

การพัฒนาเจลต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสม

ดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ

Development of Antioxidant and Anti-inflammatory Gels Containing the Extract of Mixed *Syzygium aromaticum* Flower Buds and *Myristica fragrans* Seeds

เมธิกา ฤทธิสุทธิ์^{1,2} ฉัตรชนก นุกุลกิจ¹ วรินทร์ โอนอ่อน¹ ทันทิภา แก้วสูงเนิน¹ จรินยา ขุนทะวาด¹

ภานิชา พงศ์นราทร¹ และ ยลดา ศรีเศรษฐ^{1*}

Methika Ritsut^{1,2} Chatchanok Nukulkit¹ Warin Ohn-on¹ Thanthika Kaewsoongnern¹ Jarinya Khoontawad¹

Panicha Pongnaratorn¹ and Yollada Sriset¹

¹สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

²กลุ่มงานแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก โรงพยาบาลทับคล้อ อำเภอบึงสามพัน จังหวัดพิจิตร

¹Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus

²Thai Traditional and Alternative Medicine Department, Thap Khlo Hospital, Thap Khlo District, Phichit

*E-mail: yollada.sr@muti.ac.th

Received: Oct 17, 2023

Revised: Nov 22, 2023

Accepted: Nov 27, 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเจลต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ การเตรียมสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรใช้วิธีการแช่หมักโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลาย การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของดอกกานพลู สารสกัดเอทานอลของลูกจันทน์เทศ และ สารสกัดเอทานอลของสมุนไพรผสมที่มีดอกกานพลูและลูกจันทน์เทศในสัดส่วนที่เท่ากัน ใช้วิธี ABTS และ DPPH ส่วนการประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดดังกล่าวผ่านการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ใช้วิธี Griess ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ที่สูง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.35±0.01 และ 0.08±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.19±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากให้นำสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศมาพัฒนาเป็นเจลสมุนไพรที่ความเข้มข้นของสารสกัดร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก แล้วศึกษาความคงตัวของเจลสมุนไพรในสภาวะเร่ง ด้วยวิธี heat-cool cycling method และประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของเจลสมุนไพรด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ผลการศึกษา พบว่า เจลสมุนไพรทุกสูตรมีความคงตัวดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและทางเคมี นอกจากนี้ยังพบว่าเจลสมุนไพรทุกสูตรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบที่เทียบเท่ากับเจลมาตรฐานไดโคลิฟีนแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 ดังนั้นเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศทุกสูตรในการศึกษานี้จึงมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

คำสำคัญ: กานพลู จันทน์เทศ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ เจลสมุนไพร

Abstract

This research aimed to develop antioxidant and anti-inflammatory gels containing the extract of mixed *Syzygium aromaticum* flower buds and *Myristica fragrans* seeds. The preparation of herbal ethanol extracts was performed by maceration method using 95% ethanol as a solvent. The antioxidant activity of ethanol extract of *S. aromaticum* flower buds (SAFB), ethanol extract of *M. fragrans* seeds (MFS) and ethanol extract of mixed herbs consisting of an equal ratio of SAFB and MFS was assessed by ABTS and DPPH assays. The anti-inflammatory activity of the extracts was assessed via inhibition of nitric oxide (NO) production using Griess method. The results revealed that the extract of mixed SAFB and MFS exhibited high ABTS^{•+} and DPPH[•] radical scavenging activities with IC₅₀ values of 0.35±0.01 and 0.08±0.01 mg/mL, respectively, and was able to inhibit NO production with IC₅₀ value of 0.19±0.01 mg/mL. After the extract of mixed SAFB and MFS was used to develop gel formulations containing 0.05%, 0.10% and 0.20% w/w of the extract, the herbal gels were subjected to the accelerated stability test using heat-cool cycling method and the assessment of antioxidant and anti-inflammatory activities using the aforementioned methods. The results demonstrated that all herbal gel formulations showed the good stability with no change in physical and chemical characteristics. Moreover, all herbal gel formulations possessed antioxidant and anti-inflammatory activities comparable to the standard gel, 1% diclofenac gel. Therefore, all gels containing the extract of mixed SAFB and MFS used in this study have potential for further development as herbal products with antioxidant and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Syzygium aromaticum*, *Myristica fragrans*, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Herbal gel

