

นิพนธ์ฉบับ

ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารสกัด และสารที่แยกได้จากหัวข้าวเย็นสายพันธุ์

Dioscorea birmanica Prain and Burkill

นวลจันทร์ ใจอารีย์, อรุณพร อิฐรัตน์, สุมาลี ปานทอง, ผกากรอง ทองดียิ่ง

บทคัดย่อ

- บทนำ:** หัวข้าวเย็น เป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการรักษามะเร็ง ฝีหนอง ลดปวด ลดอักเสบ และเป็นสมุนไพรที่มีใช้มากในตำรับยารักษามะเร็ง วัตถุประสงค์ในการวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราของสารสกัดหัวข้าวเย็นชนิด *Dioscorea birmanica* และสารที่แยกได้
- วิธีการศึกษา:** การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร สารสกัด และการแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธีการ bioassay guide fractionation การพิสูจน์สูตรโครงสร้างใช้เทคนิคThin Layer Chromatography (TLC) และสเปกโตรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (inhibitory effect on PGE2 production) ตามวิธีของ Copeland ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion
- ผลการศึกษา:** ผลการศึกษาพบว่า หัวข้าวเย็นที่ถูกนำมาสกัดด้วย เอทานอล ร้อยละ ๘๕ และแยกด้วย vacuum chromatography โดยการเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย ได้สารสกัดที่เป็นแต่ละส่วน ที่มีรหัสเป็น DB-Fr1 จนถึง DB-Fr4 ตามลำดับ พบว่า สารสกัดหัวข้าวเย็นด้วย ชั้น chloroform : methanol, ๑:๑ มีค่าปริมาณสารสกัดสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ ๕๐.๐๒ (๑๐.๖๔๖ กรัม) สารสกัดทั้งหมดถูกนำไปทดสอบ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (inhibitory effect on PGE2 production) และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่า สารสกัด DB-Fr2 จากชั้น CHCl_3 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุดคือ ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.02 ± 0.31 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร รองลงมาคือ สารสกัด DB-Fr 3 จากชั้น CHCl_3 : MeOH, ๘ : ๒ และสารสกัด DB-Fr 1 จากชั้น Hexane : CHCl_3 , ๒:๘ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมี IC_{50} เท่ากับ 6.56 ± 0.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 11.04 ± 1.23 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานคือ indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารสกัดทุกตัวไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* สำหรับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก สารสกัดชั้น ๖ ตัวอย่างจาก ๘ ตัวอย่าง มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* อยู่ในระดับต่ำกว่าสารมาตรฐาน (ขนาดของการยับยั้งเชื้อ อยู่ในช่วง ๗-๘ มิลลิเมตร) การแยกสารบริสุทธิ์ทำโดยวิธี bioassay-guided fractionation ได้สาร DB-Fr2-P1, DB-Fr2-P2 และ DB-Fr4-P1 และสารที่แยกได้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.40 ± 0.04 , 10.16 ± 0.47 และ 24.11 ± 1.14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (indomethacin มีค่า IC_{50} เท่ากับ ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่สาร DB-Fr4-P1 มีค่าการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* โดยมี clear zone เท่ากับ 10 ± 0.17 มิลลิเมตร $\text{MIC} = 12.5$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคือ Amphotericin B ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า DB-Fr4-P1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิด *Candida albicans* ได้ระดับกลาง
- วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา:** ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับองค์ความรู้แพทย์แผนไทยที่ใช้หัวข้าวเย็น ในการรักษาและลดการอักเสบในกลุ่มผู้ป่วย มะเร็ง หนองฝี และโรคทางระบบสืบพันธุ์

คำสำคัญ: หัวข้าวเย็น ชนิด *Dioscorea birmanica*, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

