

การตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรว่านนางคำ

MACROSCOPIC EXAMINATION AND MICROSCOPIC EXAMINATION, ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Curcuma aromatica* Salisb.

นฤมล วิถีธรรมศักดิ์* นพวรรณ พรศิริ และ กุลภัสร โภชนกุล

สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร

Naruemon Witheethummasak*, Nopphawan Pornsiri and Kullaphat Pochanakul

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok.

*E-mail: Naruemon.w@pnru.ac.th

Received: 2022-03-22

Revised: 2020-04-01

Accepted: 2022-05-20

บทคัดย่อ

ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นสมุนไพรไทยที่ใช้ในแพทย์แผนไทยเป็นเวลานานการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อการพัฒนาการตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรว่านนางคำ แหล่งที่มาจากกรมวิชาการเกษตรและการประเมินลักษณะทางมหัพรรณและจุลพรรณของเครื่องยาสมุนไพร คุณลักษณะภายนอกและลักษณะผงยาสมุนไพรว่านนางคำและมีการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้แผ่นซิลิกาเจล 60 GF254 เป็นวัสดุภาคคงที่โดยใช้ตัวทำละลายโครโมฟอร์มาตอเมทานอล (9:1) รวมทั้งแก๊สโครมาโทกราฟี การสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี การระบุองค์ประกอบทางเคมีที่ระเหยง่ายได้ดำเนินการโดยการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี พบว่า มีน้ำมันหอมระเหยที่พบมากที่สุดคือ β -Curcumene ใน retention time ที่ 31.25 คิดเป็นร้อยละ 49.83 ของพื้นที่ รองลงมา ได้แก่ α -Curcumene retention time ที่ 29.97 คิดเป็นร้อยละ 30.48 ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Curcuminoids และมีการศึกษาการต้านฤทธิ์ออกซิเดชันด้วยวิธีการต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช พบว่า สารสกัดว่านนางคำมีฤทธิ์ที่ $IC_{50} = 0.207$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารควบคุมกลุ่มเชิงบวกแอสคอร์บิก แอซิด พบว่า มีฤทธิ์ที่ $IC_{50} = 0.195$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารบีเอชที พบว่า มีฤทธิ์ที่ $IC_{50} = 8.460$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสารเคซีที พบว่า มีฤทธิ์ที่ $IC_{50} = 3.137$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ว่านนางคำ เภสัชเวท ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แก๊สโครมาโทกราฟี ดีฟิฟิเอช

ABSTRACT

Curcuma aromatica Salisb. (Zingiberaceae) have been used in traditional Thai medicine for a long time. This study was carried out to develop the pharmacognostic specifications by

qualitative content of *C. aromatica* Salisb. The sample was collected from the Department of Agriculture in Thailand. Macroscopic and microscopic characteristics of crude drug was illustrated. The physicochemical parameters of *C. aromatica* Salisb. was prelim analyzed by thin layer chromatography (TLC) using silica gel60 GF254 as stationary phase. Chloroform and methanol (9:1) were used as mobile phase. Volatile oils were extracted using steam distillation method and subjected to gas chromatographic analysis. Identification of the volatile chemical constituents were performed by Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) was demonstrated the most common volatile oil was β -Curcumene in retention time at 31.25, accounting for 49.83 % of the area, followed by α -Curcumene retention time at 29.97 %, accounting for 30.48 %, respectively. It is a substance in the Curcuminoids group. The free radical scavenging potentials of the ethanolic extract of *C. aromatica* Salisb. was demonstrated with the IC_{50} of 0.207 μ g/ml for DPPH and the IC_{50} of 0.195 μ g/ml for Ascorbic acid, the IC_{50} of 8.460 μ g/ml for BHT, the IC_{50} of 3.137 μ g/ml for Quercetin.

Keywords: *Curcuma aromatica* Salisb., pharmacognostic, thin layer chromatography, Gas chromatography, DPPH

บทนำ

ว่านนางคำ (*Curcuma aromatica* Salisb.) เป็นว่านที่อยู่ในกลุ่มหรือวงศ์เดียวกันกับข่า และขิง และมีลักษณะคล้ายกับขมิ้น มีใบกว้าง และใหญ่กว่า และมีแถบแดงที่ขอบ และเส้นกลางใบ เป็นว่านที่ส่วนใหญ่นิยมนำหัวว่านมาใช้ทำเป็นผลิตภัณฑ์เสริมความงาม เครื่องสำอาง รวมถึงใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคต่าง ๆ โดยประโยชน์ทางยาทางแพทย์แผนไทย มีสรรพคุณใช้ฝนแก้เม็ดผื่นคันและโรคผิวหนังชนิดคันอย่างรุนแรง รับประทานเป็นยาขับลมในลำไส้ แก้ปวดท้อง แก้ฟกช้ำและข้อเคล็ดหรือห่อทำลูกประคบใช้ประคบแก้โรคเหน็บชา ชาตามกล้ามเนื้อ ชาตามแขนขา (Shamim, 2011)

