Journal of Agri. Research & Extension 40(3): 43-54

การศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในดีปลีที่เพาะปลูกในพื้นที่จำกัด

The Study of Heavy Metal and Microbial Contaminations in *Piper retrofractum* Vahl. Planting by Space-saving Model

พรพรรณ ก้อใจ เกียรติภูมิ ลาภภิญโญ และจักรกฤษณ์ คณารีย์*

Pornphun Kowjai, Khiartiphum Lappinyo and Chakkrit Khanaree*

วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย เชียงราย 57100

School of Traditional and Alternative Medicine, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, Thailand 57100

*Corresponding author: chakkrit.kh@gmail.com

Received: *March 24, 2022*
Revised: *November 01, 2022*
Accepted: *November 15, 2022*

Abstract

Heavy metal and microbial contaminations in herbal raw materials are the main problems of herbal production due to contamination and pollution in agricultural areas, hence the high concentration of chemical residues. This study focused on developing a space saving model for planting herbs with reduction of contaminations and with the ability to control the levels of heavy metal and microbial contaminations using *Piper retrofractum* Vahl. as a model plant. This study developed a pattern for planting *Piper retrofractum* Vahl. in rectangular-shaped cement pots with a size of 30x100x30 cm. (width x length x height) in one pot per five plants with a mixture soil free from heavy metal contaminants. The component of the soil mixture contained soil, black chaff, and coconut flakes in a ratio of 1: 1: 1, and organic fertilizer contained dry leaves, manure, and effective microorganisms in a ratio of 10: 1: 1, and the watering period has been set. After 6 months of cultivating the dill, it was found that on average, 300 grams of orange *Piper retrofractum* Vahl. can be harvested per pot. The study found that the heavy metal and microbial contaminations found in *Piper retrofractum* Vahl. did not exceed the specified standards. Furthermore, it was found that the active components using the fingerprint-thin layer chromatography method were just as efficient as those of the standard herb.

Keywords: *Piper retrofractum* Vahl., contamination, heavy metal, microorganisms

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์เป็นปัญหาหลักของการเพาะปลูกพืชสมุนไพรในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ที่ผ่านการทำเกษตรเคมีมาก่อน จึงเป็นเหตุให้มีสารเคมีตกค้างค่อนข้างมาก การศึกษานี้จึงสนใจพัฒนารูปแบบการเพาะปลูกพืชสมุนไพรในบริเวณพื้นที่ที่มีขนาดจำกัดและสามารถควบคุมการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยยกตัวอย่างการเพาะปลูกดีปลี การศึกษานี้ได้

พัฒนารูปแบบการเพาะปลูกดีปลีในกระถางปูนรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาด 30x100x30 ซม. (กว้างxยาวxสูง) โดย 1 กระถางปลูกดีปลีจำนวน 5 ต้น ด้วยดินปรุงที่ไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก ซึ่งมีส่วนประกอบของ ดิน แกลบดำ และขุยมะพร้าวละเอียด อัตราส่วน 1:1:1 และใช้ปุ๋ยหมักที่มีส่วนผสมของใบไม้แห้งบด มูลวัว และกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (Effective Microorganisms (EM)) ในอัตราส่วน 10:1:1 โดยได้มีการกำหนดช่วงเวลาการให้น้ำ หลังจากการเพาะปลูกดีปลีครบ 6 เดือน พบว่าสามารถเก็บผลดีปลีที่มีสีส้มในปริมาณเฉลี่ย 300 กรัมต่อกระถาง และผลดีปลีที่เพาะปลูกด้วยวิธีนี้ไม่พบการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ที่เกินมาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบว่าผลดีปลีดังกล่าวยังคงมีสารสำคัญเช่นเดียวกันกับต้นพันธุ์โดยเทียบลายพิมพ์นิ้วมือของพืช (Fingerprint) ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบชั้นบาง

คำสำคัญ: ดีปลี การปนเปื้อน โลหะหนัก เชื้อจุลินทรีย์

คำนำ

ดีปลี มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Piper retrofractum* Vahl. อยู่ในวงศ์ Piperaceae เป็นไม้เถาอายุหลายปี ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปไข่หรือรูปใบหอก โคนใบรูปหัวใจ ดอกออกเป็นช่อเชิงลด เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ผลเป็นช่อรูปทรงกระบอกปลายมน เป็นลักษณะผลย่อยแบบผล มีเนื้อหลายเมล็ด กระจายพันธุ์ในเป็นพื้นที่ฝนตกชุกอากาศร้อนชื้น (Ministry of Public Health, Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, 2015) เป็นพืชที่สามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายอย่าง ทางการแพทย์แผนไทยนำเอาดีปลีมาปรุงเป็นเครื่องยารักษาโรคหรืออาการเจ็บป่วยต่าง ๆ โดยใช้ส่วนผลดีปลี (ในตำราเภสัชกรรมไทยเรียกดอกดีปลี) ดีปลีเป็นสมุนไพรรสร้อน มีสรรพคุณ แก้ปถวีธาตุพิการ แก้อาการท้องร่วง ขับลมในลำไส้ (Office of the Permanent Secretary, Ministry of Public Health, 1998) และยังปรากฏในส่วนประกอบของตำรับยาไทย อาทิ ตำรับยาริดสีดวงมหากาฬใช้รักษาโรคริดสีดวงทวารหนัก (Ministry of Education, 1999) ตำรับยาประสะไพลใช้รักษาอาการปวดประจำเดือนและอาการประจำเดือนมาไม่ปกติ และตำรับยาบำรุงน้ำนมที่ใช้ดูแลหญิงหลังคลอดที่มีภาวะน้ำนมน้อย (Office of the Permanent Secretary Ministry of Public Health, 2006)