วันที่รับบทความ: ๒๑ พฤศจิกายน ๒๕๕๕

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๘ เมษายน ๒๕๕๖

บทนำ

หัวข้าวเย็น เป็นสมุนไพรไทย ที่มีประวัติการใช้มายาวนานในกลุ่มแพทย์แผนไทยโบราณมานานกว่า ๗๐๐ ปี^{๑, ๒} และพบมีการใช้ในตำรับยาสูงสุดถึง ๒,๔๔๔ ตำรับ^{๓, ๔} โดยมีการใช้ในการรักษาและลดการอักเสบในกลุ่มโรคเรื้อนโรคทางผิวหนัง โรคระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบตา หู คอ จมูก ระบบกล้ามเนื้อและกระดูก โรคระบบทางเดินปัสสาวะและตำรับโรคมะเร็ง^{๕-๖} จากการศึกษาวิจัยเชิงคุณภาพโดยการสอบถามแพทย์แผนไทยภาคใต้พบว่า มีการใช้หัวข้าวเย็นเป็นส่วนประกอบสำคัญในตำรับยาสูงถึง ร้อยละ ๖๐ จาก ๓๐ ตำรับ^{๗, ๘} หัวข้าวเย็นแบ่งเป็น หัวข้าวเย็นเหนือ และหัวข้าวเย็นใต้ เมื่อพิจารณาตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในประเทศไทยพบว่า มี ๕ สายพันธุ์ โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ดังนี้ *Dioscorea birmanica* prain & burkill, *Dioscorea membranacea*, *Pygmaeo premnaherbacea*, *Smilax corbularia* และ *Smilax glabra* โดยที่ *Dioscorea birmanica* มีการใช้ในการรักษา มะเร็งสูงสุดในกลุ่มแพทย์พื้นบ้าน ถึงร้อยละ ๕๒.๒^{๙, ๑๐} ร่วมกับมีงานวิจัยว่าพบสาร sapogenin (diosgenin) ในหัวข้าวเย็นสายพันธุ์นี้ด้วย^{๑๑-๑๓} ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ว่า สารสกัดขึ้นเอทานอล จากหัวข้าวเย็น สายพันธุ์ *D. birmanica* แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้^{๑๔, ๑๕, ๑๖} แต่ยังไม่พบงานวิจัยสนับสนุนกลไกการลดความเสี่ยงในการเกิดความเสี่ยงของเซลล์ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX-2 inhibitor) ของสารที่พบในหัวข้าวเย็นสายพันธุ์นี้และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ มีเพียงการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยดูการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์ RAW 264.7 ของหัวข้าวเย็นสายพันธุ์นี้ซึ่งพบว่า สารสกัดขึ้นเอทานอล มีฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์^{๑๗, ๑๘} ดังนั้น สารสกัดและสารที่แยกได้ ยังไม่ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของหัวข้าวเย็นชนิดนี้ ด้วยการยับยั้ง cyclooxygenase นอกจากนี้ยังไม่มี การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารที่แยกได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเห็นสมควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาต่อยอดองค์ความรู้ที่ใช้หัวข้าวเย็นในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้สนับสนุนการใช้หัวข้าวเย็นในการรักษาโรคและลดการอักเสบในกลุ่มโรคเรื้อน โรคทางผิวหนัง และตำรับโรคมะเร็ง ต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์ คือ

๑. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสารสกัดหัวข้าวเย็นสายพันธุ์ *D. birmanica* และสารที่แยกได้

๒. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของสารสกัดหัวข้าวเย็นสายพันธุ์ *D. birmanica* และสารที่แยกได้

วิธีการศึกษา

การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร การสกัดและการแยกสารบริสุทธิ์ด้วย วิธี bioassay guided fractionation

หัวข้าวเย็นสายพันธุ์ *D. birmanica* เก็บจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งได้รับการพิสูจน์สายพันธุ์จากกรมป่าไม้เรียบร้อยแล้วนำมาล้าง หั่น อบที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส และบดหยาบ สมุนไพรบดหยาบจำนวน ๑ กิโลกรัม หมักด้วยเอทานอล ร้อยละ ๘๕ นาน ๓ วัน กรองและทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง evaporator หลังจากนั้นจึงนำไปแยกต่อด้วยวิธี vacuum liquid chromatography (VLC) ตามลำดับส่วนความมีขั้วของสารละลาย นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และนำสารสกัดใน fraction ที่มีฤทธิ์ดีที่สุดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography สารที่แยกได้นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารด้วย spectroscopy โดยใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry spectroscopy (MS) และ ultraviolet spectroscopy (UV) แล้วจึงนำสารสกัดที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX-2 inhibitor)

หลักการของการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX-2 inhibitor)

เอนไซม์ cyclooxygenase ทำหน้าที่เปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin G₂ (PGG₂) และ ผ่าน peroxidase activity กลายเป็น prostaglandin H₂ (PGH₂) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ prostaglandins thromboxane และ prostacyclines เอนไซม์ cyclooxygenase มี ๒ ชนิดคือ COX-1 ซึ่งทำหน้าที่ดูแลสภาวะปกติของร่างกาย (house keeping) มีผลต่อการสร้างเยื่อเมือก ลดการอักเสบในกระเพาะ การปรับสมดุลของหลอดเลือด การทำงานของเกล็ดเลือด การทำงานของไต ซึ่ง COX-1 จะถูกกระตุ้นโดย hormone และ growth factor ต่างๆ ส่วนเอนไซม์ COX-2 จะอยู่ในรูป inducible และอยู่ชั่วคราวไม่พบในเนื้อเยื่อปกติ พบมากในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น macrophages และ monocytes ซึ่งถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นเมื่อร่างกายเกิดการอักเสบ

ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้หลักการทดสอบเอนไซม์ตามวิธีของ Copeland^{๑๙} และวัดเฉพาะเอนไซม์ COX-2 โดยใช้ปฏิกิริยา

oxidation ของ N,N,N,N-tetra methyl-p-phenylenediamine (TMPD) ที่ทำให้ PGG2 เปลี่ยนเป็น PGH2 วิธีการโดยผสม 100 mM tris-HCl buffer, pH 8.0, 15 μ M hematin และ 3 μ M EDTA, 100 μ g CoX-2 enzyme และสารที่ทำการทดสอบเก็บที่ ๒๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที หลังจากนั้นเติม arachidonic acid และ TMPD วัด enzyme activity จากการเกิด TMPD oxidation ใน ๒๕ นาทีแรก โดยวัดที่ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น ๖๐๓ นาโนเมตรคำนวณเปรียบเทียบกับที่ไม่เติมสารสกัด คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และ IC₅₀

