QE/g of Extract)			average
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	358.40	360.10	358.40	358.97 ± 0.98

3. การพัฒนาระบบ Thin-layer chromatography เพื่อการตรวจสอบมิทราไจนีน

ในการพัฒนาระบบ TLC เพื่อใช้ตรวจสอบมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่พัฒนาขึ้น (Solvent A : Solvent B ในอัตราส่วน 99 : 5 (Solvent A = คลอโรฟอร์มผสมกับ NaOH 0.2 N ในเมทานอล และ Solvent B = เมทานอล) สามารถแยกสารมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อม FD 40 % ได้ ค่า R_f = 0.48 ตรวจสอบแผ่น TLC ภายใต้แสง UV 254 นาโนเมตร ได้จุดดำบนแผ่นเรืองแสงเขียว (ภาพที่ 4.3) และ UV 366 นาโนเมตร ได้จุดเรืองแสงเขียวอมฟ้าบนพื้นดำ พบว่า ค่า R_f สารมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อมเท่ากับ สารมาตรฐานมิทราไจนีน ภาพที่ 4.4

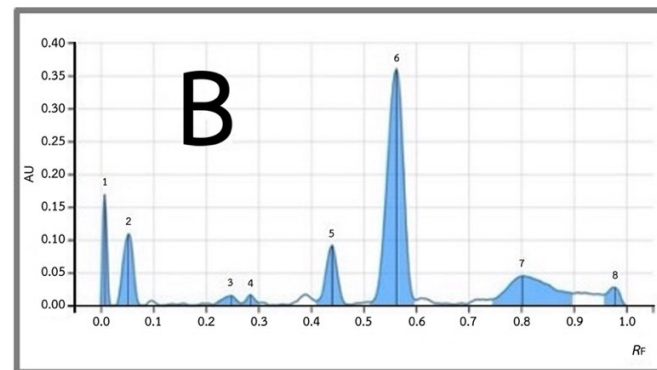
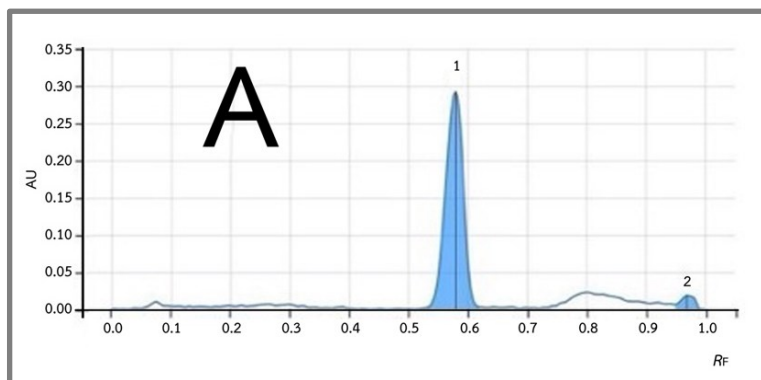


ภาพที่ 4.3 ค่า R_f ของสารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) ภายใต้แสง UV 254 นาโนเมตร (S=sample, M= Mitragynine standard)

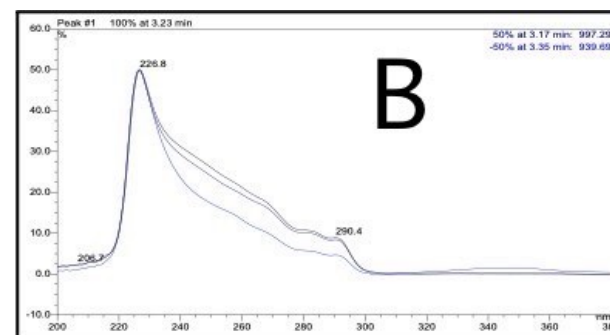
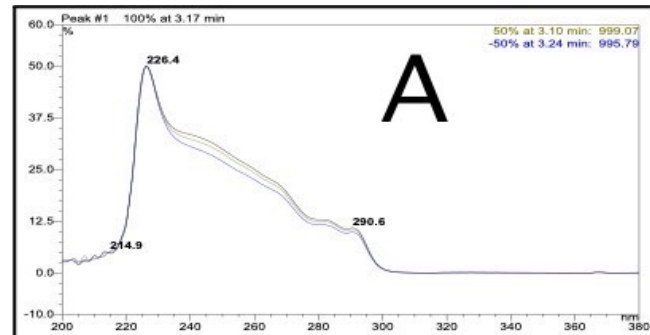
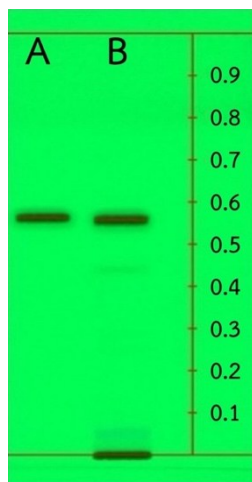


ภาพที่ 4.4 ค่า R_f ของสารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) ภายใต้แสง UV 366 นาโนเมตร (S=sample, M= Mitragynine standard)

เมื่อนำไปตรวจสอบในเครื่อง HPTLC พบว่า ค่า R_f ของสารมิทราไจนีนของสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) มีค่าเท่ากับสารมาตรฐานมิทราไจนีน และมีรูปแบบของช่วงการดูดกลืนแสง UV 254 นาโนเมตร เหมือนกันภาพที่ 4.5 และ ภาพที่ 4.6



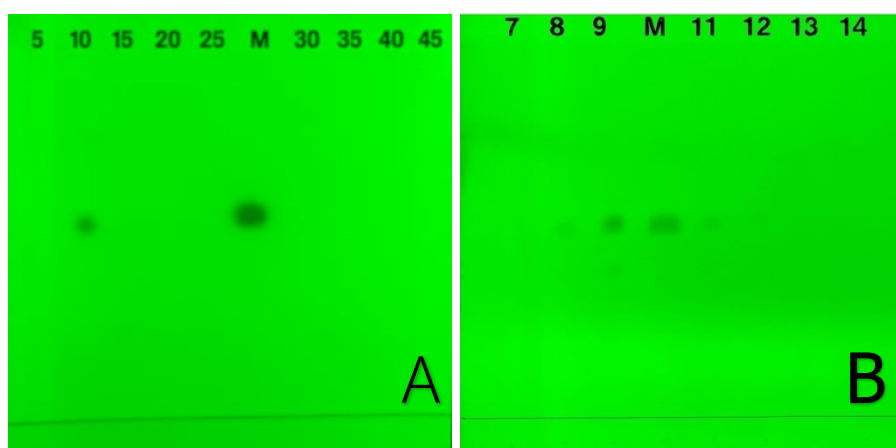
ภาพที่ 4.5 HPTLC โครมาโตแกรมภายใต้ UV 254 nm ของสารมาตรฐานมิทราไจนีนปริมาณ 12 μL ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ [A] สารสกัดกระท่อม 40 % EtOH ปริมาตร, 2 μL ความเข้มข้นของสารสกัด 80 $\mu\text{g/mL}$ [B] [TLC system: Silica gel GF₂₅₄, *CHCl₃-MeOH 99 : 5] โดย *CHCl₃ = 99 mL + 1 mL MeOH (0.2 N NaOH)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะภายใต้ UV 254 nm ของสารมาตรฐาน มิทราไจนีน [A] และสารสกัดกระท่อม 40% EtOH [B] และ UV absorption spectra [TLC system: Silica gel GF₂₅₄, *CHCl₃-MeOH 99 : 5]

4. การแยกมิทราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ตรวจสอบส่วนประกอบในหลอดเก็บสารชะล้างจากคอลัมน์ด้วย TLC เทียบกับสารมาตรฐาน มิทราไจนีน (M) พบว่ามิทราไจนีนถูกชะออกมาในหลอดที่ 8-11 (ภาพที่ 4.7) รวมหลอดที่มี มิทราไจนีนแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนได้น้ำหนัก 0.0164 กรัม ละลาย ด้วยเมทานอล 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หยดสารละลายอิมัลชันในน้ำของกรดฟิสิกกลงในหลอดทดลองจนไม่มีลักษณะขุ่นเพิ่ม นำไปเก็บในตู้เย็นให้ตกตะกอนสมบูรณ์ กรองเก็บตะกอน มิทราไจนีนฟิสิกเรตได้น้ำหนัก 0.0212 กรัม

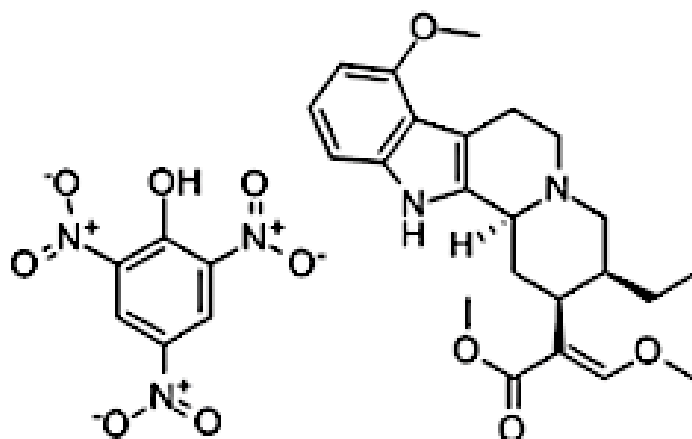


ภาพที่ 4.7 TLC โครมาโตแกรมของสารชะล้างจากคอลัมน์ (eluate) ทุกหลอดที่ 5 (ภาพ A) และ ทุกหลอดตั้งแต่ 7-14 (ภาพ B) [ระบบ TLC silica gel GF₂₅₄ ; เฟสเคลื่อนที่ คลอโรฟอร์มที่มี 0.2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ : เมทานอล อัตราส่วน 99:5, M = สารมาตรฐานมิทราไจนีน]

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของมิทราไจนีนฟิสิกเรต

5.1 วิเคราะห์ด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตร สโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

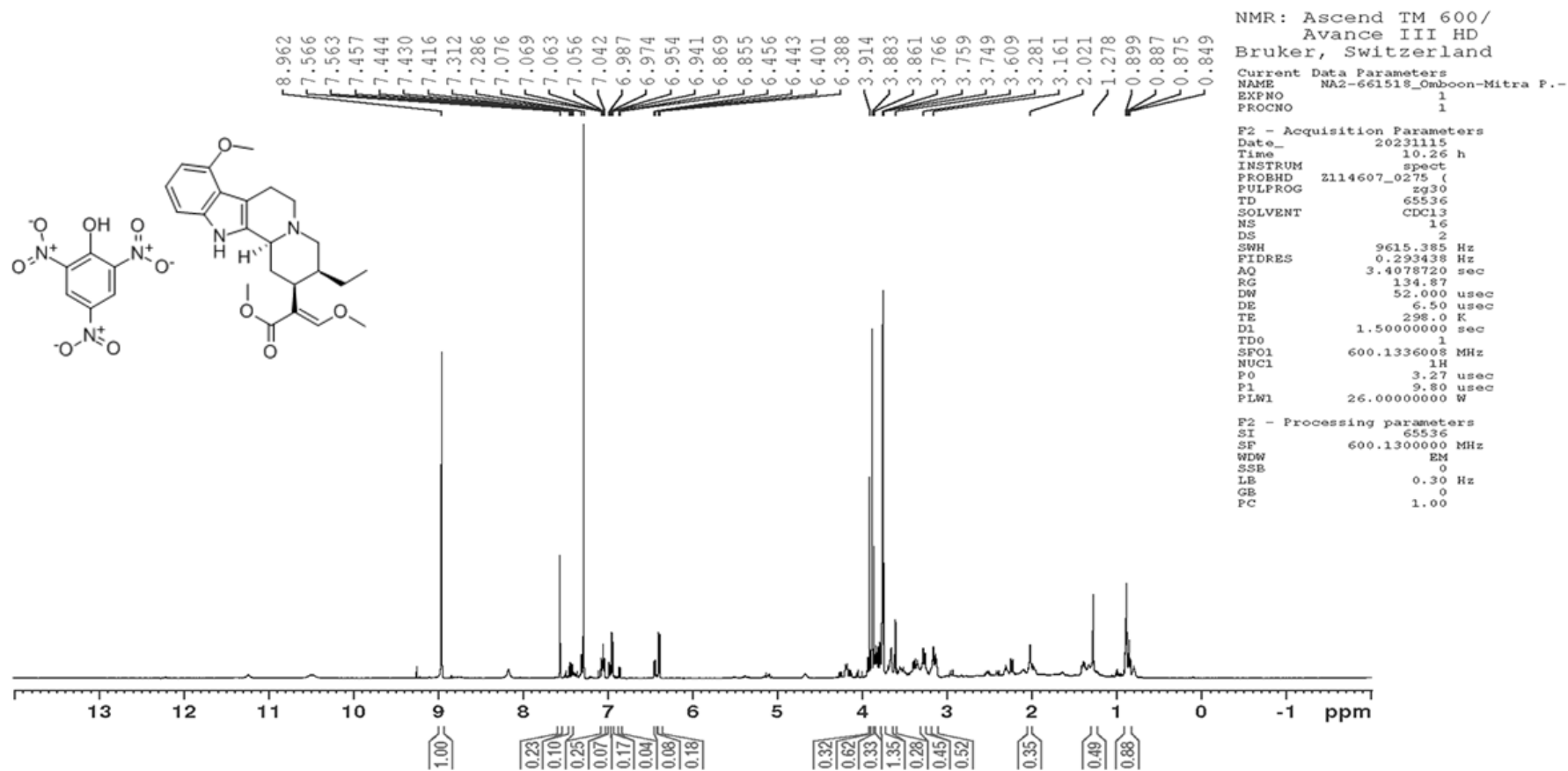
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิทราไจนีนฟิสิกเรตด้วยเทคนิค ¹H-NMR ได้ spectrum ของสารมิทราไจนีน พบโครงสร้างของฟิสิกเรต ปรากฏที่ δ เท่ากับ 8.962 ppm ส่วนโครงสร้างของสารมิทราไจนีนพบไฮโดรเจนของวงแหวนอะโรมาติก (Ar-H) ในช่วง δ ที่ 7.566-6.456 ppm ค่า δ ของหมู่ -OCH₃ อยู่ที่ 3.8-3.7 ค่า δ ของหมู่ -N-CH₂ อยู่ที่ 3.3 พบสัญญาณที่ 7.56-6.45 ppm เป็นโปรตอนของวงแหวนอะโรมาติก (aromatic protons), สัญญาณที่ 6.44 ppm เป็นโปรตอนของหมู่แอลคีน (alkene proton), สัญญาณที่ 3.86, 3.76 และ 3.75 ppm เป็นโปรตอนของหมู่เมทิล (methyl proton) ที่จับกับออกซิเจน (O-CH₃) และสัญญาณที่ 3.28, 3.16 และ 1.27 ppm เป็นโปรตอนของหมู่แอลคิล (alkyl proton) (ตารางที่ 4.6) (ภาพที่ 4.8 และภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.8 สูตรโครงสร้างของโมเลกุลมิตราไจนีนพิกเครต
ที่มา : พิชัพพ์ ฐิตธนาภิพงษ์, 2568

5.2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิตราไจนีนพิกเครต ด้วยเทคนิค FTIR ได้ IR spectrum (ภาพที่ 4.10) และพบพีกที่แสดงถึง N-H stretch ของหมู่ secondary amine (2° amine) จำนวน 1 พีก ที่ตำแหน่ง 3319 cm^{-1} แต่ไม่พบพีกแสดงถึง N-H stretch ของ primary amine (1° amine) และ tertiary amine (3° amine) ในตำแหน่งที่ $3400\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง C-N stretch (aromatic amines) ในช่วง $1335\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง C-N stretch (aliphatic amines) อยู่ในช่วง $1250\text{--}1020\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง N-H wag ของหมู่ secondary amines ที่ $723\text{--}708\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง C-H stretch $2952\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง C=O ที่ตำแหน่ง $1685\text{--}1608\text{ cm}^{-1}$ พีกที่แสดงถึง -OCH_3 อยู่ที่ตำแหน่ง 2847 cm^{-1} และอยู่ในช่วง $1145\text{--}1078\text{ cm}^{-1}$ ในส่วนของพิกเครตพบพีกที่ตำแหน่ง 3084 cm^{-1} และพบพีกของ N-O stretch ที่ตำแหน่ง 1545 และ 1437 cm^{-1}



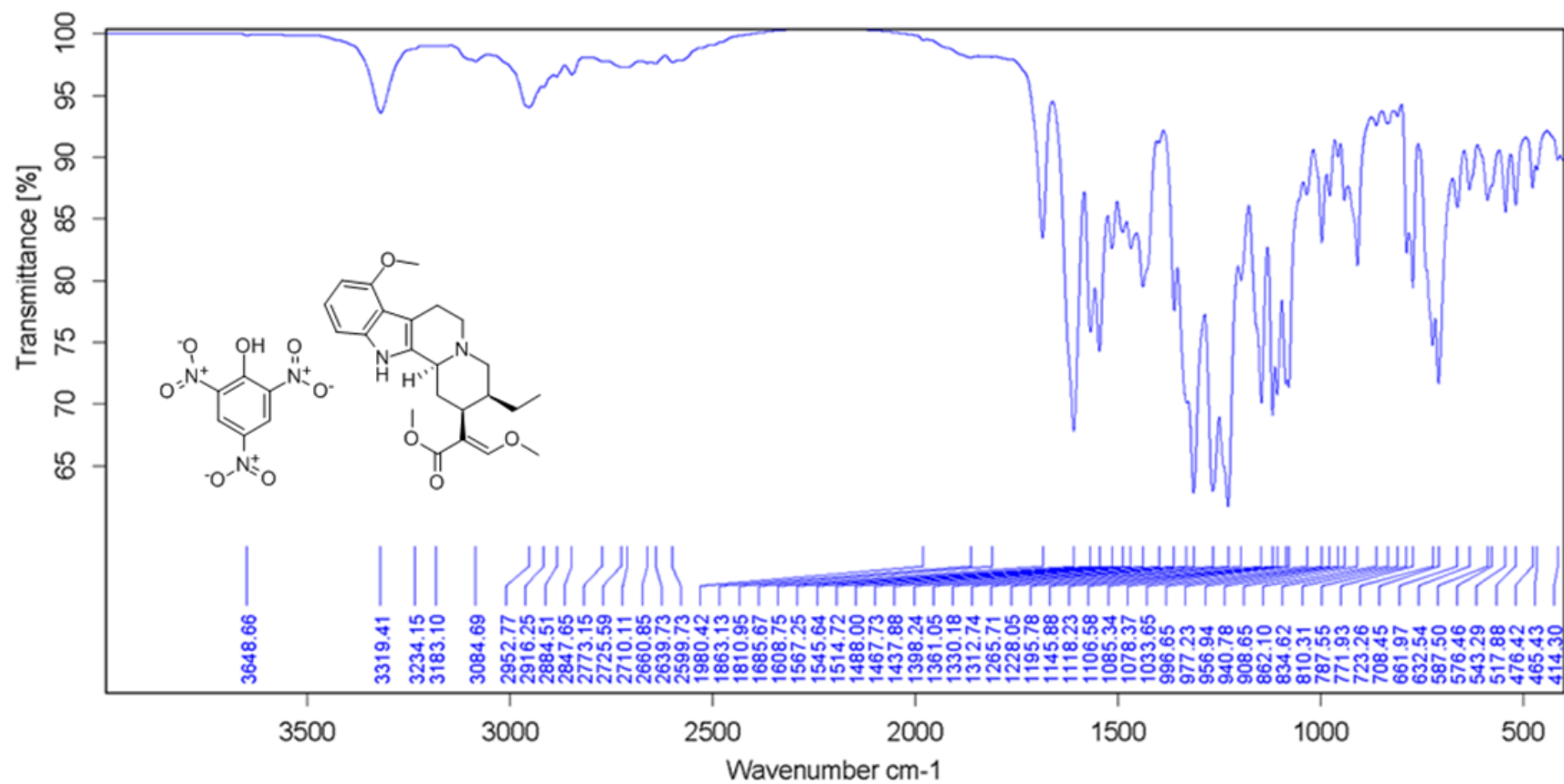
ภาพที่ 4.9 สเปกตรัม ¹H-NMR ของมิทราไจนีนพเครตและโครงสร้างของโมเลกุล

ตารางที่ 4.6 แสดง chemical shift ของโปรตอนในมิทราไจนีนพิกเครต

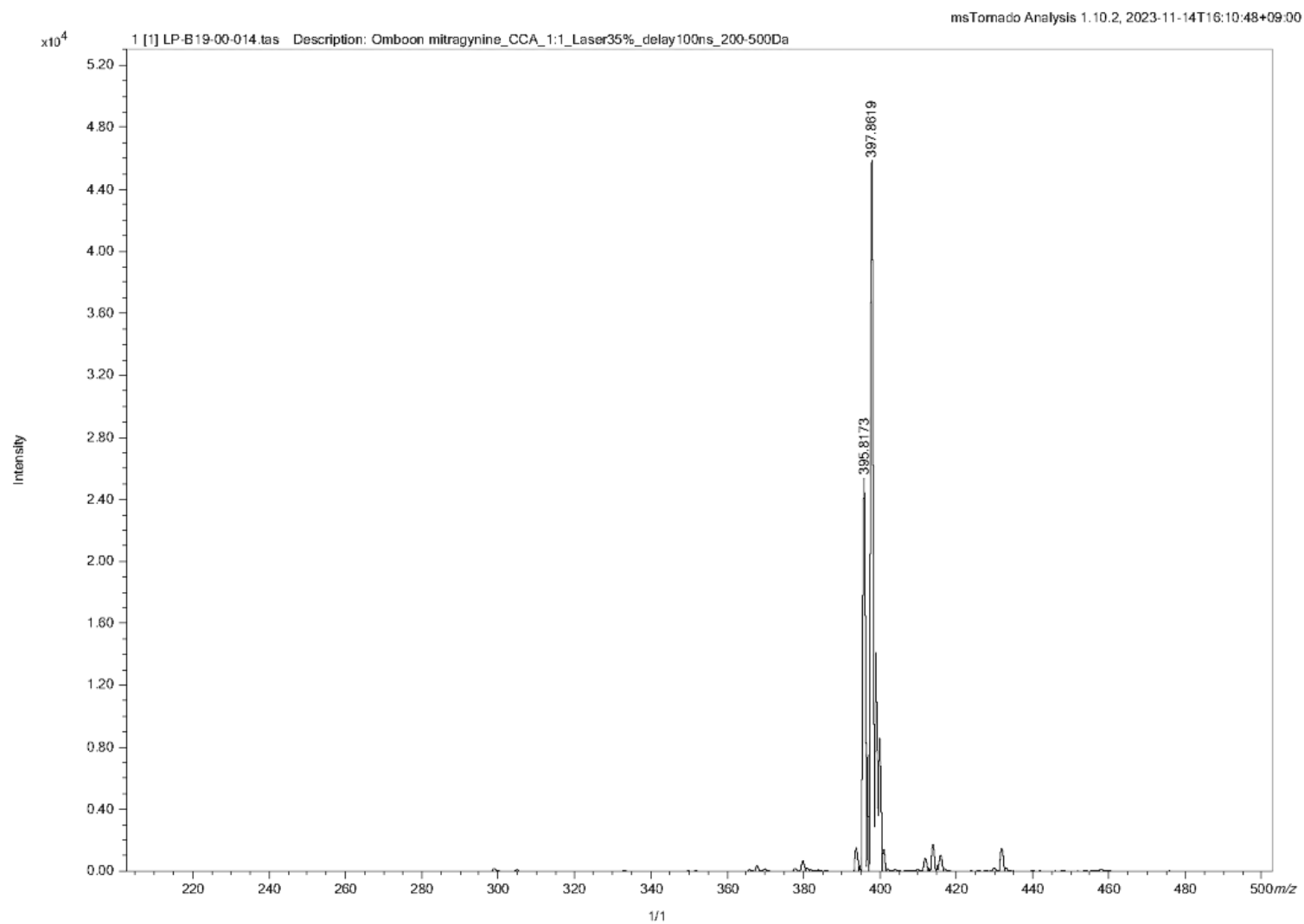
δ in ppm ^1H NMR of mitragynine picrate
7.566-6.456 (3H, m, Ar-H)
6.443(1H, s, =CH)
3.861(3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.766 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.759 (3H, s, $-\text{OCH}_3$)
3.281 (4H, $-\text{N}-\text{CH}_2$)
3.161(2H, $-\text{CH}_2$)
1.278 (2H, m, $-\text{CH}_2$)
0.875 (3H)

5.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิทราไจนีนพิกเครตด้วยเทคนิค MS