ปัจจุบันการนำดีปลีในพื้นที่ป่าธรรมชาติมาใช้นั้นกระทำไม่ได้ จึงต้องมีการเพาะปลูกในรูปแบบเกษตร เพียงแต่การเพาะปลูกดีปลีเพื่อให้ได้ตัวยาที่ดีหรือให้มีสรรพคุณทางยานั้นอาจจะเพาะปลูกในรูปแบบเกษตรทั่วไปไม่ได้ เนื่องจากการปลูกพืชสมุนไพรจะต้องให้ความสำคัญในการดูแลและควบคุมคุณภาพ ประกอบกับพื้นที่การเกษตรในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ทำการเกษตรเคมี โดยมีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชและการใช้ปุ๋ยเคมีเป็นระยะเวลานาน ทำให้มีการตกค้างและสั่งสมของโลหะหนักในพื้นที่เกษตรกรรม และเมื่อทำการเพาะปลูกสมุนไพรส่งผลให้มีโอกาสปนเปื้อนโลหะหนัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Priprem *et al.* (2006) ที่ได้ศึกษาการปนเปื้อนโลหะหนักในสารสกัดสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบที่สำคัญของตำรับหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งมีดีปลีเป็นส่วนประกอบ โดยพบว่าดีปลีที่นำมาศึกษามีการปนเปื้อนของสารหนูในช่วง 0-0.2 ส่วนในล้านส่วน และมีการปนเปื้อนของแคดเมียม >0.030 ส่วนในล้านส่วน โดยการปนเปื้อนดังกล่าวคาดว่ามีผลมาจากแหล่งเพาะปลูก แหล่งที่มาของสมุนไพร หรือวิธีการเก็บเกี่ยวสมุนไพร ดังนั้นการนำดีปลีมาปรุงเป็นยาจึงมีโอกาสปนเปื้อนโลหะหนักและมีผลต่อการขึ้นทะเบียนยาสมุนไพรกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) และที่สำคัญ คือ เป็นอันตรายต่อร่างกายผู้ป่วยอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรโดยพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Clostridium* spp., *E. coli, Salmonella* spp. และเชื้อรา ทำให้ยาสมุนไพรเหล่านี้ไม่ได้รับการขึ้นทะเบียน โดยมีสาเหตุการปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น น้ำ

ดิน และมูลสัตว์ที่ใช้ทำปุ๋ยคอก (Pongmueangmun *et al*., 2016) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเพาะปลูกสมุนไพรมีความจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วย

จากปัญหาดังกล่าววิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ในฐานะสถาบันการศึกษาที่บุกเบิกด้านการแพทย์พื้นบ้านล้านนาและการแพทย์แผนไทยที่ผลิตบัณฑิตออกไปรับใช้ประชาชนจึงสนใจที่ศึกษาและพัฒนารูปแบบการเพาะปลูก ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพาะปลูกดีปลีในพื้นที่จำกัดที่ให้ผลผลิตที่ปลอดการปนเปื้อนโลหะหนักและจุลินทรีย์ โดยมีการควบคุมปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของดีปลี ตั้งแต่การควบคุมคุณภาพดิน คุณภาพน้ำ การให้ปุ๋ย นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบคุณภาพดีปลีโดยอาศัยความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพื่อยืนยันคุณภาพของการเพาะปลูกดีปลีให้มีคุณภาพทางยาที่ดี ได้แก่ การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของดีปลี รวมถึงการปนเปื้อนโลหะหนักและจุลินทรีย์ เพื่อให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนของคณะกรรมการอาหารและยา และได้วัตถุดิบเครื่องยาที่ดีมีคุณภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยและพัฒนารูปแบบการเพาะปลูกดีปลีที่ปลอดการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงคุณภาพ โดยมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลเชิงลึกขององค์ความรู้การเพาะปลูกพืชสมุนไพรและการเพาะปลูกดีปลี ทั้งความรู้ทางการแพทย์แผนไทยและความรู้ทางวิทยาศาสตร์ จากนั้นได้มีการพัฒนากระบวนการเพาะปลูกดีปลีให้ปลอดจากโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ในพื้นที่จำกัดที่ไม่ใช่พื้นที่การเกษตร โดยการศึกษานี้มีตัวบ่งชี้ คือ ผลผลิตดีปลีที่ไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ หรือมีการปนเปื้อนโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์แต่ไม่เกินมาตรฐานตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา หรือ อย. กำหนด รวมถึงดีปลีที่เพาะปลูกยังคงคุณภาพเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ซึ่งกระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการรวบรวมข้อมูล ระหว่างเดือนมกราคม–เดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 ในพื้นที่ของฟาร์มสาธิตเภสัชเกษตร วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