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย^{๑๑} ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในครั้งนี้ ใช้เชื้อทั้งหมด ๖ ชนิด (ATCC-registered strains) ได้แก่ แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhi* ATCC 13311, *S. dysenteriae* ATCC 13313) แบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633) ในการทดลองครั้งนี้ยามาตรฐาน คือ Norfloxacin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Tetracycline ๓๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Ampicillin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Gentamycin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์จะใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน ๒๔ ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้เชื้อปริมาณ ๑๐^๘- ๑๐^๙ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เริ่มโดยเชื้อโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ ๒๔ ชั่วโมง ประมาณ ๒ - ๓ โคโลนีนำมาใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ ๕ มิลลิลิตร นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๒ ชั่วโมง แล้วนำมาเจือจางให้ได้แบคทีเรียความเข้มข้นประมาณ ๑๐^๘- ๑๐^๙ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเทียบกับ McFarland's standard No. 0.5 ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar, MHA (oxoid, England) แล้วนำแผ่น paper disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง ๖ มิลลิเมตร) ชุบสารสกัดความเข้มข้น ๑ ไมโครกรัม/แผ่น วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพาะเลี้ยงที่ ๓๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๘ ชั่วโมง แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น disc ด้วยไม้บรรทัด แล้วแปรผลตามตารางแปลผล National committee for clinical laboratory standards (NCCLS/CLSI) สารสกัดที่ให้ inhibition zone มากกว่า ๖ มิลลิเมตร จะนำไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เชื้อจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration; MIC) ต่อไป การทดสอบหาค่า MIC ทำโดยวิธี resazurin microtiter assay plate method^{๑๒} โดยเจือจางสารสกัดในอาหารเหลว (microdilution) แบบลำดับสอง (2-fold serial dilution) ใน microtiter plate ประมาณ ๑๐ ความเข้มข้นๆ ละ ๓ ซ้ำ ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ คือ ๑,๐๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้ว (bacterial suspension) ลงไปทุกหลุม (96 well plate) นำไปเพาะเลี้ยงที่ ๓๕ องศาเซลเซียส นาน ๑๘ ชั่วโมง แล้วจึงวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของ resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide) ถ้าเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นสีชมพู จะแปลผลได้ว่ามีเชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิต (cell viability)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

เชื้อที่ทดสอบ ได้แก่ *C. albicans* (ATCC 90028) ทำการทดสอบแบบ disc diffusion และหาค่า MIC เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ Sabouraud's agar (SDA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้ยามาตรฐานคือ Amphotericin B ๑๐ ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

ในแต่ละการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และในแต่ละตัวทำละลาย รวมทั้งน้ำหนักของสารตัวอย่างที่แตกต่างกัน จะทำการทดสอบ ๓ ครั้ง (3n) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง IC₅₀ ด้วยโปรแกรม prism และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และคำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕) ด้วย independent t-test โปรแกรม SPSS

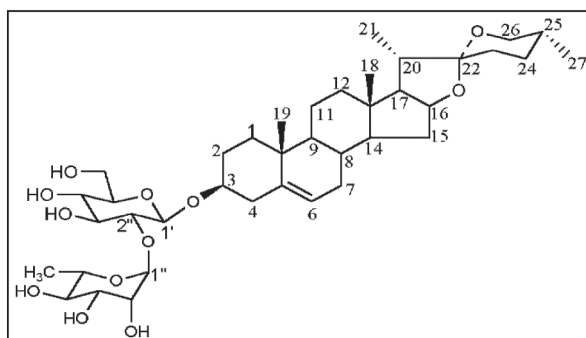
ผลการศึกษา

ผลการแยกสกัดสารด้วยวิธี bioassay guided fractionation และผลการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค chromatography technique

น้ำหนักสารสกัดแห้งและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักสมุนไพรแห้ง (%yield) แสดงผลในตารางที่ ๑ ตามลำดับ ดังนี้ ร้อยละ ๑๑.๓ (๑๑๑.๓๔ กรัม) ร้อยละ ๐.๖๓ (๐.๖๑๔ กรัม) ร้อยละ ๒.๘๕ (๑.๖๑๕ กรัม) ร้อยละ ๔.๗๗ (๔.๗๗ กรัม) และร้อยละ ๕๐.๐๒ (๑๐.๖๔๖ กรัม) ตามลำดับ โดยให้รหัสสารดังนี้ DBE (95% Ethanol extract), DB-Fr1 (Hexane : CHCl₃ , 2:8), DB-Fr2 (CHCl₃), DB-Fr3 (CHCl₃ : MeOH, 8:2), DB-Fr4 (CHCl₃ : MeOH, 1:1) โดย fraction ที่มี %yield เรียงลำดับจากมากไปน้อย, DB-Fr4, DB-Fr3 และ DB-Fr2 ตามลำดับ จากการ

พิจารณา DB-Fr4 และ DB-Fr2 มีน้ำหนักสารสกัดสูงสุด มีความเหมาะสมเบื้องต้นในการแยกเป็นสารบริสุทธิ์ต่อไป จากการแยกสารสกัด DB-Fr4 และ DB-Fr2 พบว่า ได้สารสกัดบริสุทธิ์ DB-FR4-P1 จาก DB-Fr4 และได้สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1, DB-Fr2-P2 จาก DB-Fr2 โดย DB-FR4-P1 มีน้ำหนัก