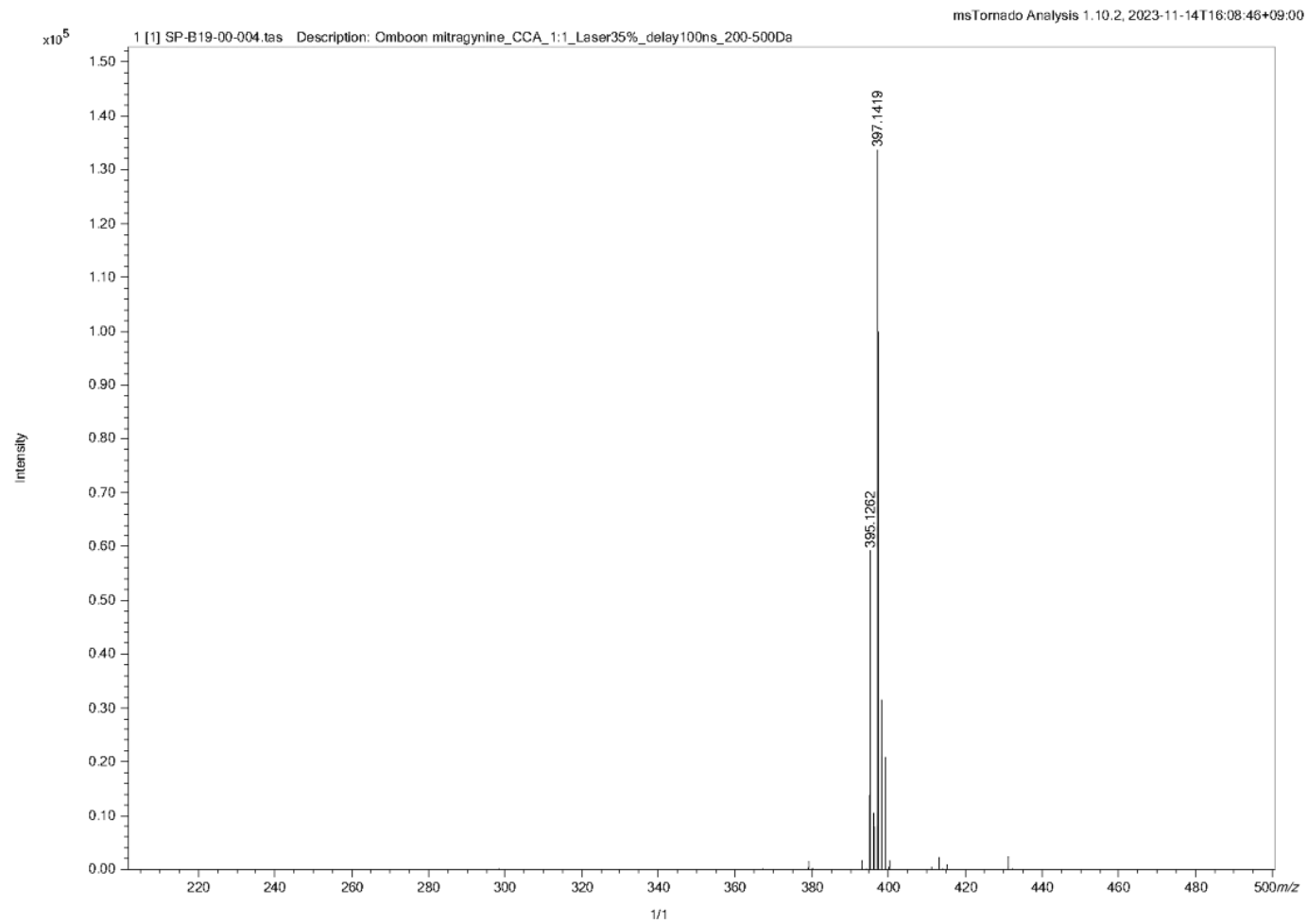
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิทราไจนีนพิกเครต ด้วยเทคนิค MALDI Mass spectroscopy ในโหมด Linear ได้ mass spectrum (ภาพที่ 4.11) พบว่า มิทราไจนีนพิกเครต เกิดการแตกตัวกลายเป็นไอออนที่มีมวลโมเลกุล 397.8619, 395.8173 ดังนั้น สารเบสพิก M-H 397.8619 เป็นสารมิทราไจนีนมวลโมเลกุล 398.5 กรัมต่อโมล เมื่อสารมิทราไจนีนพิกเครต ที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับ matrix (CCA) ถูกยิงด้วยเลเซอร์ สารมิทราไจนีนพิกเครต เกิดการแตกตัวกลายเป็นไอออนที่มีมวลโมเลกุล 379.0470, 335.0610, 307.1785, 282.0505, และ 212.0131 เมื่อเปลี่ยนไปใช้โหมด spiral พบว่า สารมิทราไจนีนพิกเครตเกิดการแตกตัวกลายเป็นไอออนที่มีมวลโมเลกุล 397.1419, 395.1262 (ภาพที่ 4.12 และ ภาพที่ 4.13)



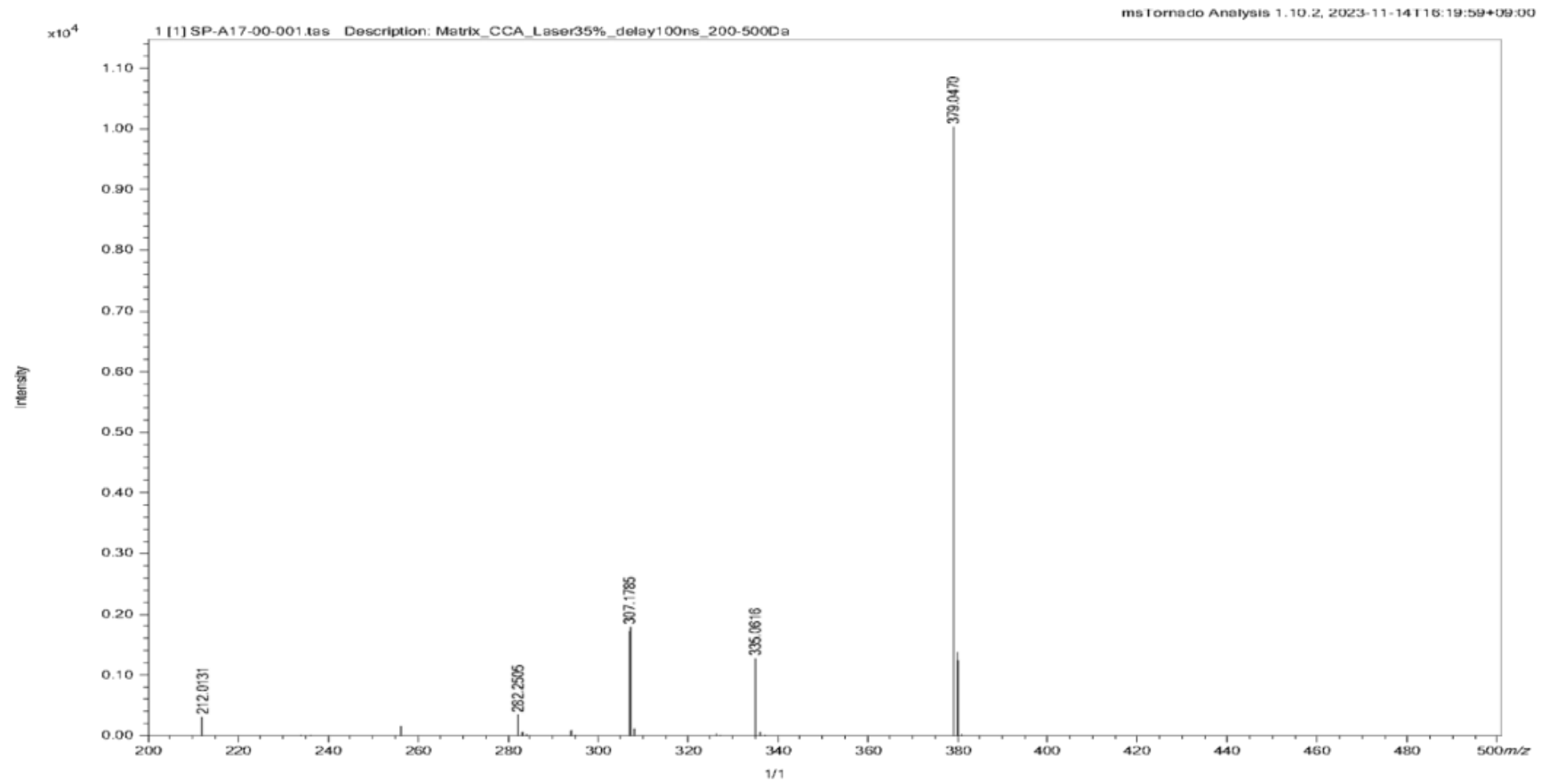
ภาพที่ 4.10 IR spectrum ของมิตราไจนินและโครงสร้างของโมเลกุล



ภาพที่ 4.11 MALDI mass spectrum ของมิทราไจนีนฟิเคเรตใน Linear mode



ภาพที่ 4.12 MALDI mass spectrum ของมิทราไจนีนพิกเครตใน Spiral mode



ภาพที่ 4.13 MALDI mass spectrum ของมัทราไฉนีนฟิคเรตใน matrix of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CCA)

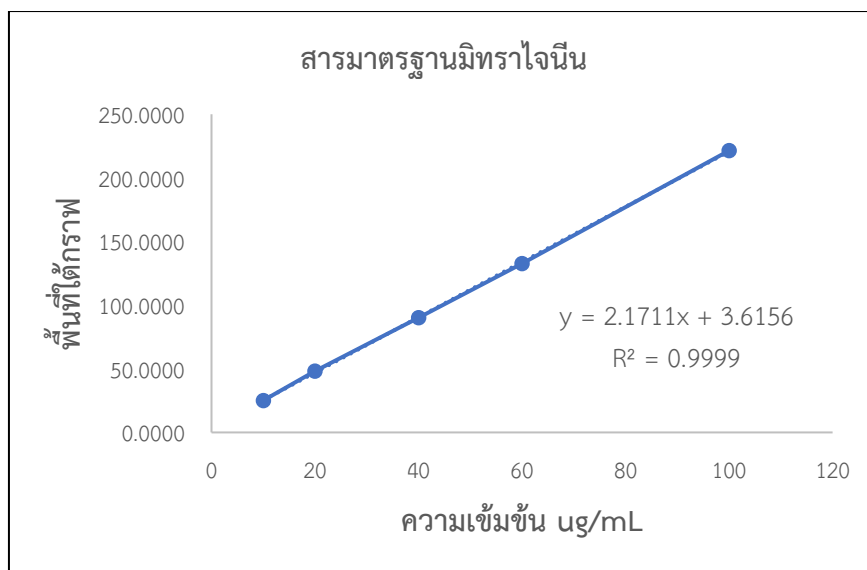
6. การหาปริมาณมิทราไจนีนตาม Thai Herbal Phamacopoeia (THP) 2021

ด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

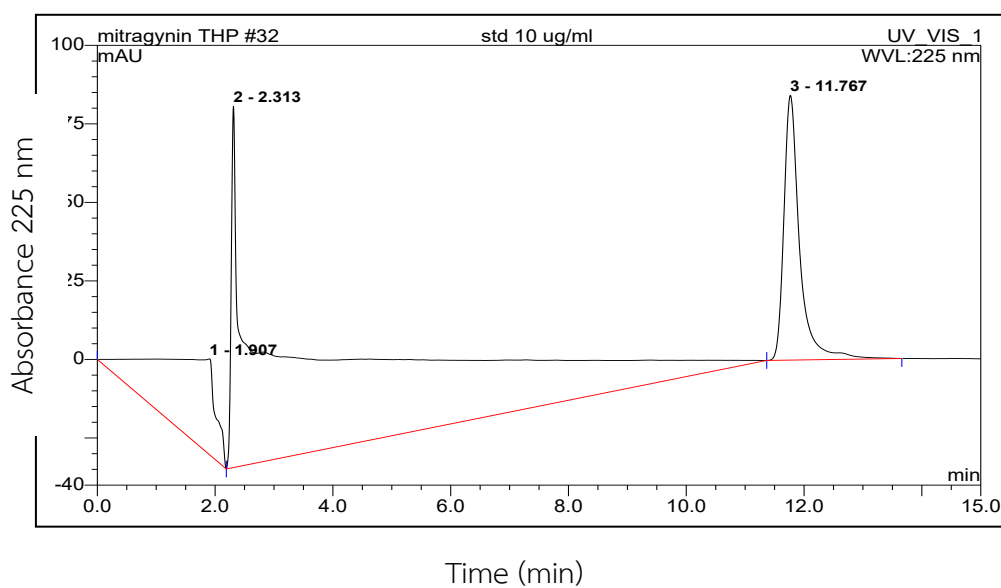
วิเคราะห์ปริมาณมิทราไจนีน ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ($y = 2.1711x + 3.6156$, $R^2=0.9999$) (ภาพที่ 4.14) โดยสารมาตรฐานมิทราไจนีนปรากฏที่ 11.767 นาที (ภาพที่ 4.15) สารสกัดกระท่อม FD 40 % และ FD 95 % แสดงมิทราไจนีนที่ 11.847 นาที และ 11.497 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) พบว่าในสารสกัดกระท่อม FD 40 % EtOH มีมิทราไจนีน 32.35 $\mu\text{g/mL}$ ในผงใบกระท่อมแห้งมีมิทราไจนีนร้อยละ 0.103 g/dry wt ส่วนสารสกัดกระท่อม FD 95% EtOH มีมิทราไจนีน 34.44 $\mu\text{g/mL}$ ผงใบกระท่อมแห้งมีมิทราไจนีนร้อยละ 1.56 g/dry wt ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน THP

ตารางที่ 4.7 แสดงพื้นที่ใต้กราฟกับปริมาณความเข้มข้นของสารมาตรฐานมิทราไจนีนและมิทราไจนีน ในสารสกัดกระท่อม (FD 40 % และ FD 95 %) ด้วยวิธี HPLC (THP 2021)

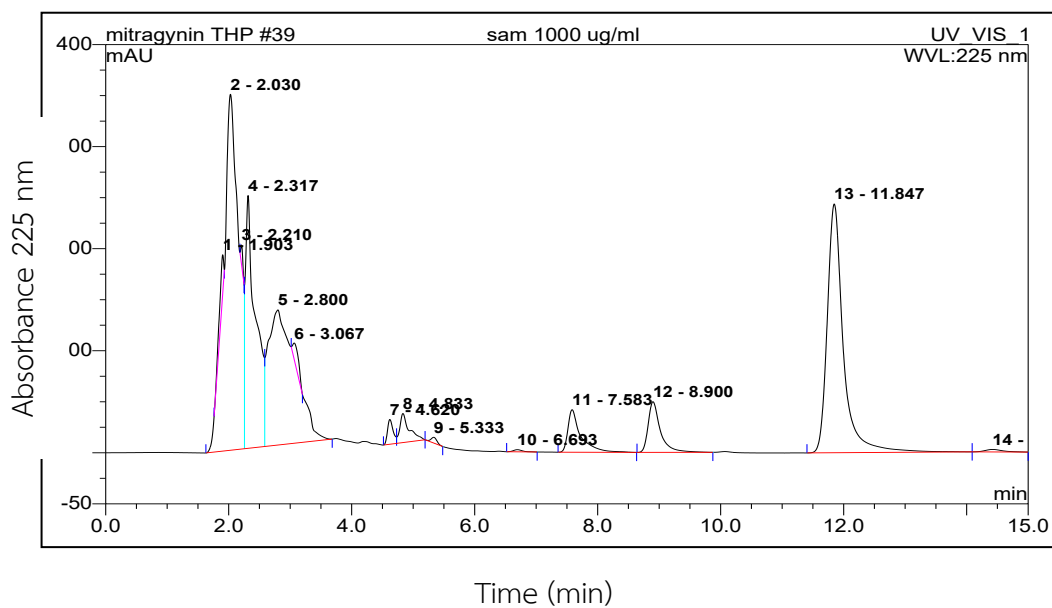
ชื่อตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	พื้นที่ใต้กราฟ			ค่าเฉลี่ย
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	100	221.473 1	221.311 8	221.382 9	221.3893 $\pm$ 0.0808
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	60	132.650 6	132.707 5	132.572 8	132.6436 $\pm$ 0.0676
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	40	90.1732	90.232	90.0363	90.1472 $\pm$ 0.1004
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	20	48.3266	48.0805	48.0612	48.1561 $\pm$ 0.1480
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	10	24.5272	24.4981	26.241	25.0888 $\pm$ 0.9980
สารสกัด กระท่อม FD 40 %	1000	73.8905	73.7853	73.8787	73.8515 $\pm$ 0.0576
สารสกัด กระท่อม FD 95%	500	78.0920	78.4847	78.5885	78.3884 $\pm$ 0.2619



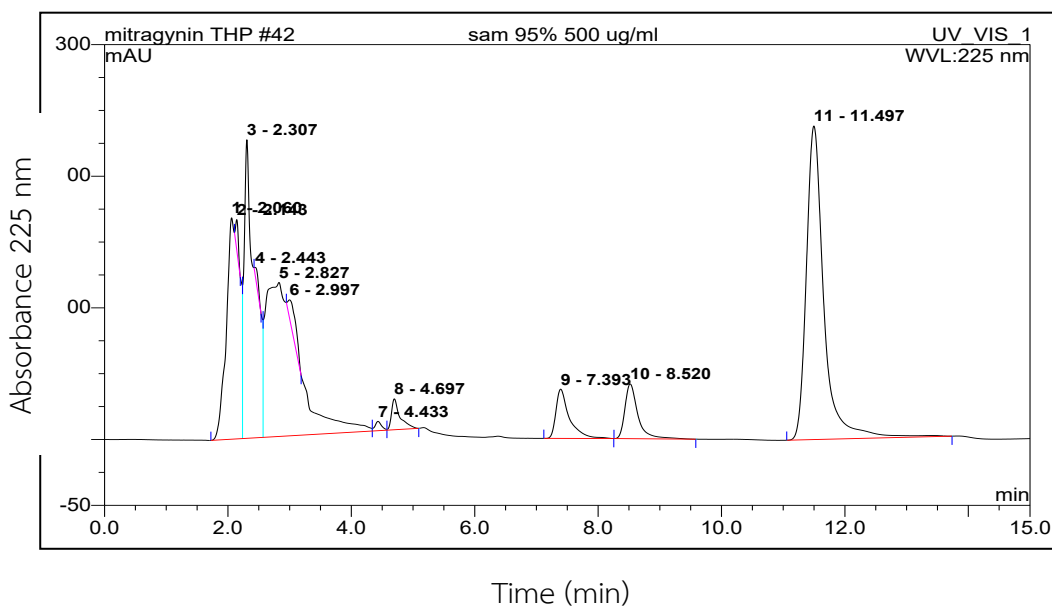
ภาพที่ 4.14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานมิทราไจนีน



ภาพที่ 4.15 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานมิทราไจนีน
ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.16 โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 40 % ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.17 โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ UV 225 นาโนเมตร

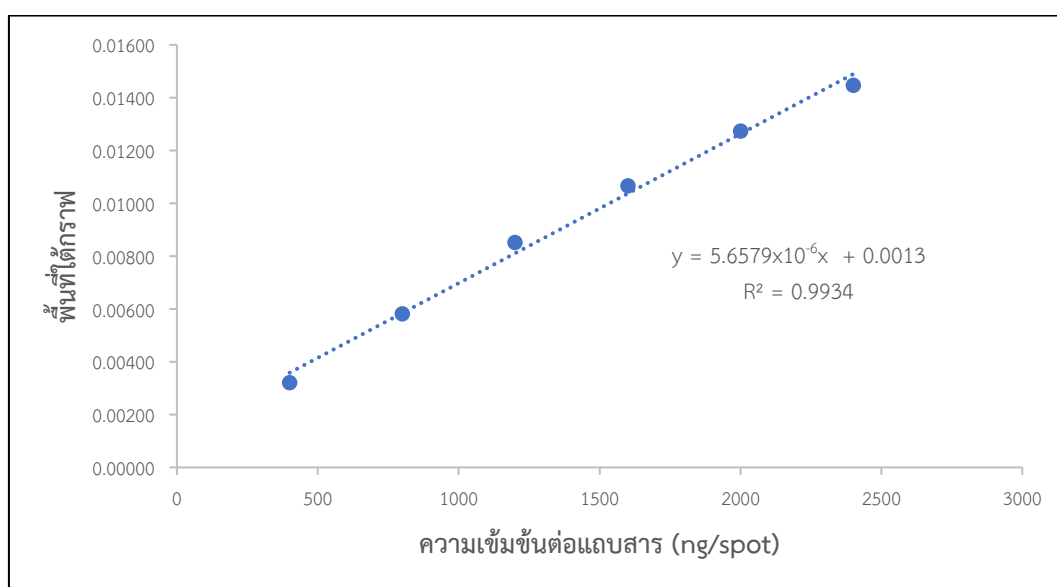
7. การตรวจสอบความถูกต้องในวิธีวิเคราะห์ปริมาณมิทราไจนีนด้วย HPTLC

7.1 ความจำเพาะ (Specificity)

เมื่อใส่สารมาตรฐานมิทราไจนีน ปริมาตร 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ไมโครลิตร และสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC พบว่า ค่า R_f ของสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัดกระท่อม (40 % EtOH) (ภาพที่ 4.3) มีค่า $R_f = 0.48$ เท่ากัน

7.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

เมื่อใส่สารมาตรฐานมิทราไจนีน ปริมาตร 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น TLC ได้ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้น 400-2400 นาโนกรัมต่อแถบสาร (Range) ได้สมการเชิงเส้น $y = 5.6579 \times 10^{-6} X + 0.001317$ (ภาพที่ 4.18) และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r^2) เท่ากับ 0.9934 (ตารางที่ 4.8)



ภาพที่ 4.18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานมิทราไจนีน

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของสารมิตราไจนีน (AU) จากการทดลอง (n=3)

ปริมาณ ng/spot	พื้นที่ใต้กราฟ (AU)			ค่าเฉลี่ย $\pm$
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
400	0.00333	0.00282	0.00349	0.00321 $\pm$ 0.00035
800	0.00606	0.00577	0.00563	0.00582 $\pm$ 0.00022
1200	0.00823	0.00857	0.00876	0.00852 $\pm$ 0.00027
1600	0.01019	0.01081	0.01100	0.01067 $\pm$ 0.00042
2000	0.01225	0.01295	0.01302	0.01274 $\pm$ 0.00043
2400	0.01399	0.01471	0.01470	0.01447 $\pm$ 0.00042

การศึกษาความถูกต้อง (Accuracy) โดยการคำนวณจากค่าร้อยละการคืนกลับ (% Recovery) ของปริมาณสารมาตรฐานมิตราไจนีน 0.4, 1.6 และ 2.8 ไมโครกรัม ได้ค่าเฉลี่ยของการคืนกลับ เท่ากับ 92.37 ± 0.97 , 105.55 ± 3.56 และ 95.41 ± 1.83 ตามลำดับ และร้อยละของค่าเฉลี่ยรวม (n=9) เท่ากับ 97.77 ± 6.90 (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ความถูกต้อง (Accuracy) ด้วย HPTLC

ปริมาณสารมาตรฐาน มิตราไจนีน (μg)	ปริมาณสารมาตรฐาน มิตราไจนีนที่วัดได้ (μg)	% recovery	ค่าเฉลี่ย
0.4	0.3654	91.35	92.37 ± 0.97
	0.3701	92.50	
	0.3731	93.27	
1.6	1.7116	106.98	105.55 ± 3.56
	1.6240	101.50	
	1.7308	108.17	
2.8	2.6140	93.36	95.41 ± 1.83
	2.7123	96.87	
	2.6884	96.02	
ค่าเฉลี่ยรวม (n=9)			97.77 ± 6.90

ตารางที่ 4.10 การวิเคราะห์ความเที่ยงภายในวันเดียวกัน (Intraday Precision) ด้วย HPTLC

ปริมาณ (ng/spot)	ค่าเฉลี่ย (AU)	% RSD
400	0.003138 ± 0.000693	22.07
800	0.005988 ± 0.000381	6.36
1200	0.008331 ± 0.000234	2.81
1600	0.010338 ± 0.000242	2.34
2000	0.012107 ± 0.000125	1.03
2400	0.013609 ± 0.000336	2.47

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความเที่ยงต่างวัน ติดต่อกัน 3 วัน (Interday Precision) ด้วย HPTLC

ปริมาณ (ng/spot)	ค่าเฉลี่ย (AU)	% RSD
400	0.003214 ± 0.000352	10.95
800	0.005822 ± 0.000215	3.70
1200	0.008521 ± 0.000271	3.18
1600	0.010668 ± 0.000417	3.91
2000	0.012743 ± 0.000352	2.76
2400	0.014469 ± 0.000415	2.87

ผลการหาปริมาณต่ำสุดของสารมิตราไจนีนที่สามารถตรวจพบ (Limit of detection, LOD) จาก Calibration curve ได้ค่า LOD = 239.46 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณต่ำสุดของสารมิตราไจนีนที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of quantitation, LOQ) มีค่าเท่ากับ 725.63 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.12 ปริมาณมิตราไจนีนต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) และปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (LOQ)

การวิเคราะห์	ครั้งที่ 1 ng/mL	ครั้งที่ 2 ng/mL	ครั้งที่ 3 ng/mL	ค่าเฉลี่ย
LOD	198.07	261.86	258.44	239.46 ± 35.88
LOQ	600.22	793.50	783.16	725.63 ± 108.73

8. การควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วย High Performance Thin layer chromatography (HPTLC) ของสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH

พบว่า สามารถตรวจพบมิตราไจนีนในสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH (ภาพที่ 4.17) ปรากฏเป็นแถบดำบนพื้นเรืองแสงเขียว (ภาพที่ 4.6) ค่าเฉลี่ยปริมาณมิตราไจนีนของสารสกัด 40% EtOH ที่ความเข้มข้น 400 นาโนกรัมต่อแถบสาร มีค่า 0.01305 ± 0.00111847 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.13)