1. บทนำ

ปัจจุบัน อุบัติการณ์ของการเกิดโรคในกลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อและพังผืด (Myofascial pain syndrome) เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในคนวัยทำงาน เนื่องจากการดำรงชีวิตประจำวันและการทำงานของมนุษย์ที่มีจะอยู่ในอิริยาบถเดิมเป็นเวลานาน ๆ เช่น การนั่งทำงานในท่าเดิมนาน ๆ และความเมื่อยล้าจากการทำกิจกรรมต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน รวมทั้งความเครียดจากการทำงาน ทำให้กล้ามเนื้อถูกใช้งานมากกว่าปกติ จึงเกิดการเกร็งตัวหรือการบาดเจ็บของกล้ามเนื้อ นำไปสู่อาการปวดกล้ามเนื้อเรื้อรัง [1] สภาวะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการอักเสบ (Inflammation) ซึ่งเป็นการตอบสนองของร่างกายต่อการได้รับบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ มีกลไกที่สำคัญคือการขยายตัวของหลอดเลือด (Vasodilation) เป็นผลมาจากการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ (Inflammatory mediators) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว เช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่เข้าไปกำจัดสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อ อีกทั้งในขณะที่เกิดการอักเสบ เซลล์เม็ดเลือดขาวยังมีการปลดปล่อยอนุมูลอิสระ (Free radicals) ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระในร่างกาย [2] ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative

stress) ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ และส่งผลให้อวัยวะในร่างกายทำงานได้น้อยลงหรือสูญเสียหน้าที่ [3] การรักษาอาการปวดกล้ามเนื้อในปัจจุบันมีหลายวิธี ซึ่งวิธีหนึ่งที่นิยมกันคือ การใช้ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (Non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) ในรูปแบบยารับประทาน แต่การใช้ยาในกลุ่มนี้มักก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น ผลในกระเพาะอาหาร [4] ดังนั้นการศึกษาหาสารสำคัญหรือพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และลดการอักเสบได้ จึงเป็นอีกทางเลือกของการรักษา และนำไปสู่การพัฒนาายบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ

ดอกกานพลู (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry.) มีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นน้ำมันระเหยง่าย (Volatile oil) ที่สำคัญ ได้แก่ Eugenol พบปริมาณร้อยละ 66-89 [5]-[7] ในทางการแพทย์แผนไทย ใช้ดอกตูมของกานพลู (Clove flower bud) เป็นยาแก้ปวด แก้เหน็บชา ขับลม และแก้จุกเสียด [8] และมีรายงานทางเภสัชวิทยา พบว่าดอกกานพลูมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ [9] และต้านเซลล์มะเร็ง [9]-[11] ส่วนลูกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans* Houtt.) พบน้ำมันระเหยง่ายส่วนใหญ่เป็น Sabinene ปริมาณร้อยละ 20-53 α -Pinene ปริมาณร้อยละ 13-22 และ Myristicin ปริมาณ

ร้อยละ 10-20 [12] ในทางการแพทย์แผนไทย ใช้ลูกจันทน์เทศ (Nutmeg) เป็นยาบำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงโลหิต ขับลม และแก้ปวดท้อง [8] นอกจากนี้ยังมีรายงานทางเภสัชวิทยาว่า ลูกจันทน์เทศมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและไวรัส ยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ลดปวด และยับยั้งเซลล์มะเร็ง [12]

ในทางการแพทย์แผนไทย ใช้รสรยาสมุนไพรเป็นตัวชี้้นำให้ทราบถึงสรรพคุณของสมุนไพร โดยการรักษากลุ่มอาการปวดกล้ามเนื้อส่วนใหญ่มักจะใช้สมุนไพรที่มีสรร้อนช่วยขับลมที่คั่งค้างในเส้นเอ็นและกล้ามเนื้อ และลดการอักเสบ [13] เนื่องจากกานพลู และจันทน์เทศเป็นสมุนไพรที่มีสรร้อน และผลทางฤทธิ์เภสัชวิทยาที่ดีของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบ อาจช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อได้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำดอกกานพลูและลูกจันทน์เทศไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ ซึ่งเป็นรูปแบบของผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอกที่น่าจะมีความสะดวกต่อการใช้ เพิ่มทางเลือกในการใช้ยาสมุนไพรลดอาการปวดกล้ามเนื้อ และลดผลข้างเคียงจากการรับประทานยาแผนปัจจุบัน ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงนำสารสกัดจากดอกกานพลู และลูกจันทน์เทศมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และด้านการอักเสบในหลอดทดลอง และนำไปพัฒนาเป็นเจลเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม มีความคงตัว และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปศึกษา งานวิจัยทางคลินิกต่อไป

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. สารเคมี

กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เควอซีทิน (Quercetin) เอบีทีเอส (2,2'-Azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid; ABTS) ดีพีพีเอซ (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ดีเอ็มเอสโอ (Dimethyl sulfoxide; DMSO) โซเดียมไนโตรพรัสไซด์ (Sodium nitroprusside) ซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide) และ เอ็น-(1-แนฟทิล)เอทิลีนไดอะมิน ไดไฮโดรคลอไรด์ (N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) จากบริษัท Sigma-Aldrich (Missouri, USA) Carbopol®940 Polyethylene glycol 400 (PEG 400) Polypropylene glycol (PPG) Phenoxyethanol และ Triethanolamine จากบริษัท Chemipan Corporation Co., Ltd. (Bangkok, Thailand) ไดโคลฟีแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 (Diclofenac, Difelene®) จากบริษัท Thai Nakorn

Patana Co., Ltd. (Nonthaburi, Thailand) และสารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้เป็นกรดสำหรับการวิเคราะห์

2.2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากดอกกานพลูและลูกจันทน์เทศ

สมุนไพรแห้ง ได้แก่ ดอกกานพลู และลูกจันทน์เทศ ได้จากร้านบ้านสมุนไพรเขาทราย อำเภอทับคล้อ จังหวัดพิจิตร เมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2565 และตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องยาสมุนไพรด้วยการดูเอกลักษณ์ภายนอกโดยอาจารย์รัตน อินทเกตุ อาจารย์ประจำสาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางด้านสมุนไพร และมีใบประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทยด้านเภสัชกรรมไทย (พท.ภ.24033) นำสมุนไพรแต่ละชนิดมาบดด้วยเครื่องบดแบบอ่างลูกกลิ้ง 30 นิ้ว และนำผงสมุนไพรมาร่อนผ่านตะแกรงขนาด เบอร์ 40 จากนั้นจึงผงสมุนไพรแต่ละชนิด และผงสมุนไพรผสมของดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศในอัตราส่วนเท่ากัน นำมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:10 (ผงสมุนไพร 1 ส่วน และเอทานอล 10 ส่วน) โดยใช้วิธีการแช่หมักในตัวทำละลาย (Maceration) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน จากนั้นทำการกรองแยกสารสกัดแล้วนำส่วนที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary evaporator; Rotavapor® R-300, Buchi, Flawil, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และคำนวณหา ร้อยละปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%Yield)

2.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี ABTS

นำสารสกัดความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาผสมกับรีแอคชั่นมิกเจอร์ (Reaction mixture) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) ความเข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ (รีแอคชั่นมิกเจอร์นี้ถูกเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร) จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 6 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader (Infinite® 200 pro, Tecan, Männedorf,

Switzerland) โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน (0.0125-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ให้ลดลงได้ร้อยละ 50 (the half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Inhibition) ดังสมการ

$$\%Inhibition = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

โดยที่

A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

A₁ = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

จากนั้นนำค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า IC₅₀ [14]

2.4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน (0.001-0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ให้ลดลงได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ซึ่งมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 2.3. [14]

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Griess

นำสารสกัดความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (Sodium

nitroprusside) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 150 นาที แล้วเติม Griess reagent ที่ประกอบด้วย ซัลฟานิลาไมด์ (Sulfanilamide) ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ เอ็น-(1-แนฟทิล)เอทิลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตราส่วน 1:1 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้เคอูซิทินเป็นสารมาตรฐาน (6.25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านการอักเสบถูกรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการสร้าง NO ให้ลดลงได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ซึ่งมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 2.3. [15]

2.6. การพัฒนาเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานตะวันและลูกจันทน์เทศ

นำสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานตะวันกับลูกจันทน์เทศมาทำผลิตภัณฑ์เจล โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับร้อยละ 0.05, 0.1 และ 0.2 โดยน้ำหนัก (Figure 1) ในการศึกษานี้ได้ดัดแปลงสูตรเจลจากการศึกษาของ Khan et al. [16] โดยส่วนประกอบของเจลแต่ละสูตรได้แสดงไว้ใน Table 1

จากนั้นนำเจลสมุนไพรแต่ละสูตรมาทำการประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธีการทดสอบในสภาวะเร่ง (Heat-cool cycling method) โดยการนำเจลสมุนไพรที่เตรียมไว้เก็บในหลอดบรรจุภัณฑ์ที่บ่มแสงที่อุณหภูมิ 4±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ 45±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบทำการทดสอบทั้งหมด 4 รอบ ประเมินผลก่อนการทดสอบและเมื่อสิ้นสุดการทดสอบในแต่ละรอบ โดยดูลักษณะเนื้อสัมผัส สี การแยกชั้น ความหนืด (Viscosity) และความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเจล

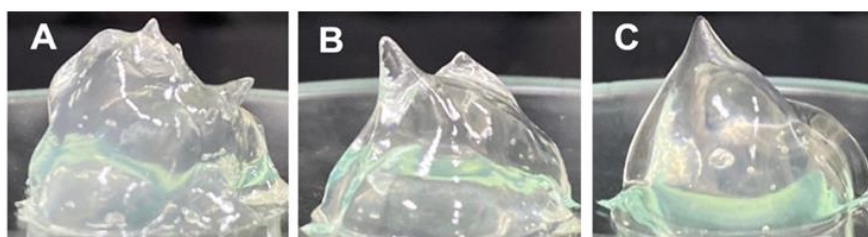


Figure 1 Herbal gels containing the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds and *M. fragrans* seeds at concentrations of 0.05% (A), 0.10% (B) and 0.20% (C).

Table 1 Composition of the herbal gel formulations containing different concentrations of the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds (SAFB) and *M. fragrans* seeds (MFS)

Part	Composition	Gel formulation (% w/w)			
		F1	F2	F3	F4
A	Carbopol® 940	1.00	1.00	1.00	1.00
	SAFB + MFS extract	-	0.05	0.10	0.20
B	Polyethylene glycol 400	4.00	4.00	4.00	4.00
	Polypropylene glycols	8.00	8.00	8.00	8.00
	Phenoxyethanol	0.30	0.30	0.30	0.30
C	Deionized water (q.s. to)	100	100	100	100
	Triethanolamine (adjusting pH 4-7)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.

F1 is gel base; F2, F3, and F4 are gels containing 0.05%, 0.10% and 0.20% of the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds and *M. fragrans* seeds, respectively.

q.s. stands for quantum satis which is a Latin term meaning “Add as much of the ingredient as is needed to achieve the desired result, but not more”.

2.7. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบของเจลสมุนไพร

นำเจลสมุนไพรไปประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อดูประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ โดยมีวิธีการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH[•] ดังข้อที่ 2.3. และ 2.4. ตามลำดับ และวิธีการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ ดังข้อที่ 2.5. ซึ่งใช้เจลมาตรฐานที่มีส่วนผสมของไดโคลฟีแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบถูกรายงานเป็นร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งการอักเสบ (%Inhibition) ซึ่งมีวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับข้อ 2.3.

2.8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation; SD) (n=3) การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) ร่วมกับการทดสอบแบบ Tukey's post-hoc test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p\text{-value} < 0.05$ ($p < 0.05$) ด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (IBM SPSS) เวอร์ชัน 26.0

3. ผลการวิจัย

3.1. ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดสมุนไพร

สารสกัดดอกกานพลูมีสีน้ำตาล ลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 12.48 กรัม คิดเป็นร้อยละปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง เท่ากับ ร้อยละ 6.24 ขณะที่สารสกัดลูกจันทน์เทศ และสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ มีสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นเช่นกัน น้ำหนักสารสกัดหยาบเท่ากับ 3.87 และ 7.93 กรัม คิดเป็นร้อยละปริมาณสารสกัดที่ได้ต่อน้ำหนักพืชแห้ง เท่ากับ ร้อยละ 1.93 และ ร้อยละ 3.96 ตามลำดับ (Table 2)

3.2. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี ABTS และวิธี DPPH

สารสกัดดอกกานพลู สารสกัดลูกจันทน์เทศ และสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH[•] ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (IC₅₀ เท่ากับ 0.44±0.09 และ 0.02±0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH[•] ตามลำดับ) และสารสกัดแต่ละชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารสกัดดอกกานพลูสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.34±0.04 และ 0.16±0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ค่า IC₅₀ ของสารสกัดลูกจันทน์เทศต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.40±0.04 และ 0.11±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดของ

สมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.35±0.01 และ 0.08±0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3) จากค่า IC₅₀ ที่ต่ำ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด

Table 2 Physical characteristics, weights and %yields of *S. aromaticum* flower bud (SAFB) extract, *M. fragrans* seed (MFS) extract and the extract of mixed SAFB and MFS (SAFB + MFS extract)

Extract	Physical characteristics	Weight (g)	%Yield
SAFB extract	 Brown viscous liquid	12.48	6.24
MFS extract	 Dark brown viscous liquid	3.87	1.93
SAFB + MFS extract	 Dark brown viscous liquid	7.93	3.96

Table 3 Antioxidant activity (determined by ABTS and DPPH assays) and anti-inflammatory activity (determined by the inhibition of nitric oxide (NO) production) of *S. aromaticum* flower bud (SAFB) extract, *M. fragrans* seed (MFS) extract and the extract of mixed SAFB and MFS (SAFB + MFS extract)

Extract	IC ₅₀ (mg/mL)		
	ABTS assay	DPPH assay	Inhibition of NO production
SAFB extract	0.34±0.04 ^a	0.16±0.02 ^b	0.27±0.05 ^d
MFS extract	0.40±0.04 ^a	0.11±0.03 ^b	0.23±0.07 ^c
SAFB + MFS extract	0.35±0.01 ^a	0.08±0.01 ^b	0.19±0.01 ^c
Standard			
Ascorbic acid	0.44±0.09 ^a	0.02±0.00 ^b	-
Quercetin	-	-	0.01±0.00 ^c

The results are expressed as mean ± SD (n=3).

Mean values with different superscript letters in a column are significantly different at a significance level of 0.05.

3.3. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี Griess

สารสกัดลูกจันทน์เทศ และสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ สามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 ± 0.07 และ 0.19 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์เทียบเท่ากับสารมาตรฐานเคอซิทีน (IC_{50} เท่ากับ 0.01 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สารสกัดดอกกานพลูสามารถยับยั้งการสร้าง NO ได้แตกต่างกับสารสกัดลูกจันทน์เทศ สารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ และเคอซิทีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.27 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 3)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบในระดับหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ดี โดยค่า IC_{50} ที่น้อยบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการต้านการอักเสบที่สูงในการเตรียมเจลจากสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศได้ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดในระดับที่สูงกว่าค่า IC_{50} โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับความเข้มข้นของสารสกัด ร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

3.4. ผลการวิเคราะห์ความคงตัวของเจลสมุนไพรในสถานะแรง ด้วยวิธี heat-cool cycling method

การทดสอบความคงตัวในสถานะแรงจำนวน 4 รอบของผลิตภัณฑ์เจล 4 สูตร โดยสูตรที่ 1 เป็นเจลพื้น และสูตรที่ 2, 3 และ 4 เป็นเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ พบว่า ก่อนการทดสอบความคงตัวในสถานะแรง (รอบที่ 0) เจลสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 มีลักษณะทางกายภาพที่ดี คือ เป็นของแข็งแข็งเกร็ง สีใส เนื้อเนียนเป็นเนื้อเดียวกัน เนื้อสัมผัส ไม่พบการแยกชั้นของเจล และไม่เห็นเยวเหวหะ ค่าความหนืดของเจลสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ $23,288.00 \pm 703.77$, $21,632 \pm 636.91$, $21,914 \pm 864.32$ และ $21,982.1185.67$ cP (Centipoise) ตามลำดับ และเจลสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ

5.45 ± 0.05 , 4.39 ± 0.02 , 4.80 ± 0.06 และ 4.17 ± 0.09 ตามลำดับ หลังจากการทดสอบความคงตัวในแต่ละรอบ พบว่าลักษณะทางกายภาพของเจลสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ยังคงสภาพเดิม ค่าความหนืดในแต่ละรอบของเจลสูตรที่ 1 ($22,573.00-23,321.20$ cP), สูตรที่ 2 ($20,762-21,632$ cP), สูตรที่ 3 ($20,948-21,970$ cP) และสูตรที่ 4 ($20,976-21,982$ cP) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และความเป็นกรด-ด่างในแต่ละรอบของเจลสูตรที่ 1 (4.00-5.45), สูตรที่ 2 (4.13-4.60), สูตรที่ 3 (4.33-4.81) และ สูตรที่ 4 (4.17-4.67) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่วัดได้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหนังมนุษย์ (pH 4-9) [17] ดังนั้นผลการทดสอบความคงตัวในสถานะแรงจึงแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปไม่ส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพ ค่าความหนืด และความเป็นกรด-ด่างของเจลทุกสูตรตำรับ (Table 4)

3.5. ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบของเจลสมุนไพร

จากการประเมินฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และฤทธิ์ด้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการสร้าง NO ของเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศเปรียบเทียบกับเจลดมาตรฐานไดโคลฟีแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่า ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และร้อยละการยับยั้งการสร้าง NO ของเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกกานพลูกับลูกจันทน์เทศ ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเจลสมุนไพรทั้ง 3 ความเข้มข้นนี้แสดงฤทธิ์ที่เทียบเท่ากับเจลดมาตรฐานไดโคลฟีแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (ร้อยละ 65.29 ± 1.55) และ DPPH[•] (ร้อยละ 64.78 ± 4.71) และการยับยั้งการสร้าง NO (ร้อยละ 64.78 ± 4.71) อย่างไรก็ตาม ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ และร้อยละการยับยั้งการสร้าง NO ของเจลสมุนไพรนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (Dose-dependent manner) โดยเจลสมุนไพรที่มีสารสกัดสมุนไพร ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ได้ร้อยละ 78.82 ± 0.51 และ 65.88 ± 1.84 ตามลำดับ และยับยั้งการสร้าง NO ได้ร้อยละ 66.81 ± 1.93 ขณะที่เจลสมุนไพรที่มีสารสกัดสมุนไพร ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 โดยน้ำหนัก ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ได้ร้อยละ 88.87 ± 1.70

Table 4 Accelerated stability test of herbal gel formulations containing different concentrations of the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds and *M. fragrans* seeds

Formulation	Physical/chemical parameters	0 cycle	1 st cycle	2 nd cycle	3 rd cycle	4 th cycle
F1	Appearance	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent
	pH	5.45±0.05 ^a	4.95±0.07 ^a	4.82±0.03 ^a	4.99±0.12 ^a	4.00±0.10 ^a
	Viscosity (cP)	23,288.00±703.77 ^b	23,321.20±987.24 ^b	22,573.00±278.23 ^b	23,100.20±619.14 ^b	22,682.20±619.53 ^b
F2	Appearance	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent
	pH	4.39±0.02 ^a	4.24±0.02 ^a	4.60±0.34 ^a	4.13±0.01 ^a	4.59±0.03 ^a
	Viscosity (cP)	21,632±636.91 ^b	21,564±605.59 ^b	21,326±272.29 ^b	20,762±128.74 ^b	21,210±305.74 ^b
F3	Appearance	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent
	pH	4.80±0.06 ^a	4.81±0.05 ^a	4.47±0.08 ^a	4.55±0.02 ^a	4.33±0.41 ^a
	Viscosity (cP)	21,914±864.32 ^b	21,114±242.61 ^b	21,132±253.09 ^b	21,970±1031.15 ^b	20,948±127.49 ^b
F4	Appearance	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent	Homogenous, clear, and translucent
	pH	4.17±0.09 ^a	4.30±0.20 ^a	4.46±0.07 ^a	4.67±0.04 ^a	4.50±0.07 ^a
	Viscosity (cP)	21,982.1185.67 ^b	21,396±600.61 ^b	21,190±321.12 ^b	20,976±347.53 ^b	21,170±282.27 ^b

F1 is gel base; F2, F3, and F4 are gels containing 0.05%, 0.10% and 0.20% of the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds and *M. fragrans* seeds, respectively.

All values are expressed as mean ± SD (n=3).

Mean values with the same superscript letter (a or b) in a row are not significantly different at a significance level of 0.05.

และ 76.03 ± 1.48 ตามลำดับ และยับยั้งการสร้าง NO ได้ ร้อยละ 73.30 ± 0.39 และเจลสมุนไพรที่มีสารสกัดสมุนไพร ความเข้มข้นร้อยละ 0.20 โดยน้ำหนัก ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH⁺ ได้ร้อยละ 94.51 ± 1.18 และ 86.27 ± 0.45 ตามลำดับ และยับยั้งการสร้าง NO ได้ร้อยละ 89.15 ± 1.59 (Table 5)

4. อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศ พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ที่ดี เนื่องจากการมีสารสำคัญหลายชนิดที่ช่วยเสริมฤทธิ์กัน โดยดอกทานพลูพบสารส่วนใหญ่เป็น Eugenol และลูกจันทน์เทศพบสารส่วนใหญ่เป็น Sabinene, α -Pinene และ Myristicin นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ ที่พบได้ทั้งในดอกทานพลู และลูกจันทน์เทศ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolics) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นต้น [5]-[7], [12] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ El Ghallab et al. [18] ที่ได้ทำการสกัดดอกทานพลูด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดดอกทานพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 ± 0.01 และ 0.41 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และยังพบสารประกอบฟีนอลิกรวมในปริมาณที่สูง คือ 351.83 ± 17.90 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg gallic acid equivalent/g extract) ส่วนการศึกษาของ Li et al. [19] พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกทานพลูมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH⁺ เท่ากับ 58.44 และ 2,298.01 ไมโครโมลสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมสารสกัด ($\mu\text{mol trolox equivalent/g extract}$) ตามลำดับ และการศึกษาของ Temesgen et al. [20] พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกทานพลูสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH⁺ และยับยั้งการสร้าง NO โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 413.14 ± 10.52 และ 290.37 ± 3.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาข้างต้นที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเอทานอลของลูกจันทน์เทศมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS และ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.68 ± 0.31 , 39.65 ± 0.83 และ 65.42 ± 4.95 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ [21], [22] เนื่องด้วยฤทธิ์เภสัชวิทยาที่ดีของสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศ จึงนำไปใช้พัฒนาเป็นเจลสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ

การพัฒนาสูตรเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก โดยใช้ Carbopol® 940 (Carbomer 940) เป็นสารก่อเจล (Gelling agent) ซึ่งเป็นสารประเภทคอลลอยด์ (Colloid) สังเคราะห์ ชนิดมีประจุ ที่นิยมใช้มากเมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของเจลในสภาวะเร่งทั้งหมด 4 รอบ พบว่า ก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละรอบ เจลสมุนไพรทุกความเข้มข้นมีความคงตัวดี ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ มีความเหนียวพอเหมาะ และค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลสมุนไพรแต่ละความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4.13-4.81 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสม เนื่องจากใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรด-ด่างของผิวหนังมนุษย์ที่เป็นกรดอ่อน (pH 4-6) [23] ดังนั้นภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำสลับสูง ความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศจึงไม่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพ ความเหนียว และความเป็นกรด-ด่างของเจล นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศ ซึ่งพบว่า เจลสมุนไพรทุกความเข้มข้นมีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ และ DPPH⁺ และร้อยละการยับยั้งการสร้าง NO ที่เทียบเท่ากับเจลมาตรฐานไดโคโลฟีแนค ความเข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งเป็นยาทาแก้ปวดที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในกลุ่ม NSAIDs และมักใช้บรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ยิ่งไปกว่านั้นร้อยละการยับยั้งนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเจลมีความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศมากขึ้น การศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการสร้าง NO ของสารสกัดสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศ ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ (Active Ingredient) ของผลิตภัณฑ์เจล การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่มีการพัฒนาสูตรเจลด้านการอักเสบจากสารสกัดเอทานอลของลูกจันทน์เทศ ซึ่งพบว่า เจลจากสารสกัดลูกจันทน์เทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2-12 โดยน้ำหนัก สามารถลดการอักเสบและบวมที่ขาหนูได้ โดยมีร้อยละการยับยั้งการอักเสบอยู่ในช่วงร้อยละ 11.69-44.92 ซึ่งร้อยละการยับยั้งการอักเสบที่มากขึ้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น [24] นอกจากนี้ยังพบว่าครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันระเหยง่ายจากทานพลูที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก สามารถลดการอักเสบที่ผิวหนังจากการถูกเหนียวด้วยน้ำมันสลอดได้ โดยผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบชนิดไซโคลออกซีจีเนส-2 (Cyclooxygenase-2) [25]

Table 5 Antioxidant activity (determined by ABTS and DPPH assays) and anti-inflammatory activity (determined by the inhibition of nitric oxide (NO) production) of herbal gel formulations containing different concentrations of the extract of mixed *S. aromaticum* flower buds (SAFB) and *M. fragrans* seeds (MFS)

Formulation	%Inhibition		
	ABTS assay	DPPH assay	Inhibition of NO production
0.05% SAFB and MFS extract gel	78.82±0.51 ^a	65.88±1.84 ^b	66.81±1.93 ^c
0.10% SAFB and MFS extract gel	88.87±1.70 ^a	76.03±1.48 ^b	73.30±0.39 ^c
0.20% SAFB and MFS extract gel	94.51±1.18 ^a	86.27±0.45 ^b	89.15±1.59 ^c
1% Diclofenac gel	65.29±1.55 ^a	64.78±4.71 ^b	72.89±3.83 ^c

The results are expressed as mean ± SD (n=3).

Mean values with the same superscript letter (a, b or c) in a column are not significantly different at a significance level of 0.05.

5. บทสรุป

จากการศึกษา พบว่า เจลทั้ง 3 สูตรนี้ มีลักษณะทางกายภาพที่ดี และมีความคงตัวที่ดีในสภาวะเร่งทั้งหมด 4 รอบ นอกจากนี้เจลเหล่านี้ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูล ABTS^{•+} และการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล DPPH[•] จึงทำให้อะตอมของอนุมูลอิสระมีความเสถียร อีกทั้งยังสามารถต้านการอักเสบผ่านกลไกการยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางการอักเสบชนิด NO ดังนั้นเจลที่มีสารสกัดของสมุนไพรผสมดอกทานพลูกับลูกจันทน์เทศความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.10 และ 0.20 โดยน้ำหนัก จึงเป็นสูตรเจลที่มีความคงตัวที่ดีทั้งทางกายภาพและทางเคมี รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับหลอดทดลอง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อ ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานและต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ภายนอกจากสารสกัดสมุนไพร อย่างไรก็ตามการพัฒนาเจลสมุนไพรนี้สำหรับใช้บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในด้านความปลอดภัย และประสิทธิผลทางคลินิก

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

7. References

- [1] Saxena, A. and et al. 2015. Myofascial pain syndrome: an overview. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy*. 29(1): 16-21.
- [2] Mense, S. 2003. The pathogenesis of muscle pain. *Current Pain and Headache Reports*. 7(6): 419-425.
- [3] Closa, D. and Folch-Puy, E. 2004. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life*. 56(4): 185-191.
- [4] Bindu, S., Mazumder, S. and Bandyopadhyay, U. 2020. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochemical Pharmacology*. 180: 114147.
- [5] Golmakani, M.T., Zare, M. and Razzaghi, S. 2017. Eugenol enrichment of clove bud essential oil using different microwave-assisted distillation methods. *Food Science and Technology Research*. 23(3): 385-394.
- [6] Kennouche, A. and et al. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* Cloves extracted by conventional and microwave techniques. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 5(1): 1-11.

- [7] Gonzalez-Rivera, J. and et al. 2016. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): chemical composition and thermal analysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 33: 308-318.
- [8] Wuttidhamaved, W. 2007. **The Rattanakosin Pharmacy Ancient Book**. Bangkok: Odeon store. (in Thai)
- [9] Dahham, S. and et al. 2015. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**. 20(7): 11808-11829.
- [10] Ramadan, M.M. and et al. 2015. Essential oils from Egyptian aromatic plants as antioxidant and novel anticancer agents in human cancer cell lines. **Grasas y Aceites**. 66(2): e080.
- [11] Haro-Gonzalez, J.N. and et al. 2021. Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**. 26(21): 1-25.
- [12] Ashokkumar, K. and et al. 2022. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: a review on its composition, biological, and pharmacological activities. **Phytotherapy Research**. 36(7): 2839-2851.
- [13] Nualkaew, S. 2020. **Applied Thai Traditional Pharmacy**. Khon Kaen: Khon Kaen University Printing House. (in Thai)
- [14] Ohn-on, W. and et al. 2022. Effects of extraction methods on total phenolic content and antioxidant activity of Chan-Tang-Ha recipe. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 24(3): 88-96. (in Thai)
- [15] Sriset, Y., Chatuphonprasert, W. and Jarukamjorn, K. 2021. In vitro antioxidant potential of *Mallotus repandus* (Willd.) Muell. Arg stem extract and its active constituent bergenin. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 43(1): 24-30.
- [16] Khan, A.W. and et al. 2013. Formulation development, optimization and evaluation of aloe vera gel for wound healing. **Pharmacognosy Magazine**. 9(Suppl. 1): S6-S10.
- [17] Ijaz, N. and et al. 2022. Formulation and characterization of aloe vera gel and tomato powder containing cream. **Acta Ecologica Sinica**. 42(2): 34-42.
- [18] El Ghallab, Y. and et al. 2020. *Syzygium aromaticum* L.: phytochemical investigation and comparison of the scavenging activity of essential oil, extracts and eugenol. **Advances in Traditional Medicine**. 20: 153-158.
- [19] Li, Y. and et al. 2022. Chemical compositions of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.) extracts and their potentials in suppressing SARS-CoV-2 spike protein-ACE2 binding, inhibiting ACE2, and scavenging free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 70(45): 14403-14413.
- [20] Temesgen, S., Sasikumar, J.M. and Egigu, M.C. 2022. Effect of extraction solvents on total polyphenolic content and antioxidant capacity of *Syzygium aromaticum* L. flower bud from Ethiopia. **BioMed Research International**. 2022: 4568944.
- [21] Li, C.W. and et al. 2020. Evaluation of antioxidant and anti- α -glucosidase activities of various solvent extracts and major bioactive components from the seeds of *Myristica fragrans*. **Molecules**. 25(21): 5198.

- [22] Champasuri, S. and Itharat, A. 2016. Bioactivities of ethanolic extracts of three parts (wood, nutmeg and mace) from *Myristica fragrans* Houtt. **Journal of the Medical Association of Thailand.** 99(Suppl. 4): S124-S130.
- [23] Ali, S.M. and Yosipovitch, G. 2013. Skin pH: from basic science to basic skin care. **Acta Dermato-Venereologica.** 93(3): 261-267.
- [24] Ikhsanudin, A., Lolita, L. and Rais, D.D. 2021. Anti-inflammatory activity of Indonesian nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt): a topical gel formulation. **International Journal of Public Health Science.** 10(3): 689-695.
- [25] Sugihartini, N., Lestari, G. and Yuliani, S. 2019. Anti-inflammatory activity of essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*) in O/W and W/O creams. **Pharmaciana.** 9(1): 109-118.