สารบริสุทธิ์ เท่ากับ ๙ มิลลิกรัม (%w/w) และ DB-FR2-P1 มีน้ำหนักสารบริสุทธิ์ เท่ากับ ๑๐ มิลลิกรัม (%w/w) DB-FR2-P2 มีน้ำหนักสารบริสุทธิ์ เท่ากับ ๘ มิลลิกรัม (%w/w) สาร DB-FR4-P1 เมื่อถูก identify ด้วยการใช้ ^1H NMR, ^{13}C NMR และการเทียบกับ authentic sample^๔ สรุปว่าเป็นสารที่มีสูตร ดังรูปที่ ๑ และตารางที่ ๒



รูปที่ ๑ แสดง Diosgenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D glucopyranoside (DB-FR4-P1)

ตารางที่ ๑ แสดงผลการแยกสารสกัดด้วยวิธี bioassay guided fractionation

สมุนไพร	%yield และน้ำหนักหลังสกัด
DBE (95% Ethanol extract)	ร้อยละ ๑๑.๓ (๑๑๑.๓๔ กรัม)
DB-Fr1 (Hexane : CHCl_3 , 2:8)	ร้อยละ ๐.๖๓ (๐.๖๑๔ กรัม)
DB-Fr2 (CHCl_3)	ร้อยละ ๒.๘๕ (๑.๖๑๕ กรัม)
DB-Fr3 (CHCl_3 : MeOH, 8:2)	ร้อยละ ๙.๗๗ (๔.๗๗ กรัม)
DB-Fr4 (CHCl_3 : MeOH, 1:1)	ร้อยละ ๕๐.๐๒ (๑๐.๖๔๖ กรัม)

ตารางที่ ๒ แสดงผลการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค chromatography technique

สมุนไพร	น้ำหนักสารบริสุทธิ์ (%w/w)
สารบริสุทธิ์ DB-FR4-P1 (แยกจาก DB-FR4)	๙ มิลลิกรัม
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1 (แยกจาก DB-FR2)	๑๐ มิลลิกรัม
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2 (แยกจาก DB-FR2)	๘ มิลลิกรัม

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพร ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ (COX-2 inhibitor) สารสกัดขึ้นแอลกอฮอล์ (95% EtOH) และสารสกัดที่แยกชั้นได้ด้วยตัวทำละลายตามหลักการแยกสารด้วยวิธี bioassay guided fractionation ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบตามวิธีของ Copeland^๔ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส-ทู (COX-2 inhibitor) ให้ผลแสดงดังตารางที่ ๓ พบว่า มีฤทธิ์ COX-2 inhibitor ตามลำดับดังนี้ สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 หรือยับยั้งกระบวนการผลิต prostaglandin โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.80 ± 0.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด DB-Fr2 มีค่ารองลงมาโดยมี

ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.02 ± 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด DB-Fr3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.86 ± 0.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.075 ± 0.47 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด DB-Fr1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.04 ± 0.23 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด DB-Fr4 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.23 ± 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1 ที่แยกได้สารสกัดชั้น DB-Fr4 (CHCl₃ : MeOH, 1:1) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.11 ± 0.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดหยาบ DBE มีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.35 ± 0.01 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่ indomethacin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1 ± 0.02 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ ๓ แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดจากสมุนไพรหัวข้าวเย็น (inhibitory effect on PGE₂ production) IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) $\pm$ SEM

สารสกัดสมุนไพร และสารมาตรฐาน	Anti-inflammatory activity (COX-2 inhibitor) (Mean $\pm$ SEM) IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
Indomethacin	$1 \pm 0.02^{**}$
สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1	$28.11 \pm 0.15^{**}$
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1	$10.075 \pm 0.47^{**}$
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2	$11.04 \pm 0.23^{**}$
DBE	17.23 ± 0.1
DB-Fr1	$11.04 \pm 0.23^{**}$
DB-Fr2	$4.80 \pm 0.05^{**}$
DB-Fr3	$6.86 \pm 0.04^{**}$
DB-Fr4	$17.23 \pm 0.1^{**}$

** ค่าที่ < 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ ๙๕ ระหว่างสารสกัดสมุนไพรและสารมาตรฐาน indomethacin

* คือ ผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ COX-2 inhibitor ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานคือ indomethacin

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antibacterial and antifungal activities)

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในครั้งนี้ใช้เชื้อทั้งหมด ๖ ชนิด (แบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวก) ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ ๔, ๕ และรูปที่ ๒ คือ สารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่างไม่มีฤทธิ์ต่อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ (*P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *S. typhi*, *E. coli*) ผลการศึกษานของแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. subtilis*) พบว่า มีสารสกัด ๖ ตัวอย่าง จากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง ที่

มีฤทธิ์ต่อ *S. aureus* แต่ไม่เท่ากับยามาตรฐาน (Norfloxacin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Tetracycline ๓๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Ampicillin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Gentamycin ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คือสารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 8 ± 0.05 มิลลิเมตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 7 ± 0.40 มิลลิเมตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 8 ± 0.70 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบ DBE มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 8 ± 0.10 มิลลิเมตร สารสกัด DB-Fr2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 8 ± 0.70 มิลลิเมตร

และ สารสกัด DB-Fr3 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเท่ากับ 8 ± 0.15 มิลลิเมตร สารสกัด ๖ ตัวอย่างจากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต่อ *B. subtilis* แต่ไม่เท่ากับยามาตรฐาน คือ สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 7 ± 0.10 มิลลิเมตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1 เท่ากับ 8 ± 0.23 มิลลิเมตร สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 7 ± 0.44 มิลลิเมตร สารสกัดหยาบ DBE มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 7 ± 0.14 มิลลิเมตร สารสกัด DB-Fr2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 8 ± 0.23 มิลลิเมตร และ สารสกัด DB-Fr3 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 7 ± 0.47 มิลลิเมตร และต่อเชื้อ *C. albicans* ผลวิจัย