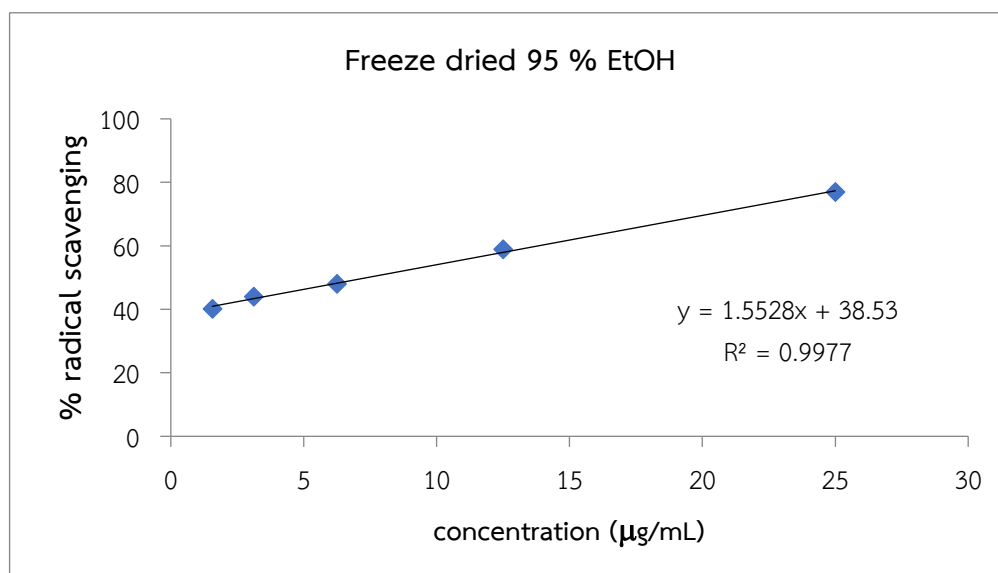
ตารางที่ 4.13 ปริมาณมิตราไจนีนในสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH ด้วยวิธี HPTLC

ตัวอย่าง	ครั้งที่ 1 ng/mL	ครั้งที่ 2 ng/mL	ครั้งที่ 3 ng/mL	ค่าเฉลี่ย
40% EtOH	0.01179	0.01347	0.01389	0.01305 ± 0.00111

ผลการศึกษาด้านชีวภาพ

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม (FD 95 %) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging capacity assay พบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.47 ± 0.10 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 4.19, ตารางที่ 4.14)

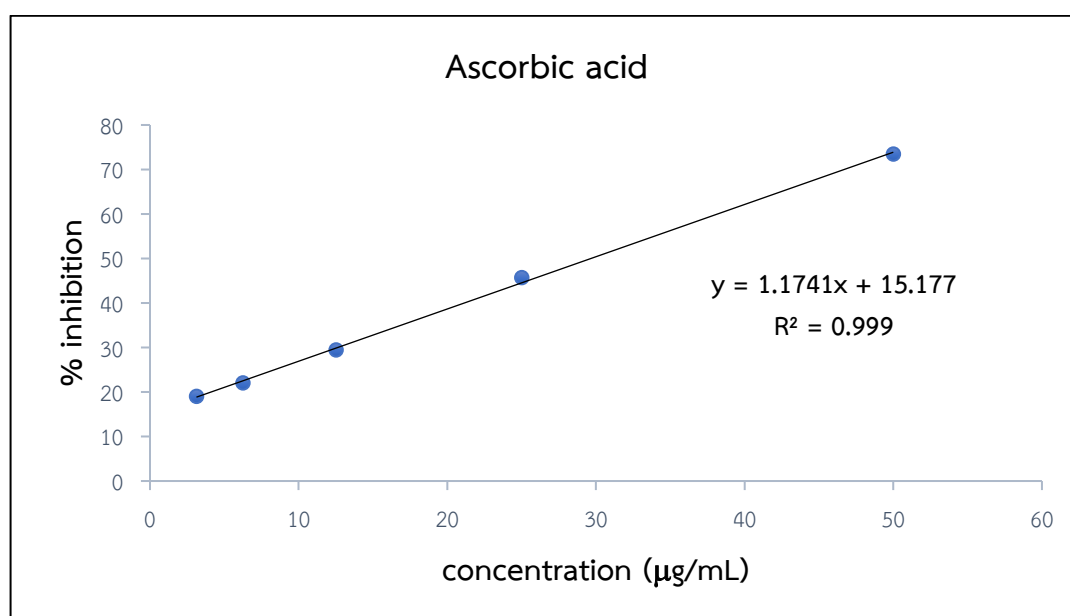


ภาพที่ 4.19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับ % radical scavenging ของสารสกัดกระท่อม FD 95 %

ตารางที่ 4.14 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี DPPH radical scavenging

สารสกัด	IC ₅₀ (μg/mL)			ค่าเฉลี่ย (μg/mL)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	7.73	7.62	6.83	7.39 ± 0.49

1.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ด้วยวิธี ABTS⁺ radical cation decolorization assay โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจากการสร้างกราฟมาตรฐาน ($R^2=0.999$) โดยมีสมการเส้นตรง ($y=1.1741x + 15.177$) (ภาพที่ 4.20) พบว่าสารสกัดหยาดกระท่อม FD 95 % มีค่า Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VEAC Value) เท่ากับ 17.76 ± 0.33 mg ascorbic acid equivalent/g extract (ตารางที่ 4.15)

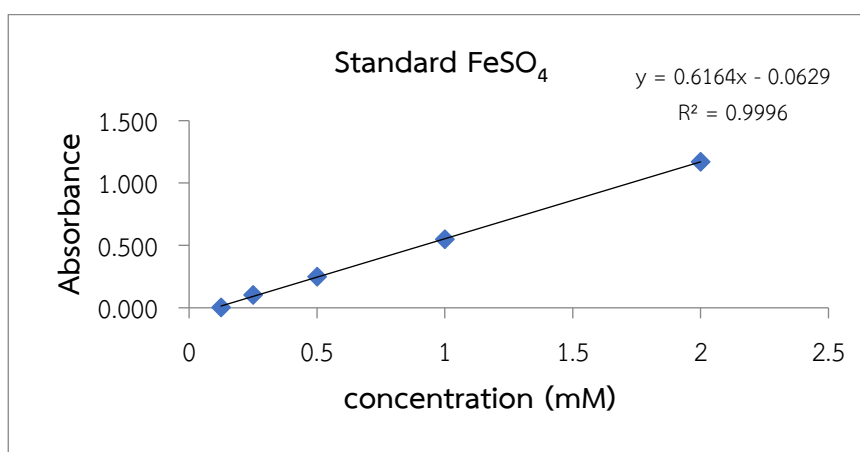


ภาพที่ 4.20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการยับยั้งของสารมาตรฐาน Ascorbic acid

ตารางที่ 4.15 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี ABTS^{•+} radical cation decolorization assay

สารสกัด	VEAC Value of ABTS (mg ascorbic acid/g extract)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย (mM/mg)
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	17.53	18.14	17.61	17.76 ± 0.33

1.3 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ด้วยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay เทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟตได้สมการเส้นตรง ($y=0.6164x - 0.0629$, $R^2=0.9996$) (ภาพที่ 4.21) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดกระท่อม FD 95 % มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเท่ากับ 5211.44 ± 9.366 mM FeSO₄ equivalent/g extract (ตารางที่ 4.16)



ภาพที่ 4.21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น
กับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate (FeSO₄)

ตารางที่ 4.16 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท่อม FD 95 % โดยวิธี ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay

สารสกัด	FRAP value (mM Fe ²⁺ /g)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	5222.26	5206.04	5206.04	5211.44 ± 9.36

2. ความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ของสารมาตรฐานมิตราไจนีน และสารสกัดกระท่อม

เมื่อนำสารมาตรฐานมิตราไจนีนที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และสารสกัดกระท่อม (FD 40 % และ FD 95 %) ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay พบว่า สารมาตรฐานมิตราไจนีน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 61 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดกระท่อม (FD 40 % และ FD 95 %) ความเข้มข้น 12.50 - 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มีอัตราการรอดชีวิต 98-106 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (ตารางที่ 4.17)

ตารางที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์รอดชีวิตของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิตราไจนีนและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ (%cell viability)
กลุ่มควบคุม		100.00
สารมาตรฐาน มิตราไจนีน	12.5	106.88 $\pm$ 3.47
	25	105.65 $\pm$ 5.33
	50	107.53 $\pm$ 2.57
	80	106.15 $\pm$ 3.48
	100	61.87 $\pm$ 3.18
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	12.5	105.20 $\pm$ 3.23
	25	105.50 $\pm$ 2.72
	50	106.62 $\pm$ 5.20
	100	101.30 $\pm$ 6.12
	200	98.70 $\pm$ 1.09
สารสกัดกระท่อม FD 40 %	12.5	104.41 $\pm$ 8.25
	25	100.06 $\pm$ 10.63
	50	104.28 $\pm$ 7.21
	100	107.25 $\pm$ 7.90
	200	102.80 $\pm$ 5.01

3. ผลของการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดกระท่อมต่อการหลั่งไนตริกออกไซด์ (NO) โดยเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่ง NO ของสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัดกระท่อม (FD 40% และ FD 95 %) ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานมิทราไจนีนที่ ความเข้มข้น 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้าง ไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 12.10, 48.03 และ 76.02 ตามลำดับ และสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ได้ร้อยละ 6.88, 20.16, 48.86 และ 79.16 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.18)

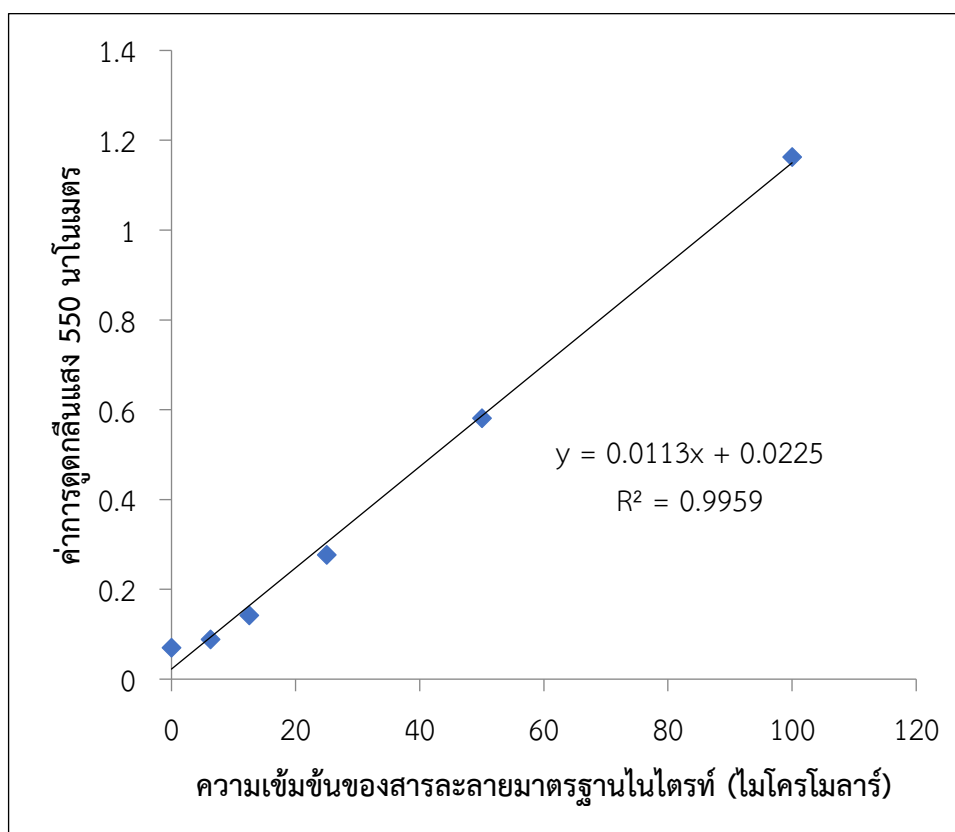
ตารางที่ 4.18 การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนีน และสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาณ NO (μM)	% ยับยั้งการผลิต NO
กลุ่มควบคุม	-	0.75 ± 0.12	-
กลุ่ม LPS	-	33.73 ± 0.14	-
Dexamethasone	20	2.71 ± 0.01	91.97
	12.5	35.40 ± 0.55	-4.95
สารมาตรฐานมิทราไจนีน	25	29.65 ± 0.76	12.10
	50	17.44 ± 0.98	48.03
	80	8.09 ± 0.47	76.02
	12.5	39.65 ± 0.80	-17.55
สารสกัดกระท่อม FD 95%	25	31.41 ± 0.10	6.88
	50	26.93 ± 0.20	20.16
	100	17.25 ± 3.11	48.86
	200	7.03 ± 1.05	79.16

ส่วนสารสกัดกระท่อม FD 40 % ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ร้อยละ 9.1, 13.1, 25.8 และ 44.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.19)

ตารางที่ 4.19 การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระเทียม FD 40 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	การยับยั้ง NO (μM)	% ยับยั้งการผลิต NO
กลุ่มควบคุม	-	2.56 ± 0.02	-
กลุ่ม LPS	-	36.48 ± 0.18	-
สารสกัดกระเทียม FD 40 %	12.5	42.15 ± 0.73	-15.6
	25	33.15 ± 0.03	9.1
	50	31.70 ± 0.66	13.1
	100	27.05 ± 0.67	25.8
	200	20.24 ± 1.04	44.5



ภาพที่ 4.22 กราฟมาตรฐานของไนไตรท์

4. ผลของการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ต่อการหลั่ง ไซโตไคน์ Interleukin 6 (cytokine IL-6, IL-6)

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin 6 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานมิทราไจนินที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin 6 ได้ร้อยละ 4.68, 0.61 และ 28.70 ตามลำดับ และสารสกัดกระเทียม FD 95 % ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin 6 ได้ร้อยละ 18.68 และ 35.64 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.20 การยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ Interleukin 6 ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐานมิทราไจนินและสารสกัดกระเทียม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาณ Interleukin 6 (pg/mL)	% การยับยั้ง การหลั่ง IL-6
กลุ่มควบคุม	-	1359.03	-
กลุ่ม LPS	-	18024.63 $\pm$ 12.09	-
สารมาตรฐาน มิทรา ไจนิน	12.5	17180.67 $\pm$ 13.48	4.68
	25	17914.33 $\pm$ 41.15	0.61
	50	21111.98 $\pm$ 46.26	-17.13
	80	12850.67 $\pm$ 22.99	28.70
สารสกัดกระเทียม FD 95 %	25	18709.10 $\pm$ 24.28	-3.80
	50	18501.41 $\pm$ 20.27	-2.65
	100	14656.83 $\pm$ 31.59	18.68
	200	11600.84 $\pm$ 20.85	35.64

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ต่อการหลั่ง TNF- α

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ TNF- α ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานมิทราไจนินที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม LPS และสารสกัดกระเทียม FD 95 % ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม LPS เช่นกัน (ตารางที่ 4.21)

ตารางที่ 4.21 การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ TNF- α ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับ สารมาตรฐานมิทราไจนีนและสารสกัดกระเทียม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาณ TNF-alpha (pg/mL)	% การยับยั้ง การหลั่ง TNF- α
กลุ่มควบคุม	-	1461.82 $\pm$ 12.97	-
กลุ่ม LPS	-	6697.12 $\pm$ 0.92	-
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	12.5	6632.82 $\pm$ 27.64	0.96
	25	6638.21 $\pm$ 40.95	0.88
	50	6685.38 $\pm$ 33.47	0.18
	80	6680.55 $\pm$ 22.28	0.25
สารสกัดกระเทียม FD 95 %	25	6693.46 $\pm$ 0.71	0.05
	50	6696.72 $\pm$ 6.13	0.006
	100	6693.04 $\pm$ 2.75	0.06
	200	6684.10 $\pm$ 28.07	0.19

6. ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ต่อการหลั่ง PGE2

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบ PGE2 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารมาตรฐานมิทราไจนีนที่ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตสารสื่ออักเสบ PGE2 ได้เพียงร้อยละ 6.62 และสารสกัดกระเทียม FD 95 % ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการอักเสบ PGE2 ได้เพียงร้อยละ 1.89 ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม LPS (ตารางที่ 4.22)

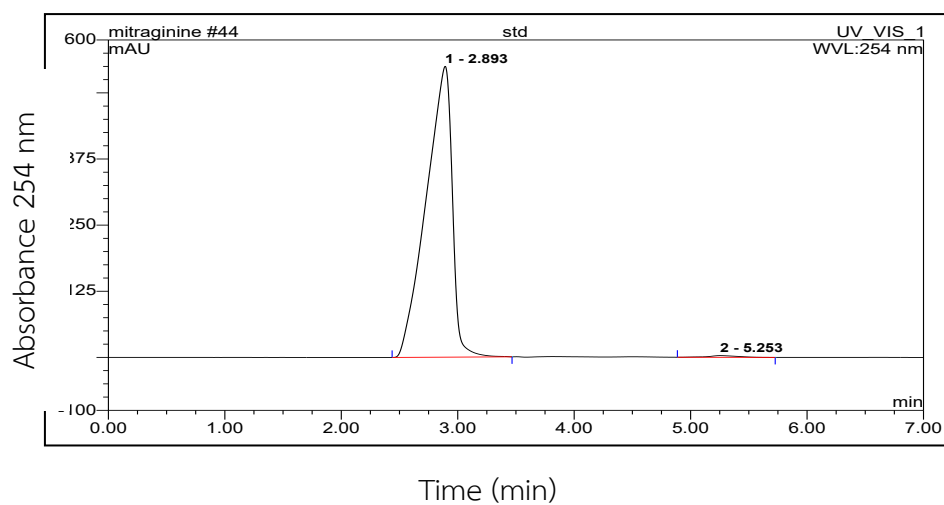
ตารางที่ 4.22 การยับยั้งการหลั่ง PGE2 ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐาน มิทราไจนีนและสารสกัดกระท่อม FD 95 % ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ปริมาณ PGE2 (pg/mL)	% การยับยั้ง การหลั่ง PGE2
กลุ่มควบคุม	-	139.68 ± 2.16	-
กลุ่ม LPS	-	168.65 ± 0.96	-
สารมาตรฐาน มิทราไจนีน	12.5	167.74 ± 1.25	0.54
	25	168.92 ± 0.31	-0.16
	50	166.11 ± 0.72	1.51
	80	157.48 ± 2.62	6.62
สารสกัดกระท่อม FD 95 %	25	168.74 ± 1.13	-0.05
	50	167.47 ± 1.79	0.70
	100	166.74 ± 0.83	1.13
	200	165.47 ± 2.19	1.89

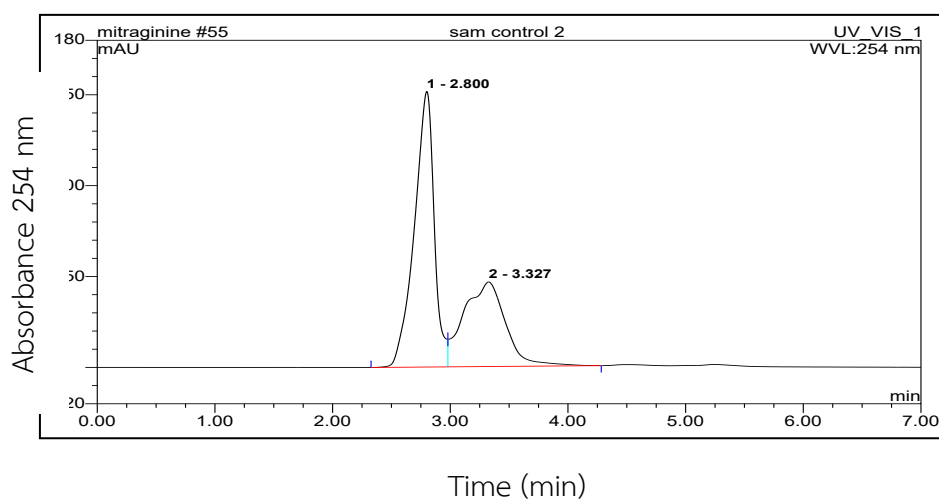
ผลการศึกษาด้านผลิตภัณฑ์

1. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ

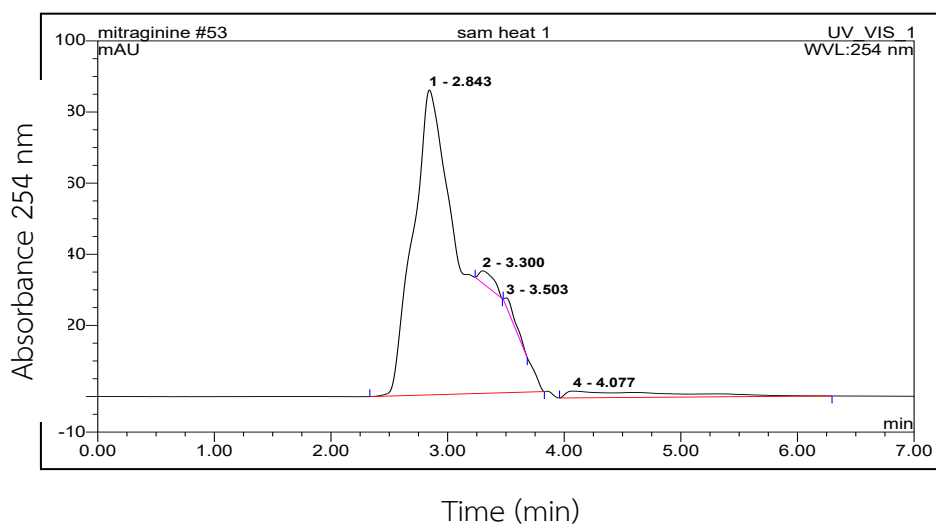
จากการนำสารสกัดกระท่อม FD 95 % ไปทดสอบความคงตัวในสภาวะต่าง ๆ ตามวิธีการในหัวข้อการศึกษาด้านผลิตภัณฑ์ ข้อ 1. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ ตาม Thai FDA guideline จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC ใช้คอลัมน์ C_{18} ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน ขนาดคอลัมน์ 4.6 มิลลิเมตร $\times$ 150 มิลลิเมตร ใช้เมทานอล ต่อน้ำ ต่อกะดอะซิติก (95 : 4 : 1 มิลลิลิตร) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ปริมาณสารที่ฉีดเข้าเครื่อง 10 ไมโครลิตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตั้งค่าอุณหภูมิของคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ตรวจจับสัญญาณที่ความยาวคลื่น UV 254 นาโนเมตร เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงโครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % เทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า กลุ่มที่อยู่ภายใต้สภาวะออกซิเดชันลักษณะของโครมาโตแกรมไม่มีความแตกต่าง จากกลุ่มควบคุมแม้จะมีการลดลงของพีคเล็กน้อย แต่พบการเสื่อมสภาพเพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะกรด สภาวะอุณหภูมิสูง และพบการเสื่อมสภาพมากที่สุดภายใต้สภาวะต่าง



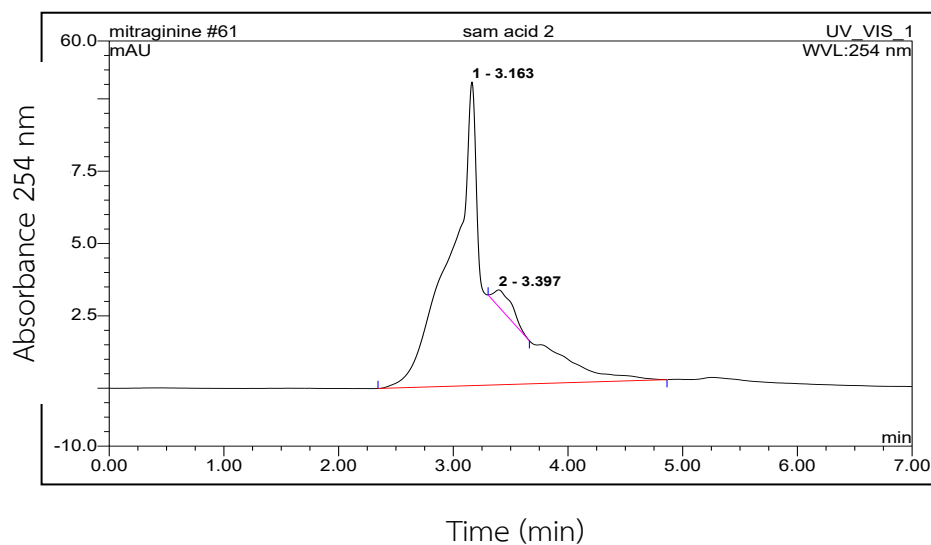
ภาพที่ 4.23 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานมิทราไจนีน



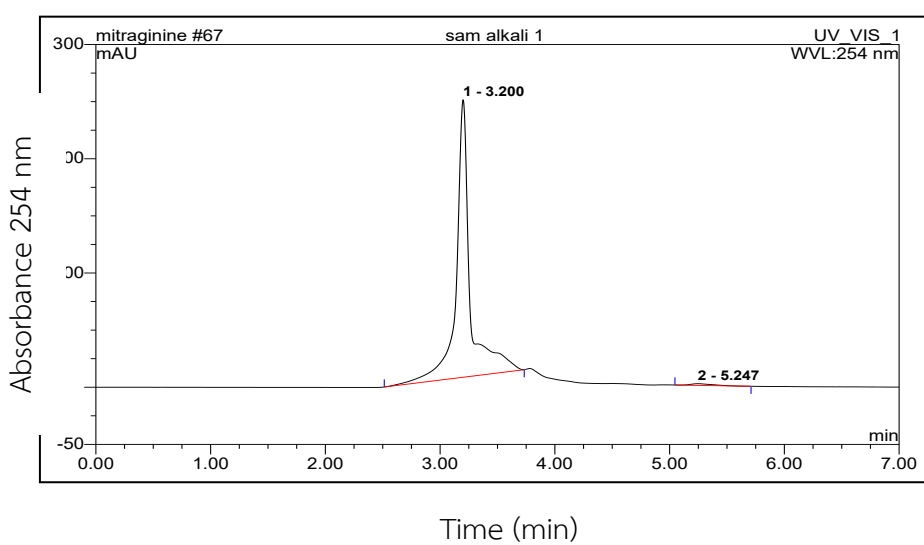
ภาพที่ 4.24 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % กลุ่มควบคุม



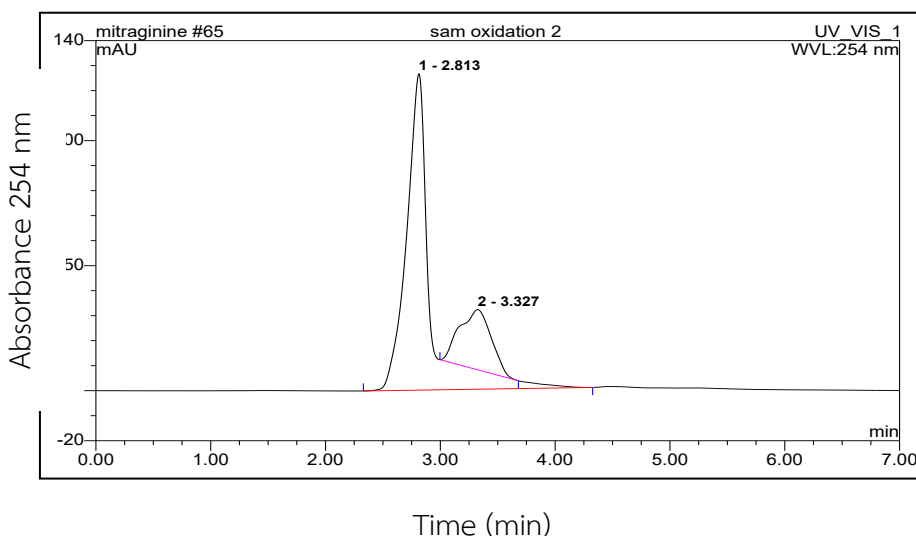
ภาพที่ 4.25 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้อุณหภูมิสูง



ภาพที่ 4.26 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะกรด



ภาพที่ 4.27 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะด่าง



ภาพที่ 4.28 HPLC โครมาโตแกรมของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ภายใต้สภาวะออกซิเดชัน

2. การพัฒนาไมโครอิมัลชันสารสกัดกระท่อม FD 95 %

2.1 คัดเลือกวัฏภาคน้ำมันสำหรับละลายสารสกัดกระท่อม

ประเมินความสามารถในการละลายของสารสกัดกระท่อม FD 95 % ในวัฏภาคน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ isopropyl myristate, propylene glycol และ Propylene Glycol Dicaprylate โดยใช้เกณฑ์การประเมินจากความใส ความสม่ำเสมอ และการเกิดตะกอนของสารสกัดพบว่า Propylene Glycol Dicaprylate เป็นวัฏภาคน้ำมันที่สามารถละลายสารสกัดได้ดีที่สุด

2.2 การเลือก Surfactant mixture (S_{mix})

สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ประกอบด้วย Polyglyceryl-4-Capate, Isopentyldiol และ Ethoxydiglycol ในอัตราส่วน 1:1:1 ส่วนผสมดังกล่าวให้ค่า HLB อยู่ระหว่าง 13.1–14.4 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการสร้างไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) จึงเลือกใช้เป็น S_{mix} สำหรับการทดสอบอัตราส่วนกับวัฏภาคน้ำมันในขั้นตอนต่อไป

2.3 การหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างวัฏภาคน้ำมันและ S_{mix} (Oil : S_{mix} ratio)

ทดสอบอัตราส่วนระหว่างวัฏภาคน้ำมันและ S_{mix} ในช่วง 0.1 : 0.9 ถึง 0.9 : 0.1 โดยเตรียมตัวอย่างน้ำหนักรวม 1 กรัม และประเมินความใส ความขุ่น และการแยกชั้นหลังการผสมด้วยเครื่อง Vortex พบว่าอัตราส่วนที่ให้ระบบมีความใสและเสถียร ได้แก่ 0.1 : 0.6, 0.2 : 0.6 และ 0.4 : 0.5 จึงนำอัตราส่วนดังกล่าวไปใช้ในขั้นตอนสร้างวัฏภาคไตรเทียม (pseudoternary phase diagram)

2.4 การสร้าง Pseudoternary Phase Diagram

นำส่วนผสม S_{mix} : Oil (0.1 : 0.6, 0.2 : 0.6 และ 0.4 : 0.5) ที่ได้จากข้อ 2.3 มาไทเทรตกับน้ำเพื่อหาปริมาณน้ำที่ทำให้เกิดบริเวณใสเป็นเนื้อเดียวกัน (isotropic liquid) นำไปสร้างแผนภาพเฟสสามส่วน (ternary phase diagram) ด้วยโปรแกรม Triplot (ภาพที่ 4.29) เพื่อระบุพื้นที่ของการเกิดไมโครอิมัลชัน พบว่าสูตรที่ให้ลักษณะเป็นไมโครอิมัลชันใสและมีความเสถียรดีที่สุดคือ S_{mix} : Oil : Water = 6 : 2 : 2 (ไมโครอิมัลชันเบส) นำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา

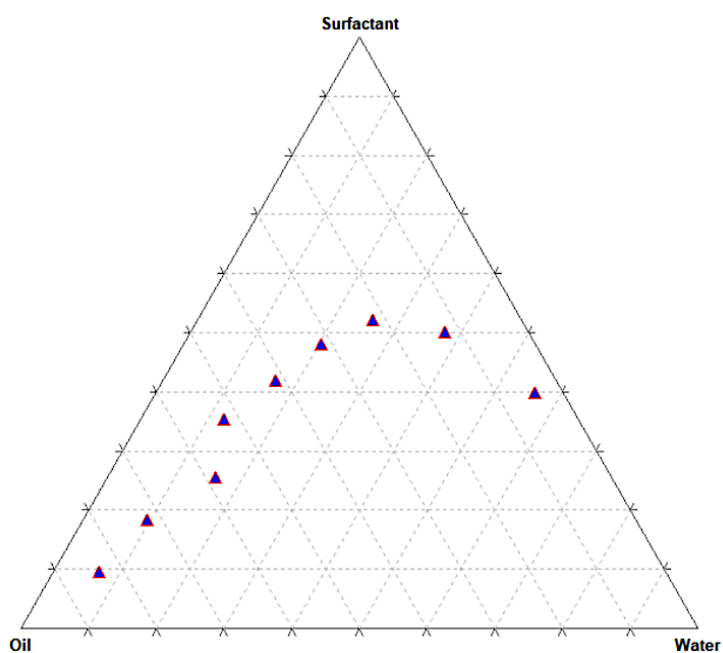
2.5 การเตรียมไมโครอิมัลชันกระท่อม

จากการทดสอบการละลายของสารสกัดกระท่อมภายในวัฏภาคน้ำมันตามข้อที่

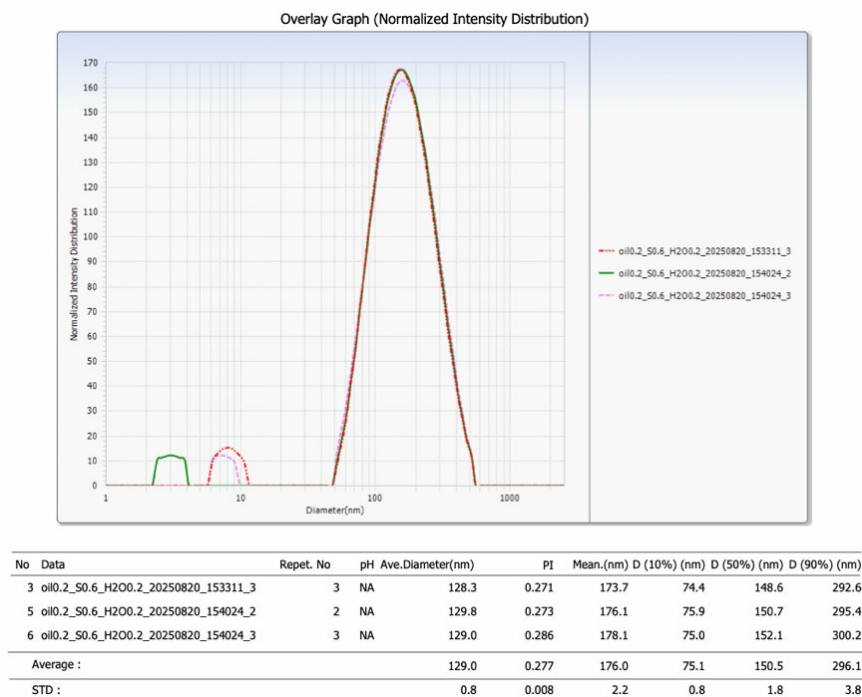
2.1 ละลาย FD 95 % 100 มิลลิกรัม ใน Propylene Glycol Dicaprylate 500 มิลลิกรัม นำไปผสมกับ S_{mix} และน้ำ ตามสูตรในตารางที่ 3.1 นำไปวัดขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา

2.6 ขนาดอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันเบส และไมโครอิมัลชันกระท่อม

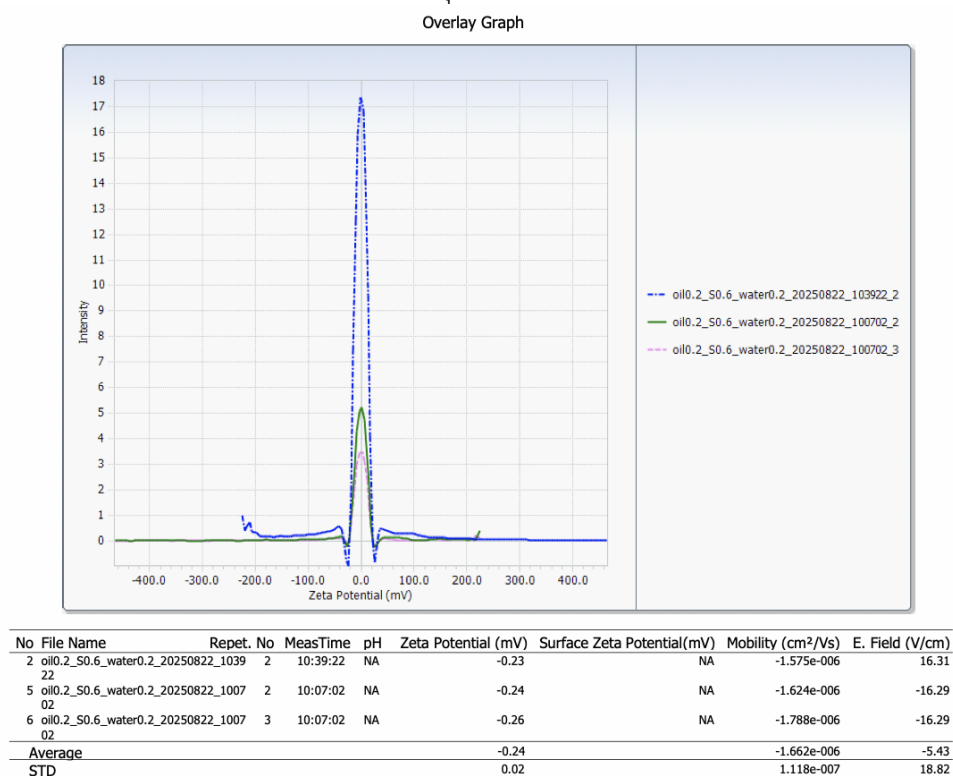
ทำการวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัว (Polydispersity Index, PI) และค่าศักย์ไฟฟ้า ซีตา (Zeta Potential) ของไมโครอิมัลชันเบส และค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta Potential) ของไมโครอิมัลชันกระท่อมด้วยเครื่อง Nanoplus-3 พบว่า ไมโครอิมัลชันเบส มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย 129 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของอนุภาค (PI) เท่ากับ 0.277 (ภาพที่ 4.30) ค่าเฉลี่ยศักย์ไฟฟ้าซีตา ของไมโครอิมัลชันเบส มีค่า -0.24 ± 0.02 มิลลิโวลต์ (ภาพที่ 4.31) ค่าเฉลี่ยศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันกระท่อม มีค่า -11.30 ± 0.89 มิลลิโวลต์ (ภาพที่ 4.32)



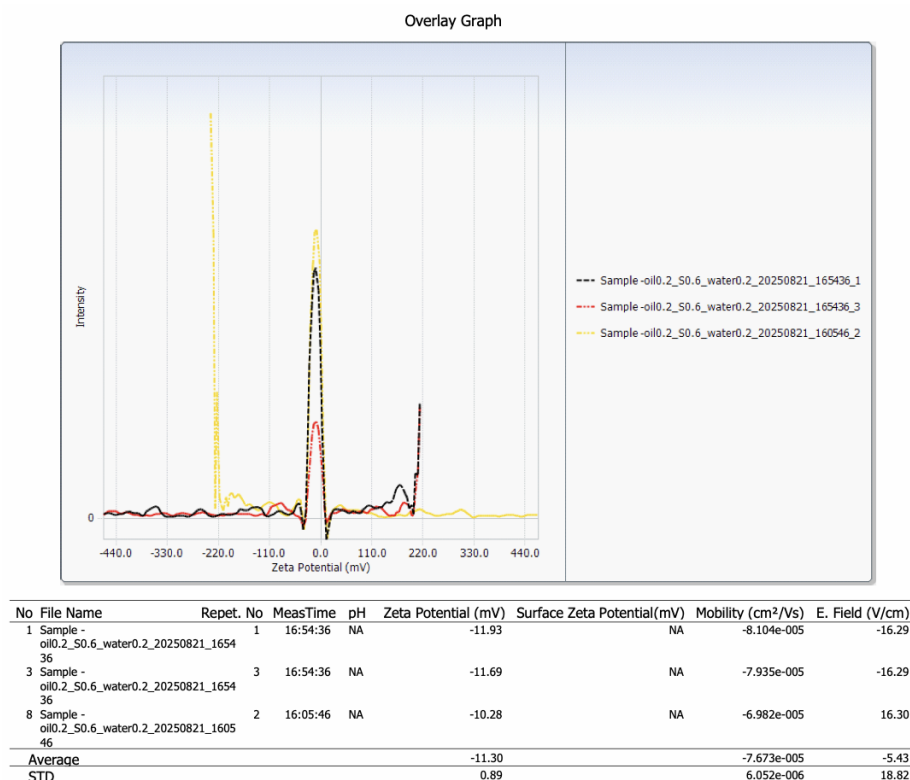
ภาพที่ 4.29 การเกิดอิมัลชันโดยโปรแกรม Triplot



ภาพที่ 4.30 ขนาดอนุภาคของไมโครอิมัลชันเบส



ภาพที่ 4.31 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันเบส



ภาพที่ 4.32 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาของไมโครอิมัลชันกระท่อม

5. การทดสอบความคงตัวของอิมัลเจลกระท่อม

เมื่อได้ไมโครอิมัลชันกระท่อมแล้วจึงเติมสารก่อเจลได้เป็นอิมัลเจลกระท่อม ที่มี FD 95 % ร้อยละ 1 นำไปทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Freeze-thaw cycle จำนวน 6 รอบ เมื่อครบกำหนดวัดค่าความหนืด, pH และสี ของผลิตภัณฑ์ก่อนและหลัง Freeze-thaw cycle (ตารางที่ 4.23)

ตารางที่ 4.23 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลเจลกระท่อม FD 95 % ก่อนและหลัง Freeze-thaw cycle จำนวน 6 รอบ

สูตร	ค่าความหนืด		ค่า pH		ลักษณะและสี	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
อิมัลเจลเบส	216,367±971.25	215,433±665.83	4.67±0.01	4.64±0.02	ใส ไม่มีสี	ใส ไม่มีสี
อิมัลเจลกระท่อม	199,867±6312.95	189,900±5708.77	4.63±0.01	4.59±0.02	ใส น้ำตาล	ใส น้ำตาล



ภาพที่ 4.33 อิมัลเจลเบส (ภาพ A) และ อิมัลเจลกระท่อม FD 95 % (ภาพ B)
หลังจากผ่าน Freeze-thaw cycle 6 รอบ

จากตารางที่ 4.22 ผลการวัดความหนืดพบว่าอิมัลเจลเบส และอิมัลเจลกระท่อม FD 95 % ก่อนทำ Freeze-thaw cycle มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $216,367 \pm 971.25$ และ $199,867 \pm 6312.95$ ตามลำดับ และหลังทำ Freeze-thaw cycle มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $215,433 \pm 665.83$ และ $189,900 \pm 5708.77$ ตามลำดับ

ค่า pH ของอิมัลเจลเบส และอิมัลเจลกระท่อม FD 95 % ก่อนทำ Freeze-thaw cycle มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.67 ± 0.01 และ 4.63 ± 0.01 ตามลำดับ และหลังทำ Freeze-thaw cycle มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.64 ± 0.02 และ 4.59 ± 0.02 ตามลำดับ ลักษณะและสีของไมโครอิมัลชันเบสก่อน และหลัง Freeze-thaw cycle มีลักษณะใส และไม่มีสี สำหรับอิมัลเจลกระท่อม ก่อน และหลัง Freeze-thaw cycle มีลักษณะใสและสีน้ำตาล คงเดิม

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาผลผลิตร้อยละของสารสกัดหยาบ ใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ABTS assay และ FRAP assay ฤทธิ์การต้านอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตสารสื่อการอักเสบในหลอดทดลอง รวมถึงการควบคุมคุณภาพสารสกัดจากใบกระท่อมที่มีมาตรฐานโดยมีมิตราไจนินเป็นสารมาตรฐานด้วยเครื่องรังสีเลข ผิวบางสมรรถนะสูง (HPTLC) และพัฒนาสูตรไมโครอิมัลชันที่มีสารสกัดกระท่อม และอิมัลเจลกกระท่อม ตลอดจนความคงตัวทางกายภาพของอิมัลเจลกกระท่อม

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การตรวจสอบวัตถุดิบตามข้อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (THP)

1.1 การวิเคราะห์ตามข้อกำหนดตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2021)

เกณฑ์ของมาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, 2021) ของกระท่อม ได้กำหนดปริมาณความชื้นที่หายไปของผงใบกระท่อมเมื่อนำไประเหยแห้ง (% Loss on drying) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษา % Loss on drying มีค่าเท่ากับ 8.74 ± 0.27 เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดมาเล็กน้อย ปริมาณเถ้ารวม (% Total ash) ไม่เกิน 6 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษา % Total ash มีค่าเท่ากับ 9.15 ± 0.13 เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด และค่าของเถ้าจากผงใบกระท่อมที่ไม่ละลายในกรด (% Acid insoluble ash) มีค่าเท่ากับ 0.7 ± 0.23

โดยงานวิจัยก่อนหน้าของ ธนวัฒน์ ทองจีน และคณะ (2567) พบว่า % Loss on drying มีค่า 5.60 ± 0.68 ในส่วนของ % Total ash มีค่าเท่ากับ 4.67 ± 0.37 ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด มีค่าเท่ากับ 0.14 ± 0.02

อย่างไรก็ตามแม้ผลการศึกษา % Loss on drying และ % Total ash จากการศึกษาในครั้งนี้จะเกินมาตรฐานยาสมุนไพรไทยของกระท่อม แต่ก็ตามยังผ่านเกณฑ์มาตรฐานสมุนไพรโดยทั่วไป ซึ่งกำหนดไว้ว่า % Loss on drying ไม่ควรมากกว่าร้อยละ 10 ในส่วนของ % Total ash มีค่าร้อยละ 1-20 โดยน้ำหนัก และ % Acid insoluble ash มีค่าร้อยละ 1-10 โดยน้ำหนัก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดเอทานอล (95 %) ของผงใบกระท่อมที่ผ่านการทำแห้งด้วยความเย็นได้ร้อยละ 22.67 ± 0.61 โดยน้ำหนัก ต่างจากข้อกำหนดของ THP 2021 (supplement 2025) ซึ่งได้ร้อยละ 25.0 โดยน้ำหนัก เนื่องจาก THP ใช้ 80 % EtOH ในการสกัด จึงได้สารที่มีชีวออกมามากกว่าและในงานวิจัยนี้ใช้การทำแห้งด้วยความเย็นจึงได้ค่าน้อยกว่าเล็กน้อย

ตารางที่ 5.1 เกณฑ์มาตรฐานของใบกระท่อม

เกณฑ์มาตรฐาน		พิชาพัชร รัฐธินอภิพงษ์, 2568	ธนวัฒน์ ทองจีน และคณะ, 2567	สรุปผลเทียบมาตรฐาน
% Loss on drying	≤ 7% (THP 2021)	8.74 ± 0.27%	5.60 ± 0.68%	สูงกว่าเกณฑ์ แต่ยังผ่าน มาตรฐานทั่วไป (≤10%)
% Total ash	≤ 6% (THP 2021)	9.15 ± 0.13%	4.67 ± 0.37%	สูงกว่าเกณฑ์ แต่ยังผ่าน มาตรฐานทั่วไป (1–20%)
% Acid insoluble ash	1–10% (ทั่วไป)	0.7 ± 0.23%	0.14 ± 0.02%	ผ่านเกณฑ์ทั้งสองงาน

1.2 การตรวจสอบกลุ่มสารพิษเคมีเบื้องต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ ตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นจากใบกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ พบสารพิษเคมี 2 กลุ่ม ได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Yuniarti et al. (2020) ที่ทำการทดสอบสารพิษเคมีจากใบกระท่อมโดยใช้สารสกัดเอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ หมักเป็นเวลา 5 วัน มาทำการตรวจสอบ พบสารพิษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ไตรเทอร์พีนอยด์ (สเตียรอยด์) ซาโปนิน และแทนนิน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Leon et al. (2022) ที่พบว่าสารสกัดจากใบกระท่อมที่สกัดด้วยเมทานอลโดยวิธีการ Soxhlet เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน ไตรเทอร์พีนอยด์ ดังนั้นการทดสอบสารเคมีเบื้องต้นของใบกระท่อมจึงสรุปได้ว่ามีอัลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุด รองลงมาคือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยทำมาก่อนหน้า สรุปได้ว่าวิธีการสกัดและการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันส่งผลให้ได้สารพิษเคมีจากใบกระท่อมแตกต่างกัน

ตารางที่ 5.2 การตรวจสอบกลุ่มสารพิษเคมีจากใบกระท่อม

ผู้วิจัย	ตัวทำละลาย	วิธีสกัด / ระยะเวลา	กลุ่มสารที่ตรวจพบ	หมายเหตุ
พิชาพัชร จิตธิธนนภิพงษ์, 2568	เอทานอล 80%	Sonicate 30 นาที	อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์	พบ 2 กลุ่มสาร
Yuniarti et al., 2020	เอทานอล 96%	หมัก 5 วัน	อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, ไตรเทอร์พีนอยด์, ซาโปนิน, แทนนิน	พบสารจำนวนมากกว่า
Leon et al., 2022	เมทานอล	Soxhlet 72 ชั่วโมง	อัลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์, ซาโปนิน, ไตรเทอร์พีนอยด์	คล้ายกับงาน Yuniarti

สรุปผลการศึกษาด้านเคมี

1. การสกัดแบบแช่หมัก (Maceration)

งานวิจัยนี้ทำการสกัดใบกระท่อมด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:10 (w/v) เป็นเวลา 7 วัน ได้จำนวนร้อยละของผลผลิต 22.67 ± 0.61 กรัม ซึ่งมีค่ามากกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้เนื่องจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของกระท่อม อัตราส่วนตัวทำละลายต่อ ผงยา และวิธีสกัด จากผลการศึกษาของ ฉัญญภัสร์ เชาว์ธนกุลศักดิ์ (2567) ซึ่งใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วน 1:20 (w/v) ด้วยวิธีเขย่า 200 rpm 3 ชั่วโมง ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 11.71 ± 0.51 แต่ถ้าใช้อัตราส่วน 1 : 6 (w/v) โดยการหมัก 7 วัน จะได้ร้อยละ ของผลผลิตเท่ากับ 5.85 (ชวณ พุ่มพงษ์ และคณะ, 2566) อนึ่งมีงานวิจัยที่ใช้อัตราส่วน 1 : 5 วิมรัตน์ อินศวร และคณะ (2567) หมัก 3 วันร่วมกับการกวนตลอดเวลา ได้ร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 13.04 ± 1.03 และการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (Ultrasonic extraction) เป็นเวลา 60 นาที ได้ร้อยละผลผลิต 9.73 ± 0.55 จะเห็นได้ว่าร้อยละของผลผลิตของสารสกัดจากใบกระท่อมที่ได้ในแต่ละงานวิจัยมีความแตกต่างกัน แม้จะสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน (เอทานอล 95%)