กรมวิชาการเกษตรจึงได้เร่งผลักดันให้เกษตรกรปลูกสมุนไพรภายใต้ระบบ GAP เพื่อยกระดับคุณภาพและมาตรฐานสมุนไพรไทยให้เป็นที่ยอมรับ ซึ่งได้เร่งผลักดันให้เกษตรกรปลูกสมุนไพรชนิดหนึ่งใน 18 ชนิด ได้แก่ กระชาย กระชายดำ ขมิ้นชัน บัวบก ขิง ข่า อบเชย ว่านหางจระเข้ ว่านชักมดลูก ว่านนางคำ ฟ้าทะลายโจร ฟักข้าว เจริญกุลหลาน เพกา เพชรสังฆาต มะดัน หญ้าปักกิ่ง หญ้าหวาน จำนวน 818 ราย เป็นพื้นที่ 2,842.46 ไร่ โดยในจำนวนดังกล่าว เป็นสมุนไพรประเภท Product champion คือ บัวบก ไพล กระชายดำและขมิ้นชัน จำนวน 134 ราย คิดเป็นพื้นที่ 165.23 ไร่ และเตรียมเข้าระบบรับรองแปลงอินทรีย์ มีพืช 21 ชนิด ได้แก่ กระชาย กระชายดำ ขมิ้นชัน บัวบก ขิง ข่า อบเชย ว่านน้ำ ว่านหางจระเข้ ว่านชักมดลูก ว่านนางคำ ฟ้าทะลายโจร ฟักข้าว หญ้าปักกิ่ง ย่านาง หญ้าหวาน เจตมูลเพลิง เจริญกุลหลาน เพกา เพชรสังฆาต กระเทียม จำนวน 458 ราย พื้นที่ 280.1 ไร่ โดยมี Product champion บัวบก ไพล กระชายดำ ขมิ้นชัน รวม 47 ราย พื้นที่ 39.88 ไร่ ซึ่งว่านนางคำเป็นสมุนไพรเศรษฐกิจที่สำคัญ (Department of Agriculture, 2019)

สมุนไพรไทยที่มีศักยภาพตรงความต้องการของตลาด การพัฒนาอุตสาหกรรมและตลาดสมุนไพรให้มีคุณภาพระดับสากล การส่งเสริมการใช้เพื่อการรักษาโรค เสริมสร้างสุขภาพ และการสร้างความเข้มแข็งด้านการ

บริหารและนโยบายภาครัฐเพื่อขับเคลื่อนสมุนไพรอย่างยั่งยืนกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีการขับเคลื่อนด้านวัตถุดิบสมุนไพร ขับเคลื่อนเป้าหมายยุทธศาสตร์ที่ 1 ในประเด็นที่ 1 การส่งเสริมผลิตผลสมุนไพรไทยที่มีศักยภาพตรงความต้องการของตลาด ประกอบกับ แผนการส่งเสริมการเพิ่มผลิตภาพสมุนไพรที่มีคุณภาพสู่การผลิตสมุนไพรที่มีมูลค่าสูง สนับสนุนให้เกิดเศรษฐกิจ BCG เพิ่มความสามารถในการแข่งขันภาคเกษตร กระจายรายได้สู่เกษตรกร

โดยต้นน้ำ ผลิตสมุนไพรปลอดภัยให้ได้มาตรฐาน GAP หรือเกษตรอินทรีย์ใช้เทคโนโลยีในการผลิต มีการปลูกแปลงใหญ่ สนับสนุนกลุ่มวิสาหกิจ สหกรณ์ กลางน้ำ การแปรรูปผลิตภัณฑ์ ใช้เทคโนโลยีเพื่อเพิ่มมูลค่า มีนวัตกรรมต่อยอด มีการลงทุนวิจัย และปลายน้ำ ส่งเสริมตลาดชุมชน ออนไลน์ตลาดกลางสมุนไพร โดยมีการขับเคลื่อนการผลิตสมุนไพร กำหนดพืช Product champion 12 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือขาว กระชายดำ ขมิ้นชัน บัวบก มะขามป้อม กระชาย พริก พืชทะเลยาโจร กระเจี๊ยบแดง หนุ่ยหวาน ว่านหางจระเข้ โพลี ทั้งนี้ในปี 2564 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ดำเนินการส่งเสริมการปลูกพืชสมุนไพรให้เกษตรกร จำนวน 363,353 ราย รวมพื้นที่ปลูกสมุนไพร 1,151,495 ไร่ ทั้งนี้ ได้ส่งเสริมการจัดทำมาตรฐานเพื่อส่งเสริมการผลิตสมุนไพร Product Champion 12 ชนิด ให้ได้คุณภาพมาตรฐาน โดย กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการพัฒนาห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน (ISO 17025) เพื่อรองรับการให้บริการการตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการเกษตร สำนักงานการปฏิรูปที่ดินเพื่อเกษตรกรรม กรมพัฒนาที่ดิน กรมส่งเสริมสหกรณ์สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมปศุสัตว์ ร่วมจัดทำระบบฐานข้อมูลสมุนไพร โดยมีศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เป็นหน่วยงานกลางในการจัดทำระบบฐานข้อมูลสมุนไพรต่อไป (Department of Agriculture, 2019) ร่างกายของมนุษย์เรานั้นมีผลเสียมากมายที่ทำให้เกิดโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ การเจ็บป่วยต่าง ๆ เนื่องจากความเสี่ยงต่าง ๆ ที่อยู่รอบตัวเรา ไม่ว่าจะเป็นอาหารทอด อาหารย่าง อาหารปิ้ง เป็นต้น รวมทั้งอากาศเสีย มลภาวะควัน ทำให้ร่างกายมีการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ เนื่องจากเกิดจากอนุมูลอิสระที่มาจากร่างกายหรือสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ก่อให้เกิดโรคร้ายต่าง (Rizwana, 2015) ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีบทบาททั้งที่จำเป็นและสำคัญต่อร่างกายและอีกด้านหนึ่งถ้าไม่สามารถควบคุมปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น จากสารว่องไวปฏิกิริยาจะสามารถก่อการบาดเจ็บ และสามารถเกิดโรคร้ายได้ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่มีในร่างกาย เช่น วิตามิน ซี อี กรดไลโปอิก เบต้า-แคโรทีน เป็นต้น (Kukongviriyapan, 2015)