พบว่า มีเพียงสารสกัด ๒ ตัวอย่างจากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต่อ *C. albicans* แต่ไม่เท่ากับ ยามาตรฐาน คือ Amphotericin B ๑๐ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ที่มีค่า เท่ากับ ๒๑ มิลลิเมตร โดยมีค่า minimum inhibitory concentrations (MIC = ๑ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร) ดัง รายละเอียดตามตารางที่ ๕ คือ สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 10 ± 0.17 , MIC = ๑๒.๕ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร และสารสกัด DB-Fr4 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 10 ± 0.54 , MIC = ๑๒.๕ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร

ตารางที่ ๕ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหัวข้าวเย็น (inhibition diameter, mm $\pm$ SD และ minimum inhibitory concentrations (MIC, μ g/ml.)

สารสกัดและสารบริสุทธิ์	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
DBE	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	8 ± 0.10 MIC> 5mg/ml.	7 ± 0.14 MIC> 5mg/ml.
DB-Fr1	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
DB-Fr2	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	8 ± 0.10 MIC> 5mg/ml.	8 ± 0.23 MIC> 5mg/ml.
DB-Fr3	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	8 ± 0.14 MIC> 5mg/ml.	7 ± 0.47 MIC> 5mg/ml.
DB-Fr4	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
DB-Fr4-P1	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	10 ± 0.17 MIC> 5mg/ml.	7 ± 0.10 MIC> 5mg/ml.
DB-Fr2-P1	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	7 ± 0.40 MIC> 5mg/ml.	8 ± 0.23 MIC> 5mg/ml.
DB-Fr2-P2	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	8 ± 0.10 MIC> 5mg/ml.	7 ± 0.44 MIC> 5mg/ml.
Norfloxacin 10 μ g/ml	NT	NT	NT	๒๓	๓๗	๓๕
Tetracycline 30 μ g/ml	NT	NT	NT	๓๐	๓๗	๒๗
Ampicillin 10 μ g/ml	NT	NT	NT	๓๑	๓๕	๑๕
Gentamycin 10 μ g/ml	NT	NT	NT	๒๕	๓๓	๒๓

^aขนาดของ diameter น้อยกว่า ๖ มิลลิเมตรซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

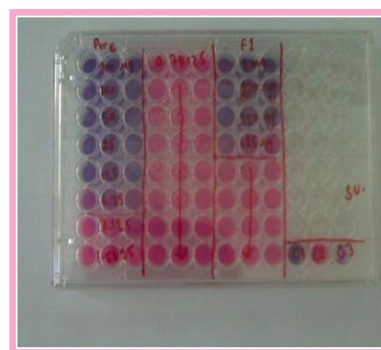
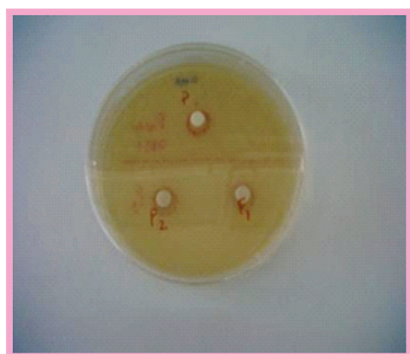
สารสกัดที่ให้ inhibition zone > ๖ มิลลิเมตร จะนำไปทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration

ตารางที่ ๕ แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหัวข้าวเย็น (inhibition diameter, mm $\pm$ SD และ minimum inhibitory concentrations (MIC, μ g/ml.)

สารสกัด	C. albicans (Inhibition diameter, mm $\pm$ SD)
สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1	๑๐ $\pm$ ๐.๑๗, MIC = ๑๒.๕ μ g/ml.
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P1	- ^a
สารบริสุทธิ์ DB-Fr2-P2	- ^a
DBE	- ^a
DB-Fr1	- ^a
DB-Fr2	- ^a
DB-Fr3	- ^a
DB-Fr4	๑๐ $\pm$ ๐.๕๘ , MIC = ๑๒๕ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร
Amphotericin B10 μ g/ml	๒๑, MIC = ๑ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร

^aขนาดของ diameter น้อยกว่า ๖ มิลลิเมตรซึ่งถือว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา

สารสกัดที่ให้ Inhibition zone > ๖ มิลลิเมตรจะนำไปทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration



รูปที่ ๒ แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* (ซ้าย) และการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารที่ต้านเชื้อ *Candida albicans* (ขวา)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

จากองค์ความรู้แพทย์แผนไทยในการใช้หัวข้าวเย็น สมุนไพรหัวข้าวเย็นถูกนำไปใช้ในการรักษาโรคหลายระบบของร่างกาย หลายกลุ่มอาการ แต่ที่พบใช้บ่อยมากคือการอักเสบ ลดปวดในร่างกาย มะเร็ง ใช้ หนองฝี แผลเน่า เปื่อยพุพอง อ่อนเพลีย ปวดบวม ท้องโต ตับโต โดยเฉพาะโรคทางระบบสืบพันธุ์ เช่น ระบุขาว กามโรค ลดปวด สำหรับหญิงอยู่ไฟหลังคลอดบุตร^{๔๔} พบว่า มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ กล่าวคือสารสกัดจากหัวข้าวเย็น สายพันธุ์ *D. birmanica* สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไซโคออกซิจีเนส-ทู (COX-2 inhibitor) ได้ผลดี จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า สารสกัด DB-Fr2-P1 มีฤทธิ์ที่ดียิ่งที่สุดคือ IC₅₀ เท่ากับ