ตารางที่ 5.3 เปรียบเทียบร้อยละผลผลิตและวิธีการสกัดใบกระท่อม

ลำดับที่	วิธีสกัด	ตัวทำละลาย	อัตราส่วน (w/v)	ระยะเวลา	Percent yield (%)	เอกสารอ้างอิง
1	Maceration	เอทานอล 95 %	1 : 10	อุณหภูมิห้อง 7 วัน,	22.67 ± 0.61	พิชาพัชร ฐิติธนอภิพงษ์ (2568)
2	Kinetic Maceration	เอทานอล 95 %	1 : 20	เขย่า 200 rpm, 3 ชั่วโมง, อุณหภูมิห้อง	11.71 ± 0.51	ชญญ์ภัทร์ เชาว์ธนกุลศักดิ์ (2567)
3	Maceration	เอทานอล 95 %	1 : 6	อุณหภูมิห้อง 7 วัน	5.85	ชวณณ พุ่มพงษ์ และคณะ (2566)
4	Kinetic Maceration	เอทานอล 95 %	1 : 5	อุณหภูมิห้อง 3 วัน	13.04 ± 1.03	วิมลรัตน์ อินศร และคณะ (2567)
5	Ultrasonic extraction	เอทานอล 95%	1:5	Ultrasound 60 นาที	9.73 ± 0.55	วิมลรัตน์ อินศร และคณะ (2567)

2. ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) เท่ากับ 285.50 ± 1.67 mg GAE/g extract ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของชญญ์ภัทร์และณัฐฐาวุฒิ (2567) ที่ใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน โดยพบ TPC เท่ากับ 166.81 ± 9.20 mg GAE/g extract และสูงกว่าผลของ Zhang et al. (2023) ที่ใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี TPC เท่ากับ 24.62 ± 3.74 mg GAE/g extract แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้ตัวทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัด สารฟีนอลิกได้มากกว่าการใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ วิธีการและระยะเวลาการสกัดยังส่งผลต่อปริมาณ TPC ด้วย ในส่วนของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) พบว่า สารสกัดกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มี TFC เท่ากับ 358.97 ± 0.98 mg QE/g extract ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของ Melania et al. (2024) ที่ใช้เอทานอล 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ค่า TFC เพียง 0.86 ± 0.0 mg QE/g extract แสดงให้เห็นว่าการหมักด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระออกมาได้ในปริมาณมาก ทั้งนี้ สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญที่มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารฟีนอลิกสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ส่วนสารฟลาโวนอยด์ที่มีปริมาณสูงในพืชมักแสดงฤทธิ์

ด้านอนุมูลอิสระที่ดี นอกจากนี้ชนิดของกระท่อมก็มีผลต่อปริมาณสาร ในงานวิจัยนี้ได้ใช้กระท่อมพันธุ์ก้านแดงจึงได้ปริมาณสารสูงกว่างานวิจัยอื่น

ตารางที่ 5.4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

เอกสารอ้างอิง	ตัวทำละลาย / วิธีสกัด	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)	สรุป
พิชาพัชร ฐิติธนอภิพงษ์ (2568)	เอทานอล 95% / หมัก 7 วัน	285.50 ± 1.67	358.97 ± 0.98	ให้ TPC และ TFC มากที่สุด
ธัญญภัทร์และ ณัฐธาวุฒิ (2567)	เอทานอล 95%	166.81 ± 9.20	-	TPC น้อยกว่า
Zhang et al. (2023)	เอทานอล 70%	24.62 ± 3.74	-	ใช้ตัวทำละลาย ที่มีส่วนผสมน้ำ สูงจึงให้ค่า TPC น้อยกว่า
Melania et al. (2024)	เอทานอล 96%	-	0.86 ± 0.0	TFC น้อยกว่า

3. การพัฒนาระบบ Thin-layer chromatography เพื่อการตรวจสอบมิตราไจนีน

จากการทดลองใช้ระบบตัวทำละลายตามรายงานของ Beng et al (2011) ซึ่งใช้เฮกเซนและเอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 80 : 20 โดยปริมาตร พบว่าไม่สามารถแยกสารมิตราไจนีน ออกจากสารประกอบอื่นในสารสกัดใบกระท่อมได้ แม้จะปรับอัตราส่วนตัวทำละลายหลายครั้ง อาจเกิดจากความชื้นของระบบดังกล่าวไม่เหมาะสมกับคุณสมบัติทางเคมีของอัลคาลอยด์จากใบกระท่อม และความเป็นกรดของซิลิกาเจลอาจส่งผลต่อการแยก การศึกษาในครั้งนี้จึงพัฒนาระบบเฟสเคลื่อนที่ใหม่โดยใช้คลอโรฟอร์มผสมกับเมทานอลที่มี 0.2 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งทำให้ระบบมีความเป็นด่างอ่อน ช่วยลดแรงยึดเหนี่ยวระหว่างหมู่ฟังก์ชันไนโตรเจนของอัลคาลอยด์กับพื้นผิวซิลิกาเจล ส่งผลให้สารสามารถเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นบนแผ่น TLC การเพิ่มเมทานอลในสัดส่วนเล็กน้อย (CHCl₃ 99 mL : MeOH 5 mL) เป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายและแยกสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันได้ดียิ่งขึ้น

ผลการตรวจสอบทางโครมาโทกราฟีของสารสกัดภายใต้แสงปกติและรังสียูวีที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ พบแถบสีที่ตรงกับรายงานของ Thongchin et al (2024) ได้แก่ แถบสีน้ำตาลภายใต้แสงปกติ แถบสีดำนบนพื้นเรืองแสงสีเขียวภายใต้ UV 254 นาโนเมตร และแถบเรืองแสงสีเขียวบนฟ้าภายใต้ UV 365 นาโนเมตร ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของมิตราไจนีน ซึ่งพบว่าระบบเฟสเคลื่อนที่ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกมิตราไจนีนได้ดีกว่าระบบที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ซึ่งการพัฒนาระบบเฟส

เคลื่อนที่ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นระบบมาตรฐานสำหรับการตรวจวิเคราะห์สารอัลคาลอยด์ในใบกระท่อมด้วยวิธี TLC และ HPTLC ได้

ตารางที่ 5.5 เปรียบเทียบระบบเฟสเคลื่อนที่สำหรับแยกมิตราไจนีนด้วย TLC

Beng et al., 2011	ผลการศึกษา	สรุป
ระบบเฟสเคลื่อนที่	Hexane : Ethyl acetate = 80:20 v/v ไม่สามารถแยกมิตราไจนีนจากสารใกล้เคียงกันได้	ความเป็นขั้วไม่เหมาะสมกับอัลคาลอยด์และซิลิกาเจลมีความเป็นกรดสูง
เหตุผลที่แยกไม่ได้	ระบบตัวทำละลายเป็น non-polar และไม่มีสภาวะต่าง	แรงยึดเหนี่ยวระหว่างคาลอยด์กับ ซิลิกาเจลสูง ทำให้เคลื่อนที่ไม่ดี
พิชาพัชร ฐิตธนอภิพจน์, 2568	ผลการศึกษา	สรุป
ระบบเฟสเคลื่อนที่ใหม่	Chloroform (99 mL) + Methanol ที่มี 0.2 N NaOH (1mL) คือ (A) MP: A 99 mL : MeOH 5 mL	มีสภาวะต่างช่วยลดแรงยึดเหนี่ยวกับซิลิกาเจลเพิ่มการเคลื่อนที่ของสาร
ผลจากระบบเฟสเคลื่อนที่ใหม่	ช่วยแยกสารที่ใกล้เคียงกันได้ดีขึ้น	เหมาะสำหรับการแยกอัลคาลอยด์ในกระท่อมโดยเฉพาะมิตราไจนีน
ลักษณะแถบของมิตราไจนีนบน TLC	• แสงปกติ: แถบสีน้ำตาล • UV 254 nm: แถบสีดำบนพื้นเรืองแสงสีเขียว • UV 365 nm: แถบเรืองแสงสีเขียวปนฟ้า	ตรงกับรายงานของ Thongchin et al. (2024) เป็นลักษณะเฉพาะของมิตราไจนีน
สรุปผล	ระบบเฟสเคลื่อนที่ ใหม่แยกสารได้ดีกว่าระบบเฟสเคลื่อนที่เดิม ของ Beng et al.	สามารถใช้เป็นระบบมาตรฐานสำหรับ TLC และ HPTLC ในการตรวจอัลคาลอยด์ของกระท่อม

Note : MP = เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase)

4. การแยกมิทราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

การนำสารที่แยกได้จากคอลัมน์ไปละลายในเมทานอลและเติมกรดฟิสิกริกจนถึงจุดอิ่มตัว ทำให้เกิดการสร้างเกลือมิทราไจนีนฟิสิกเรต ซึ่งเป็นรูปแบบที่ตกผลึกได้ง่ายกว่าอัลคาลอยด์อิสระ และใช้ความเย็นเพิ่มการตกผลึก ทำให้ได้ผลึกที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น วัดจุดหลอมเหลวได้ 235-236 องศาเซลเซียส ซึ่งมีช่วงของการหลอมเหลวสั้นกว่ารายงานก่อนหน้านี้ 220-225 องศาเซลเซียส (Beng et al., 2011) แสดงถึงความบริสุทธิ์สูง สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์โครงสร้างด้วย NMR, IR และ MS

งานวิจัยนี้ได้นำเสนอข้อมูลใหม่คือระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการตรวจวิเคราะห์สารสกัดใบกระท่อมด้วย TLC และการแยกสารมิทราไจนีนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยจำเป็นต้องใช้สภาวะที่เป็นเบสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์แทนการใช้สารละลายแอมโมเนีย ทำให้สามารถคงสภาวะต่างได้ตลอดการวิเคราะห์ สารสกัดใบกระท่อมที่จะนำมาแยกสารมิทราไจนีนควรเตรียมโดยใช้ 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล จะทำให้สามารถแยกสารมิทราไจนีนจากการผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียว การใช้ซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ในคอลัมน์โครมาโทกราฟีต้องทำให้มีสมรรถนะระดับ 5 เพื่อลดความสามารถการดูดซับสาร เมื่อได้สารมิทราไจนีนจากคอลัมน์ ทำการเปลี่ยนเป็นรูปเกลือฟิสิกเรต ซึ่งอยู่ในสถานะของแข็ง เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษา ตลอดจนความคงตัวและสามารถสกัดกลับมาเป็นเบสได้เมื่อต้องการ

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของมิทราไจนีนในรูปมิทราไจนีนฟิสิกเรต

5.1 การวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสารที่ได้จากกระบวนการตกผลึกเป็นมิทราไจนีนฟิสิกเรตด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H -NMR) แสดงให้เห็นว่าสัญญาณโปรตอนที่ตรวจพบมีความสอดคล้องกับข้อมูลของมิทราไจนีนที่รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (ตารางที่ 5.6) โดยเฉพาะสัญญาณของโปรตอนบนวงแหวนอะโรเมติก (Ar-H) ที่ปรากฏในช่วง δ 7.566–6.456 ppm ซึ่งตรงกับข้อมูลอ้างอิง (Shamima et al., 2012 และ Flores-Bocanegra et al., 2020) สะท้อนให้เห็นว่าตำแหน่งของอะโรเมติกโปรตอนในโครงสร้างหลักของมิทราไจนีนยังคงอยู่ในสภาพเดิมหลังจากผ่านกระบวนการสร้างเกลือฟิสิกเรตสัญญาณเด่นที่ δ 6.443 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนของหมู่แอลคีน ($=\text{CH}$) แสดงค่าที่แทบจะซ้อนทับกับข้อมูลอ้างอิง (6.43 ppm) บ่งบอกว่าแกนโครงสร้างอินโดลของมิทราไจนีนยังคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลง และสัญญาณของหมู่เมทอกซี ($-\text{OCH}_3$) ซึ่งพบที่ δ 3.861, 3.766 และ 3.759 ppm มีตำแหน่งใกล้เคียงกับค่าที่อ้างอิง แม้จะมีความเคลื่อนเล็กน้อยในหน่วยทศนิยม แต่ยังอยู่ในช่วง chemical shift ที่เป็นลักษณะจำเพาะของหมู่เมทอกซีในโมเลกุลอินโดลอัลคาลอยด์ อย่างไรก็ตามพบว่า สัญญาณของหมู่ไฮโดรเจนบนโครงสร้างอัลคิลบางตำแหน่ง โดยเฉพาะหมู่ $-\text{N}-\text{CH}_2$ และ $-\text{CH}_2$ มีการขยับค่าทางเคมีไปทางซ้าย (downfield) เมื่อเทียบกับข้อมูลอ้างอิง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากอิทธิพลของประจุและความเป็นอิเล็กโตรเนกาติวิตีของฟิสิกเรตที่จับกับโมเลกุลมิทราไจนีน ส่งผลให้สนามแม่เหล็กภายในโมเลกุลถูกปรับเปลี่ยน ทำให้สัญญาณของโปรตอนบริเวณใกล้หมู่อะตอมที่สามารถดึงอิเล็กตรอน (electron-withdrawing groups) ปรากฏเยื้องออกสู่ตำแหน่ง low-field มากขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปเมื่ออัลคาลอยด์เปลี่ยนสภาพเป็นเกลือ อนึ่ง การปรากฏของสัญญาณเดี่ยวที่ δ 8.962 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนของโครงสร้างฟิสิกเรต สัญญาณนี้บ่งชี้ได้ว่าเป็นเกลือฟิสิกเรตของมิทราไจนีน

ไม่ใช่มิทราไจนีนอิสระ โดยมีค่าใกล้เคียงกับข้อมูลที่เคยรายงาน (ประมาณ 9 ppm) (Prasad et al., 2014)

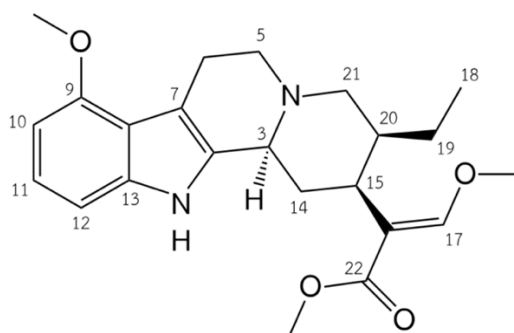
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมของมิทราไจนีนพิกเรตจากการทดลองนี้ กับข้อมูลของมิทราไจนีนอิสระตามรายงานของ Shamima et al. (2012) พบว่าสัญญาณสำคัญทุกตำแหน่งยังอยู่ในช่วง chemical shift ที่เป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละโปรตอน แม้ค่าบางตำแหน่งจะมีการคลาดเคลื่อนเล็กน้อย แต่ถือว่าอยู่ในช่วงที่ตรงกับการศึกษาของ Liu (2024) สรุปได้ว่าสเปกตรัม NMR ที่ได้มีความสอดคล้องกับโครงสร้างของมิทราไจนีน

ตารางที่ 5.6 เปรียบเทียบ Chemical Shift ของโปรตอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของมิทราไจนีน และ มิทราไจนีนพิกเรต

Proton position	Mitragynine picrate		Mitragynine (Shamina et al 2012)		Mitragynine (Flores-Bocanegra et al 2020)	
	type	δH	type	δH	type	δH
3	CH	3.60 (d)	-	-	CH	3.20 (d)
5, 21	4H, -N-CH ₂	3.28-3.16 (m)	4H, -N-CH ₂	3.01-2.99(m)	-	-
10	Ar-H	6.456 (d)	Ar-H	6.455 (d)	CH	6.45 (d)
11	Ar-H	7.042 (t)	Ar-H	6.984 (t)	CH	7.00 (t)
12	Ar-H	6.987 (d)	Ar-H	6.899 (d)	CH	6.90 (d)
17	1H, =CH	6.44 (s)	1H, =CH	6.43 (s)	CH	7.43 (s)
18	3H, -CH ₃	0.875 (t)	3H, -CH ₃	0.862(t)	CH ₃	0.87 (t)
9-OCH ₃	3H, -CH ₃	3.861 (s)	3H, -CH ₃	3.86(s)	CH ₃	3.87 (s)
17-OCH ₃	3H, -CH ₃	3.766 (s)	3H, -CH ₃	3.71(s)	CH ₃	3.73 (s)
22-OCH ₃	3H, -CH ₃	3.759 (s)	3H, -CH ₃	3.70(s)	CH ₃	3.71 (s)
NH	1H, -NH	8.96 (s)	1H, -NH	7.79(s)	-	7.74 (bs)

5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมิทราไจนีนพิกเรตด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่าสเปกตรัมที่ได้มีตำแหน่งพีกที่สอดคล้องกับหมู่ฟังก์ชันสำคัญของโครงสร้างมิทราไจนีน รวมทั้งหมู่ฟังก์ชันที่เป็นลักษณะเฉพาะของพิกเรต ซึ่งช่วยยืนยันได้ว่าผลึกที่ได้เป็น mitragynine picrate พีกแรกที่ตรวจพบอยู่ที่ 3319 cm⁻¹ ซึ่งบ่งบอกถึงการสั่นแบบ N-H stretch ของหมู่ secondary amine (2° amine) ที่มีอยู่ในโครงสร้างของมิทราไจนีน โดยลักษณะพีกสอดคล้องกับโครงสร้างที่มีหมู่เอมีน (2° amine) หนึ่งตำแหน่งและไม่มีหมู่ primary amine หรือ tertiary amine สอดคล้องกับโครงสร้างอินโดลอัลคาลอยด์ของมิทราไจนีน และในช่วง 1335–1250 cm⁻¹ พบพีกของ C-N stretch ของ aromatic amine สำหรับช่วง 1250–1020 cm⁻¹ เป็นการสั่น

ของ C–N stretch ของ aliphatic amine เป็นการยืนยันโครงสร้างของมิตราไจนีน ที่ประกอบด้วย ส่วนของอโรเมติก และอะลิฟาติกที่เชื่อมโยงกับ หมู่เอะมิโน นอกจากนี้ ยังพบพีคของ N–H ของ secondary amine ในช่วง $723\text{--}708\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นพีคที่บอกลักษณะจำเพาะของหมู่เอะมิโน พีคในช่วง $2952\text{--}2884\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีคของคาร์บอน-ไฮโดรเจน (C–H stretch) จากหมู่แอลคิล ส่วนพีค บริเวณ $1685\text{--}1608\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีคของ หมู่คาร์บอนิล (C=O) ที่สอดคล้องกับหมู่เอสเตอร์ ในโครงสร้างของมิตราไจนีน สำหรับหมู่เมทอกซี (--OCH_3) พบพีคที่ 2847 cm^{-1} และพีคในช่วง $1145\text{--}1078\text{ cm}^{-1}$ เป็นตำแหน่ง characteristic ของ C–O stretch ของหมู่ เมทอกซี ที่ยืนยัน องค์ประกอบของหมู่ O-alkyl ในโครงสร้าง นอกจากนี้ การปรากฏพีคที่ตำแหน่ง 3084 cm^{-1} และพีค เด่นของ N–O stretch ที่ 1545 และ 1437 cm^{-1} เป็นการบ่งชี้ ลักษณะเฉพาะของ picrate ซึ่งพบ ในสารประกอบ picrate salt ทำให้สามารถยืนยันได้ว่ามิตราไจนีน ได้ทำปฏิกิริยากับกรดพิกริก (ตารางที่ 5.6) โดยสรุป สเปกตรัม FT-IR ที่วิเคราะห์ได้แสดงตำแหน่งพีคที่ตรงกับหมู่ฟังก์ชันสำคัญของมิตราไจนีนและหมู่พิกเรตอย่างครบถ้วน ทั้ง N–H (secondary amine), C=O, OCH_3 , aromatic C–N และ N–O ของ picrate ทำให้สามารถยืนยันเอกลักษณ์ของสารที่ได้ว่า เป็น mitragynine picrate



ภาพที่ 5.1 แสดงสูตรโครงสร้างของโมเลกุลมิตราไจนีน
ที่มา : พิชัพพ์ รุติธนนภิพงษ์, 2568

ตารางที่ 5.7 สรุปเอกลักษณ์ของ Mitragynine Picrate ด้วย FT-IR

ตำแหน่งพิก (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชันที่ระบุ	ผลการศึกษา
3319	N-H stretch (secondary amine)	ยืนยันหมู่เอมีนระดับ 2° ของโครงสร้างอินโดลอัลคา ลอยด์
1335–1250	C-N stretch (aromatic amine)	บ่งชี้การมีส่วนร่วมของวงแหวนอะโรเมติกเชื่อมกับหมู่อะมิโน
1250–1020	C-N stretch (aliphatic amine)	สอดคล้องกับโครงสร้างอะลิฟาติกเอมีนของมิตราไจนีน
723–708	N-H wag (secondary amine)	พิกจำเพาะของหมู่เอมีนในอินโดลอัลคาลอยด์
2952–2884	C-H stretch (alkyl)	บ่งบอกการมีหมู่แอลคิลในโครงสร้าง
1685–1608	C=O stretch (ester)	ยืนยันหมู่คาร์บอนิลของเอสเตอร์ในโครงสร้างมิตรา ไจนีน
2847	O-CH ₃ (methoxy)	สอดคล้องกับหมู่เมทอกซีในโครงสร้างอินโดลอัลคาลอยด์
1145–1078	C-O stretch (methoxy)	เป็นตำแหน่ง characteristic ของหมู่ O-alkyl
3084	Aromatic C-H stretch	แสดงการมีวงแหวนอะโรเมติก
1545 และ 1437	N-O stretch (picrate)	พิกจำเพาะของ picrate salt ยืนยันปฏิกิริยากับ กรดพิกคริก
สรุป		สเปกตรัมยืนยันโครงสร้าง Mitragynine Picrate

5.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MALDI Mass Spectroscopy ในโหมด Linear แสดงให้เห็นว่าสารมิตราไจนีนพิกเรตมีการแตกตัวระหว่างกระบวนการไอออไนเซชัน โดยให้อิออนที่ตำแหน่ง m/z 397.8619 และ 395.8173 โดยที่พิกหลัก (base peak) ที่ m/z 397.8619 สามารถอธิบายได้ว่าเป็นไอออน [M-H]⁺ ของ มิตราไจนีน ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 398.5 กรัมต่อโมล แสดงให้เห็นว่าหลังการแตกตัวของเกลือพิกเรต โครงสร้างหลักของมิตราไจนีนยังคงอยู่

เมื่อสารมิตราไจนีนพิกเรตทำปฏิกิริยากับเมทริกซ์ (CCA) และถูกยิงด้วยเลเซอร์พบว่าเกิด fragmentation เพิ่มเติมให้อิออนที่มวล m/z 379.0470, 335.0610, 307.1785, 282.0505 และ 212.0131 ซึ่งเป็นผลจากการแตกตัวของโครงสร้างมิตราไจนีน หรืออาจเกิดจากพิกเรตแตกตัวออกมา การไม่พบพิกที่มวลโมเลกุล 626.6 กรัมต่อโมล ของเกลือมิตราไจนีนพิกเรตทั้งโมเลกุล สะท้อนว่าภายใต้สภาวะ MALDI เกลือยังไม่เสถียรพอที่จะคงอยู่ในรูปของไอออนเต็มโมเลกุล แต่มีแนวโน้มที่จะแตกตัวให้อิออนของมิตราไจนีนและแฟรกเมนต์ของพิกเรตแทน ทั้งนี้ mass spectrum ปรากฏมวลโมเลกุล 379.0470 ดังนั้น สารที่เกิดแตกตัวออกจาก

สารมิทราไจนีนพิกเครต อาจเป็นสารพิกเครต ที่มีมวลโมเลกุล 228.1 กรัมต่อโมล พร้อมกับสารบางชนิด ที่มีมวลโมเลกุล 19.453 กรัมต่อโมล

การตรวจวัดในโหมด Spiral ให้ผลสเปกตรัมที่มีพีคเด่นที่ m/z 397.1419 และ 395.1262 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากโหมด Linear เป็นสิ่งที่สนับสนุนว่ามีการสร้างไอออนของมิทราไจนีนในลักษณะเดิมอย่างสม่ำเสมอในทั้งสองโหมดการวัด แม้จะมีความละเอียดและเส้นทางการแตกตัวของไอออนแตกต่างกัน จากการวิเคราะห์ MALDI-MS ทั้งในโหมดของ Linear และ Spiral แสดงให้เห็นไอออนที่สอดคล้องกับมวลโมเลกุลของมิทราไจนีนที่เกิดจากการแตกตัวของเกลือพิกเครต ซึ่งเมื่อนำผลของ NMR และ FT-IR มาพิจารณาร่วมกัน สามารถยืนยันเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้ว่าเป็นมิทราไจนีนพิกเครต

ตารางที่ 5.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Mitragynine Picrate ด้วย MALDI-MS