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวทและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรว่านางคำเพื่อเป็นหลักในการเลือกใช้สมุนไพรและมาตรฐานในการผลิตยา ส่งเสริมศักยภาพในการผลิต ทั้งการผลิตยาในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่ได้มาตรฐานต่อไป รวมทั้งกรมวิชาการเกษตรได้เร่งผลักดันให้เกษตรกรปลูกสมุนไพรชนิดหนึ่งใน 18 ชนิด (Department of Agriculture, 2019)

วิธีการ

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่าง

ศึกษาสมุนไพรและแหล่งที่เก็บสมุนไพร โดยได้รับการตรวจพิสูจน์ (Authentication) เปรียบเทียบเพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างสมุนไพร (Herbarium) จากตัวอย่างพันธุ์ไม้อ้างอิง จากสำนักหอพันธุ์ไม้ กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับการยืนยันชนิดของพันธุ์ไม้จากผู้เชี่ยวชาญ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสมุนไพรว่านางคำ (ส่วนเหง้า) จากกรมวิชาการเกษตร จังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยศึกษา

สมุนไพรและแหล่งที่เก็บสมุนไพร โดยได้รับการตรวจพิสูจน์ (Authentication) เปรียบเทียบ เพื่อยืนยันชนิดของตัวอย่างสมุนไพร (Herbarium) จากตัวอย่างพันธุ์ไม้อ้างอิง จากสำนักหอพันธุ์ไม้ กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช ร่วมกับการยืนยันชนิดของพันธุ์ไม้จากผู้เชี่ยวชาญ

ขั้นที่ 2 ศึกษาวิธีการทดลอง ทฤษฎีต่าง ๆ ในการทำการทดลอง

การตรวจเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท

คุณลักษณะของ monograph ของสมุนไพร ในแต่ละ monograph ของแต่ละตัวยาประกอบด้วยข้อกำหนดถือว่าเป็นข้อบังคับ (Requirements) และข้อกำหนดในรูปแบบทั่วไป (General Notices) ซึ่งอย่างไรก็ตามโดยทั่วไปตรวจสอบเอกลักษณ์ทางมหรรณ (Macroscopical) และจุลทรรศน์ (Microscopical) ซึ่งเป็นการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเภสัชเวท

1. ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางมหรรณ (Macroscopical)

นำตัวอย่างมานางคำมาศึกษาที่เห็นได้ประสาทสัมผัส เช่น การมอง การดมกลิ่น ลักษณะภายนอกที่เห็น ใบ ราก ลำต้น เป็นต้น หลังจากนั้นนำมาตรวจโดยกำหนดอัตราส่วนที่ถูกต้อง

2. ตรวจสอบเอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ (Microscopical)

นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดเป็นผง โดยการนำมาใส่สไลด์ส่องกล้องจุลทรรศน์จำนวนเล็กน้อย แล้วใช้พู่กันเกลี่ยให้เข้ากัน นำน้ำมาใส่สไลด์เล็กน้อยแล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำส่องกล้องจุลทรรศน์ใช้กำลังขยาย 4x 10x 20x เพื่อดูลักษณะของสมุนไพรอย่างละเอียด

การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี

1. ตรวจสอบเอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีบนร่องเลขฉีบบางโดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer Chromatographic identification: TLC)

การเตรียมสารละลาย

นำตัวอย่างผงมาชั่งน้ำหนักแบบแห้ง 2 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล จำนวน 20 มิลลิลิตร นำไปอังในเตาความร้อน เมื่อได้ตะกอนเติมเอทานอล 1000 ไมโครลิตร เพื่อละลายเป็นสารละลาย โดยวิธีการ นำเอาได้ปิเปต ดูดบรรจุสารละลาย จำนวน 3 ไมโครลิตร ลงในบนแผ่นซิลิกาเจล (TLC Silica gel 60 F254) โดยแต่ละตัวอย่างห่างกัน 1 เซนติเมตรแล้วผึ่งให้แห้ง การตรวจสอบและนำแผ่นซิลิกาเจลใส่ในอุปกรณ์คอลัมน์ (column) ที่เตรียมสารละลาย ขนาด 10x10 เซนติเมตร โดยสารละลายที่เตรียมไว้ คลอโรฟอร์ม (chloroform) : เมทานอล (methanol) อัตราส่วน 9:1 เพื่อเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