๔.๘๐ $\pm$ ๐.๐๕ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร รองลงมาคือ สารสกัด DB-Fr2 มี IC₅₀ เท่ากับ ๕.๐๒ $\pm$ ๐.๓๑ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร และ สารสกัด DB-Fr3 มี IC₅₀ เท่ากับ ๖.๙๖ $\pm$ ๐.๐๔ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ทั้ง ๓ ค่า นี้ มีค่าใกล้เคียงกับ indomethacin ที่มีค่า IC₅₀ เท่ากับ ๑.๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิเมตร จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า IC₅₀ ของสารสกัด DB-Fr2 และ DB-Fr4 มีค่าต่ำกว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งสามารถพบได้ในงานวิจัยด้านสมุนไพรที่ฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดหยาบ จะให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีกว่าสารสกัดบริสุทธิ์ และเมื่อพิจารณาถึงรายงานวิจัยของ Jaiaree^{๔๕} ถึงฤทธิ์ต้านอื่นๆ ของสมุนไพรหัวข้าวเย็น (ในสารสกัดชั้นเดียวกัน) ที่สามารถนำมาประกอบ

ในการรักษาโรคอีกมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (nitric oxide) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH method) ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (SRB assay) ที่พบว่า สารสกัดขึ้นเอทานอล (ethanol) ของหัวข้าวเย็น ชนิด *D. birmanica* มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ปอดชนิด A 549 และ COR-L23 ($IC_{50} = 7.45 \pm 0.31$ และ 8.71 ± 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่ไม่มีพิษต่อเซลล์ปกติของปอด ชนิด MRC-5 ($IC_{50} = 9.73 \pm 0.15$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และยังพบฤทธิ์ที่สนับสนุนให้การรักษากลุ่มอาการต่างๆ ดีขึ้นอีก เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $EC_{50} = 9.35 \pm 0.62$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วยวิธีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ของสารสกัดขึ้นคลอโรฟอร์มมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.81 ± 0.15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไม่มีพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ($IC_{50} > 100$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ฤทธิ์ต้านเชื้อพบว่า สารสกัดขึ้นเอทานอลมีฤทธิ์ต่อแบคทีเรีย *S. aureus* โดยมีค่า MIC = 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นทำให้สรุปว่าสารสกัดขึ้นเอทานอล ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วยการออกฤทธิ์ผ่านทางไนตริกออกไซด์มากกว่าฤทธิ์ต้านการอักเสบเฉียบพลัน คือ ผ่าน COX-2 inhibitor แต่อย่างไรก็ตามสารสำคัญคือ สารสกัด DB-Fr4-P1 ซึ่งรัฐสูตรโครงสร้างแล้วว่าเป็น Diosgenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside และออกฤทธิ์ผ่าน COX-2 inhibitor โดยมีค่า $IC_{50} = 29.11$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างผลการศึกษานี้ และองค์ความรู้แพทย์แผนไทยในการใช้หัวข้าวเย็น รักษาอาการติดเชื้อ วิเคราะห์ได้ดังนี้ สารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ต่อ *P. aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสจะมีการติดเชื้อมัคนักที่ภูมิคุ้มกันต่ำหรือป่วยมากๆ^{๑๑} สารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ต่อ *S. dysenteriae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มก่อโรคทางเดินอาหารชนิดหนึ่งโดยเฉพาะโรคท้องร่วงที่ส่งผ่านจากคนสู่คนได้โดยไม่ตั้งใจ^{๑๒} สารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ต่อ *S. typhi* ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อยหรือไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever, enteric fever) และโรคไข้รากสาดเทียม (paratyphoid) ในคน^{๑๓, ๑๔} สารสกัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ไม่มีฤทธิ์ต่อ *E. coli* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบ่อยมาก และเป็นเชื้อก่อโรคระบบทางเดินอาหาร^{๑๕} วิเคราะห์ได้ว่า สารสกัดจากหัวข้าวเย็นในงานวิจัยครั้งนี้ ไม่มีผลยับยั้งเชื้อกลุ่มโรคทางเดินอาหารที่ก่ออาการถ่ายเหลวจากการติดเชื้อโรคกลุ่ม *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* และ *S. dysenteriae* ซึ่งตรงกับองค์ความรู้ของแพทย์แผนไทย ที่ไม่นิยมใช้หัวข้าวเย็นเพื่อการรักษาท้องเสียที่เกิดจากพฤติกรรมกินอาหารบูดเสีย

สารสกัด ๖ ตัวอย่างจากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต่อ *S. aureus* แต่ไม่เท่ากับยามาตรฐาน จากผลวิจัยวิเคราะห์ได้ว่า สารสกัดจากหัวข้าวเย็นในงานวิจัยครั้งนี้ มีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการที่แพทย์แผนไทยใช้มากคือ กลุ่มอาการผื่นองที่ผิวหนัง (ระบบผิวหนัง) คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย (ระบบทางเดินอาหาร) ซึ่งปรกติ *S. aureus* เป็นสาเหตุหนึ่งของกลุ่มอาการดังกล่าว สารสกัด ๖ ตัวอย่างจากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง มีฤทธิ์ต่อ *B. subtilis* แต่ไม่เท่ากับยามาตรฐาน ซึ่งปรกติ *B. subtilis* ไม่ก่อให้เกิดโรคโดยตรง ยกเว้นในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ดังนั้น สารสกัดจากหัวข้าวเย็นในงานวิจัยครั้งนี้ มีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการที่แพทย์แผนไทยใช้มากคือ ผู้ป่วยอ่อนเพลียมาก *C. albicans* จัดเป็นยีสต์ที่สามารถก่อโรคตามส่วนต่างๆ ของร่างกายหลายส่วนด้วยกันคือ การติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือกในช่องปากและลำคอ บริเวณช่องคลอด บริเวณผิวหนัง^{๑๖, ๑๗} ผลวิจัยพบว่ามีสารสกัด ๒ ตัวอย่างจากสารสกัดทั้ง ๘ ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ต่อ *C. albicans* แต่ไม่เท่ากับยามาตรฐานคือ Amphotericin B ที่มีค่าเท่ากับ ๒๑ มิลลิเมตร โดยมีค่า MIC = ๑ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คือ สารบริสุทธิ์ DB-Fr4-P1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 10 ± 0.67 , MIC = ๑๒.๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ สารสกัด DB-Fr4 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 10 ± 0.๕๘ , MIC = ๑๒.๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลวิจัยวิเคราะห์ได้ว่า สารสกัด ๒ ตัวอย่าง จากหัวข้าวเย็นในงานวิจัยครั้งนี้ มีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการที่แพทย์แผนไทยใช้มาก คือ โรคทางระบบสืบพันธุ์ในสตรี เช่น ตกขาว มีกลิ่นเหม็น โดยเฉพาะในคัมภีร์มัจฉาภิขันธ์ิกา ที่มีการใช้หัวข้าวเย็นในกลุ่มอาการตกขาว มีกลิ่น ร่วมกับปวดท้องน้อย^{๑๘} และยังสัมพันธ์กับการใช้หัวข้าวเย็นรักษาข้างคือ การมีฝ้าขาวที่ปาก ลิ้น กระพุ้งแก้ม หรือเหลืองอ่อน ในคัมภีร์ปฐมจินดา^{๑๙} และการรักษาฝีต่างๆ ในคัมภีร์ทิพมาลา และในพระคัมภีร์วิสุทธิกฐโรค เช่น เรือนบอน เรือนมูลน^{๒๐, ๒๑} ซึ่งในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *C. albicans* เป็นสาเหตุหนึ่งของทั้ง ๓ กลุ่มอาการ

ข้อเสนอแนะ

ควรวิจัยต่อยอดเรื่องเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในสารสกัดขึ้นคลอโรฟอร์ม ที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคออกซีจีเนส-ทู (COX-2 inhibitor) ควรทำการทดสอบฤทธิ์ TNF- α (tumor necrosis factor) การวิจัยเพื่อสร้างลายพิมพ์นิ้วมือของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคออกซีจีเนส-ทู (COX-2 inhibitor) สำหรับใช้เป็น

ข้อมูลสำคัญในการทดสอบทางคลินิก และการพัฒนายา โดยเฉพาะการหายาทดแทนกลุ่มยาลดการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non-steroidal-antiinflammatory-drugs;NSAIDs)

ปรกติผลการรักษาของยา NSAIDs นั้นมาจากการยับยั้ง COX-2 แต่ยา NSAIDs ก็มีผลยับยั้ง COX-1 เช่นเดียวกัน ยา NSAIDs จึงมีผลต่อภาวะสรีรวิทยาของร่างกายด้วย โดยเฉพาะที่ระบบทางเดินอาหาร ไต การทำงานของเกล็ดเลือด เพื่อลดอาการข้างเคียงดังกล่าวจึงมีการผลิตยาที่มีคุณสมบัติที่เฉพาะเจาะจง กับ COX-2 มากกว่า COX-1 ที่เรียกว่า COX-2 inhibitors ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบทางเดินอาหารน้อยกว่า traditional NSAIDs จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สมุนไพรหัวข่าเย็นมีฤทธิ์ต้านการอักเสบผ่านกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาในกลุ่ม COX-2 inhibitors นอกจากฤทธิ์ต้านการอักเสบแล้ว ฤทธิ์ด้านเชื้อราก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการพัฒนายารักษาเชื้อราต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔ ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งการสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่ ตลอดจนเครื่องมือวิจัย และทางผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ที่กำลังพัฒนาและสนับสนุนการใช้พืชสมุนไพร

เอกสารอ้างอิง

- โครงการอนุรักษ์มรดกไทย สถาบันภาษาไทย. ตำราแพทยศาสตร์สงเคราะห์ ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวัฒนธรรมของชาติ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว; ๒๕๕๒.
- กองประกอบโรคศิลปะ กรมส่งเสริมสุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข. การใช้ยาเฉพาะโรค จากตำราการแพทย์แผนโบราณ สาขาเวชกรรม ๒:๒๕๔๒;๑๔๐.
- Itharat A, Supavita T, Jusanit P, Singchagchai P, Subchareon P, Devisad G, et al. Survey of medicinal plants and local folk wisdom in Southern Thailand: case study at Talebun National Parks. Research report of Prince of Songkla University 1999;82:98-115.
- Itharat A. Studies on bioactivity of five Thai medical plants called Hua-Khao-Yen (dissertation). London: King's College University of London; 2002.
- พระธรรมวโรดม. ยาบำบัดโรคผิวหนังจากตำรายากลางบ้าน. กรุงเทพมหานคร: ไบร่บุสำนักพิมพ์; ๒๕๓๖:๑๑๒-๒๐.
- พิศนุประสาทเวช. เวชศึกษาแพทย์ศาสตร์สังเขป เล่ม ๑. พระนคร: ไบร่บุสำนักพิมพ์; ๒๕๓๒.
- Jaiarree N. Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain and Burkill extract and its active ingredients (dissertation). Pathumthani: Thammasat university; 2010.
- Jaiarree N, Itharat A, Kumapava K. Cytotoxic Saponin against lung cancer cells from *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. J Med Assoc Thai 2010;93:192-97.
- Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, et al. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91: 11202-6.
- Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 4th ed: Baltimore: Williams & Wilkins; 1996.
- Coban AY, Darka NT, Fisgin CC, Cihan K, Bilgin A. Akgunes T, et al. The resazurin microplate method for rapid detection of vancomycin resistance in enterococci. J Chemother 2005;17:361.
- LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 1998;19:700-8.
- สุรเกียรติ์ อาชานุกาพ. ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ ๓. กรุงเทพมหานคร: หมอชาวบ้าน; ๒๕๔๔.
- Betley MJ, Miller VL, Mekalanos JJ. Genetics of bacterial enterotoxins. Annu Rev Microbiol 1986;40:577-605.
- Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1983; 2:534-8.
- Odds FC. Morphogenesis in *Candida albicans*. Critical Reviews in Microbiology 1985;12:45-93.

๑๗. เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. โรคภัยจากตำราเวชกรรมแผนไทย มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. ๒๕๕๘;๑-๔๕.
๑๘. วัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม. ตำรายาศิลาจารึก ในวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม. กรุงเทพมหานคร: ๒๓๘๕; ๑๙๓-๒๑๙.
๑๙. มุกดา ต้นชัย. โรคเกี่ยวกับผิวหนังและฝี จากตำราเวชกรรมแผนไทย มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช; ๒๕๕๘;๒๒๕๖-๒๕๖.

Abstract

Anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activities of *Dioscorea birmanica* Prain and Burkill extract and its ingredients Nuanjan Jaiarree, Arunporn Itharat, Sumalee Panthong, Pakakrong Thongdeeying

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Hau-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica* Prain and Burkill) is a herb that was used to treat inflammatory condition, reduce pain, abscess and cancer, etc. The objective of this research was to investigate the anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activities of *D. birmanica* Prain & Burkill extract (DBE) and its ingredients.

Method: Bioassay guided fractionation was used for isolating compounds. The structure elucidation of active ingredients was proven by thin layer chromatography (TLC) and spectrophotometry techniques. Anti-inflammatory activity was test by inhibitory effect on PGE2 production as followed the method of Copeland. Agar diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) was used for antibacterial and antifungal activities.

Result: Four fractions from DBE were isolated using vacuum liquid chromatography (VLC) with ordering polarity of solvents and were coded as DB-Fr1 to DB-Fr4, respectively. The results showed the chloroform : methanol (1:1) fraction of *D. birmanica* Prain & Burkill (DB-Fr4) showed the highest percentage of yield (50.02%, 10.646 g.). All fractions showed anti-inflammatory activity by inhibitory effect on PGE2 production. The antifungal and antibacterial activities were also tested by disc diffusion method. The results showed that the fraction DB-Fr2 (CHCl₃), DB-Fr3 (CHCl₃ : MeOH, 8:2) and DB-Fr1 (Hexane : CHCl₃, 2:8) exhibited high inhibitory effect on PGE2 production (IC₅₀ = 5.02 ± 0.31 µg/ml, 6.96 ± 0.04 µg/ml and 11.04 ± 1.23 µg/ml respectively) (IC₅₀ of indomethacin or positive control as 1 µg/ml). All of extract had no antibacterial activity against gram negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* but showed less antibacterial against gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (clear zone diameter = 7-8 mm.) DB-Fr2-P1, DB-Fr2-P2 and DB-Fr4-P1 were isolated by bioassay guided fractionation and showed the highest inhibitory effect on PGE2 production (IC₅₀ = 4.80 ± 0.05, 10.18 ± 1.47 and 29.11 ± 1.15 µg/ml, respectively). For the antifungal activity, DB-Fr4-P1 showed the highest activity against *Candida albicans* (clear zone was equal to 10 ± 0.17 mm. and MIC value as 12.5 µg/ml). It was compared with the standard antibiotics such as Amphotericin B (MIC=1 µg/ml). It was considered as moderate antifungal activity against *C. albicans*.

Discussion and Conclusion: It can conclude that the results on antiinflammatory and antimicrobial activities of Hua-Khao-Yen (*Dioscorea birmanica*) related with the local wisdom using as inflammatory condition such as abscess, cancer and vagina discharge.

Key words: *Dioscorea birmanica* Prain and Burkill, Anti-inflammation, Antimicrobial activity