หัวข้อการวิเคราะห์	ผลที่ตรวจพบ (m/z)	ผลการศึกษา
Base Peak (Linear mode)	m/z 397.8619 (base peak), 395.8173	$[M-H]^+$ ของมิทราไจนีน สอดคล้องมวล 398.5 g/mol แต่โครงสร้างหลักยังคงอยู่
Fragment Ions (Linear mode)	379.0470, 335.0610, 307.1785, 282.0505, 212.0131	เกิดจากการแตกตัวของมิทราไจนีนหรือพิกเครต สะท้อนการ fragmentation ใน MALDI
ไม่พบมวลโมเลกุลเต็มของ Mitragynine Picrate	ไม่พบพีคที่ 626.6 g/mol	เกลือพิกเครตไม่เสถียรใน MALDI แตกตัวเป็นมิทราไจนีนและแพรกเมนต์แทน
ผลจากโหมด Spiral	m/z 397.1419, 395.1262	ยืนยันรูปแบบไอออนของมิทราไจนีนสอดคล้องกับ Linear mode
สรุปผล		ทั้ง Linear และ Spiral ให้ไอออนที่ตรงกับโครงสร้างมิทราไจนีน → ยืนยันว่าเป็น Mitragynine Picrate เมื่อพิจารณาพร้อมกับ NMR และ FT-IR

6. การหาปริมาณมิทราไจนีนตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2021 Supplement 2025 ด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

พบว่า ตัวทำละลาย 95 % EtOH สามารถสกัดมิทราไจนีนออกมาได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลาย 40 % EtOH 15 เท่า ผลการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพของการสกัดมิทราไจนีนในใบกระท่อม โดยเอทานอลความเข้มข้นสูง (95%) ให้ผลสกัดได้ปริมาณมิทราไจนีน ร้อยละ 1.56 g/dry wt มากกว่าวิธีใช้เอทานอล 40 % ซึ่งได้เพียงร้อยละ 0.103 g/dry wt ดังนั้นการนำสารสกัดกระท่อม 95 % EtOH ไปพัฒนาเป็นอิมัลเจชันจึงมีความเหมาะสม

7. การตรวจสอบความถูกต้องในวิธีวิเคราะห์ปริมาณมิทราไจนีนด้วย HPTLC

จากการทดสอบได้ข้อสรุปของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

7.1 ความจำเพาะ (Specificity) จากการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารมาตรฐาน มิทราไจนีนกับสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH พบว่าให้ค่า R_f เท่ากันที่ 0.48 และการตรวจจับสัญญาณด้วย UV 254 นาโนเมตร สามารถแยกมิทราไจนีนจากส่วนประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดกระท่อมได้ชัดเจน แสดงถึงความจำเพาะของวิธีในการระบุสารมิทราไจนีนได้อย่างถูกต้องและชัดเจน

7.2 ความเป็นเส้นตรง (Linearity) การประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟในช่วงความเข้มข้น 400 – 2400 ng/spot ได้สมการ $y = 5.6579 \times 10^{-6}x + 0.001317$ และ ค่า $r^2 = 0.9934$ แสดงให้เห็นว่าวิธีมีความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟเป็นเส้นตรงที่ดีและสามารถใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณได้อย่างเหมาะสม

7.3 ความถูกต้อง (Accuracy) ผลการคำนวณคืนกลับของปริมาณสารมาตรฐาน มิทราไจนีนที่ปริมาณ 0.4, 1.6 และ 2.8 μg ได้ค่า % Recovery เท่ากับ $92.37 \pm 0.97\%$, $105.55 \pm 3.56\%$ และ $95.41 \pm 1.83\%$ ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยรวม ($n=9$) เท่ากับ $97.77 \pm 6.90\%$ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณ

7.4 ความเที่ยง (Precision) Repeatability การวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (intraday) เมื่อมีปริมาณสาร 1200-2400 นาโนกรัม ได้ค่า % RSD ต่ำกว่า 5% แสดงถึง ความเที่ยงที่ดีของวิธี ในช่วงนี้ สำหรับการวิเคราะห์ต่อเนื่อง 3 วัน (Interday) เมื่อมีปริมาณสาร 800-2400 นาโนกรัม ได้ค่า % RSD ต่ำกว่า 5% แสดงให้เห็นถึงความสม่ำเสมอ และเสถียรภาพของวิธีเมื่อวิเคราะห์ต่างวัน

7.5 ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบและวิเคราะห์ได้ (LOD และ LOQ) ค่าที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน คือ $\text{LOD} = 239.46 \pm 35.88 \text{ ng/mL}$ และ $\text{LOQ} = 725.63 \pm 108.73 \text{ ng/mL}$ แสดงว่าวิธี HPTLC มีความไวเพียงพอต่อการตรวจวัดปริมาณสารมิทราไจนีน ในสารสกัดกระท่อม

ดังนั้น วิธี HPTLC ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะดี มีความเป็นเชิงเส้นสูง ความถูกต้องและความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อีกทั้งยังมีค่าการตรวจวัดต่ำสุดที่เหมาะสม สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีควบคุมคุณภาพสารสกัดกระท่อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 5.9 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หิมทราไจนินในสารสกัดกระท่อมด้วย HPTLC

พารามิเตอร์	ผลการศึกษา	การแปลผล / เกณฑ์มาตรฐาน (ICH)
Linearity	ช่วง 400–2400 ng/spot สมการ: $y = 0.00517x - 0.00234$ ($r^2 = 0.9922$)	อยู่ในระดับยอมรับได้ ($r^2 \geq 0.99$)
Precision (Intra-day)	%RSD = 9.25%	เป็นที่ยอมรับ (<10%)
Precision (Inter-day)	%RSD = 8.27%	เป็นที่ยอมรับ (<10%)
Accuracy	%Recovery = 97.77%	อยู่ในเกณฑ์ 90–110%
LOD (Limit of Detection)	489.59 ng/mL	เหมาะสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ
LOQ (Limit of Quantification)	1,483.61 ng/mL	เหมาะสำหรับการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

8. การควบคุมคุณภาพเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) ด้วย High Performance Thin layer chromatography (HPTLC) ของสารสกัดกระท่อม 40 % EtOH

จากสมการกราฟเส้นตรง $y = 5.6579 \times 10^{-6}x + 0.001317$ สามารถคำนวณปริมาณหิมทราไจนินในผงใบกระท่อมแห้ง เมื่อสกัดด้วย 40 % EtOH ได้ร้อยละ 1.29 เมื่อเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยการ Sonicate ผงใบแห้ง 2 กรัม 30 นาที โดยไม่ใช้ความร้อน กรองแล้วนำมาปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร นำ 2 ไมโครลิตรไปวิเคราะห์ด้วย HPTLC ทันทันตามวิธีข้างต้น

สรุปผลการศึกษาด้านชีวภาพ

1.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี ได้แก่

1.1 วิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.39 ± 0.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานไว้ 43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ชวณและชยานนท์, 2566), 38.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Yuniarti et al., 2020), 21.61 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Zhang et al., 2023) และ 15.60 ± 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิมลรัตน์และคณะ 2567) แสดงว่า สารสกัดใบกระท่อมก้านแดง (95 % EtOH) มีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่ากลุ่มที่เปรียบเทียบกับ 2-6 เท่า ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับชนิดของพันธุ์พืชที่ใช้และแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระท่อมพันธุ์ก้านแดง สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีแม้ในความเข้มข้นต่ำ

1.2 วิธี ABTS^{•+} assay พบว่าสารสกัดกระท่อม (95 % EtOH) มีค่า VEAC เท่ากับ 17.76 ± 0.33 mg ascorbic acid/g extract ส่วนผลการศึกษาของ Zhang et al. (2023) ที่ใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ค่า VEAC เท่ากับ 9.33 ± 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเอทานอล 95 % สามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ดีกว่าเอทานอล 70 % ขณะที่ผล

การศึกษาของธัญญภัทร์และณัฐวาทิ (2567) ซึ่งใช้วิธีการสกัดแบบแช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ที่ 200 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าให้ค่า VEAC สูงถึง 219.91 ± 1.08 mg ascorbic acid/g extract แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัด โดยการสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และการแช่ต่อเนื่องสามารถสกัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการหมักนึ่ง

1.3 วิธี FRAP assay พบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่สกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่า FRAP เท่ากับ $5,211.44 \pm 9.36$ mM FeSO₄ equivalent/g extract ซึ่งสูงกว่าค่าที่รายงานโดย Zhang et al. (2023) ที่ใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ค่า FRAP เท่ากับ 89.31 ± 1.44 mM FeSO₄ equivalent/g extract สะท้อนให้เห็นว่าสารสกัดจากเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺ เป็น Fe²⁺ ได้ดีกว่า ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงว่ามิทราไจนินและอนุพันธ์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Goh et al., 2014)

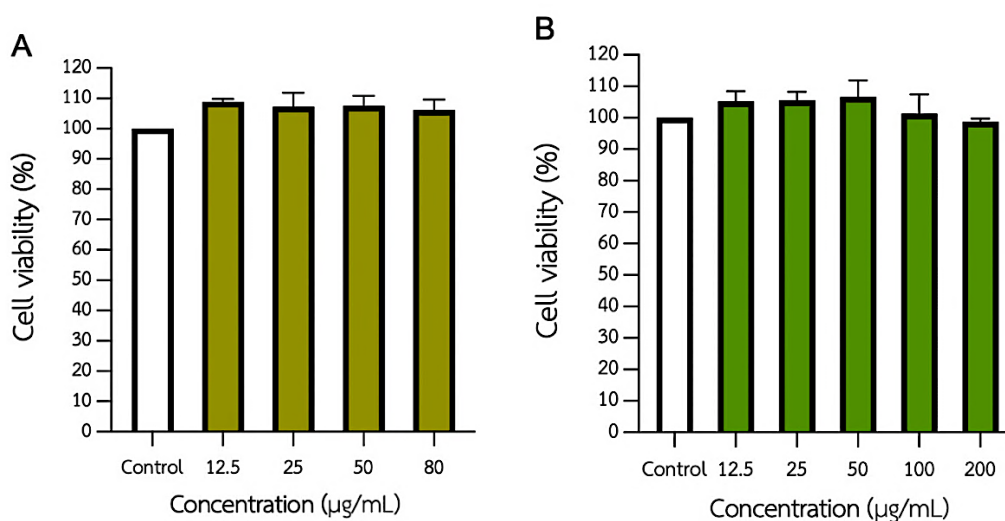
จากผลการทดสอบทั้งสามวิธี ได้แก่ DPPH, ABTS^{•+} และ FRAP assay พบว่าวิธี DPPH และ ABTS^{•+} เป็นการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสภาวะตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ โดย DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียร สีม่วง และมีโครงสร้างไนโตรเจนที่คงตัว ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการกระตุ้นเพื่อเกิดอนุมูลใหม่ ส่วน ABTS^{•+} เป็นอนุมูลอิสระที่สามารถรับไฮโดรเจนอะตอมจากสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดอนุมูลเปอร์ออกไซด์ (peroxyl radical) ในกระบวนการสลายตัว ส่วนวิธี FRAP เป็นการทดสอบในตัวกลางที่เป็นน้ำ ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในเซลล์ของมนุษย์ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก (สุชาติและปวีณา, 2558) จึงให้ภาพรวมที่สอดคล้องกับสภาวะทางชีวภาพมากกว่า

ตารางที่ 5.10 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS, DPPH and FRAP assays ของสารสกัดกระท่อม FD 95 %

ตัวอย่าง	ความสามารถในการ ต้านอนุมูลอิสระ IC ₅₀ of DPPH (µg/ml)	VEAC Value of ABTS (mg ascorbic acid /g extract)	FRAP assay (mM FeSO ₄ equivalent/g extract)
95% EtOH	7.39±0.49	17.76±0.33	5211.44±9.36
กรดแอสคอร์บิก	2.47±0.10	-	-

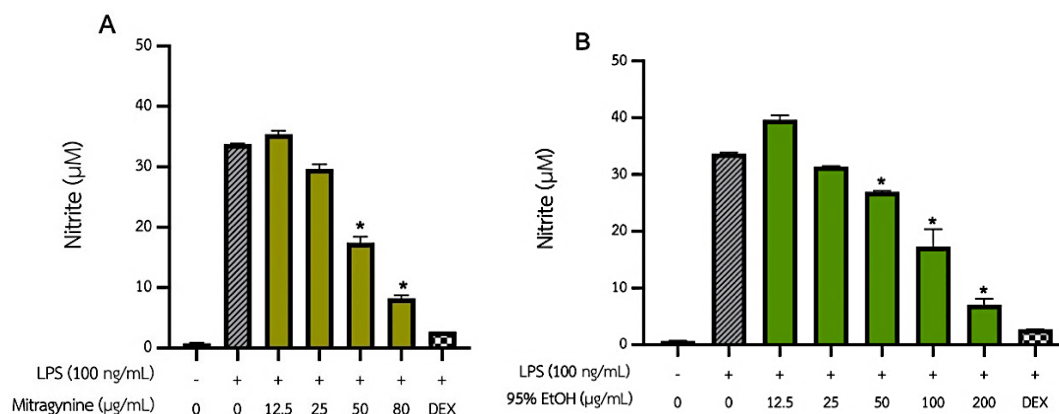
2. ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

ก่อนทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 จำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานและสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารมาตรฐานมิทราไจนิน ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรและสารสกัดกระเทียมที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 4.17 และภาพที่ 5.2) มาทดสอบการยับยั้งการหลั่ง NO รวมทั้งไซโตไคน์ IL-6, TNF- α และ PGE2 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้อักเสบด้วย LPS



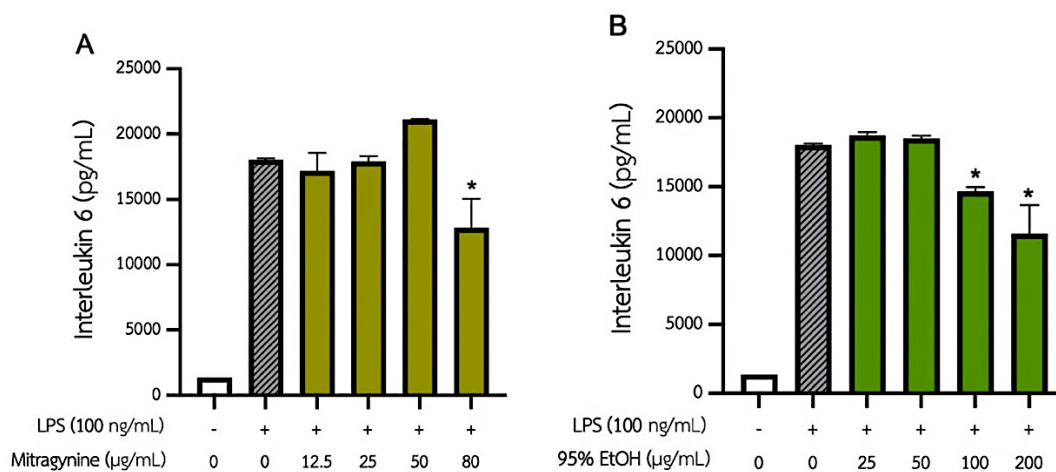
ภาพที่ 5.2 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนิน (A) และสารสกัดกระเทียมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความอยู่รอดของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ภายหลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการรอดชีวิตของเซลล์แสดงเป็นร้อยละเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ฤทธิ์ด้านการอักเสบสารสกัดกระเทียมด้วย 95% เอทานอลที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานมิทราไจนิน ที่ความเข้มข้น 50 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS โดยสามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS อย่างเดียว (ตารางที่ 4.18, 4.19 และภาพที่ 5.3)



ภาพที่ 5.3 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เดกซาเมทาโซน (DEX, 20 µg/mL) เป็นกลุ่มควบคุมบวก ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $*p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว

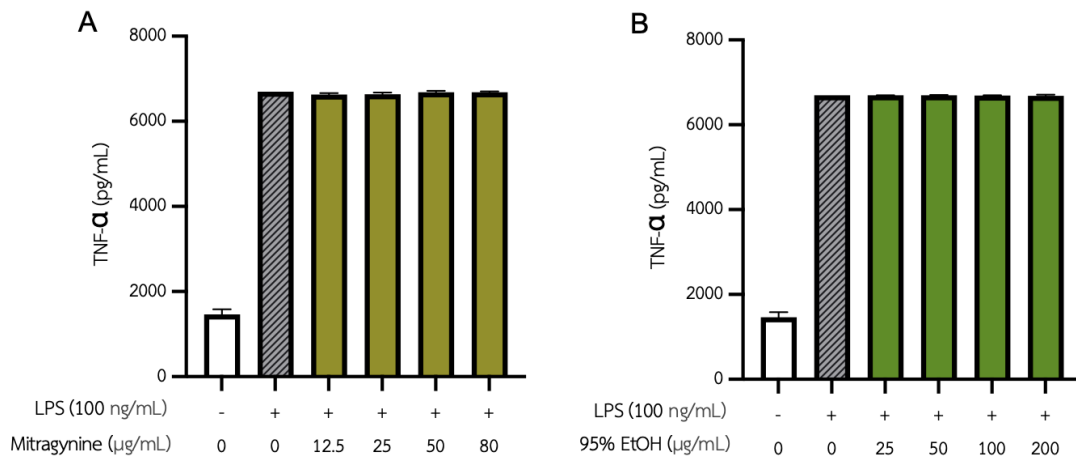
จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการหลั่งสารไซโตไคน์อักเสบ ได้แก่ IL-6 (ตารางที่ 4.20), TNF- α (ตารางที่ 4.21) และ PGE2 (ตารางที่ 4.22) ของสารมาตรฐานมิทราไจนินและสารสกัดกระท่อมในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารมาตรฐานมิทราไจนิน และสารสกัดกระท่อม (FD 95 %) ลดการหลั่ง IL-6 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 5.4)



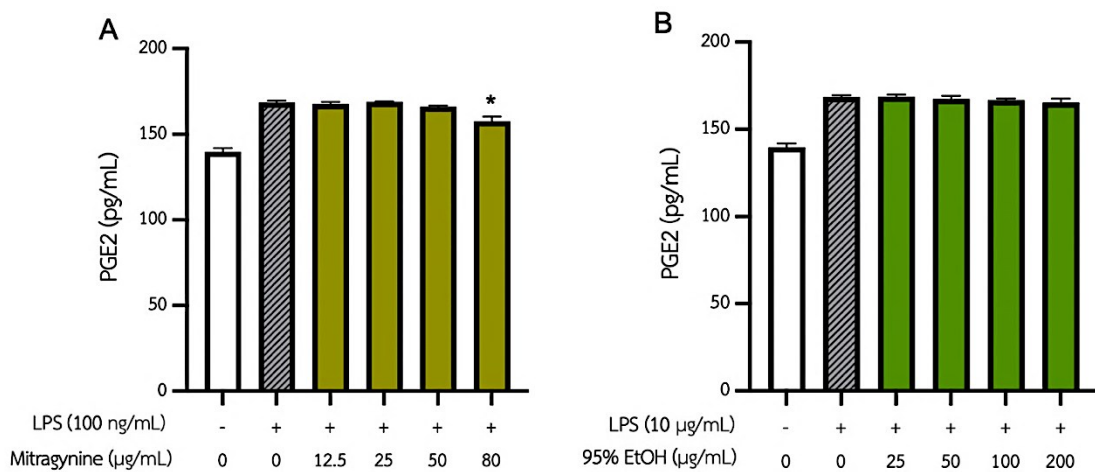
ภาพที่ 5.4 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ต่อการต้านการอักเสบ โดยการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ IL-6 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง IL-6 ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย $*p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว

อย่างไรก็ตาม ไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง $\text{TNF-}\alpha$ ที่มีนัยสำคัญ (ภาพที่ 5.5) อาจเป็นเพราะ $\text{TNF-}\alpha$ เป็นไซโตไคน์ที่ถูกหลั่งในระยะเริ่มต้นของกระบวนการอักเสบ โดยมีการกระตุ้นและแสดงออกสูงสุดภายใน 1–3 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย LPS ผ่านทาง NF- κ B pathway (Guha and Mackman, 2001; Tak and Firestein, 2001) ดังนั้น การวัดระดับ $\text{TNF-}\alpha$ หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง อาจไม่สามารถแสดงผลการยับยั้งได้อย่างชัดเจน

อนึ่ง จากการทดสอบ พบว่า มีเพียงสารมาตรฐานมิทราไจนินในระดับความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่สามารถลดการหลั่ง PGE_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 5.6) การลดระดับของ IL-6 และ PGE_2 อาจเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของ มิทราไจนิน ร่วมกับสารสำคัญอื่น ๆ ในสารสกัดกระท่อมที่ออกฤทธิ์ผ่านเส้นทาง MAPKs (เช่น p38, JNK) และ/หรือ JAK/STAT ซึ่งมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ IL-6 และเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGE_2 (Kim et al., 2010; Tanaka et al., 2014) การที่มิทราไจนินสามารถลดระดับ PGE_2 ได้ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารออกฤทธิ์หลัก ในการต้านการอักเสบผ่านการยับยั้ง COX-2 มากกว่าสารสกัดหยาบที่มีองค์ประกอบสารอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงได้ว่ามิทราไจนินออกฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านการยับยั้ง COX-2 และ prostaglandin E2 ในเซลล์มาโครฟาจ (Utar et al., 2010)



ภาพที่ 5.5 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ TNF- α ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง TNF- α ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 5.6 ผลของสารมาตรฐานมิทราไจนิน (A) และสารสกัดกระท่อมด้วยเอทานอล 95% (B) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการหลั่ง PGE2 ในเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 โดยเซลล์ถูกบ่มร่วมกับสารทั้งสองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนกระตุ้นด้วย LPS (100 ng/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การหลั่ง PGE2 ตรวจวัดโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ โดย * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ LPS เพียงอย่างเดียว

สรุปผลการศึกษาด้านผลิตภัณฑ์

1. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดก่อนการตั้งตำรับ

ผลการทดสอบความคงตัวของสารสกัดกระท่อม (FD 95 % EtOH) ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าสารสกัดภายใต้สภาวะออกซิเดชัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ HPLC โครมาโตแกรมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ขนาดของพีคมีทราเจนินจะลดลงเล็กน้อยอาจเนื่องจากสารสกัดกระท่อมมีฤทธิ์เป็นแอนติออกซิแดนท์ จึงไม่เสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีตัวกระตุ้นหรือความรุนแรงของออกซิเดชันมากเกินไป แสดงว่าสารสกัดสามารถเก็บรักษาได้ในสภาวะปกติ หลีกเลี่ยงแสงแดดและอุณหภูมิที่สูงเกินไป จากการทดสอบความคงตัวของสารสกัดพบว่าการเสื่อมสภาพภายใต้สภาวะกรด สภาวะความร้อน และเสื่อมสภาพภายใต้สภาวะต่าง สอดคล้องกับข้อมูลโครงสร้างของอินโดลอัลคาลอยด์ (indole alkaloids) ที่มีหมู่ฟังก์ชันหลายตำแหน่งที่ไวต่อการแตกพันธะหรือทำให้โมเลกุลไม่เสถียรภายใต้สภาวะกรดหรือด่างที่มากเกินไป (extreme pH) แม้ว่าสภาวะออกซิเดชันในการศึกษาครั้งนี้จะไม่ส่งผลมากนักในการพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ เช่น อิมัลชันหรือผลิตภัณฑ์กึ่งแข็ง ควรมีการเติม สารช่วยคงตัว (stabilizers) เช่น antioxidants, pH buffer เพื่อช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของสารสำคัญ เพิ่มอายุการเก็บรักษา และคงประสิทธิภาพทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ได้ดียิ่งขึ้น

2. ไมโครอิมัลชันสารสกัดกระท่อม

ในการเตรียมไมโครอิมัลชันเบสจำเป็นต้องหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างองค์ประกอบทั้ง 3 ได้แก่ วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และวัฏภาคน้ำ (water phase) จากการทดสอบการละลายของสารสกัดกระท่อมในวัฏภาคน้ำมันหลายชนิด พบว่า Propylene Glycol Dicaprylate ให้การละลายดีที่สุด สารลดแรงตึงผิวจำเป็นต้องใช้ส่วนผสมระหว่าง Polyglycerl-4-Capate : Isopentylidol : Ethoxydiglycol (S_{mix}) ในอัตราส่วน 1:1:1 ซึ่งเหมาะสำหรับการสร้างไมโครอิมัลชันชนิด O/W ทำการหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างวัฏภาคน้ำมัน และ S_{mix} แล้วนำไปสร้างวัฏภาคไตรเทียม พบว่าสูตรที่ให้ไมโครอิมัลชันโปร่งใส มีความเสถียร และสามารถกักเก็บสารสกัดไว้ในอิมัลชันได้ คือ S_{mix} : Oil : Water = 6 : 2 : 2 นำไปวัดขนาดอนุภาคได้ ค่าเฉลี่ย 129 นาโนเมตร ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของอนุภาค (PI) = 0.277 และศักย์ไฟฟ้าซีตา -0.24 ± 0.02 มิลลิโวลต์