2. Gas chromatography แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกตัวอย่างที่เป็นสารผสมที่ระเหยได้โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง ไอที่เกิดขึ้นจะถูกนำเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas ตาม flow rate ที่ต้องการ ภายในคอลัมน์บรรจุด้วยสารที่ทำหน้าที่ในการแยก เรียกว่า เฟสคงที่ (stationary phase) สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆที่คอลัมน์นี้ ด้วยความแตกต่างของสมบัติทางเคมีโครงสร้างน้ำหนักโมเลกุลโดยที่จุดเดือดสารที่แยกได้ผ่านออกไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) ทำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าส่งไปยังระบบประมวลผล (data system) ซึ่งสามารถคำนวณและรายงานผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ให้ทราบถึงองค์ประกอบหรือเทียบปริมาณของสารตัวอย่างได้กล่าวคือสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ วิธีการ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC 2010 plus, Shimadzu, ญี่ปุ่น) ประกอบด้วยเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (AOC 5000 plus, Shimadzu, ญี่ปุ่น) คอลัมน์ชนิด HP-5MS (30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร x 0.25 ไมโครเมตร, Agilent

Technologies, เยอรมนี) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีตั้งอุณหภูมิ ของส่วนฉีดสารที่ 300 องศาเซลเซียส ปริมาตร การฉีด ตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร โปรแกรมอุณหภูมิของตัวอย่าง เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส และคงที่ไว้เป็น เวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที เพิ่มอุณหภูมิต่อไป จนถึง 230 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 300 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 30 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ไว้ 18 นาที เครื่องตรวจวัดมีอุณหภูมิ 310 องศาเซลเซียส โดยมีแก๊สฮีเลียม เป็นแก๊สตัวพาที่มี อัตราการไหลที่ความแรงเชิงเส้น 25 เซนติเมตรต่อวินาที

3. ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำมัน เป็นการกำหนดปริมาณน้ำมันหอมระเหยเป็นการควบคุมสมุนไพรรักษาวิธีหนึ่ง โดยการกลั่นด้วยไอน้ำจากน้ำ จากนั้นเก็บของเหลวที่กลั่นได้วัดในหลอดวัดปริมาตร (graduated tube) โดยน้ำ กับน้ำมันจะแยกตัวกัน และไหลกลับไปยังภาชนะที่ไกลั่น (distilling flask) โดยน้ำมันจะอยู่เหนือ น้ำ ทำให้อ่านปริมาณ ของน้ำมันได้ วิธีการโดยการชั่งตัวอย่างแบบแห้ง 100 กรัม ต้มในน้ำอุณหภูมิประมาณจุดเดือด 100-140 องศาเซลเซียส โดยใช้ความร้อนจากเครื่อง Portable Steam Distillation Unit เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยนี้ใช้กลั่นเพื่อสกัด แยกเอาน้ำมันชนิดน้ำมันหอมระเหย (Volatile oil) ออกมา

4. การทดสอบอนุมูลอิสระ การทดสอบดีพีพีเอช เป็นการวัดความสามารถของสารในงานรีดิวซ์ DPPH ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระสีม่วง ดูดกลืนที่แสงความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ไปเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว ซึ่งคำนวณ เป็น % inhibition = $\frac{(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{DPPH} + \text{test}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}}$ เขียนเป็นกราฟระหว่าง % inhibition และ ความเข้มข้น เพื่อหาค่า IC_{50} การวิเคราะห์แปรผลของการต้านอนุมูลอิสระโดยการคิดค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration) ของแต่ละสารตั้งต้น

การเตรียมสาร DPPH

การตรวจวัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดำเนินการในไมโครเพลท 96 หลุม สารสกัดหรือสารควบคุมที่เป็นบวก (Ascorbic acid, Quercetin, BHT) เข้มข้น 0.50 มิลลิโมล ในเอทานอลถูกเติมด้วย 100 ไมโครลิตรของสารละลาย DPPH (120 ไมโครโมล) ที่บ่มเพาะที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืดและวัดการดูดกลืนแสงวัดได้จาก ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณหาค่า % Inhibition สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการ ทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ทดสอบ ตัวอย่าง 3 ครั้ง คำนวณโดยใช้สูตรต่อไปนี้ % Inhibition = $\frac{(\text{Absorbance control} - \text{Absorbance sample})}{(\text{Absorbance control})} \times 100$

การทดสอบ DPPH-scavenging assay ด้วยเครื่อง Microplate reader

ปิเปตสารมาตรฐาน Ascorbic acid หรือสารตัวอย่าง 1000 ไมโครลิตร ในแต่ละความเข้มข้นใน 96-well plate ในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นใส่สาร DPPH ที่ความเข้มข้น 0.50 มิลลิโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมตัวอย่าง โดยที่ใช้ positive control เป็นเมทานอล 100 ไมโครลิตรและ เติมน้ำตาลละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร เขย่าและนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนด เวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณหาค่า % Inhibition สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบเพื่อหา ค่าความเข้มข้นที่ให้ผลในการต้านอนุมูลอิสระครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ (Brand-Williams et al., 1995)

ผลการทดลองและวิจารณ์

เอกลักษณ์ทางมหทรรศน์ (Macroscopical)



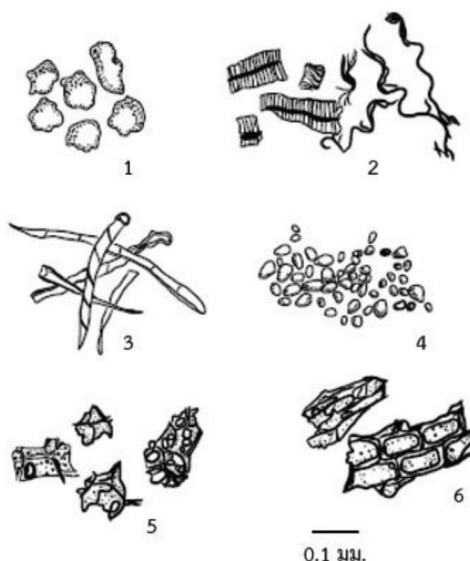
ภาพที่ 1 เครื่องยาสมุนไพรว่านนางคำ



ภาพที่ 2 ภาพวาดของสมุนไพรว่านนางคำ

จากภาพที่ 1 และภาพที่ 2 เป็นลักษณะเครื่องยาสมุนไพรของว่านนางคำ มีลักษณะลักษณะเป็นส่วนของหัวเหง้าที่อยู่ใต้ดิน ลักษณะของก้านใบยาวแข็ง สีใบเขียวเข้มโดยมีกระดูกและขอบใบสีแดง เนื้อในหัวเหง้ามีสีเหลืองถึงสีเหลืองเข้ม หัวเหง้ามีกลิ่นหอมเย็นและมีรสเผ็ดว่านนางคำมีหลายชนิด (Thummatuchsana, 1980)

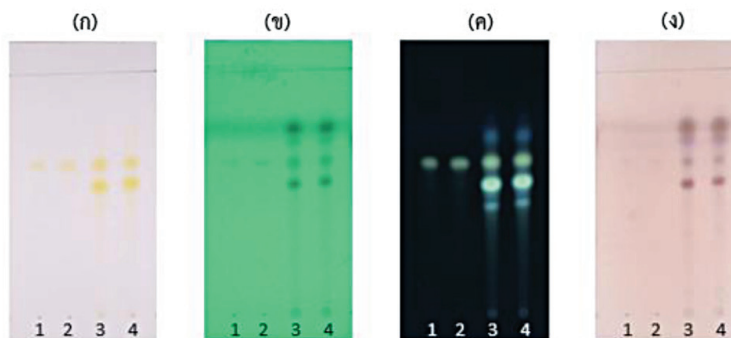
เอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ (Microscopic)



ภาพที่ 3 เอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ลักษณะทางผงยา (Microscopic)

1. โอลีโอเรซิน (oleoresin)
2. ส่วนของท่อลำเลียงน้ำ (fragment of reticulated vessel)
3. ส่วนของไฟเบอร์ (fragment of fiber)
4. เม็ดสตาร์ชหรือเม็ดแป้ง (starch grain)
5. พarenchyma ที่บรรจุในส่วนของเม็ดสตาร์ช (parenchyma containing starch grain)
6. ส่วนตามยาวของพarenchyma (parenchyma, longitudinal view)

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Charoenphon & Jirakornwong (2007) ได้ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางจุลทรรศน์ของผงยา ของสมุนไพรว่านนางคำ ภายใต้สภาพของเหง้าสดพบชั้นของกาบใบแห้ง (scale), periderm, cortex, endodermoid และ stele มีระบบนำน้ำและอาหารแบบปฐมภูมิกระจายอยู่ทั้งใน cortex และ stele ซึ่งพบอาหารสะสมที่ ได้แก่ โอลิโอเรซิน และเม็ดสตาร์ชเป็นจำนวนมาก รวมทั้งพบท่อลำเลียงแบบ reticulate, scalariform และ spiral ส่วนที่พบมากที่สุดคือ พวาเรงโคมา และที่พบน้อยสุด ได้แก่ ไฟเบอร์



ภาพที่ 4 โครมาโทกราฟีชนิดแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) ของสารสกัดว่านนางคำ
รูปแบบโครมาโทแกรมของสารสกัดว่านนางคำ

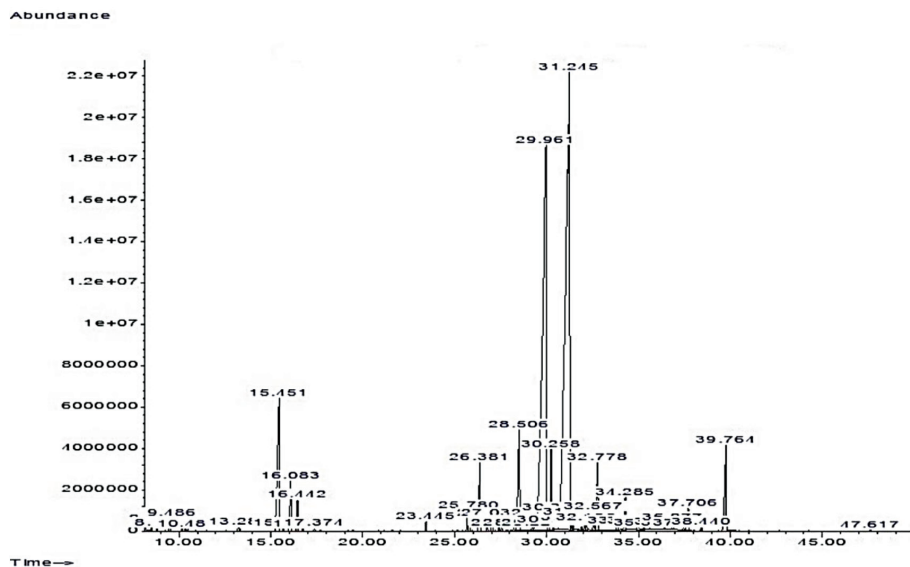
(ก) ส่องภายใต้แสงปกติ (ข) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร
(ค) ส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และ (ง) พ่นด้วยสารละลาย Anisaldehyde
(1-2) สารมาตรฐาน Curcumin (3-4) สารสกัดว่านนางคำ

จากภาพที่ 4 จะเห็นได้ว่า โครมาโทแกรมชนิดแผ่นบางของสารสกัดว่านนางคำเทียบกับสารมาตรฐาน Curcumin ใช้เฟสอยู่กับที่คือ TLC aluminium sheet, Silica gel 60 F254 และ Chloroform : Methanol (9:1) เป็นเฟสเคลื่อนที่ พ่นด้วยสารละลาย Anisaldehyde ตัวอย่างจากซ้ายไปขวา สารมาตรฐาน Curcumin (1-2) และ สารสกัดว่านนางคำ (3-4) ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีระยะที่ตรงกับสารมาตรฐาน Curcumin ซึ่งในงานวิจัยของ Panicha (2009) พบว่า ในว่านนางคำมีสารในกลุ่ม Curcuminoids ซึ่งประกอบด้วย Curcumin ซึ่งมีลักษณะสีเหลือง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และต้านจุลินทรีย์

ตารางที่ 1 แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography)

Sample name	Library search NIST11	Quality	tR	Area %
Oil 1	β -Curcumene	97	31.25	41.55
	α -Curcumene	99	29.97	30.48
	(+)-2-Bornanone	98	15.45	5.6
	(E)- β -Famesene	98	28.5	3.52
	Curzerene	95	30.26	2.13
	Isoborneol	95	16.08	1.31
	Endo-Borneol	97	16.44	0.78
	(-)- β -Elemene	90	25.78	0.43
	Caryophyllene	99	27.03	0.34
	α -Bergamotene	99	26.77	0.3
	α -Phellandrene	91	9.483	0.21
	α -Selinene	98	30.06	0.21
	δ -Elemene	96	23.44	0.2
	(+)- δ -Cadinene	97	31.34	0.15
	Selina-3,7(11)-diene	97	31.07	0.15
	β -Pinene	97	8.498	0.12
	γ -Elemene	96	27.41	0.12
	2-Nonanol	90	13.29	0.09
	Eremophilene	91	31.92	0.09
	D-Limonene	99	10.34	0.08
	β -Linalool	83	13.22	0.08
	Cis-muurolo-3,5-diene	95	28.22	0.07
	P-Cymene	94	10.16	0.06
	Eucalyptol	98	10.48	0.05
	α -Terpineol	90	17.37	0.05
	Terpinen-4-ol	90	16.74	0.04

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่า น้ำมันหอมระเหยที่พบมากที่สุดในส่วนสมุนไพรว่านนางคำ ได้แก่ β -Curcumene ใน retention time ที่ 31.25 คิดเป็นร้อยละ 49.825 ของพื้นที่ ลำดับ 2 รองลงมา ได้แก่ α -Curcumene retention time ที่ 29.97 คิดเป็นร้อยละ 30.48 และลำดับ 3 ได้แก่ (+)-2-Bornanone retention time ที่ 15.45 คิดเป็นร้อยละ 5.6 ตามลำดับ และน้ำมันหอมระเหยที่พบน้อยที่สุดคือ Terpinen-4-ol retention time ที่ 16.74 คิดเป็นร้อยละ 0.04 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Panicha (2009) พบน้ำมันหอมระเหย Curcumin ซึ่งเป็นสารสำคัญของข่าและว่านนางคำ ซึ่งโครมาโทแกรมแก๊สโครมาโทกราฟีของน้ำมันหอมระเหยว่านนางคำ แสดงในภาพที่ 5

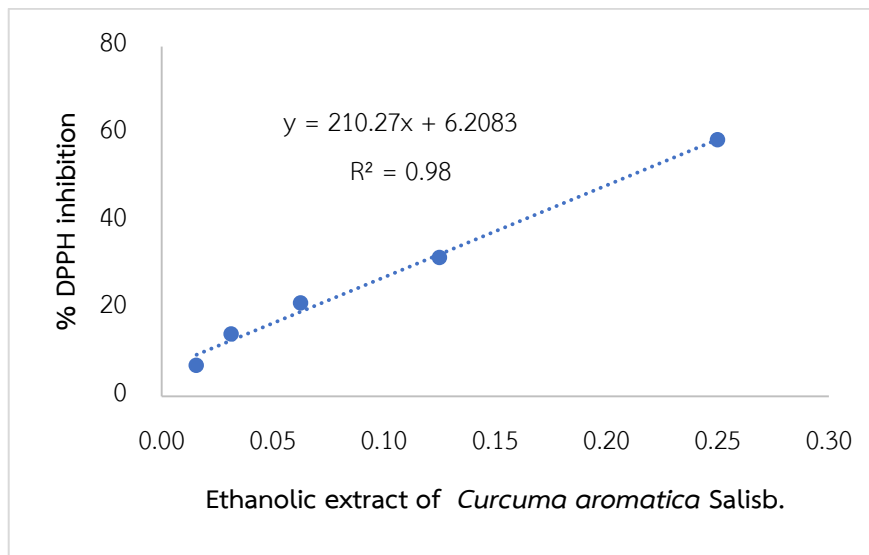


ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมแก๊สโครมาโทกราฟีของน้ำมันหอมระเหยของว่านนางคำ

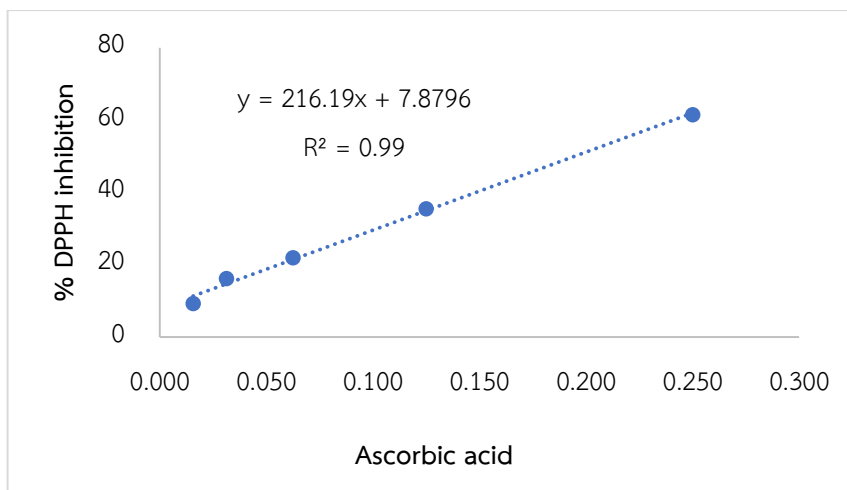
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging assay)

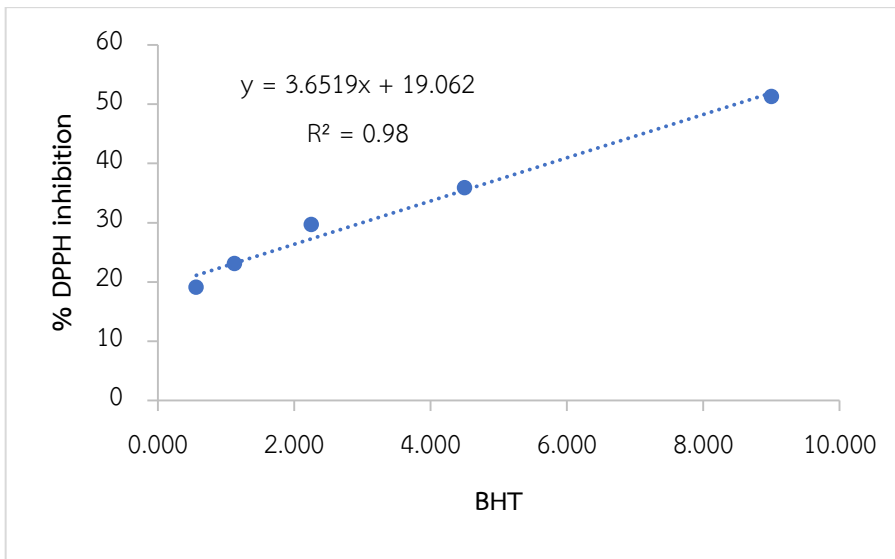
สารสกัดเอทานอลจากว่านนางคำ พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของ IC_{50} เท่ากับ 0.207 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 6) สารมาตรฐาน Ascorbic acid, BHT และ Quercetin เป็นค่าบวกซึ่งมีค่า IC_{50} 0.195 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 7) 8.460 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 8) และ 3.137 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 9) ตามลำดับ



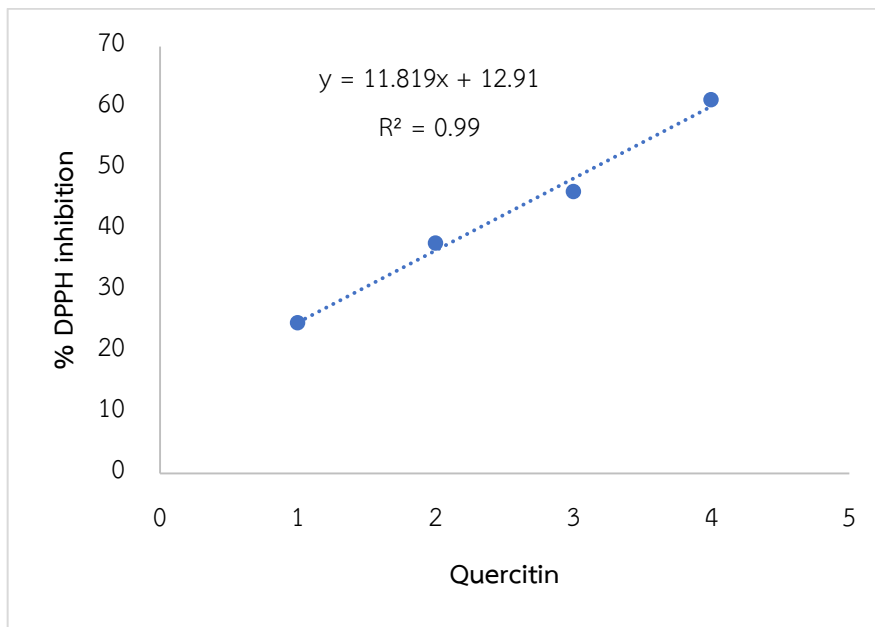
ภาพที่ 6 การยับยั้งดีฟิฟิเอซของสารสกัดว่านนางคำ



ภาพที่ 7 การยับยั้งดีฟิฟิเอซของแอสคอร์บิก แอซิด



ภาพที่ 8 การยับยั้งดีฟิเคชันของบีเอชที



ภาพที่ 9 การยับยั้งดีฟิเคชันของเคอซิทิน

สรุปผล

การควบคุมคุณภาพทางพฤกษศาสตร์และจุลทรรศน์ รวมทั้งข้อกำหนดทางเภสัชเวท จะใช้เพื่อรักษาความปลอดภัยและประสิทธิภาพของยาสมุนไพร กระบวนการที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งของการควบคุมคุณภาพคือมาตรฐานที่กำหนดข้อกำหนดของพารามิเตอร์ด้วยการวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์สมบัติทางเคมีฟิสิกส์และโครมาโทกราฟี การหาน้ำมันหอมระเหยรวมทั้งการหาสารสำคัญโดยการเทียบกับสารมาตรฐาน และการหาคุณสมบัติทางเคมีเพื่อให้แน่ใจถึงความบริสุทธิ์และคุณภาพของเครื่องยา รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยรัฐบาลได้มีการกำหนดนโยบายเกี่ยวกับสมุนไพรไทย ออกเป็นแผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย (พ.ศ.2560 - 2564) โดยเป้าหมายเพื่อส่งเสริมและสนับสนุนสมุนไพรไทย และการใช้ยาที่ผลิตจากสมุนไพรไทย และสำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้จัดทำตำรับยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia; THP) โดยจัดทำครั้งแรกในปี 2538 และประกาศใช้อย่างเป็นทางการเมื่อปี 2541 ตำรับยาดังกล่าวได้ถูกนำไปใช้เป็นมาตรฐานทั้งในด้านการผลิต การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย และเป็นคู่มือการใช้สำหรับบุคลากรทางการแพทย์ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินกองทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2563 มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร รวมทั้งขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิ เจ้าหน้าที่ที่สำนักงานจากกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร และผู้ที่เกี่ยวข้อง ผู้ให้ข้อมูลทุกท่าน ที่ได้ให้ข้อมูล คำแนะนำ และชี้แนะงานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 28(1):25-30.
- Charoenphon W., & Jirakornwong T. (2007). *Preliminary study on specification of Curcuma aromatica* Salisb.: microscopic and physical characters. (Bachelor degree). Mahidol University, Bangkok.
- Department of Agriculture, (2019). *Supported to plant 18 types of medicinal plants according to GAP standards*. Retrieved from <https://www.kaset1009.com/th/articles/163486> [2020, 20 Dec.]
- Kukongviriyapan V., (2015). Essential Role of Antioxidant network of Vitamins and Enzymes. *Srinagarind Medical Journal, Faculty of Medicine, Khon Kaen University*, 29, 16-18. (In Thai)
- Panicha, U. (2009). *The effects of Alpinia galanga and Curcuma aromatica extracts containing antioxidant phenolics on cellular melanogenesis induced by UV radiation*. The Thailand Research Fund, Bangkok

- Rizwana S., Ajmal K., Sadia N., Sara K., Afsar K., Abdur R., Haji B., & Reaz U. (2015). Evaluation of Antioxidant, Free Radical Scavenging, and Antimicrobial Activity of *Quercus incana* Roxb. **Front Pharmacol**, **23**(6), 277-283.
- Shamim A., Shahid H., & Ansaria, F. (2011). Phytoconstituents from the rhizomes of *Curcuma aromatica* Salisb. **Journal of Saudi Chemical Society** **15**(3), 287-290.
- Sharif M., Atiqur R., Sattar M., Oliur M., & Hasan M. (2010). Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salisb. **Food and Chemical Toxicology**, **48**(6), 1757- 1760.
- Thummatuchsana B. (1980, 18 Dec.) Aloe Vera for treatment. **Moh Chao Ban**, **20**(3), 41-42. (In Thai)
-