การเตรียมวัสดุอุปกรณ์สำหรับการเพาะปลูกดีปลี

การศึกษานี้ใช้กล้าพันธุ์ดีปลีสายพันธุ์พื้นเมืองในท้องถิ่น (สายพันธุ์ภายในจังหวัดเชียงราย) เป็นสายพันธุ์ที่วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านฯ ใช้ในการปรุงยารักษาโรคริดสีดวงทวารหนัก ซึ่งได้พัฒนากระบวนการปลูกที่สามารถควบคุมคุณภาพได้ โดยการเพาะปลูกในกระถางปลูกทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 30x100x30 ซม. (กว้างxยาวxสูง) ใช้ดินปรุงที่มีส่วนประกอบของ ดิน แกลบดำ และขุยมะพร้าว ละเอียด อัตราส่วน 1:1:1 และใช้ปุ๋ยหมักที่มีส่วนผสมของใบไม้แห้งบด มูลวัว และกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ (Effective Microorganisms: EM) ในอัตราส่วน 10:1:1

การตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer (ICP-MS)

นำตัวอย่างดีปลีแห้งส่งตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ ตะกั่ว (Lead) สารหนู (Arsenic) แคดเมียม (Cadmium) และปรอท (Mercury) ตามวิธีการ In-House Method TE-CH-260 in connection with AOAC (2019), 2013.06 และ AOAC (2019), 999.10 ณ ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่

นำตัวอย่างดินปรุงส่งตรวจวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ สารหนู (Arsenic) แคดเมียม (Cadmium) ตะกั่ว (Lead) และปรอท (Mercury) ตามวิธีการ In-House Method TE-CH-329 based on A Handbook of Soil analysis 1/2553 and Environmental Protection Agency (EPA) 3052, 1996 ณ ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่

การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate

สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Clostridium Agar (Himedia, India), Salmonella Shigella Agar (Himedia, India), Mannitol Salt Agar (Himedia, India), MacConkey Agar (Himedia, India) และ Potato Dextrose Agar (Himedia, India) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli (E.coli)* และเชื้อรา ตามลำดับ โดยนำผงดีปลีแห้งจำนวน 1 กรัม มาผสมกับสารละลายฟอสเฟต (Phosphate buffer) (Himedia, India) จำนวน 9 มล. และผสมให้เข้ากัน รอให้ตกตะกอนและนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นหยดตัวอย่างจำนวน 0.1 มล. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด และทำการกระจายเชื้อด้วยวิธี Spread plate ทำการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35°ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชม. เมื่อครบเวลาทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony) ของจุลินทรีย์ และคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (Colony forming unit/gram; CFU/g)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี (Colony) เฉลี่ย}}{\textit{Dilution factor} \times \text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใส่ในเพลต (มล.)}}$$

การตรวจสอบคุณภาพและเอกลักษณ์ทางเคมีโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography)

เตรียมตัวอย่างโดยนำดีปลีแห้งมาบดให้เป็นผงโดยเครื่องบดสมุนไพร (WF-04 Disintegrator, YILIchoice, China) แล้วร่อนผ่านตะแกรงมาตรฐานขนาด 40 Mesh จากนั้นชั่งผงดีปลีจำนวน 1 กรัม นำมาสกัดด้วย 80% เอทานอล (AR grade, RCI Labscan, Ireland) ปริมาตร 5 มล. และนำมาเขย่าประมาณ 10 นาที ด้วยเครื่องเขย่าสาร (Orbital shaker, Miulab, Taiwan) แล้วแช่ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman 93, Cytiva, China) เพื่อแยกสารสกัดออกจากกากที่เหลือ จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 0.01 มล. มาหยดลงบนแผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วย Silica gel (TLC silica gel 60 F_{254}, Merck, Germany) ที่ใช้เป็นวัฏภาคคงที่ แล้วนำไปวางในภาชนะปิด (Developing chamber) ที่เตรียมไว้โดยใช้ Dichloromethane (AR grade, Fisher Scientific, UK): Methanol (AR grade, RCI Labscan, Ireland) ในอัตราส่วน 9:1 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ จากนั้นนำแผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วย Silica gel ออกจากภาชนะปิด (Developing chamber) ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติและภายใต้แสงอัตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร พร้อมทั้งตรวจสอบตำแหน่งและสีของแถบสาร เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง และหาค่าคงที่อัตราไหล (Rate of flow: R_f) ซึ่งหาได้จากอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่สารเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

ผลการวิจัย

การพัฒนารูปแบบการเพาะปลูกดีปลีให้ปลอดการปนเปื้อนโลหะหนักและจุลินทรีย์

ดีปลีเป็นไม้เลื้อยที่มีรากยึดเกาะทุกข้อ ทำให้มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับต้นไม้ เสาปูน หรือกำแพงได้ดี ซึ่งการเพาะปลูกในครั้งนี้ เพาะปลูกดีปลีในฟาร์มสาธิตเภสัชเกษตร วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านฯ และเป็นบริเวณที่มีกำแพงชนิดปูน โดยเริ่มจากการขยายพันธุ์ดีปลีด้วยวิธีการปักชำยอดในถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 4x8 นิ้ว ในดินปรุงที่ประกอบด้วย ดิน แกลบดำ และขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยจะต้องปักชำให้ข้อของดีปลีอยู่ใต้ดินปรุงประมาณ 2-3 ข้อ จากนั้นนำไปจัดเรียงในเรือนเพาะชำชั่วคราวแบบควบแน่น (ความเข้มแสง 50-80% อุณหภูมิไม่เกิน 30°ซ. และมีความชื้นสัมพัทธ์ 50-70%) เป็นระยะเวลา 4 เดือน



Figure 1 Plant nursery

เมื่อครบเวลา 4 เดือน นำต้นกล้าดีปลีมาเพาะปลูกในกระถางปูนขนาด 30x100x30 ซม. ด้วยดินปรุงที่ประกอบด้วย ดิน แกลบดำ และขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 1:1:1 โดยมีวิธีการดูแล คือ รดน้ำด้วยการติดตั้งระบบน้ำโดยให้น้ำวันละ 1 ครั้ง ในช่วงเช้าหรือเย็นที่อากาศไม่ร้อนเกินไป ตอนเช้ารดน้ำในขณะที่ยังมีแดดอ่อน ๆ เวลาประมาณ 06.00–08.00 น. หรือตอนเย็นรดน้ำก่อนพระอาทิตย์ตกเวลาประมาณ 16.00–18.00 น. เพื่อให้น้ำในดินระเหยออกไปบ้างบางส่วน และไม่เก็บความชื้นไว้มากเกินไป เนื่องจากถ้าเลยเวลาช่วงนี้ไป จะมีความชื้นที่สะสมมากเกินไปและอาจทำให้รากเน่าได้ โดยใช้เวลาในการให้น้ำ 10–20 นาที ส่วนการให้ปุ๋ยจะเริ่มเมื่อดีปลีอายุ 40 วัน โดยใช้ปุ๋ยหมัก หยอดที่โคนต้น 1 กำมือต่อต้น เมื่อครบเวลา 6 เดือน ทำการเก็บเกี่ยวผลของดีปลีเพื่อใช้ทำเป็นยา โดยการเก็บผลดีปลีที่ใช้ทำเป็นยานั้นจะต้องเก็บผลดีปลีที่มีสีส้ม ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการเพาะปลูกดีปลีจำนวน 125 ต้น ในกระถางปูนรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 30x100x30 ซม. จำนวน 25 กระถาง กระถางละ 5 ต้น มีระยะห่างต้นละ 20 ซม. เมื่อถึงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวสามารถเก็บผลผลิตเฉลี่ยต่อกระถางเท่ากับ 0.3 กก. ปริมาณการเก็บเกี่ยวโดยประมาณทั้งหมด 7.5 กก. และสามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดทั้งปี



Figure 2 *Piper retrofractum* Vahl. planting

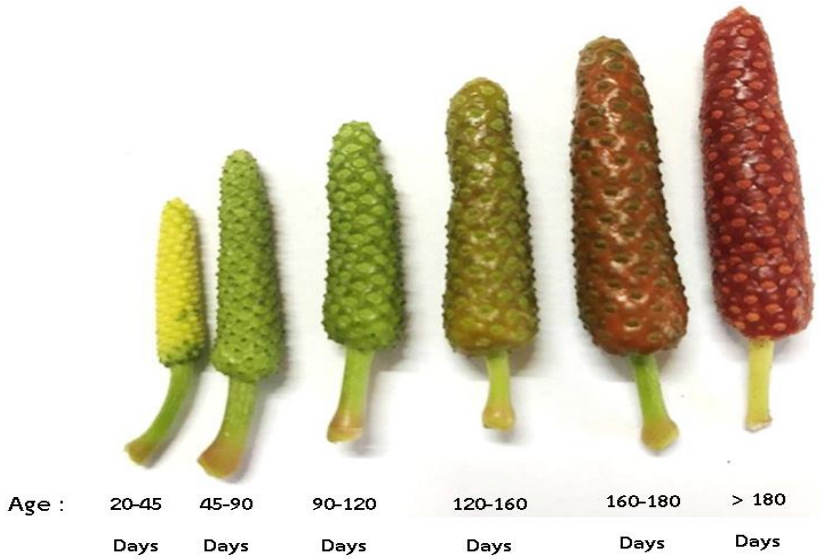


Figure 3 Fruit of *Piper retrofractum* Vahl.

การตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักในดีปลี

การนำพืชสมุนไพรมาพัฒนาหรือผลิตมาเป็นยารักษาผู้ป่วยนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ป่วยด้วย โดยปัจจุบันสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา หรือ อย. ได้ประกาศหลักเกณฑ์การพิจารณาขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณเกี่ยวกับมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนัก ซึ่งได้กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนัก โดยจะต้องทำการตรวจวัดปริมาณของ สารหนู (Arsenic; As) แคดเมียม (Cadmium; Cd) ตะกั่ว (Lead; Pb) และปรอท (Mercury; Hg) และจะต้องตรวจพบในปริมาณไม่เกิน 4, 0.3, 10 และ 0.5 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ (Food and Drug Administration, 2004) โดยผลการศึกษาพบว่า ผลดีปลีที่ทำการเพาะปลูกในการศึกษานี้มีปริมาณตะกั่วและปรอท น้อยกว่า 0.050 และน้อยกว่า 0.018 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ และไม่พบการปนเปื้อนของสารหนูและแคดเมียมในตัวอย่างดีปลี (Table 1)

ขณะเดียวกันทางคณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบปริมาณโลหะในตัวอย่างดินปรุง ทั้งนี้เนื่องจากดินเป็นส่วนที่มีการสะสมของโลหะหนัก และพืชสามารถดูดซึมโลหะหนักในดินได้และสะสมไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยของการใช้ดินปรุงจึงได้ทำการตรวจสอบปริมาณโลหะหนักเช่นเดียวกันกับผลดีปลี โดยผลการตรวจสอบพบว่า ดินปรุงไม่พบการปนเปื้อนของแคดเมียมและปรอท แต่พบสารหนูและตะกั่วในปริมาณ 3.1 และ 15.9 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งไม่เกินมาตรฐานของการปนเปื้อนโลหะหนักในดิน ตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 (พ.ศ. 2547)

Table 1 The heavy metal concentration in *Piper retrofractum* Vahl. and soil-based growing media

Heavy metals	Heavy metal concentration (mg/kg)			
	Standard value	*P. retrofractum* Vahl.	Standard value	Soil-based growing media
Arsenic (As)	< 4	Not detected	< 3.9	3.1±0.5
Cadmium (Cd)	< 0.3	Not detected	< 37	Not detected
Lead (Pb)	< 10	< 0.050	< 400	15.9±0.7
Mercury (Hg)	< 0.5	< 0.018	< 23	Not detected

All data are expressed of three independent experiments.

การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในดีปลี

สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลดีปลี ในการศึกษานี้จะทำการตรวจหาเชื้อ 1) *Clostridium* spp. 2) *Escherichia coli* 3) *Salmonella* spp. และ 4) *Staphylococcus* spp. และเชื้อรา โดยเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหาร ได้แก่ โรคท้องเสีย อาหารเป็นพิษ เป็นต้น ซึ่งการตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นี้จะเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ คือ ห้ามตรวจพบเชื้อ 1) *Clostridium* spp. 2) *E. coli* 3) *Salmonella* spp. และ 4) *Staphylococcus* spp. และเชื้อราสามารถตรวจพบได้ไม่เกิน $5.0x10^3$ CFU/g (Food and Drug Administration, 2004) ผลการตรวจสอบการปนเปื้อนพบว่า ผลดีปลีที่เพาะปลูกในงานวิจัยนี้ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด (Table 2)

Table 2 The microbial contamination in *Piper retrofractum* Vahl.

Microorganisms	Microbial concentration (CFU/g)	
	Standard value	Microbial contamination
Clostridium spp.	Not found	Not found
E. coli	Not found	Not found
Salmonella spp.	Not found	Not found
Staphylococcus spp.	Not found	Not found
Fungi	$< 5.0 \times 10^3$	Not found

All data were expressed of three independent experiments.

การตรวจสอบคุณภาพและเอกลักษณ์ทางเคมีของดีปลี

นอกเหนือจากการตรวจสอบการปนเปื้อนในสมุนไพรแล้ว การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสมุนไพรยังเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการตรวจสอบคุณภาพยา โดยการศึกษานี้ได้อาศัยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) เพื่อใช้บ่งบอกคุณภาพทางฤทธิ์ยา หรือตรวจสอบสารสำคัญของดีปลี ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบดีปลีที่เป็นแม่พันธุ์และใช้ปรุงยารักษาโรคของวิทยาลัยการแพทย์ฯ เปรียบเทียบกับดีปลีที่เพาะปลูกในการศึกษานี้ ผลการศึกษาพบว่า หลังจากตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของดีปลีภายใต้แสงธรรมชาติ ไม่พบแถบสีของสาร ในขณะที่การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของดีปลีภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตรวจพบแถบของสารจำนวน 8 ตำแหน่ง ในทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยดีปลีที่ใช้ปรุงยา (Standard) มีค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.38, 0.43, 0.50, 0.60, 0.71, 0.79 และ 0.88 ตามลำดับ ส่วนดีปลีที่เพาะปลูกเอง มีค่า R_f เท่ากับ 0.09, 0.38, 0.43, 0.48, 0.59, 0.70, 0.79 และ 0.88 ตามลำดับ จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของดีปลีภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ตรวจพบแถบของสารจำนวน 7 ตำแหน่ง ในทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยดีปลีที่ใช้ปรุงยา (Standard) มีค่า R_f เท่ากับ 0.38, 0.43, 0.50, 0.71, 0.88, 0.94 และ 0.98 ตามลำดับ ขณะที่ดีปลีที่เพาะปลูกเอง มีค่า R_f เท่ากับ 0.38, 0.43, 0.50, 0.73, 0.88, 0.93 และ 0.98 ตามลำดับ (Figure 4 และ Table 3) จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ดีปลีที่มีการเพาะปลูกในกระถางสำหรับการศึกษาในครั้งนี้และดีปลีที่วิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ใช้ปรุงยารักษาโรคให้แก่ผู้ป่วย มีคุณภาพและฤทธิ์ทางยาที่เหมือนกัน ซึ่งสามารถนำดีปลีที่มีการเพาะปลูกในกระถางมาใช้ในการปรุงยารักษาโรคให้แก่ผู้ป่วยได้

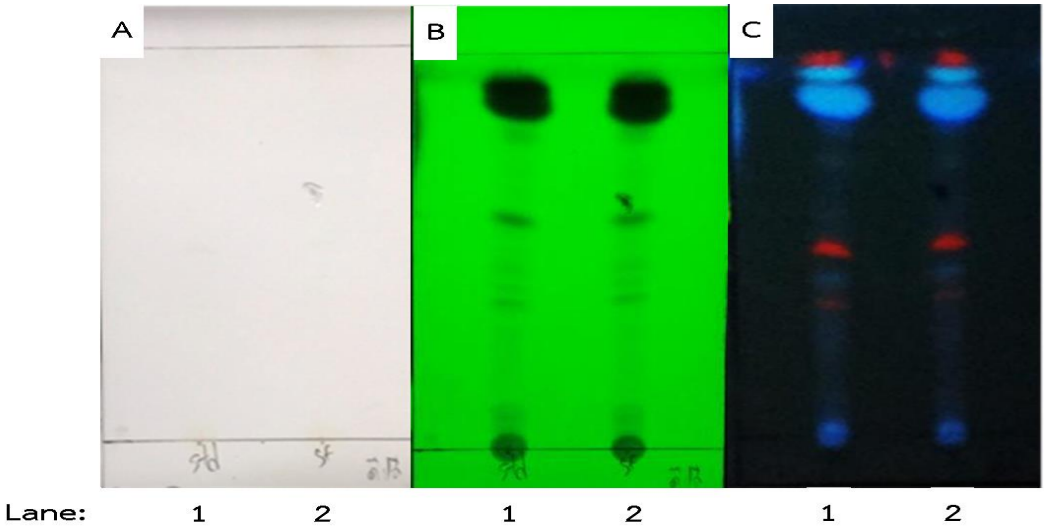


Figure 4 The TLC chromatogram of *Piper retrofractum* Vahl. (A) observed under normal lighting, (B) observed under UV light at 254 nm and (C) observed under UV light at 366 nm
Lane 1: *Piper retrofractum* Vahl. (Standard)
Lane 2: *Piper retrofractum* Vahl. (Planting in container)
Adsorbent: Silica gel; Solvent system: Dichloromethane : Methanol = 9:1 (v/v)

Table 3 The R_f value in TLC chromatogram of *Piper retrofractum* Vahl.

Detection	TLC fraction	R_f value	
		Piper retrofractum Vahl. (Standard)	*Piper retrofractum* Vahl. (Planting in container)
Normal lighting		-	-
UV254	1	0.09	0.09
	2	0.38	0.38
	3	0.43	0.43
	4	0.50	0.48
	5	0.60	0.59
	6	0.71	0.70
	7	0.79	0.79
	8	0.88	0.88
UV366	1	0.38	0.38
	2	0.43	0.43
	3	0.50	0.50
	4	0.71	0.73
	5	0.88	0.88
	6	0.94	0.93
	7	0.98	0.98

The R_f value difference of less than 0.05 (<0.05) was considered to be the same substance

วิจารณ์ผลการวิจัย

การเพาะปลูกดีปลีนั้นเป็นเรื่องง่าย แต่การที่จะเพาะปลูกดีปลีเพื่อให้ได้คุณภาพ มีสรรพคุณทางยาและมีฤทธิ์ยาที่มากพอจะรักษาโรคได้นั้นเป็นเรื่องที่ยากมาก เนื่องจากต้องให้ความสำคัญกับปัจจัยในหลาย ๆ อย่าง ได้แก่ สายพันธุ์ดีปลีที่จะนำมาเพาะปลูก สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งสภาพของดิน น้ำ อากาศ การดูแล ระยะเวลาการให้ปุ๋ย และวิธีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ประกอบกับธรรมชาติของดีปลีเป็นพืชที่มีวิสัยเถาเลื้อยที่มีรากยึดเกาะตามข้อและมีรากอยู่บริเวณหน้าดิน ทำให้ดีปลีมีการดูดซับสารตกค้างในดินได้โดยเฉพาะโลหะหนัก และสะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ โดยเฉพาะส่วนผลของดีปลีที่แพทย์แผนไทยจะนำมาปรุงเป็นยารักษาโรค ถ้าหากมีการสะสมของโลหะหนักจำนวนมากหรือเกินกว่ามาตรฐานที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กำหนด ก็อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ป่วยได้ เช่น การสะสมของตะกั่วในร่างกายซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย เช่น โลหิตจาง เม็ดเลือดแดงแตก ไตถูกทำลาย และมีผลต่อระบบประสาททำให้สมองเสื่อม เป็นต้น (Tangpong *et al.*, 2013) การสะสมของสารหนูในร่างกายจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายหรือทำลายอวัยวะภายใน เช่น หลอด

อาหารอักเสบ ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด ตับโต ไขกระดูกไม่เจริญ กระดูกฝ่อ และเม็ดเลือดขาวต่ำ เป็นต้น (Monkaew, 2020) การสะสมของแคดเมียมในร่างกายจะก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย เช่น ความดันโลหิตสูง หัวใจเต้นผิดจังหวะ โลหิตจาง และทำให้เป็นโรคอิไต อิไต มีอาการกระดูกพรุน กระดูกโก่ง กระดูกเสียรูป เป็นต้น (Thanakitchanjaroen *et al.*, 2008) และการสะสมของปรอทในร่างกายจะก่อให้เกิดโรคมินามาตะ ที่มีอาการมือและใบหน้าเกิดอาการบวมและเจ็บ บางรายอาจเกิดอาการเหน็บชาบางส่วน หรือบางรายอาการหนักอาจถึงขั้นเป็นอัมพาต (Ministry of Science and Technology. Pollution Control Department, 1999) โดยการศึกษาของ Priprem *et al.* (2006) แสดงให้เห็นว่าดีปลีซึ่งที่เป็นวัตถุดิบที่สำคัญของตำรับหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่าง ๆ มีการปนเปื้อนสารหนูและแคดเมียมโดยการปนเปื้อนดังกล่าวคาดว่ามีผลมาจากแหล่งเพาะปลูกแหล่งที่มาของสมุนไพร หรือวิธีการเก็บเกี่ยวสมุนไพร

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการเพาะปลูกดีปลีโดยคำนึงถึงสายพันธุ์ดีปลี และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของดีปลี การดูแล การให้ปุ๋ย ระยะเวลา และวิธีการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ซึ่งได้นำเอาวิธีการขององค์ความรู้การแพทย์แผนไทยผนวกกับการนำเอาความรู้วิทยาศาสตร์มาเป็นเครื่องมือในการดำเนินงาน นอกจากนี้การใช้ดินในการเพาะปลูกดีปลียังเป็นดินที่มีการปรุงขึ้นมาใช้แทนดินทั่วไป โดยมีการตรวจสอบค่ามาตรฐานการปนเปื้อนสารในดินก่อนใช้ และพบว่าดินที่ปรุงไม่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักตามเกณฑ์มาตรฐานของกระทรวงอุตสาหกรรมเกี่ยวกับค่ามาตรฐานของสารอันตรายในดิน (Ministry of Industry, 2016) และตามประกาศของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติว่าด้วยเรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพดิน (Pollution Control Department, 2004) และเมื่อนำมาเพาะปลูกดีปลีก็ยังพบว่า ผลผลิตที่ได้ผ่านเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนักของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) โดยไม่พบการปนเปื้อนของสารหนูและแคดเมียม รวมถึงตะกั่วและปรอทที่พบแต่ไม่เกินค่ามาตรฐาน ดังนั้นดีปลีดังกล่าวจึงมีโอกาสนำไปใช้เป็นยารักษาโรคได้

นอกเหนือจากการปนเปื้อนของโลหะหนักแล้ว การเพาะปลูกและการเก็บเกี่ยวผลผลิตดีปลี จะต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นปัญหาหนึ่งสำหรับการเพาะปลูกสมุนไพรที่ไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) โดยดีปลีที่นำมาปรุงยาจะอยู่ในรูปแบบยาผงบรรจุแคปซูล และยาเม็ดที่ใช้ในการรักษาโรค และจัดอยู่ในกลุ่มยาแผนไทยหรือยาแผนโบราณ ซึ่งยากลุ่มนี้ตามประกาศเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนจุลินทรีย์จะต้องไม่พบเชื้อดังนี้ 1) *Clostridium* spp. 2) *E. coli* 3) *Salmonella* spp. และ 4) *Staphylococcus* spp. และเชื้อราสามารถตรวจพบได้ไม่เกิน 5.0×10^3 CFU/g (Ministry of Public Health, 2021) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น อาการท้องร่วง อาการท้องเสีย และอาหารเป็นพิษ เป็นต้น อีกทั้งยังมีผลทำลายสารสำคัญที่มีสรรพคุณทางยาของดีปลีด้วย ทำให้ดีปลีที่ใช้ปรุงยาให้ฤทธิ์หรือสรรพคุณทางยาลดลง โดยการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเพาะปลูก การดูแล และการเก็บเกี่ยวดีปลีนี้ สามารถควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ คือ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เกินค่ามาตรฐานตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กำหนด

สำหรับการตรวจสอบคุณภาพยาหรือฤทธิ์ยาของสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย เป็นการตรวจสอบโดยการใช้ประสาทสัมผัสเข้ามาช่วยในการตรวจสอบ ได้แก่ การสังเกตลักษณะภายนอก เช่น รูปร่าง สี เป็นต้น การสัมผัส การดมกลิ่น การชิมรส และการฟังเสียง ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีการดังกล่าวต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญอย่างสูงของแพทย์แผนไทยในการตรวจสอบ ทว่าในยุคปัจจุบันมีการนำเอาความรู้และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์เข้ามาช่วยในการตรวจสอบคุณภาพยาหรือฤทธิ์ของยา ได้แก่ เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานวิธีหนึ่ง

ในการบ่งบอกคุณภาพยาของสมุนไพร โดยการศึกษานี้ได้นำดีปลีที่ทำการเพาะปลูกตรวจสอบคุณภาพยาโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง ซึ่งพบว่ายังคงลายพิมพ์นิ้วมือหรือ Fingerprint เหมือนกับต้นพันธุ์ที่มีฤทธิ์ในการนำมาปรุงยา แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเพาะปลูกดีปลีนี้ยังคงให้คุณภาพดีปลีที่คงเดิมเช่นเดียวกับดีปลีที่ใช้ปรุงยา

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พัฒนารูปแบบการเพาะปลูกดีปลีเพื่อนำผลของดีปลีมาใช้ในการปรุงยารักษาโรคทางการแพทย์แผนไทย ซึ่งสามารถเพาะปลูกได้ในบริเวณที่มีพื้นที่จำกัด หลีกเลี่ยงการเพาะปลูกในพื้นที่เกษตรเคมี ซึ่งจะช่วยในการลดการปนเปื้อนทั้งโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทำการเพาะปลูกดีปลีในกระถางรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 30x100x30 ซม. โดยใช้ดินปรุงที่ปรุงขึ้นเองซึ่งมีปริมาณของโลหะหนักอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 25 (พ.ศ. 2547) และมีการดูแลโดยการกำหนดช่วงเวลาที่ให้น้ำและปุ๋ยคอก ซึ่งเมื่อครบเวลาเพาะปลูกประมาณ 6 เดือน ดีปลีสามารถให้ผลผลิตที่สามารถนำไปใช้ปรุงยารักษาโรคทางการแพทย์แผนไทยได้ โดยไม่พบการปนเปื้อนของโลหะหนักและเชื้อจุลินทรีย์ที่เกินมาตรฐาน นอกจากนี้การเพาะปลูกด้วยวิธีดังกล่าว ยังไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ทางยาของผลดีปลีอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากวิทยาลัยการแพทย์พื้นบ้านและการแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2019. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL.** 21st Edition. Maryland: AOAC International. 2200 p.

Food and Drug Administration. 2004. **Criteria for consideration of registration of traditional drug and microbial and heavy metal contamination standards**. [Online]. Available https://www.fda.moph.go.th/sites/drug/download/manual-herbal-medicines.pdf (January 29, 2022).

Ministry of Education. 1999. **Phathayasastra Sangkhraha**. Bangkok: Kurusapa Printing Ladphrao. 50 p. [in Thai]

Ministry of Industry. 2016. **Soil and water contamination criteria**. [Online]. Available http://http://www.ratchakitcha.soc.go.th/DATA/PDF/2559/E/275/4.PDF (January 30, 2022).

Ministry of Public Health. 2021. **Methods for quality control and specifications of herbal products.** [Online]. Available http://https://www.fda.moph.go.th/Herbal/SitePages/law_herbal6.html (January 29, 2022).

Ministry of Public Health, Department of Thai Traditional and Alternative Medicine. 2015. **Handbook of Herb Planting in Thai Pharmacy.** Bangkok: The War Veterans Organization of Thailand under Royal Patronage of His Majesty the King. 30 p. [in Thai]

Ministry of Science and Technology, Pollution Control Department. 1999. **Mercury**. Bangkok: Integrated Communication Co.,Ltd. 499 p. [in Thai]

Monkaew, P. 2020. A case study of arsenic poisoning. **Thai Journal of Hospital Pharmacy** 29(2): 103-117. [in Thai]

Office of the Permanent Secretary Ministry of Public Health. 1998. **Thai Pharmacy**. Bangkok: Agricultural Cooperative Printing Demonstrations of Thai co., Ltd. 258 p. [in Thai]

_____. 2006. **Thai Midwifery.** Bangkok: Agricultural Cooperative Printing Demonstrations of Thai co., Ltd. 320 p. [in Thai]

Pollution Control Department. 2004. **Soil quality standards**. [Online]. Available http:// https://www.pcd.go.th/laws (January 29, 2022).

Pongmueangmun, S., N. Klaykeung and W. Wutthiadirek. 2016. Situation of microbial contamination in traditional medicine and herbal medicine during 2011-2015. **Thai Food and Drug Journal** 23(2): 25-33. [in Thai]

Priprem, A., B. Sripanidkulchai, J. Julatas and P. Chitropas. 2006. Heavy metals in some Thai traditional drugs and herbal extract. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences** 2(1): 43-52. [in Thai]

Tangpong, J., P. Hiransai and C. Tanapop. 2013. Proteinuria of lead-exposed boatyard workers: the detection of renal dysfunction. **Journal of Public Health** 43(2): 164-174. [in Thai]

Thanakitchanjaroen, K., N. Mekrungsimun and S. Srilamaneechok. 2008. **Benefits and toxicology of cadmium.** [Online]. Available https://www.dss.go.th/images/st-article/cp_4_2551_Cadmium.pdf (January 29, 2022).