จากนั้นเติมสารสกัดกระท่อมที่ละลายในวัฏภาคน้ำมันลงในไมโครอิมัลชันเบสในปริมาณร้อยละ 1 แล้วนำไมโครอิมัลชันกระท่อมไปวัดศักย์ไฟฟ้าซีตาได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ -11.30 ± 0.89 มิลลิโวลต์ แสดงว่ามีความเสถียรสูง จากนั้นเติมสารก่อเจลลงในไมโครอิมัลชันเบส และไมโครอิมัลชันกระท่อม และนำไปทดสอบความคงตัวโดยวิธี Freeze-thaw cycle พบว่ามีความคงตัวดี ทั้งความหนืด ความเป็นกรดต่าง ความใส และสีของผลิตภัณฑ์

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบด้วยการยับยั้งการผลิต NO และการหาปริมาณ มิทราไจนีนโดยใช้ HPLC (THP) พบว่าสารสกัด 40 % และสารสกัด 95 % EtOH ให้เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 44.5 % และ 79.16 % ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของมิทราไจนีนในสารสกัด 95 % EtOH ที่มากกว่าสารสกัด 40 % EtOH ผลการศึกษาสนับสนุนการใช้ตำรับ 40 ของวัดศรีวังค์ จังหวัดชุมพร ซึ่งประกอบด้วยใบกระท่อมสด 50 กรัม ปั่นกับ 100 มิลลิลิตรสุราขาว (แอลกอฮอล์ 40 %) จะมีมิทราไจนีน 158.62 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร จึงควรใช้ในปริมาณ 2-4 มิลลิลิตร เพื่อระงับการอักเสบ อย่างไรก็ตามควรมีการทดลอง ทางคลินิกเพื่อยืนยันประสิทธิภาพ สำหรับอิมัลเจลกระท่อมซึ่งมีสารสกัด 95 % EtOH ร้อยละ 1 เทียบเท่ากับมีปริมาณมิทราไจนีน 68.88 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมอิมัลเจล จะมีมิทราไจนีน 688.8 ไมโครกรัมต่อกรัม ดังนั้นใช้อิมัลเจล 1 กรัม เพียงพอต่อการระงับการอักเสบ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

1. สารสกัดใบกระท่อมด้วย 95 % EtOH มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ จึงควรนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพในอนาคต
2. วิธีการตรวจวิเคราะห์สารสกัดใบกระท่อมด้วย TLC และการแยกมิทราไจนีนด้วย คอลัมน์โครมาโตกราฟี ต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการคุมสภาวะต่าง และการแยก สารมิทราไจนีนควรใช้สารสกัด (FD 40 % EtOH) เนื่องจากสามารถแยกสารมิทราไจนีนจากการผ่าน คอลัมน์เพียงครั้งเดียว
3. สนับสนุนการใช้ตำรับ 40 ของวัดศรีวังค์ ตามการบ่งใช้ในการระงับการอักเสบ
4. อิมัลเจลกระท่อมที่มีสารสกัด 95 % EtOH ร้อยละ 1 ตามสูตรที่พัฒนาขึ้น มีขนาด การใช้ (Dose) ครั้งละ 1 กรัม

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. จากผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้ง TNF- α งานวิจัยครั้งนี้ พบว่า ไม่สามารถยับยั้ง TNF- α ได้อย่างชัดเจน เพื่อให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารทดสอบได้ดียิ่งขึ้น ควรดำเนินการ ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องในเส้นทาง MAPKs, JAK/STAT และ NF-kB รวมถึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ในช่วงเวลาต่าง ๆ
2. สารสกัดใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดงมีศักยภาพเป็นแหล่งสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระและด้านการอักเสบ ซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติมในเชิงกลไกระดับโมเลกุลเพื่อยืนยันประสิทธิภาพและ แนวทางการประยุกต์ใช้ทางเภสัชกรรมในอนาคต
3. ควรทำการวิจัยเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการหมัก และวิธีการสกัด เพิ่มเติมว่ามีผลต่อปริมาณมิทราไจนีนในสารสกัดและฤทธิ์ด้านอักเสบหรือไม่ อย่างไร
4. ควรนำ HPTLC มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณมิทราไจนีนในสารสกัดกระท่อม 95 % EtOH ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ในระดับนาโนกรัมต่อแถบสาร และประหยัดทั้งเวลาและงบประมาณ
5. ควรนำอิมัลเจลกระท่อมไปทดสอบการซึมผ่าน Franz cell เพื่อยืนยันการปลดปล่อย มิทราไจนีนจากอิมัลเจล

6. คำนวณนำผลิตภัณฑ์อิมัลชันเจลกระท่อมไปทำการศึกษาด้านคลินิกเทียบกับตำรับ 40 ของวัดศรีวังก์ จังหวัดชุมพร

7. ควรประเมินความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในการใช้ผลิตภัณฑ์กระท่อมเพื่อแก้อาการปวด และอีกเสบเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น ไพล

บรรณานุกรม

- กาญจนา สาลีดีด. (2565). การเก็บรักษา (preserving) ตัวอย่างพรรณพืช. ค้นเมื่อ สิงหาคม 10, 2565, จาก <http://science.mcru.ac.th/main/filedata/Bio03.pdf>
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2565). **ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย Thai Herbal Pharmacopoeia 2021 supplement 2025**. ค้นเมื่อ พฤศจิกายน 20, 2568, จาก <https://bdn-thp.dmsc.moph.go.th/ebook/qQAcAatlpR9gC3q0GT5gMJq0qT5co3uw>
- กองควบคุมวัตถุเสพติด. (2567). **กระท่อม (Kratom)**. ค้นเมื่อ พฤษภาคม 8, 2567, จาก <https://narcotic.fda.moph.go.th/information-about-drugs/kratom/>
- ข่าวไทยพีบีเอส. (2564). **อ่อนล้า-ปวดเมื่อยจาก WFH แก้ได้ด้วยใบกระท่อม**. ค้นเมื่อ สิงหาคม 5, 2564, จาก <https://news.thaipbs.or.th/content/307253>
- คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2566). **สารสำคัญในสมุนไพร และการทดสอบกลุ่มสารสำคัญเบื้องต้น**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (เอกสารอัดสำเนา)
- จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล. (2560). **พืชกระท่อม (Kratom)**. ค้นเมื่อ สิงหาคม 7, 2564, จาก https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=251
- จุไรรัตน์ รักวาทีน. (2547). **แนวทางการเสนอ รายงานความคงสภาพของตำรับยา**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงสาธารณสุข.
- ชวภณ พุ่มพงษ์ และชยานนท์ เชาวนัญญกุล. (2566). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดใบกระท่อม**. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ**. 9(2), 25-33.
- ธนัช นาคะพันธ์, มณฑกา อธิชัยสกุล, ศิริพร ปัทม, ขวัญเรือน สมพิมาย และปรีชา หนูทิม. (2559). **การศึกษาการใช้ประโยชน์จากกระท่อมในการรักษาโรคของหมอฟันบ้านภาคใต้**. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก**. 14(3), 274-285.
- ชนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์, ประณีต โอปนโสภิต, และ สุริวัลย์ ดวงจิต. (2558). **การหาสูตรตำรับที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดพริกบรจุในตัวพาชนิดใหม่: ลิโพโซม ไมโครอิมัลชัน อนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็ง เพื่อเพิ่มการนำส่งทางผิวหนัง**. ค้นเมื่อ สิงหาคม 1, 2565, จาก <http://old.pitc.su.ac.th/pratap/8-2.pdf>.
- ธนวัฒน์ ทองจีน, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, สายัณห์ เรืองเขตร, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, อัครชัย ช่วยพรหม และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์. (2567). **การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางเคมีกายภาพของใบกระท่อม**. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก**. 22(1), 80-93.

- ธัญญภัทร์ เชาว์ธนกุลศักดิ์ (2567). การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบกระท่อมและใบบัวบก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- ธัญญภัทร์ เชาว์ธนกุลศักดิ์ และณัฐราวุฒิ ฐิติปราโมทย์. (2567). การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบกระท่อมและใบบัวบก. ค้นเมื่อ มิถุนายน 10, 2568, จาก :<https://postgrads.mfu.ac.th/wp-content/uploads/2024/11/6351701286.pdf>
- ดวงแก้ว ปัญญา, สุเมธี นามเกิด, นิตาภา อินชัยและกุลสิริ ยศเสถียร (2559). กระท่อม: สมุนไพรหรือยาเสพติด. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 14(3), 242–256.
- นราพงศ์ บุรมา. (2554). การหาปริมาณไมทราจินีนในใบกระท่อมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- นิจชิตา พงศ์ฉบับภา, ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา และ รัฐพล อาษาสุจริต. (2558). การเตรียมไมโครอิมัลชันของสารสกัดแก่นมะหาดในรูปแบบปราศจากสารลดแรงตึงผิว. ใน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต. การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 10 ปีการศึกษา 2558, 11 สิงหาคม 2558, ประเทศไทย, ปทุมธานี, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยรังสิต. หน้า 43-47.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ. (2544). ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และนางลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). คุณภาพเครื่องยาไทย จากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน. กรุงเทพมหานคร : คอนเซ็ปท์ เมดิคัล.
- นิวัติ แก้วประดับ. (2564). ใบกระท่อม สรรพคุณทางยา ประโยชน์และโทษ. ค้นเมื่อ สิงหาคม 10, 2565, จ ำ ก <https://kratom.sci.psu.ac.th/wp-content/uploads/2024/11/09/%E0%B9%83%E0%B8%9A%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%97%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%A1-%E0%B8%AA%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%9E%E0%B8%84%E0%B8%B8%E0%B8%93%E0%B8%97%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B8%A2%E0%B8%B2-%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B9%82%E0%B8%A2%E0%B8%8A%E0%B8%99%E0%B9%8C%E0%B9%81%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%82%E0%B8%97%E0%B8%A9.pdf>
- ประดิษฐ์ ประทีปวณิช และดวงพร ชัตตินานนท์. (2560). ความชุกของโรคไฟโบรรมัยอัลเจีย (FM) ในผู้ป่วยกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อมัย์โอฟาสเซียลเรื้อรัง (MPS). เวชศาสตร์ฟื้นฟูสาร. 27(2), 71-76.
- ประสาร สวัสดิ์ชิตัง. (2561). การตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดจากพืช. กรุงเทพมหานคร : โอ.เอส. พรีเมียม เอ็นจิเนียริ่ง.

- พระขวัญชัย อคฺคชโย. (2565). **เสน่ห์กระท่อมกับตำรับยาไทย เคี้ยว ฟัน ปอก ผง ตำ ต้ม สุก กวน นึ่ง รม ก้านเขียว ก้านแดง ชะงักน้กแล**. ชุมพร : ศูนย์เรียนรู้สมุนไพรไทยหมอฟันบ้านหมอพร
- พิชาพัชร ฐิติธนอภิพงษ์, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, อ้อมบุญ วลีสุต, กวินท์ สาสาย และ จันทนา ยะหัวฝ่าย (2025). ปริมาณสารพฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดผักเสี้ยนผี. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 27(1), 30–44.
- มูรณีย์ มะแซ, จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล และดารณีเยะ เจ๊ะหะ. (2564). ผลของน้ำต้มใบกระท่อมที่มีสารไมตราจายนินขนาดสูงเป็นเวลานานต่อการทดสอบกิจกรรมการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักร. ใน **วิทวัส ดิษยะศริน สัตยารักษ์. การประชุมมหาดใหญ่วิชาการระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 12**, 25 มิถุนายน 2564, ประเทศไทย, มหาวิทยาลัยหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา. หน้า 1672-1682.
- ยศพล เหลืองโสมนภา และ ศรีสุดา งามขำ. (2556). ความสนใจต่อความปวด (Attention to pain). **วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิกโรงพยาบาลพระปกเกล้า**, 30(1), 83-93.
- วิมลรัตน์ อินศวร, ศीलัญญ์ วิเศษสมบัติ, ธนิสร กรเลิศวานิช, อีรพงษ์ เดชวุ่น และ ทิพย์รัตน์ ชาหอมชื่น. (2567). ผลของวิธีการสกัดต่อปริมาณฟีนอลิครวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากใบกระท่อม (*Mitragynine speciosa*) ที่สกัดด้วยเอทานอล. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 26(1), 34-41.
- วรวิทย์ จันทร์สุวรรณ, สิริรัตน์ พานิช และ อัญญา ชัตติยะวงศ์. (2564). การตรวจสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบขลุ่ยสู่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบของผิวหนัง. สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ 2564 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.
- วันชัย ดีเอกนามกุล (2564). **การประเมินคุณภาพยาสมุนไพร วัตถุดิบ และสารสกัดโดยใช้เทคนิค HPTLC โครงการอบรมวิชาการ : มาตรฐานคุณภาพ ยาสมุนไพร สารสกัด และวัตถุดิบ**. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (เอกสารอัดสำเนา).
- วลัยลักษณ์ พรผล และ ประสาน ตั้งยืนยงวัฒนา (2563), การพัฒนาตำรับยาน้ำมันมหาจักรในรูปแบบไมโครอิมัลชัน. ใน **พัชรศักดิ์ อาลัย. งานประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ศาสตร์พระราชา และการวิจัยเพื่อสร้างสมดุลภาพชีวิตในยุค Disruptive Technology**, 9-10 กรกฎาคม 2563, ประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. วิน-วิน ดิจิตอล พรินต์ติ้ง. หน้า 2-10.

- ศุภรัตน์ ดวนใหญ่, ชารินันท์ แจงกลาง, อัจฉรา แก้วน้อย, เพชรน้ำผึ้ง รอดโพธิ์ และ อาวุธ หงษ์ศิริ. (2564).ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดพิกัดตรีสมอ พิกัดตรีสัตกุลลา พิกัดตรีผลสมุฏฐาน. *วารสารหมอยาไทย*. 7(2), 93-104.
- สาวิตรี อัจฉนาศกรชัย, อาภาศิริวงศ์ ณ อยุธยา, นิวัติ แก้วประดับ, สมสมร ชิตตระกูล, จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล, เอกสิทธิ์ कुमारสิทธิ์, สมชาย ศรีวิริยะจันทร์, ดาร์เนีย เจ๊ะหะ, วัชรพงศ์ พุ่มชื่น และดาริกา ไสงาม. (2563). บทสรุปของพืชกระท่อม. พิมพ์ครั้งที่ 2. สงขลา: ลีโอดีไซน์ แอน พริ้นท์. หน้า 20-21.
- สุชาดา มานอกและปวีณา ลิ้มเจริญ. (2558). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. *วารสารก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์*. 15(1), 106-117.
- สุภาณี ดวงธีรปรีชา. (2561). การทดสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ **Analytical Method Validation**. ค้นเมื่อ พฤษภาคม 25, 2565, จาก :https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=508
- สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด. (2564). **ความรู้ทั่วไปและงานวิจัยพืชกระท่อม**. ค้นเมื่อ พฤษภาคม 25, 2565, จาก <https://kratom.sci.psu.ac.th/knowledge/interdisciplinary/3176/>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กองผลิตภัณฑ์สมุนไพร. (2565). **การขออนุญาตผลิตภัณฑ์สมุนไพร กระท่อม**. ค้นเมื่อ พฤษภาคม 25, 2565, จาก <https://www.fda.moph.go.th/Herbal/SitePages/kratom.html>
- สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2564). **ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย**. ค้นเมื่อ พฤษภาคม 25, 2565, จาก <https://bdn-thp.dmsc.moph.go.th/ebook/qQAcAatlpR9gC3q0GT5gMJq0qT5co3uw>
- โอภาส กุริวรรณ์. (2560). **การแยกและการหาปริมาณไมทราไจนีนในใบกระท่อมจากจังหวัดปทุมธานี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร. ค้นเมื่อ สิงหาคม 1, 2565, จาก : <http://ithesis-ir.su.ac.th/dspace/bitstream/123456789/1546/1/56312338.pdf>
- อรัญญา มโนสร้อย. (2533). **เครื่องสำอาง เล่มที่ 1**. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- อ้อมบุญ ถ้วนรัตน์, พรณวิภา กฤษภาพงษ์, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์, แม้นสรวง วุฒิอุดมเลิศ, ลีณา สุนทรสุข, โอภา วัชร และนันทวัน บุญยะประภัศร. (2543). **โครงการพัฒนาอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อการพึ่งตนเอง**. สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (เอกสารอัดสำเนา)

- Ayoola, G.A., Coker, H. A., Adesegun, S.A., Adepoju-Bello, A.A., Obaweya, K., Ezennia, E.C., & Atangbayila, T.O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 7(3), 1019-1024.
- Aboofazeli, R. & Lawrence, M.J. (1993). Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. I. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-alcohol-isopropyl myristate. *International Journal of Pharmaceutics*, 93(1-3), 161-175.
- BenSaad, L.A., Kim, K.H., Quah, C.C., Kim, W.R & Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A and B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(47).
- Baroli, B., Lopez-Quintela, M.A., Delgado-Charro, M.B., Fadda, A.M. & Blanco-Mendez, J. (2000). Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *Journal of Controlled Release*, 69, 209–218.
- Beng, G.T., Hamdan, M.R., Siddiqui, M.J., Mordi, M.N. & Mansor, S.M. (2011). A simple and cost effective isolation and purification protocol of mitragynine from *Mitragyna speciosa* korth (ketum) leaves. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 15(1), 54–60.
- Benzie, I.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Boffa, L., Ghè C., Barge, A., Muccioli, G. & Cravotto, G. (2018). Alkaloid Profiles and Activity in Different *Mitragyna speciosa* Strains. *Natural Product Communications*. 13(9), 1111-1116.
- Chan, K.B., Pakiam, C. & Rahim, R.A. (2005). Psychoactive plant abuse: the identification of mitragynine in ketum and in ketum preparations. *Bulletin on Narcotics*, 57, 249-256.
- Chang, W.T., Hong, M.Y., Chen, C.L., Hwang, C.Y., Tsai, C.C & Chuang, C.C. (2021). Mutant glucocorticoid receptor binding elements on the interleukin-6 promoter regulate dexamethasone effects. *BMC Immunol*, 22(24), 1-11.
- Chewchinda, S., Kongkiatpaiboon, S. & Sithisarn, P. (2019). Evaluation of antioxidant activities, total phenolic and total flavonoid contents of aqueous extracts of leaf, stem, and root of *Aerva lanata*. *Journal of Natural Sciences Chiang Mai University*, 18(3), 345-357.
- Farah Idayu, N., Taufik Hidayat, M., Moklas, M.A.M., Sharida, F., Nurul Raudzah, A.R., Shamina, A.R. & Apriyani, E. (2011). Antidepressant-like effect of mitragynine

- isolated from *Mitragyna speciosa* Korth in mice model of depressant. *Phytomedicine*, 18(5), 402-407.
- Field, E.J. (1921). Mitragynine and mitraversine, two new alkaloids from species of *Mitragyna*. *Transaction of the Chemical Society*, 119, 887-891.
- Flores-Bocanegra, L., Raja, H.A., Graf, T.N., Augustinović, M., Wallace, E.D, Hematian, S., Kellogg, J.J., Todd, D.A., Cech, N.B. & Oberlies, N.H. (2020). The chemistry of kratom (*Mitragyna speciosa*): Updated characterization data and methods to elucidate indole and oxindole alkaloids. *Journal of Natural Products*, [Online]. 83(7), 2165–2177.
- Goh, T.B., Koh, R.Y., Mordi, M.N. & Mansor, S.M. (2014). Antioxidant value and antiproliferative efficacy of mitragynine and a silane-reduced analogue. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(14), 5659–5665.
- Guha, M & Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13(2), 85–94.
- Goh, Y.S., Karunakarun, T., Murugaiyah, V., & Santhanam R. (2021). Accelerated solvent extraction [ASE] of *Mitragyna speciosa* Korth. (Kratom) leaves: Evaluation of its cytotoxicity and antinociceptive activity. *Molecule*, 26(12), 3704.
- Grewal, K.S. (1932). Observations on the pharmacology of mitragynine. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 46(3), 251-271.
- Grewal, K.S. (1932). The effect of mitragynine on man. *British Journal of Medical Psychology*, 12(1), 41-58.
- Haneefa, K.P., Easo, S., Hafsa, P.V., Mohunta, G. & Nayar, C. (2013). Emulgel. An advanced review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(12), 254-258.
- Hannoodee, S. & Nasuruddin, D.N. (2022). Acute Inflammatory Response. *StatPearls Publishing*, website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/>
- Heijmans-Antonissen, C., Wesseldijk, F., Munnikes, R.J., Huygen, JPM.F., Meijden, P., Hop, W.C.J., Hooijkaas, H. & Zijlstra, F.J. (2006). Multiplex bead array assay for detection of 25 soluble cytokines in blister fluid of patients with complex regional pain syndrome type 1. *Mediators of Inflammation*, 2006(1), 28398.
- Hseu, Y.C., Wu, F.Y., Wu, J.J., Chen, J.Y., Chang, W.H., Lu, F.J., Lai, Y.C. & Yang, H.L. (2005). Anti-inflammatory potential of *Antrodia Camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF-kappaB pathway. *International Immunopharmacology*, 5(13-14), 1914-1925.
- Jansen, K., & Prast, C.J. (1988). Ethanopharmacology of kratom and the *Mitragyna* alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(1), 115-119.

- Joshi, B., Raymond-Hamet, & Taylor, W.I. (1963). Structure of mitragynine (19-methoxycorynantheidine). *Chemistry and Industry*, 54(14), 573.
- Kantarci, G., Ozguney, I., Karasulu, Y.H., Arzik, S. & Guneri, T. (2007). Comparison of different water/ oil microemulsions containing diclofenac sodium: preparation, characterization, release rate and skin irritation studies. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8 (4), 75-81.
- Khunt, D.M., Mishra, A.D. & Shah, D.R., (2012). Formulation Design and Development of Piroxicam Emulgel. *International Journal of PharmTech Research*, 4(3), 1332-1344.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y. & Kim, H.P. (2010). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*, 69(10), 1511–1519.
- Kitajima, M., Misawa, K., Kogure, N., Said, I.M., Horie, S., Hatori, Y., Murayama, T. & Takayama, H. (2006). A new indole alkaloid, 7-hydroxyspeciociliatine, from the fruits of Malaysian *Mitragyna speciosa* and its agonistic activity. *Journal of Natural Resources*, 60, 28-35.
- Kowalczyk, A.P., Lozak, A. & Zjawiony, J.K. (2013). Comprehensive methodology for identification of kratom in police laboratories. *Forensic Science International*, 233(1-3), 238-243.
- Koyama, F. G., Takayama, H., Ishikawa, H., Aimi, N., Ponglux, D., Matsumoto, K., Murayama, T., & Watanabe, K. (1998). Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sciences*, 62(16), 1371–1378.
- Kruegel, A.C., Gassaway, M.M., Kapoor, A., Varadi, A., Majumdar, S., Filizola, M., Javitch, J.A. & Sames, D. (2016). Synthetic and receptor signaling explorations of the *Mitragyna* alkaloids: mitragynine as an atypical molecular framework of opioid receptor modulators. *Journal of the American Chemical Society*, 138(21), 6754-6764.
- Lawrence, M.J. & Rees, G.D., (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1), 89-121.
- León, F., Habib, E., Adkins, J. E., Furr, E. B., McCurdy, C. R., & Cutler, S. J. (2009). Phytochemical characterization of the leaves of *Mitragyna speciosa* grown in U.S.A. *Natural product communications*, 4(7), 907–910.

- Liu, H., McCurdy, C.R. & Doerksen, R.J. (2010). Computational study on the conformations of mitragynine and mitragynaline. *Computational and Theoretical Chemistry*, 945(1-3), 57-63.
- Luanratana, O. (1982). *Phytochemical Investigations within the genus Duboisia*. Ph.D. Thesis, Department of Pharmacy, University of Queensland, Brisbane, Australia.
- Liu, X. (2021). Organic Chemistry I. website: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_I_%28Liu%29/06%3A_Structural_Identification_of_Organic_Compounds_IR_and_NMR_Spectroscopy/6.06%3A_H_NMR_Spectra_and_Interpretation_%28Part_I%29.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-444.
- Matsumoto, K., Horie, S., Ishikawa, H., Takayama, H., Aimi, N., Ponglux, D., & Watanabe, K. (2004). Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sciences*, 74(17), 2143–2155.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428–435
- Melania, P., Masriani, Muharini, R., Alimuddin A. H & Sartika, R. P. (2024). Total phenolic and flavonoids content, and antioxidant activity of Kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) leaf ethanol extract. *Jurnal Natural*, 24(1), 16-21.
- Mojzer, E. B., Hrcic, M. K., Skerget, M., Knez, Z & Bren, U. (2016). Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(7), 1-38.
- Mohamed, H.M. (2015). Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 176–192.
- Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, MG., Micicchè, L., Maccioni, A.M., Valenti, D. & Fadda, A.M. (2016). From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32(part B), 100-112.
- Nattha, P., Santad, W., Pritsana, R. & Chutha, T.Y. (2021). Inflammatory response of raw 264.7 macrophage cells treated with dragonfruit oligosaccharide on lipopolysaccharide-induced inflammation. *Food Science and Technology Research*, 27(1), 111–119.

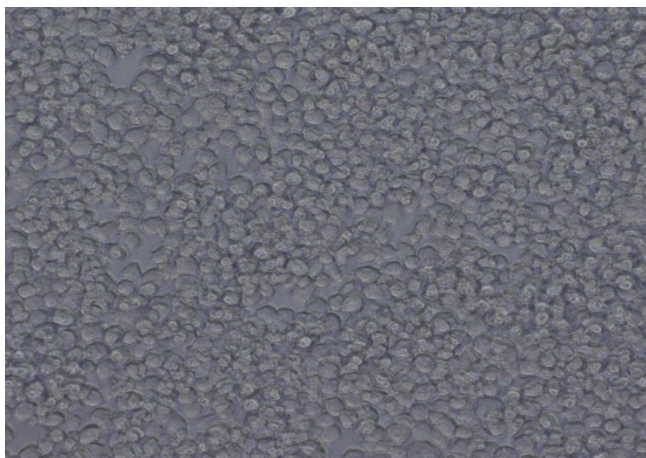
- Ohgami, K., Shiratori, K., Kotake, S., Nishida, T., Mizuki, N., Yazawa, K. & Ohno, S. (2003). Effects of Astaxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(6), 2694-2701.
- Parthasarathy, S., Bin Azizi, J., Ramanathan, S., Ismail, S., Sasidharan, S., Said, M. I., & Mansor, S. M. (2009). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Aqueous, Methanolic and Alkaloid Extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) Leaves. *Molecules (Basel Switzerland)*, 14(10), 3964–3974.
- Park, H.S., Choi, H.Y. & Kim, G.H. (2014). Preventive effect of *Ligularia fischeri* on inhibition of nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages depending on cooking method. *Biological Research*, 47(1), 1-6.
- Ponglux, D., Wongseripipatana, S., Takayama, H., Kukuchi, M., Kukihara, M., Kitayama, M., Aimi, N. & Sakai, S. (1994). A new indole alkaloid, 7 alpha-hydroxy-7H-mitragynine, from *Mitragyna speciosa* in Thailand. *Planta Medica*, 60(6), 580-581.
- Praditbongkotch, A. (2009). *Formulation of Microemulsion gel of Zingiber Officinale extract and evaluation of anti-inflammatory activity in rats*. Master of Science in Pharmacy. Chulalongkorn University.
- Prasad, K.D., & Guru Row, T.N. (2012). N-Alkyl derivative of 1,9-pyrazoloanthrone as a sensor for picric acid. *The Royal Society of Chemistry*, 4(85), 45306–45310.
- Ricciotti, E & FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986–1000.
- Sautebin, L. (2000). Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*, 71(1), 48-57.
- Shaik Mossadeq, W.M., Sulaiman, M.R., Tengku Mohamad, T.A., Chiong, H.S., Zakaria, Z.A., Jabit, M.L., Baharuldin, M.T.H. & Israif, D.A. (2009). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Mitragyna speciosa* Korth Methanolic Extract. *Medical Principles and Practice*, 18(5), 378-384.
- Shamima, A.R., Fakurazi, S., Hidayat, M.T., Hairuszah, I., Moklas, M.A.M. & Arulselvan, P. (2012). Antinociceptive action of isolated mitragynine from *Mitragyna Speciosa* through activation of opioid receptor system. *International journal of molecular sciences*, 13(9), 11427-11442.

- Siddiqui, S., Verma, A., Rather, A.A, Jabeen, F. & Meghvansi, M.K. (2009). Preliminary Phytochemicals Analysis of Some Important Medicinal and Aromatic Plants. *Advances in Biological Research*, 3(5-6), 188-195.
- Sithisarn, P., Rojsanga, P., Sithisarn, P. & Kongkiatpaiboon, S. (2015). Antioxidant Activity and Antibacterial Effects on Clinical Isolated *Streptococcus suis* and *Staphylococcus intermedius* of Extracts from Several Parts of *Cladogynos orientalis* and Their Phytochemical Screenings. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015(1), 1-8.
- Silva, A.E., Barratt, G., Chéron, M., Sócrates, E. & Egito, T. (2013). Development of oil-in-water microemulsions for the oral delivery of amphotericin B. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(2), 641-648.
- Still W.C., Kahn M. & Mitra A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(14), 2923-2925.
- Suhaila, S. M., Sulaiman, M. R., Tengku Mohamad, T. A., Chiong, H. S., Zakaria, Z. A., Jabit, M. L., Baharuldin, M. T., Israf, D. A., & Arulselvan, P. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Medical Principles and Practice*, 18(16), 378–384.
- Suwanlert, S. (1975). A study of kratom eaters in Thailand. *Bulletin on Narcotics*, 27(3), 21-27.
- Takayama, H., Ishikawa, H., Kurihara, M., Kitajima, M., Aimi, N. & Ponglux, D. (2002). Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: Discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 1949-1956.
- Takayama, H. (2004). Chemistry and Pharmacology of analgesic indole alkaloids from the Rubiaceae plant, *Mitragyna speciosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(8), 916-928.
- Tak, P. P & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7–11.
- Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 1-16.
- Thongpradichote, S., Matsumoto, K., Tohda, M., Takayama, H., Aimi, N., Sakai, S. & Watanabe, H. (1998). Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sciences*, 62(16), 1371-1378.

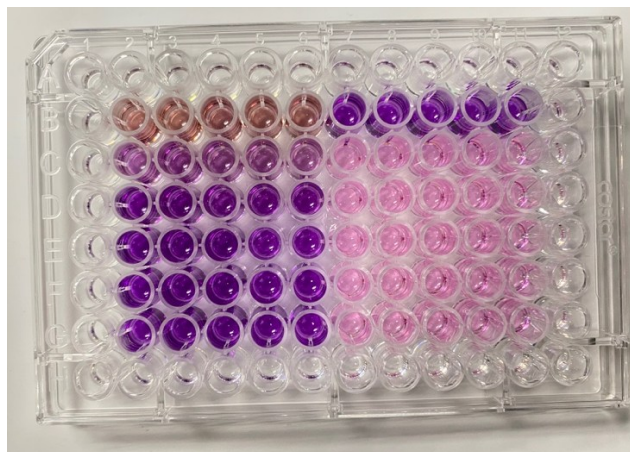
- Tian, Y., Cheng, C., Wei, Y., Yang, F. & Li, G. (2022). The Role of Exosomes in Inflammatory Diseases and Tumor-Related Inflammation. *Cells*, 11(6), 1005.
- Tuntiyasawasdikul, S., Junlatat, J., Tabboon, P., Limpongsa, E. & Jaipakdee, N. (2024). *Mitragyna speciosa* ethanolic extract: Extraction, anti-inflammatory, cytotoxicity, and transdermal delivery assessments. *Industrial Crops and Products*, 2024(208), 117909.
- Utar, Z., Majid, M.I., Adenan, M.I., Jamil, M.F. & Lan, T.M. (2011). Mitragynine inhibits the COX-2 mRNA expression and prostaglandin E2 production induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1), 75–82.
- Watanabe, K., Yano, S., Horie, S. & Yamamoto, L.T. (1997). Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor. *Life Sciences*, 60(12), 933-942.
- Yuniarti, R., Nadia, S., Alamanda, A., Zubir, M., Syahputra, R. A. & Nizam, M. (2020). Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mitragyna speciosa* Korth) Using DPPH Method. *Journal of Physics: Conference Series*, 1462(1), 012026.
- Zakaria, F., Tan, J.-K., Mohd Faudzi, S. M., Abdul Rahman, M. B. and Ashari, S. E. (2021). Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021(81), 105851.
- Zhang, J.M. & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.
- Zhang, P., Wei, W., Zhang, X., Wen, C., Ovatlarnporn, C. & Olatunji, O. J. (2023). Antidiabetic and antioxidant activities of *Mitragyna speciosa* (kratom) leaf extract in type 2 diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2023(162), 114689.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G. & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 2018(13), 1-26.

ภาคผนวก

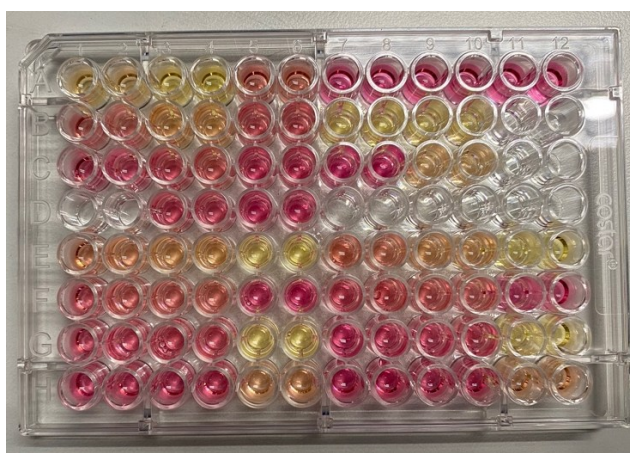
ภาคผนวก ก
การเลี้ยงเซลล์มาโคฟาจ Raw. 264.7



ภาพที่ 1. แสดงลักษณะเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดภาพหัวกลับ



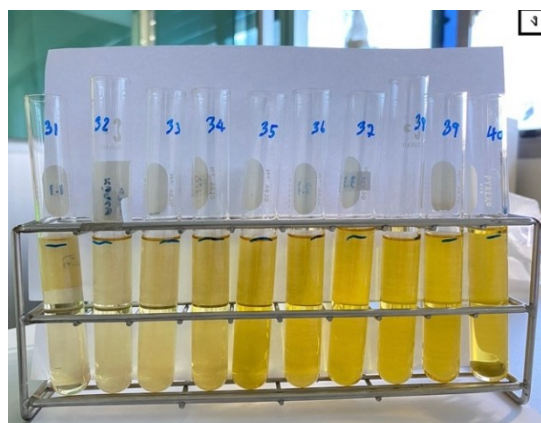
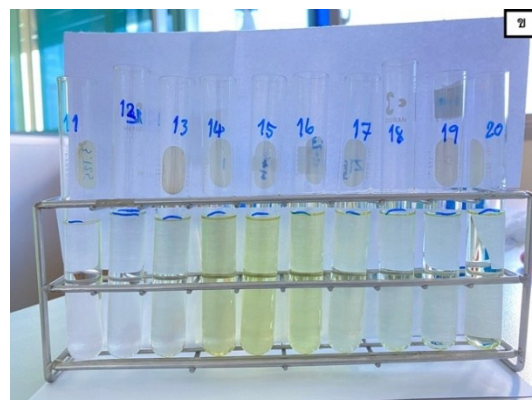
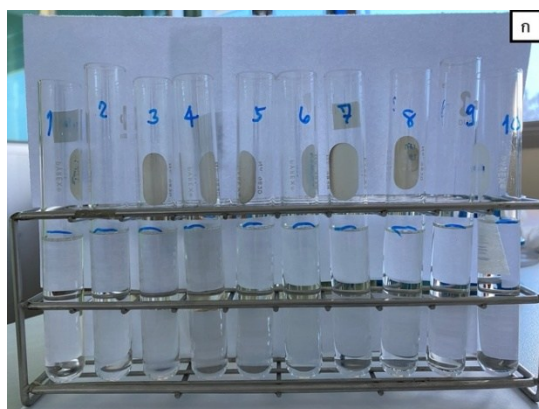
ภาพที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ 264.7 ของสารมาตรฐานมิทราไจนิน และสารสกัดกระท่อม



ภาพที่ 3 การยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 เมื่อได้รับสารมาตรฐาน มิทราไจนินและสารสกัดกระท่อม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ภาคผนวก ข

การสกัดมิตราไจนีนด้วยวิธีการคอลัมน์โครมาโตกราฟี



ภาพที่ 1 ก-ง แสดงสารสกัดที่ได้จากการลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีจากสารสกัดอัลคาลอยด์รวมใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง



ภาพที่ 2 คอลัมน์ใส่สารสกัดกระท่อมด้วย 40 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล



ภาพที่ 3 ตะกอนมิทราไจนีนฟิเกรต

ภาคผนวก ค
สำเนาประกาศนียบัตรภาษาอังกฤษ/ผลการสอบ CEFR



This is to certify that

Miss Pichapat Thititanaapipong

Achieved BSRU English Proficiency Test (BSRU-TEP) level

C1

Given on 29th November 2021

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Kun A', is positioned above the name of the official.

(Assistant Professor Dr Kulsirin Aphiratvoradej)

Director

ภาคผนวก ง

มาตรฐาน Thai Herbal Pharmacopoeia 2021
Supplement 2025

Thai Herbal Pharmacopoeia 2021

SUPPLEMENT 2025



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES

CONTENTS

	PAGE
PREFACE	V
THE COMMITTEE AND SUBCOMMITTEES	VII
INTRODUCTION	XXVII
AMENDMENT	XXIX
BUABOK, SUAN NUEA DIN	XXXI
[<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.]	
GENERAL NOTICES	1
MONOGRAPHS	9
CHETTAMUN PHLOENG KHAO, RAK	11
[<i>Plumbago zeylanica</i> L.]	
CHETTAMUN PHLOENG, RAK	17
[<i>Plumbago indica</i> L.]	
FANG, KAEN	23
[<i>Biancaea sappan</i> (L.) Tod.]	
FANG DRY EXTRACT	33
[Sappan Wood Dry Extract]	
KAMLANG SUEA KHRONG, THAO	36
[<i>Ziziphus attopensis</i> Pierre]	
KHOI, BAI	43
[<i>Streblus asper</i> Lour.]	
KRADUK KAI DAM, BAI	51
[<i>Justicia gendarussa</i> Burm. f.]	
KRATHOM DRY EXTRACT	60
[Kratom Dry Extract]	
LAMPHAN HANG MU, NGAO	62
[<i>Enhalus acoroides</i> (L. f.) Royle]	
MAKA, BAI	69
[<i>Bridelia ovata</i> Decne.]	
MAKHAM, NUEA NAI MALET	77
[<i>Tamarindus indica</i> L.]	
MANAO, PHIO	83
[<i>Citrus × aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle]	
MANGKHUT, PLUEAK PHON	90
[<i>Garcinia mangostana</i> L.]	
MANGKHUT DRY EXTRACT	97
[Mangosteen Dry Extract]	
	III

สารสกัดแห้งกระท่อม (KRATHOM DRY EXTRACT)

Kratom Dry Extract

Category Analgesic, antidiarrheal.

Kratom Dry Extract is prepared from the powdered Kratom by extraction with water. It contains not less than 90.0 per cent and not more than 110.0 per cent of the labelled amount of mitragynine ($C_{23}H_{30}N_2O_4$); the labelled amount of mitragynine is not less than 10.0 per cent, calculated on dried basis.

Description Brownish yellow powder.

Packaging and storage Kratom Dry Extract shall be kept in tightly closed containers, protected from light, and stored in a cool and dry place.

Labelling The label on the container states (1) the amount of mitragynine; (2) the expiration date.

Identification The chromatogram of the Assay preparation shows several peaks, one of which corresponds to that of the Standard preparation, as obtained in the Assay (Fig. 1).

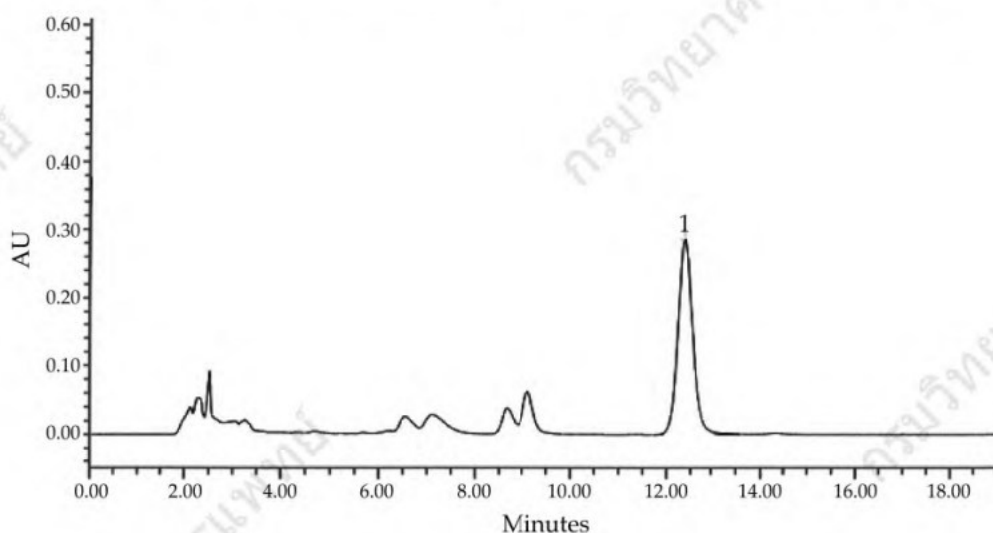


Fig. 1 HPLC Chromatogram of Kratom Dry Extract Showing Mitragynine (1)

Loss on drying Not more than 6.0 per cent w/w after drying at 105° to constant weight, use 1 g (Appendix 4.15).

Assay Carry out the determination as described in the "Liquid Chromatography" (Appendix 3.5).

Diluent Prepare a mixture of 8 volumes of *methanol* and 2 volumes of a 0.1 per cent v/v solution of *glacial acetic acid*.

Buffer solution Dissolve 1.54 g of *ammonium acetate* in 500 mL of *water*, adjust with *glacial acetic acid* to pH 6.0, and dilute to 1000.0 mL.

Mobile phase Prepare a mixture of 65 volumes of *acetonitrile* and 35 volumes of *Buffer solution*.

Standard preparations Dissolve a suitable quantity of Mitragynine RS in sufficient *Diluent* to obtain a stock solution having a known concentration of about 100 µg of mitragynine per mL. Dilute the solution quantitatively and stepwise with the same solvent to obtain six solutions of 10, 20, 40, 60, 80, and 100 µg of mitragynine per mL. Filter through a membrane having a 0.45-µm porosity.

Assay preparation Transfer about 25 mg of Kratom Dry Extract, in *fine powder* and accurately weighed, to a 50-mL volumetric flask and add 35 mL of *Diluent*. Sonicate for 30 minutes, allow to cool to room temperature, and adjust to volume with the same solvent. Centrifuge the resulting solution at $3218 \times g$ (5000 rpm) for 5 minutes. Use the supernatant and filter through a membrane having a 0.45-µm porosity.

Chromatographic system The chromatographic procedure may be carried out using (a) a stainless steel column (25 cm $\times$ 4.6 mm) packed with octadecylsilane chemically bonded to porous silica or ceramic microparticles (5 µm), (b) *Mobile phase* at a flow rate of 1.0 mL per minute, and (c) an ultraviolet photometer set at 225 nm.

To determine the suitability of the chromatographic system, chromatograph *Standard preparation* having a known concentration of 60 µg per mL, and record the peak response as directed under *Procedure* and *Calculation*: the relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0 per cent. The symmetry factor for mitragynine peak is not more than 1.5.

Procedure and Calculation Separately inject about 20 µL of *Standard preparations* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the responses for the mitragynine peaks. Plot the readings and draw the standard curve of best fit: the curve shows the correlation coefficient of not less than 0.995. Inject about 20 µL of *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatogram, and measure the response for the mitragynine peak. By reference to the standard curve, calculate the content of mitragynine ($C_{23}H_{30}N_2O_4$) in the portion of the Extract taken.

Other requirements Complies with the requirements described under “Extracts” (Appendix 1.16H).

ภาคผนวก จ

แบบตอบรับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

ที่ อว ๐๖๐๔/๖๔๙๑



มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
 ๘๕ ถนนสถลมารค ตำบลเมืองศรีโค
 อำเภวารินชำราบ
 จังหวัดอุบลราชธานี ๓๔๑๙๐

๒๖

พฤศจิกายน ๒๕๖๗

เรื่อง ขอส่งแบบแจ้งผลการพิจารณาผลงานทางวิชาการเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เรียน รองศาสตราจารย์อัมมบุญ วิลลิสุต

สิ่งที่ส่งมาด้วย แบบแจ้งผลการพิจารณาผลงานทางวิชาการเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตามที่ ท่านได้แสดงความจำนง ในการเสนอต้นฉบับเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยท่านได้เสนอต้นฉบับบทความทางวิชาการ เรื่อง "การแยกและตรวจวิเคราะห์มีทราจีนีนจากใบกระท่อมด้วยวิธีโครมาโทกราฟี" นั้น

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้นำผลงานทางวิชาการดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการพิจารณา
 กลั่นกรองจากผู้ทรงคุณวุฒิและกองบรรณาธิการโดยได้แจ้งท่านแก้ไขปรับปรุงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ดังนั้น
 จึงขอส่งแบบแจ้งผลการพิจารณาผลงานทางวิชาการเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ดังรายการสิ่งที่ส่งมาด้วย มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ขอขอบคุณท่านที่ให้ความสนใจ
 ส่งบทความเพื่อรับการพิจารณาตีพิมพ์ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ท่านจะให้ความสนใจส่งผลงานทางวิชาการเพื่อ
 รับการพิจารณาตีพิมพ์ในโอกาสต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ทวนทอง จูทาเกตุ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สำนักงานอธิการบดี สำนักงานส่งเสริมบริหารงานวิจัย โทรศัพท ๐ ๔๕๓๕ ๓๐๓๕
 Email: ubusci@ubu.ac.th

มหาวิทยาลัยชั้นนำในอาเซียน เพื่อกระตุ้นคุณภาพชีวิตให้แก่สังคม A Leading University in ASEAN Improving the Quality of Life for Society



Promoting UBU : รักและทำเพื่อ UBU

Integrity : สุจริตไม่โกง มีจริยธรรม Management by fact : ทำงานด้วยข้อมูล Proactiveness : ทำหน้าที่รุก Accountability : รับผิดชอบต่อการกระทำของตนเอง

Creativity : คิดเป็น ทำงานสร้างสรรค์ Teamwork : ทำงานเป็นทีม Stakeholders Focus : มุ่งเน้นผู้เกี่ยวข้องและผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย



แบบแจ้งผลการพิจารณาผลงานทางวิชาการ
เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

วันที่ ๒๒ พฤศจิกายน ๒๕๖๗

ตามที่ รองศาสตราจารย์อ้อมบุญ วังลิสต์ ได้ส่งผลงานทางวิชาการ เรื่อง “การแยกและตรวจวิเคราะห์มีทราไจนีนจากใบกระท่อมด้วยวิธีโครมาโทกราฟี” เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี นั้น

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้พิจารณานำผลงานดังกล่าวเข้าสู่กระบวนการโดยมีผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาจำนวน ๓ ท่าน จากมหาวิทยาลัยที่ต่างกััน และได้ส่งกัตมหาวิทยาลัยที่ผู้วิจัยสังกัดอยู่ ได้รับการตอบรับเผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ ๒๗ ฉบับที่ ๓ เดือนกันยายน - ธันวาคม ๒๕๖๘

(ศาสตราจารย์พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ)
บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สำนักงานส่งเสริมบริหารงานวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
โทรศัพท์ ๐ ๔๕๓๕ ๓๐๓๕ Email address: ubusocj@ubu.ac.th

มหาวิทยาลัยชั้นนำในอาเซียน ที่ยกระดับคุณภาพชีวิตให้แก่มัสังคม A Leading University in ASEAN Improving the Quality of Life for Society



มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Prioritizing UBU : รักและทำเพื่อ UBU

Integrity : สุจริต โปร่งใส มีจริยธรรม Management by Fact : ทำงานด้วยข้อมูลจริง Proactiveness : ทำงานเชิงรุก Accountability : รับผิดชอบต่องานและสังคม

Creativity : คิดเป็น ทำงานสร้างสรรค์ Teamwork : ทำงานเป็นทีม Stakeholders Focus : มุ่งเน้นผู้เรียนและผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย



ที่ อว 660301.1/3774

คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
จังหวัดขอนแก่น 40002

30 กรกฎาคม 2568

เรื่อง รับรองการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข.

เรียน คุณอ้อมบุญ วลีสุต

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ขอรับรองว่า บทความวิจัยเรื่อง “สารพฤษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดใบกระท่อมพันธุ์ก้านแดง” โดย พิชทรัพย์ ฐิติธนอภิพงษ์, อ้อมบุญ วลีสุต, อัจฉรา แก้วน้อย และ จันทนา ยะหัวฝาย ได้ผ่านขั้นตอนการตรวจสอบจากผู้ทรงคุณวุฒิ (peer review) จากหลากหลายสถาบันและมิได้ส่งกีดเดียวกันกับผู้พิมพ์จำนวน 3 ท่าน และบทความดังกล่าวได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ มข. ฉบับที่ 3 ปีที่ 53 ซึ่งมีกำหนดออกเดือนกันยายน - ธันวาคม ปี พ.ศ. 2568

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา

ขอแสดงความนับถือ

 Digitally
signed by
รองศาตราจารย์
นุระคำ

(รองศาสตราจารย์รจนา นุระคำ)

รองคณบดีฝ่ายวิจัย

ปฏิบัติการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วารสารวิทยาศาสตร์ มข.

โทรศัพท์ 043-009700 ต่อ 44886

E-mail: kku_scijournal@kku.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นางสาวพิชาพัชร จูติธนนภิพงษ์

วัน/เดือน/ปีเกิด

5 ธันวาคม พ.ศ. 2528

ที่อยู่ปัจจุบัน

เลขที่ 11 ซอยเพชรเกษม 60/3 แขวงบางด้วน

เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาโท

มหาวิทยาลัยมหิดล

สาขาวัฒนธรรมและการพัฒนา

พ.ศ. 2551

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ (การแพทย์แผนไทยประยุกต์)

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2557-ปัจจุบัน

สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร