การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่

COMPARISION OF EXTRACTION AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF TURMERIC EXTRACTED BY COCONUT OIL ACCORDING TO THAI TRADITIONAL MEDICINE AND MODERN METHOD

เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่

เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

COMPARISION OF EXTRACTION AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF TURMERIC EXTRACTED BY COCONUT OIL ACCORDING TO THAI TRADITIONAL MEDICINE AND MODERN METHOD

KETWARAPORN WONGPIM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว
ตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่

ของ

เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

..... ประธาน
()

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย)

ชื่อเรื่อง	การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่
ผู้วิจัย	เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การเปรียบเทียบปริมาณเคอร์คิวมินและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ วิธีการศึกษา เตรียมสารสกัดขมิ้นชันโดยนำขมิ้นชันไปทอดในน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม โดยทอดนาน 3 และ 4 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดตามวิธีการสมัยใหม่ โดยทอดขมิ้นชันนาน 35, 40 และ 45 นาที แล้วนำสารสกัดขมันชันที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมิน ด้วย UV-Vis spectrophotometry แล้วเลือกวิธีการสกัดที่มีปริมาณสารเคอร์คิวมากที่สุด นำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ด้วย HPLC และศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี COX-2 inhibition assay และ NOS inhibition assay ผลการศึกษา การวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry พบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวนาน 35 นาที, 40 นาที, 45 นาที ซึ่งเป็นวิธีการสมัยใหม่ มีปริมาณสารเคอร์คิวมินน้อยกว่าวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม โดยวิธีสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณสารเคอดร์คิวมินเฉลี่ยมากที่สุด (0.400 ± 0.014%w/v) และผลการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ด้วย HPLC พบว่า วิธีการสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวนาน 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยของ ปริมาณสารเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน บิสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน เท่ากับ 0.048 ± 0.002 %w/w, 0.014 ± 0.005 %w/w และ 0.007 ± 0.001 %w/w ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที สำหรับฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) และ nitric oxide synthase (NOS) ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 (60.115 ± 3.215 %) และ NOS (93.708 ± 0.340 %) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที สรุปผลการศึกษา วิธีการสกัดขมิ้นชันด้วยการทอดในน้ำมันมะพร้าวนาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิประมาณ 160 °C ซึ่งเป็นวิธีตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม มีปริมาณเฉลี่ยของสารเคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NOS มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว นาน 45 นาที ซึ่งเตรียมตามวิธีสมัยใหม่

คำสำคัญ : ขมิ้นชัน, เคอร์คิวมิน, น้ำมันมะพร้าว, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ไซโคลออกซิจีเนส-2, ไนตริก ออกไซด์ ซินเทส

Title	COMPARISION OF EXTRACTION AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF TURMERIC EXTRACTED BY COCONUT OIL ACCORDING TO THAI TRADITIONAL MEDICINE AND MODERN METHOD
Author	KETWARAPORN WONGPIM
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Sarin Tadtong

Objective: The purpose of this study is to compare the curcumin content and anti-inflammatory activity of coconut oil-extracted turmeric between Thai traditional and modern extraction method. Materials and Methods: The turmeric extract was prepared by deep-frying turmeric (*Curcuma longa* L.) in coconut oil for three to four hours, according to Thai traditional medicine practice. For the modern extraction method, turmeric was deep fried in coconut oil for 35, 40, and 45 minutes. The UV-Vis spectrophotometry was carried out to determine curcumin in the turmeric extract, then selected the highest yield curcumin of each method to detect with HPLC and then evaluate their anti-inflammatory activity using cyclooxygenase-2 (COX-2) and nitric oxide synthase (NOS) inhibitory assays. Results: the average content of curcumin in 35 minutes, 40 minutes, and 45 minutes with the modern method, was less than Thai traditional medicine method. The three-hour turmeric extract exhibited the highest average content of curcumin (0.400 ± 0.014% w/v). For HPLC analysis revealed that the average content of curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin in the 3-hours turmeric extract were 0.048 ± 0.002, 0.014 ± 0.005 and 0.007 ± 0.001 %w/w respectively, which more than the 45-minute turmeric extract. The anti-inflammatory activity, COX-2 and NOS inhibition of a three-hour turmeric extract indicated higher average %inhibition of COX-2 (60.115 ± 3.215 %) and NOS (93.708 ± 0.340 %) than the 45-minutes turmeric extract. Conclusion: The obtained turmeric extract from deep-frying turmeric in coconut oil for three hours at 160°C, which was the extraction method of Thai traditional medicine practice, yielding a higher average curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin content and anti-inflammatory activity, COX-2, and NOS inhibitory activities than modern extraction method (45 minutes).

Keyword : turmeric, curcumin, coconut oil, anti-inflammatory activity, cyclooxygenase-2, nitric oxide synthase

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความเมตากรุณาช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำแนะนำหรือข้อคิดเห็นที่มีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการปรับแก้ไขข้อบกพร่องจากคณะกรรมการผู้ควบคุมการสอบปริญญานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง เป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและความรู้ทางวิชาการต่าง ๆ มากมาย เอาใจใส่เป็นอย่างดี รวมทั้งคอยให้กำลังใจที่ดีเสมอมา และให้ความช่วยเหลือทุกอย่างอย่างสุดความสามารถ จนปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ และกรรมการบริหารหลักสูตรสาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การช่วยเหลือเป็นอย่างดี ให้คำแนะนำที่ดี ตลอดจนให้กำลังใจอย่างสม่ำเสมอ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัฒนพร พัฒนภักดี ที่ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ HPLC เป็นอย่างดี รวมทั้งศูนย์วิจัยและฝึกอบรมด้านสิ่งแวดล้อม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ HPLC ตลอดจนให้คำแนะนำทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงผ่านไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจอย่างดีสำหรับผู้วิจัยมาโดยตลอด จนปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 2

ความสำคัญของการวิจัย 2

ขอบเขตงานวิจัย 3

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย/กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย 3

ตัวแปรที่ศึกษา 3

นิยามคำศัพท์เฉพาะ 3

กรอบแนวคิดงานวิจัย 4

สมมติฐานในการวิจัย 5

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 6

ตำรับยาแผนไทยสำหรับสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอก 6

ตำรับยาแผนไทยที่ขอขึ้นทะเบียนยาแผนไทยที่น่าสนใจ 6

ตำรับยาแผนไทยตามประกาศฯ บัญชีรายการผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับจดแจ้งที่
สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศ 28

ขมิ้นชัน (Turmeric, *Curcuma longa* L.) 28
ลักษณะทั่วไป 29
ถิ่นกำเนิดและการการกระจายพันธุ์ 29
การใช้ขมิ้นชันตามองค์ความรู้ดั้งเดิม 30
องค์ประกอบทางเคมี 30
สารเคอร์คิวมิน (curcumin) 31
วิธีการสกัดสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม 32
น้ำมันมะพร้าว 33
วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม 35
วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีสมัยใหม่ 35
วิธีการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ 36
การควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชัน 36
เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ 40
การอักเสบ 43
สารสื่อกลางในการอักเสบ (mediator inflammatory) 44
การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสมุนไพร 45
ฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชัน 46
การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ 47
cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition assay 47
nitric oxide synthase (NOS) activity assay 47
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 48
เครื่องมือและสารเคมี 48
การคัดเลือกขมิ้นชัน 49

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม 49
การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีสมัยใหม่ 50
การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมิน ด้วย UV-Vis spectrophotometry 51
การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ 52
การทำ system suitability 52
การเตรียมตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชัน 57
การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ 58
cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition assay 58
nitric oxide synthase (NOS) activity assay 60
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 62
บทที่ 4 63
ผลการศึกษา 63
การคัดเลือกสมุนไพรขมิ้นชัน และการเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรขมิ้นชัน 63
การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม 64
การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีสมัยใหม่ 66
การหาปริมาณสารเคอร์คิวมินในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์ แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry 68
การหาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ ในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์ดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี HPLC 71
การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ 76
การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ NOS ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ 77
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 77

บทที่ 5 85
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 85
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง 85
ข้อเสนอแนะ 88
บรรณานุกรม 89
ภาคผนวก 94
ประวัติผู้เขียน 102

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สรุปการเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ COX-2 inhibition assay 59
ตาราง 2 สรุปการเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ NOS activity assay 61
ตาราง 3 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดเคี่ยวนาน 3 ชั่วโมง 64
ตาราง 4 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดเคี่ยวนาน 4 ชั่วโมง 65
ตาราง 5 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 35 นาที 66
ตาราง 6 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 40 นาที 67
ตาราง 7 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 45 นาที 68
ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ accuracy สำหรับวิธี UV-Vis spectrophotometry 69
ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ precision 70
ตาราง 10 ปริมาณร้อยละของสารเคอร์คิวมินของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 70
ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ accuracy 71
ตาราง 12 ผล % w/w curcumin ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวของทั้ง 2 วิธี 75
ตาราง 13 ผลการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ที่ 420 nm ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 76
ตาราง 14 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NOS ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 77
ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ accuracy สำหรับวิธี UV-Vis spectrophotometry 94
ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 94
ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ resolution, tailing factor, relative standard deviation 96
ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์สมการเชิงเส้น (linearity) 97
ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 98
ตาราง 20 การเปรียบเทียบ peak area ของพีคที่เกิดขึ้นก่อนพีคสาระสำคัญ 101

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างสารสำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชัน 31
ภาพประกอบ 2 กระบวนการอักเสบ 44
ภาพประกอบ 3 Site of action ของสารเคอร์คิวมินในกระบวนการอักเสบ 46
ภาพประกอบ 4 ขมิ้นชัน 63
ภาพประกอบ 5 ชิ้นส่วนขมิ้นชัน 64
ภาพประกอบ 6 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดเคี่ยวในน้ำมันมะพร้าวนาน 3 ชั่วโมง 65
ภาพประกอบ 7 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดเคี่ยวในน้ำมันมะพร้าวนาน 4 ชั่วโมง 66
ภาพประกอบ 8 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 35 นาที 67
ภาพประกอบ 9 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 40 นาที 67
ภาพประกอบ 10 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 45 นาที 68
ภาพประกอบ 11 standard curve of curcumin 69
ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของ mobile phase 72
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมของ methanol 73
ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน A 73
ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน B 73
ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมของสารละลายตัวอย่าง 74
ภาพประกอบ 17 standard curve of curcumin 74
ภาพประกอบ 18 standard curve of desmethoxycurcumin 74
ภาพประกอบ 19 standard curve of bisdesmethoxycumin 75

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันประเทศไทย มีพระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562 (พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562, 2562, 30 เมษายน, 121-164) ซึ่งเป็นกฎหมายที่ควบคุมและกำกับดูแลผลิตภัณฑ์สมุนไพร ส่งเสริมให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรอย่างเป็นระบบครบวงจร รวมทั้งกระบวนการอนุญาตทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สมุนไพร ประกอบด้วยการจดแจ้ง แจ้งรายละเอียด และการขึ้นทะเบียนขึ้นกับข้อมูลของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เกี่ยวกับชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ, 2564, 31 พฤษภาคม, 19-20) พร้อมทั้งแนบบัญชีรายการในรูปแบบมอโนกราฟที่อนุญาตผลิตภัณฑ์สมุนไพรแบบจดแจ้ง พบว่ามีตำรับยาน้ำมันบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอก ซึ่งมีตัวยาไพลขมิ้นชัน และว่านเอ็นเหลือง เป็นตัวยาสำคัญในสูตรตำรับ และจากการดำเนินงานประเมินและรับรองเอกสารประกอบการขึ้นทะเบียนยาแผนไทยของกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก (เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์, 2562, 1-35) พบว่าตำรับยาที่ขอขึ้นทะเบียนยาแผนไทยที่พบมากที่สุด คือ ตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอก ตำรับยาแผนไทยดังกล่าวมีน้ำมันไพล น้ำมันขมิ้นชัน และน้ำมันว่านเอ็นเหลืองในสูตรตำรับ ดังนั้นตำรับยาแผนไทยที่มีส่วนผสมของน้ำมันสมุนไพรเหล่านี้ จึงเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากมีความต้องการในขอขึ้นทะเบียนจำนวนมากและถูกจัดให้เป็นรายการยาสำหรับขอขึ้นทะเบียนแบบจดแจ้งได้ ซึ่งผู้วิจัยสนใจการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ซึ่งเป็นการสกัดสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

ตามประกาศฯ ของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ, 2564, 31 พฤษภาคม, 19-20) ระบุวิธีการเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน ดังนี้ ทอดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว จนขมิ้นชันแห้งกรอบเป็นสีน้ำตาล แล้วตัดกากขมิ้นชันออก นำน้ำมันขมิ้นชันไปใช้ ซึ่งวิธีการทอดขมิ้นชันที่พบในประกาศกระทรวงฯ ฉบับดังกล่าวเป็นวิธีการสมัยใหม่ แต่กรรมวิธีการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม (กลุ่มงานสนับสนุนการขึ้นทะเบียนยา, 2564) เป็นการทอดเคี่ยวขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว เป็นระยะเวลา 3-4 ชั่วโมง ก่อนนำน้ำมันขมิ้นชันไปใช้ ดังนั้น

กรรมวิธีการสกัดน้ำมันขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการสมัยใหม่ จึงมีความแตกต่างจากกรรมวิธีการสกัดน้ำมันขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม นอกจากนี้จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่พบข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ได้จากสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่ จึงไม่มั่นใจในประสิทธิภาพและความปลอดภัยของน้ำมันขมิ้นชันที่เตรียมตามวิธีที่กล่าวมา

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิมกับวิธีสมัยใหม่ และเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันที่ได้ หากเปรียบเทียบทั้งสองวิธีแล้วไม่แตกต่างกัน สามารถใช้วิธีการเตรียมน้ำมันขมิ้นชันที่เตรียมตามวิธีสมัยใหม่แทนวิธีการตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิมได้นั้น จะช่วยลดระยะเวลา ลดการใช้สารเคมี และลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ และเป็นการนำองค์ความรู้ด้านการแพทย์แผนไทยมาต่อยอดใช้ในเชิงพาณิชย์เพิ่มมากขึ้น เพิ่มมูลค่าของสมุนไพรไทย และสร้างความเชื่อมั่นในการใช้สมุนไพรไทยเพิ่มมากขึ้น

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin) ที่ได้จากวิธีสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมกับวิธีสมัยใหม่

2. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (COX-2 inhibition assay, และ NOS activity assay) ของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว วิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมกับวิธีสมัยใหม่

ความสำคัญของการวิจัย

ขมิ้นชันมีสารสำคัญเป็นกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ เป็นองค์ประกอบหลัก ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย มีการใช้ขมิ้นชันในตำรับยาแผนไทยจำนวนมาก โดยพบว่ามีการใช้สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ตำรับยาบรรเทาอาการแมลงกัดต่อย ตำรับยาโรคผิวหนัง สำหรับรูปแบบยาใช้ภายนอก เป็นต้น เตรียมโดยนำขมิ้นชันไปทอดเคี่ยวในน้ำมันมะพร้าว นาน 3-4 ชั่วโมง วิธีดังกล่าวเป็นกรรมวิธีการผลิตสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามองค์ความรู้

การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม แต่กรรมวิธีการผลิตสารสกัดขมิ้นชันตามวิธีสมัยใหม่ ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศฯ นั้น กรรมวิธีการผลิตที่แจ้งในรายการบัญชีที่อนุญาตผลิตภัณฑ์สมุนไพรแบบจดแจ้ง ระบุวิธีการทอดขมิ้นชัน คือ ทอดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวจนขมิ้นชันแห้งกรอบ เป็นสีน้ำตาล แล้วตักกากขมิ้นชันออก นำน้ำมันขมิ้นชันไปใช้ ซึ่งพบว่ากรรมวิธีการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันทั้งสองวิธีที่แตกต่างกันที่ระยะเวลาที่ใช้ในการเคี่ยวขมิ้นชัน หากทั้งสองวิธีนี้มีปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ในการต้านการอักเสบไม่แตกต่างกัน สามารถใช้แทนกันได้ จะทำให้ลดระยะเวลาในการผลิตยา ช่วยลดต้นทุนแก่ผู้ประกอบยาแผนโบราณ และยังส่งเสริมภูมิปัญญาดั้งเดิมของการแพทย์แผนไทยให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เชิงพานิชย์ได้

ขอบเขตงานวิจัย

ประชากรที่ใช้ในการวิจัย/กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ตามกรรมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่

ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรอิสระ

    1.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการทอด 35, 40, 45 นาที 3 และ 4 ชั่วโมง

2. ตัวแปรควบคุม

    2.1 ขนาดชิ้นส่วนเหง้าขมิ้นชัน

    2.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทอด

3. ตัวแปรตาม

    3.1 ปริมาณสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin) ที่ได้จากวิธีสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมกับวิธีสมัยใหม่

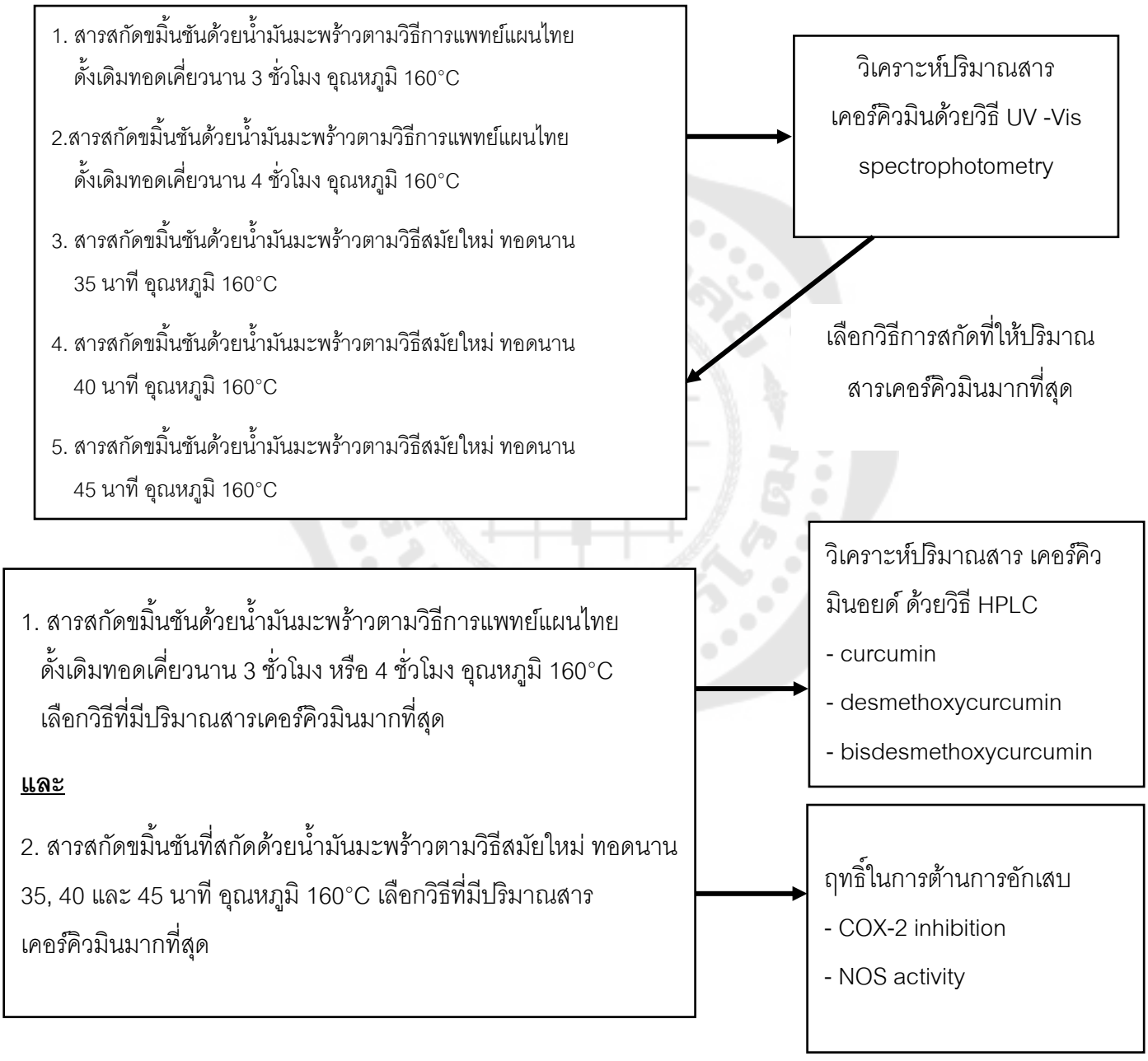
    3.2 ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (COX-2 inhibition assay และ NOS activity assay) ของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว ตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมกับวิธีสมัยใหม่

นิยามคำศัพท์เฉพาะ

สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม หมายถึง การทอดเหง้าขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว นาน 3-4 ชั่วโมง กรองเอากากขมิ้นชันออกแล้วนำน้ำมันขมิ้นชันไปใช้ เป็นวิธีตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีสมัยใหม่ หมายถึง การทอดเหง้าขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว จนขมิ้นชันมีสีน้ำตาล กรองกากขมิ้นชันออกแล้วนำน้ำมันขมิ้นชันไปใช้ ซึ่งเป็นวิธีตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยารับรองสำหรับประกอบการขออนุญาตแบบจดแจ้ง

กรอบแนวคิดงานวิจัย



สมมติฐานในการวิจัย

H_0= สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมเคี่ยวนาน 3 หรือ 4 ชั่วโมง และสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีสมัยใหม่มีปริมาณ curcuminoids ไม่แตกต่างกัน

H_1= สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมเคี่ยวนาน 3 หรือ 4 ชั่วโมง และสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีสมัยใหม่มีปริมาณ curcuminoids แตกต่างกัน

H_0= สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมเคี่ยวนาน 3 หรือ 4 ชั่วโมง และสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีสมัยใหม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ไม่แตกต่างกัน

H_1= สารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมเคี่ยวนาน 3 หรือ 4 ชั่วโมง และสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวที่สกัดด้วยวิธีสมัยใหม่ฤทธิ์ต้านการอักเสบ แตกต่างกัน

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ตำรับยาแผนไทยสำหรับสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอก
2. ขมิ้นชัน (Turmeric, *Curcuma longa* L.)
3. วิธีการสกัดสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม
4. น้ำมันมะพร้าว
5. วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม
6. วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีสมัยใหม่
7. วิธีการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินและเคอร์คิวมินอยด์
8. การอักเสบ
9. ฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชัน
10. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชัน

ตำรับยาแผนไทยสำหรับสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอก

ตำรับยาแผนไทยที่ขอขึ้นทะเบียนยาแผนไทยที่น่าสนใจ

จากการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับตำรับยาแผนไทยที่ส่งมาประเมินและรับรองเอกสารประกอบการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณด้านประสิทธิผลและความปลอดภัย ณ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก (เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์, 2562, 1-35) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559-2562 นั้น ผลพบว่าตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย รูปแบบยาใช้ภายนอกนั้น มีการขอขึ้นทะเบียนยาแผนไทยจำนวนมากที่สุด จำนวน 140 คำขอฯ จากทั้งหมด 975 คำขอฯ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาข้อมูลของตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ในรูปแบบยาใช้ภายนอก

ตำรับยาแผนไทยตามประกาศฯ บัญชีรายการผลิตภัณฑ์สมุนไพรสำหรับจดแจ้งที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประกาศ

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ, 2564, 31 พฤษภาคม, 19-20) เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ซึ่งการผลิตหรือนำเข้าเพื่อขาย ต้องได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับ ใบรับแจ้งรายละเอียดหรือใบรับจดแจ้ง และชื่อ ปริมาณ และเงื่อนไขของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สมุนไพร ลงวันที่ 31 พฤษภาคม 2564 โดยแนบบัญชีรายการยาจากสมุนไพร ประเภทตำรับยาแผนไทยที่มีขมิ้นชันเป็นส่วนประกอบในตำรับ ได้แก่ ตำรับยาน้ำมันบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย สูตร 14 และสูตร 15 สำหรับสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจเกี่ยวกับสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ในรูปแบบยาใช้ภายนอก เนื่องจากพบการใช้ตัวยาขมิ้นชันในตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกายหรือบรรเทาอาการแมลงกัดต่อย และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาได้ประกาศตำรับยาที่มีส่วนผสมของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวสำหรับขอขึ้นทะเบียนแบบจดแจ้ง หากผู้ผลิตสามารถดำเนินการทุกอย่างเรียบร้อยตามที่ระบุไว้ในมอโนกราฟของตำรับยานั้น ๆ สามารถขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาที่กำหนด

ขมิ้นชัน (Turmeric, *Curcuma longa* L.)

ขมิ้นชัน ถูกใช้มาอย่างช้านานในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเริ่มต้นการใช้ในประเทศอินเดีย และมีการใช้มานานกว่า 2,500 ปี โดยแรกเริ่มนั้น ขมิ้นชันถูกใช้เป็นสีย้อม ต่อมาถูกใช้เป็นยาหรือเครื่องเทศ เนื่องจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Bhowmik, Chiranjib, Kumar, Chandira, & B.Jayakar., 2009, 86-108) นอกจากนี้ขมิ้นชัน ยังถูกใช้ในทางการแพทย์แผนไทยมาอย่างช้านาน จะเห็นได้ว่าตำราการแพทย์แผนไทยโบราณดั้งเดิมจำนวนมาก เช่น ตำราโอสถพระนารายณ์ ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ตำราเวชศึกษา คัมภีร์แพทย์แผนโบราณของขุนโสภิตบรรณลักษณ์ เป็นต้น มีการกล่าวถึงการใช้ขมิ้นชันในตำรับยาแผนไทยมากมาย

ขมิ้นชัน หรือที่เรารู้จักกันโดยทั่วไปคือ “Turmeric” หรือ รู้จักกันในชื่อ “Golden spice” หรือ “Spice of life” ขมิ้นชันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae

ชื่อยา: ขมิ้นชัน

ชื่อพ้อง: *Amomum curcuma* Jacq., *Curcuma domestica* Valeton, *Curcuma rotunda* L. (กระทรวงสาธารณสุข, 2552, 121-127)

ชื่ออื่น ขมิ้น, ขมิ้นแกง, ขมิ้นหยอก, ขมิ้นหัว, ขี้มิ้น, หมิ้น, ตายอ, สะยอ, common turmeric, yellow root, curcuma, Indian saffron (Khalandar, Adithya, Basha, & Koshma, 2018, 68-73)

ลักษณะทั่วไป

ลักษณะพืช เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เหง้าหลัก รูปไข่หรือรูปไข่แกมรูปรี แตกแขนงในแนวราบแต่ละแขนงมักแตกย่อยต่อไปได้อีก 1- 2 ครั้ง เหง้าแขนง รูปคล้ายทรงกระบอกหรือคล้ายนิ้วมือ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย เนื้อเหง้าเป็นสีส้มและมีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่มีกาบใบเรียงซ้อนอัดแน่นสูงได้ถึง 1 เมตร หรือมากกว่า มีใบ 6-10 ใบต่อต้น ใบ เป็นใบเดี่ยว เรียงสลับถี่ กาบใบยาว 40-60 เซนติเมตร รูปรีหรือแกมรูปขอบขนาน กว้าง 10-20 เซนติเมตร ยาว 30-70 เซนติเมตร ปลายแหลมถึงเรียวแหลมโคนใบสอบแคบหรือมนขอบเรียบ ช่อดอก แบบช่อเชิงลด ออกตามปลายใบหรือระหว่างกาบใบ ก้านช่อดอกโดดยาว 10-20 เซนติเมตร ช่อดอก รูปทรงกระบอก กว้าง 5-9 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร มีใบประดับจำนวนมาก รูปรีแกมรูปขอบขนานเรียงกันเวียนถี่รอบแกนช่อดอก ใบประดับที่อยู่บริเวณโคนช่อดอกสีเขียวอ่อนหรือสีขาวแกมสีเขียวกว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 5-6 เซนติเมตร ขอบโคนใบประดับประกอบติดกับใบประดับที่อยู่ใกล้เคียงและติดกับแกนช่อดอกเกิดเป็นซอกคล้ายกระเปาะ ใบประดับที่อยู่บริเวณปลายช่อ ดอกสีขาวแกมสีเขียวอ่อน ปลายมีแถบสีเขียวอ่อน โคนไม่ประกบติดกันเป็นกระเปาะ ดอก ออกในซอกกระเปาะใบประดับซอกละ 3-5 ดอก ดอกทยอยบาน กลีบเลี้ยงสีขาวใส โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาว 0.8-1.2 เซนติเมตร ปลายหยักเป็น 3 ซี่ ไม่เท่ากัน กลีบดอกสีขาวโคนติดกันเป็นหลอดยาวได้ถึง 3 เซนติเมตร ปลายผายและแยกออกเป็น 3 แฉก รูปสามเหลี่ยมยาว 1-1.5 เซนติเมตร แฉกกลางใหญ่กว่าปลายเป็นติ่ง เกสรเพศผู้เป็นหมันคล้ายกลีบดอก มี 3 กลีบ กลีบข้างขนาดเล็กกว่ากลีบปาก รูปรีแกมรูปขอบขนาน สีเหลืองอ่อน กลีบปากรูปไข่กลับ ยาว 1.2-2 เซนติเมตร สีเหลืองอ่อน มีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณกลางกลีบ เกสรเพศผู้สมบูรณ์มี 1 อัน ก้านสั้นมาก อับเรณูเล็กเรียว มีจะงอยโอบรอบก้านเกสรเพศเมียที่โคน รังไข่ใต้วงกลีบมี 3 ช่อง ผล กลมหรือรี แต่มักไม่ติดผล เมล็ดมีเยื่อหุ้ม (กระทรวงสาธารณสุข, 2552, 121-127)

ถิ่นกำเนิดและการการกระจายพันธุ์

ขมิ้นชันมีการถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปัจจุบันขมิ้นชันมีเขตการกระจายพันธุ์ทั่วไปในภูมิภาคที่มีอาการศร้อนหรือร้อนชื้นทั่วโลก และประเทศอินเดีย เป็นประเทศที่มีการผลิต การบริโภค และส่งออกขมิ้นชันขนาดใหญ่ที่สุดในโลก (Ashraf, 2017, 672-685)

การใช้ขมิ้นชันตามองค์ความรู้ดั้งเดิม

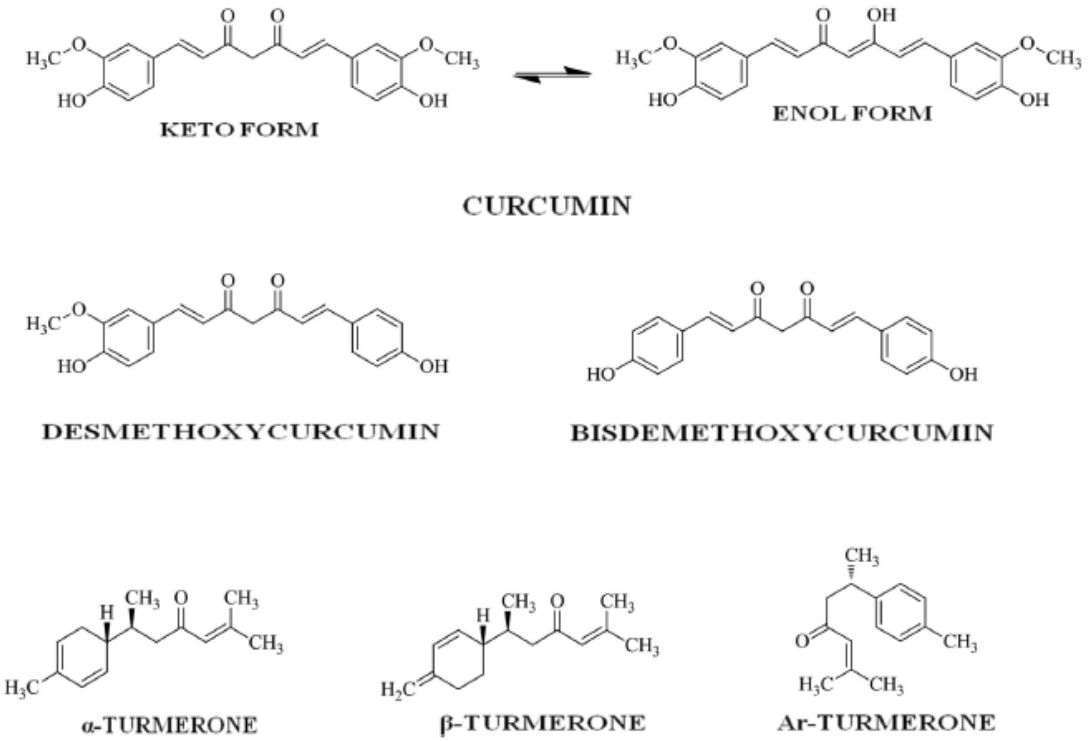
การใช้ขมิ้นชันในระบบการแพทย์อายุรเวท ใช้สำหรับรักษาอาการตาติดเชื้อทั่วไป รวมไปถึงการรักษาแผลโดนกัด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก รักษาสิว อาการทางผิวหนังต่าง ๆ โรคฟัน ระบบการย่อยอาหารต่าง ๆ เช่น ขับลม ท้องอืด ท้องเฟ้อ นอกจากนี้ขมิ้นชันถูกในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำหอมและถูกใช้เป็นสารแต่งสีในอาหารที่ได้จากธรรมชาติ (Ashraf, 2017, 672-685)

การใช้ขมิ้นชันในองค์ความรู้ดั้งเดิมของจีน ขมิ้นชันถูกใช้ในการรักษาอาการปวดท้องไม่สบายท้อง มีส่วนช่วยในการขับลม ช่วยในการย่อยอาหาร (Oommen, 2004, 1327-1338)

ตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย เหง้าขมิ้นชัน มีรสฝาดเอียน มีการกล่าวถึงประโยชน์ของตัวยาขมิ้นชันตามตำราโบราณดั้งเดิม ในคัมภีร์สรรพคุณยา กล่าวว่า “คุณขมิ้นชันขมิ้นอ้อย มีรสเผ็ดร้อน แก้พิศม์โลหิตลม แก้บวมแก้เสมหะ แก้ไข้ทั้งปวง แก้ตัวพยาธิ์กระทำให้คันทั่วสารพางค์ แก้ฝีแล” (กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, 2560, 47) และจากสารานุกรมสมุนไพร (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540, 124) มีการกล่าวถึงการนำขมิ้นชันมาใช้เป็นยา ดังนี้ นำผงขมิ้นชัน มาเคี่ยวกับน้ำมันพืช ทำน้ำมันใส่แผลสด นอกจากนี้มีการใช้ขมิ้นชันในตำรับยาแผนไทยจำนวนมาก เช่น ตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ตำรับยาบรรเทาอาการสำหรับแมลงกัดต่อย ตำรับยาบรรเทาอาการท้องเสีย ตำรับยาใช้ภายนอกสำหรับอาการทางโรคผิวหนัง เป็นต้น

องค์ประกอบทางเคมี

เหง้าของขมิ้นชัน ประกอบด้วย กลุ่มสารสำคัญที่พบคือ 1. กลุ่มสาร curcuminoids (80%) ซึ่งสารหลักที่พบคือสาร curcumin (71.5%) สาร desmethoxycurcumin (19.4%) และสาร bisdesmethoxycurcumin (9.1%) (Prafulla Sabale, 2013, 59-68) ซึ่งสาร curcumin ทำให้ขมิ้นชันมีสีเหลือง 2. กลุ่มน้ำมันหอมระเหย (5%) ประกอบด้วยสาร monoterpenes, sesquiterpenes และ diterpenes โดยจะพบสารกลุ่ม sesquiterpenes จำนวนมากที่สุด ร้อยละ 65 ของน้ำมันหอมระเหย สารสำคัญที่พบคือ Ar-turmerone, β-turmerone, และ α-turmerone และสารสำคัญที่พบในกลุ่ม monoterpenes คือ p-cymene, β-phellandrane, terpinolone และ cineole นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ๆ ในเหง้าขมิ้นชัน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ เป็นส่วนประกอบ (Ashraf, 2017, 672-685)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างสารสำคัญที่พบในเหง้าขมิ้นชัน

ที่มา Amalraj, Pius, Gopi & Gopi 2016

สารเคอร์คิวมิน (curcumin)

สารเคอร์คิวมิน เป็นสารที่พบมากที่สุดในสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ในขมิ้นชัน ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง $C_{21}H_{20}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 368.385 g/mol มีค่า log P เท่ากับ 3.43 มีค่า pKa_1 เท่ากับ 8.38±0.04 ค่า pKa_2 เท่ากับ 9.88 ± 0.02 และค่า pKa_3 เท่ากับ 10.51 ± 0.01 (Amalraj, Pius, Gopi, & Gopi, 2017, 205-233) อย่างไรก็ตามสารเคอร์คิวมิน ไม่ละลายใน aqueous physiologic media ส่งผลให้มีการกระจายตัวและชีวประสิทธิผลต่ำ (Rathore, Mukim, Sharma, & Nagar, 2020, 273-290) สารเคอร์คิวมิน เป็นสารกลุ่ม polyphenol มี 2 tautomeric form ได้แก่ keto form (an aldehyde) และ stable enol form (an alcohol) แต่จะอยู่ในรูป enol form ประมาณร้อยละ 95 (Ivan Stankovic, 2004, p 1-8) ซึ่งสารเคอร์คิวมิน มีคุณสมบัติการละลาย ดังนี้ เป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน ไม่ชอบน้ำ ไม่ละลายในน้ำ เมื่ออยู่ในสภาวะกรดหรือเป็นกลาง ไม่ละลายในอีเทอร์ และละลายได้ดีในด่าง อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วอื่น ๆ นอกจากนี้สารเคอร์คิวมิน คงตัวได้ที่อุณหภูมิสูงแต่ไม่คงตัวในสภาวะด่าง และสภาวะที่มีแสง ควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสแสง สาร

เคอร์คิวมินในขมิ้นชันจะเสื่อมสลายประมาณ 90% ในเวลา 30 นาที เมื่ออยู่ใน aqueous alkaline buffer และสีเหลืองของสารเคอร์คิวมิน จะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (Hamidpour, Hamidpour, Hamodpour, Sohraby, & Hamidpour, 2015, 37-45)

จากการศึกษาของ Estbeyoglu และคณะ (Esatbeyoglu, Katrin, Clemens, & Gerald, 2015, 887-893) ได้ทำการศึกษาความคงตัวของสารเคอร์คิวมิน ที่อุณหภูมิสูง 180 °C นาน 70 นาที พบว่าจะเกิดการเสื่อมสลายของสารเคอร์คิวมิน เป็นสาร vanillin, ferulic acid และ 4-vinyl guaiacol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์เสริมฤทธิ์การอักเสบของขมิ้นชัน แต่งานวิจัยในครั้งนี้ทำการควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ไม่เกิน 160 °C เพื่อไม่ให้เกิดการเสื่อมสลายของสารเคอร์คิวมิน และผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารเคอร์คิวมินเท่านั้น

สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ที่พบในขมิ้นชัน มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ มากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ ฤทธิ์ในการต้านไวรัส ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย เชื้อรา ฤทธิ์ต้านอาการแพ้ ฤทธิ์ในลดการอักเสบของข้อ ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านการเกิดอาการอัลไซเมอร์ ฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้า ฤทธิ์ในการช่วยลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ฤทธิ์ในการควบคุมน้ำหนัก ฤทธิ์ในการปกป้องหัวใจและตับ เป็นต้น (Rathore et al., 2020, 273-290) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่พบในขมิ้นชัน มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์แก้ปวด ฤทธิ์ต้านภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ เป็นต้น (Guimarães, Vinhahs, Gomes, Souza, & Kreepsky, 2020, 909-1013) แต่ในการศึกษานี้มีความสนใจฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของขมิ้นชัน

วิธีการสกัดสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

จากการสืบค้นข้อมูลการเตรียมน้ำมันสมุนไพรตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมตามตำรายาโบราณตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฯ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ, 2564, 31 พฤษภาคม, 19-20) ประกอบด้วย 1. ตำราเวชศึกษาของพระยาพิศณุประสาทเวช 2. ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ เล่ม 1 เล่ม 2 และเล่ม 3 3. ตำราแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ ฉบับหลวง เล่ม 1 และ เล่ม 2 4.ตำราคัมภีร์แพทย์แผนโบราณของขุณโสภิตบรรณลักษณ์ เล่ม 1 เล่ม 2 และเล่ม 3 5. ตำรายามาตรฐานยาสมุนไพรไทย และตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย พ.ศ. 2560 เป็นต้น สามารถสรุปได้ดังนี้

ตำรับยาน้ำมันหรือยาขี้ผึ้งส่วนใหญ่นั้น จะมีขั้นตอนการเตรียมตำรับโดยสรุปดังนี้ ยาหรือเครื่องยาใดที่ควรต้มให้ต้ม ควรตำให้ตำ แล้วนำน้ำยาต้มที่ได้ไปหุงกับน้ำมัน ให้คงแต่น้ำมัน อาจบดสมุนไพรให้เป็นจุณผสมลงไป แล้วแต่ตำรับยานั้น ๆ หรือนำตัวยาเครื่องยานั้นไปผสมกับน้ำมัน แล้วหุงให้คงแต่น้ำมัน

การหุงตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย คือการนำสมุนไพรหรือน้ำสมุนไพรไปผสมกับน้ำมันมะพร้าวหรือน้ำมันอื่น ๆ แล้วนำไปทอดเคี่ยวจนกระทั่งน้ำระเหยออกไปหมด ให้คงเหลือแต่น้ำมัน

น้ำมันที่ใช้ในการสกัดสมุนไพรตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทย มีจำนวนมาก เช่น น้ำมันมะพร้าว น้ำมันงา น้ำมันดิบ น้ำมันหมู น้ำมันเนย น้ำมันเหี้ย น้ำมันงูเหลือม น้ำมันกระทุ้งลาย น้ำมันยาง เป็นต้น แต่พบว่าน้ำมันมะพร้าวถูกใช้ในการสกัดสมุนไพรเป็นจำนวนมากที่สุด

จากการศึกษาของ Takenaka และคณะ (Takenaka et al., 2013, 655-659) ทำการสกัดขมิ้นชัน โดยใช้ edible oil เป็นตัวทำละลาย ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีปฏิบัติดั้งเดิม และสารสกัดที่ได้สามารถใช้ในอาหารได้โดยตรง ไม่ต้องกำจัดตัวทำลายออกเหมือนกับวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ และนอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย ผลการศึกษาการละลายของสารเคอร์คิวมินอยด์ ใน medium-chain triacylglycerols จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ rapeseed oil, soybean oil, corn oil, olive oil, Panacet 810 และ Panacet 800 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของน้ำมันมะพร้าว พบว่าสารเคอร์คิวมิน ละลายใน Panacet 810 และ Panacet 800 มากที่สุด คือ 1.85 ± 0.01 และ 2.02 ± 0.03 mg/g ตามลำดับ แต่เลือกใช้ Panacet 810 เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากน้ำมันดังกล่าวถูกใช้อย่างกว้างขวางในทางอาหารมากกว่า Panacet 800 ดังนั้นอนุพันธ์ของน้ำมันมะพร้าว จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการสกัดขมิ้นชันได้

ดังนั้น จึงเลือกใช้น้ำมันมะพร้าวในการสกัดสารสำคัญจากขมิ้นชัน เพื่อให้เป็นไปตามกรรมวิธีการการปรุงยาตามโบราณดั้งเดิมของไทย

น้ำมันมะพร้าว

น้ำมันมะพร้าว มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานมานานกว่า 4,000 ปี ในแถบ Southern Asia, Pacific, Africa, Central America และ Caribbean เนื่องจากมีต้นมะพร้าวจำนวนมาก พบการใช้มะพร้าวเป็นอาหาร เครื่องสำอาง ใช้ในทางอุตสาหกรรม เป็นต้น น้ำมันมะพร้าวได้จากมะพร้าว ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cocus nucifera* L. อยู่ในวงศ์ Arecaceae น้ำมันมะพร้าวแบ่งเป็น 2 ประเภท ด้วยกัน ได้แก่ copra oil และ virgin coconut oil แต่ชนิดของกรดไขมันที่พบนั้นเหมือนกัน น้ำมันทั้ง 2 ประเภทนี้แตกต่างกันที่วิธีการในการสกัด โดย copra oil คือการนำมะพร้าว

แห้งไปบดหรือบีบคั้นจนได้เป็นน้ำมัน จัดเป็นน้ำมันมะพร้าวสกัดร้อน แต่ virgin coconut oil คือ การนำมะพร้าวสดไปบีบจนได้น้ำมันมะพร้าวและกะทิ ซึ่งจะอยู่ในรูปแบบอิมัลชัน ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้หลายวิธี เช่น การหมัก, การใช้เอนไซม์, centrifugal separation, refrigeration เป็นต้น จัดเป็นน้ำมันมะพร้าวสกัดเย็น (Wallace, 2019, 97-107) ซึ่งทางการแพทย์แผนไทยใช้น้ำมันมะพร้าวที่ใช้วิธีการสกัดร้อน (copra oil)

น้ำมันมะพร้าว จัดเป็น vegetable oil โดยมี saturated fatty acid เป็นองค์ประกอบหลัก ประกอบด้วย lauric acid (45-52%), myristic acid (16-21%), palmitic acid (7-10%) caprylic acid (5-10%), capric acid (4-8%), stearic acid (2-4%), caproic acid (0.5-1%), และ palmitoleic acid และกลุ่ม unsaturated fatty acid (Wongpoowarak, Pichayakorn, Oungbho, & Boontaweesakul, 2009, 43-49) ประกอบด้วย oleic acid (5-8%), linoleic acid (1-3%) และ linolenic acid (0.2%) เป็นต้น

ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ของน้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะพร้าว ไม่ละลายในน้ำที่อุณหภูมิมากกว่า melting point อาจไม่ผสมเข้ากับสารกลุ่ม non hydroxylic เช่น light petroleum, benzene, carbon tetrachloride เป็นต้น แต่น้ำมันมะพร้าวสามารถละลายได้ดีในแอลกอฮอล์

น้ำมันมะพร้าว มีงานวิจัยทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการปกป้องตับ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอาการปวด ฤทธิ์ลดไข้ การรักษาแผล ฤทธิ์ในการป้องกันอาการ อัลไซเมอร์ และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในช่องปาก (Shirwaikar & Shirwaikar, 2015, 34-41) นอกจากนี้ยังพบการใช้น้ำมันมะพร้าว มาแต่โบราณของไทย โดยใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นยาทาแก้กลาก ทาแผลที่เกิดจากความเย็นจัดหรือร้อนจัด ใช้ผสมกับตัวยาอื่นทางโรคผิวหนังต่าง ๆ ใช้ทาแก้ผิวหนังแห้งแตกเป็นขุย (ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต, & วิเชียร จีรวงส์, 2542, 117-138)

จากการประชุมผู้เชี่ยวชาญด้านการแพทย์แผนไทย (กลุ่มงานสนับสนุนการขึ้นทะเบียนยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพร, 2564, 13 มกราคม, 1-13) เมื่อวันที่ 13 มกราคม 2564 เรื่องการเตรียมยาน้ำมันสมุนไพร ตามองค์ความรู้แผนไทยดั้งเดิม จากข้อมูลการเตรียมน้ำมันสมุนไพรตามตำราโบราณดั้งเดิม และองค์ความรู้ที่ปฏิบัติสืบต่อกันมาของผู้เชี่ยวชาญด้านการแพทย์แผนไทย พบว่ากรรมวิธีการผลิตน้ำมันขมิ้นชันตามองค์ความการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม มีขั้นตอน โดยสรุปดังนี้ นำเหง้าขมิ้นชันไปทอดเคี่ยว เป็นระยะเวลา 3 – 4 ชั่วโมง กรองเอากากออก นำน้ำมันไปใช้ หากจะทำการวิจัยเกี่ยวกับการเตรียมน้ำมันขมิ้นชัน ควรควบคุมตัวแปรอื่น ๆ เช่น ความร้อนที่ใช้

ในการทอด ขนาดของชิ้นขมิ้นชัน ปริมาณของขมิ้นชัน และคุณภาพของน้ำมันมะพร้าว จึงสรุปเป็นขั้นตอน ดังนี้

วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันตามองค์ความรู้การแพทย์แผนไทยดั้งเดิม มีดังนี้

1) นำเหง้าขมิ้นชันสด ล้างทำความสะอาด ผึ่งลมจนสะเด็ดน้ำ

2) หั่นขมิ้นชัน เป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดสม่ำเสมอ และชั่งน้ำหนัก 2 กิโลกรัม

3) นำน้ำมันมะพร้าว 1 กิโลกรัม ตั้งไฟร้อนปานกลาง ประมาณไม่เกิน 160 °C

4) เมื่อน้ำมันเริ่มร้อน ใส่ขมิ้นชันที่หั่นเป็นชิ้น 2 กิโลกรัม ทอดเคี่ยวเป็นระยะเวลา 3 และ 4 ชั่วโมง ใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก (อัตราส่วนขมิ้นชันต่อน้ำมันมะพร้าว เท่ากับ 2 ต่อ 1)

5) ยกลงจากเตา กรอง และชั่งน้ำหนักน้ำมันที่ได้ และบันทึกเก็บไว้

วิธีการสกัดขมิ้นชันตามวิธีสมัยใหม่

บัญชีรายการยาจากสมุนไพร.(ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพรฯ, 2564, 31 พฤษภาคม, 19-20) ประเภทตำรับยาแผนไทยมีตำรับยาน้ำมันบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย สูตร 14 และสูตร 15 ซึ่งสูตรตำรับดังกล่าวมีการใช้น้ำมันขมิ้นชันในสูตรตำรับ โดยระบุกรรมวิธีการเตรียมน้ำมันขมิ้นชัน ดังนี้

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันตามวิธีสมัยใหม่ มีดังนี้

1) นำเหง้าขมิ้นชันสด ล้างทำความสะอาด ผึ่งลมจนสะเด็ดน้ำ

2) หั่นขมิ้นชัน เป็นชิ้นเล็ก ๆ และชั่งน้ำหนัก 2 กิโลกรัม

3) นำน้ำมันมะพร้าว 1 กิโลกรัม ตั้งไฟร้อนปานกลาง ประมาณไม่เกิน 160 °C

4) เมื่อน้ำมันเริ่มร้อน ใส่ขมิ้นชันที่หั่นเป็นชิ้น 1 กิโลกรัม ทอดจนเนื้อขมิ้นชันแห้ง กรอบ เป็นสีน้ำตาล ใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก เติมขมิ้นชันที่เหลืออีก 1 กิโลกรัมลงไปในน้ำมันเดิม ทอดจนเนื้อขมิ้นชันแห้ง กรอบ เป็นสีน้ำตาล ปิดไฟ ใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก (อัตราส่วนขมิ้นชันต่อน้ำมันมะพร้าว เท่ากับ 2 ต่อ 1)

5) ยกลงจากเตากรอง และชั่งน้ำหนักน้ำมันที่ได้ และบันทึกเก็บไว้ โดยมีปริมาณน้ำมันที่เหลือไม่น้อยกว่า 600 กรัม

วิธีการทดสอบหาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์

จากงานวิจัย Radha และคณะ (Radha, Ragavendran, Thomas, & Kumar, 2016, 1-15) พบว่ามีวิธีการมากมายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารเคอร์คิวมินอยด์ เช่น direct fluorimetry, spectroscopic (IR, NMR, MS) และ High performance liquid chromatography (HPLC) method การวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ถูกใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากวิธีที่ง่ายและมีความไวสูง จากศึกษานี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับ cost effective ของวิธี HPLC สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของสารเคอร์คิวมินอยด์ ผลพบว่า การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ด้วยวิธี HPLC เป็นวิธีมีความคุ้มค่าคุ้มทุน มีความถูกต้องแม่นยำ มีความเฉพาะเจาะจง สามารถทำซ้ำได้ และเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับงานวิเคราะห์เป็นประจำ

การควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชัน

การควบคุมคุณภาพขมิ้นชันตาม Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) 2020

การควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชันตาม Thai Herbal Pharmacopoeia 2020 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560, 141-149) กำหนดการตรวจปริมาณสารสำคัญคือ ผงจากเหง้าขมิ้นชัน มีสารเคอร์คิวมินอยด์ ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก (w/w) และน้ำมันระเหยง่ายไม่น้อยกว่าร้อยละ 6 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก (v/w)

ขั้นตอนการทดสอบ volatile oil

ชั่งน้ำหนักขมิ้นชันหนักประมาณ 10 g

↓

เติมน้ำ 100 ml. ใน round bottom flask ขนาด 500 ml

↓

กลั่นในอัตรา 2-3 ml/นาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ขั้นตอนการทดสอบปริมาณเคอร์คิวมินอยด์

standard curcumin solution

ละลาย curcumin RS ประมาณ 25 mg

↓

เติม methanol จำนวน 250 ml

↓

ปิเปตสารละลาย 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ml ใส่ volumetric flask ขนาด 100 ml ตามลำดับ

↓

เจือจางด้วย methanol และผสมให้เข้ากัน

↓

วัด absorbance ที่ 420 nm

assay preparation

ชั่งขมิ้นชัน 300 mg ใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 25 ml เติม methanol 10 ml และหมักทิ้งไว้

↓

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 ชั่วโมง และคนอย่างสม่ำเสมอ

↓

ปิเปตส่วนที่ใส จำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask ขนาด 25 ml

เจือจางด้วย methanol และผสมให้เข้ากัน

↓

วัด absorbance ที่ 420 nm โดยใช้ methanol เป็น blank

การควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชัน ตาม Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2015

กำหนดให้ต้องมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่น้อยกว่า 7% และปริมาณสารเคอร์คิวมิน ไม่น้อยกว่า 1% ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คิวมิน ใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

chromatographic system and system suitability

model: LC

detector: Vis 430 nm

column: octylsilane bonded silica gel

flow rate: -

injection volume: 5 µl

mobile phase: acetonitrile: 4% glacial acetic acid (48:52)

the number of theoretical plates (N) not less than 4,000

reference solution

ชั่ง curcumin R ละลายใน methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 µg/ml

test solution

ชั่งน้ำหนักผงขมิ้นชันหนัก 0.2 g ใส่ใน stopped conical flask

↓

เติม methanol 10 ml และชั่งน้ำหนัก

↓

reflux เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น และชั่งน้ำหนัก

↓

เติมน้ำหนักที่หายไปด้วย methanol ผสมให้เข้ากันและนำไป centrifuge

↓

นำส่วนใส จำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask 20 ml เจือจางด้วย methanol จนครบปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

การควบคุมคุณภาพปริมาณสารสำคัญของขมิ้นชัน (curcuminoids) ตาม USP 42 NF 37

จาก USP 42 NF 37 มีข้อกำหนดดังนี้ มีปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ไม่น้อยกว่า 95.0 % โดยคำนวณเป็นปริมาณรวมของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ซึ่งประกอบด้วย 70.0 % - 80.0 % ของ curcumin, ปริมาณของ desmethoxycurcumin 15.0 % - 25.0 % และ bisdesmethoxycurcumin ปริมาณ 2.5 % - 6.5 %

วิธีการหาปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์

mobile phase: tetrahydrofuran: 1 mg/ml of citric acid in water (4:6)

standard solution A: 40 µg/ml of USP curcuminoids RS ใน mobile phase

standard solution B:

มีส่วนผสมของ curcumin RS 40 µg/ml, desmethoxycurcumin RS 10 µg/ml, และ bisdesmethoxycurcumin RS 2.0 µg/ml ใน mobile phase.

↓

นำไป sonication ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC, กรองผ่าน 0.45 µm pore size และทิ้งส่วนแรก ประมาณ 10 ml

การเตรียม sample stock solution

ชั่ง curcuminoids ประมาณ 20 mg ใส่ใน volumetric flask 50 ml

↓

เติม acetone จำนวน 30 ml และ sonicate นาน 30 นาที

↓

เจือจางด้วย acetone จนครบปริมาตร ผสมให้เข้ากัน และนำไป centrifuge

การเตรียม sample solution

นำสารละลายตัวอย่าง 5 ml ใส่ใน volumetric flask 50 ml

↓

เจือจางด้วย mobile phase จนครบปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

↓

นำไป sonication ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC, กรองผ่าน 0.45 µm pore size และทิ้งส่วนแรก ประมาณ 10 ml

chromatographic system

model: LC

detector: Vis 420 nm

column: 4.6-mm x 25-cm; 5-µm packing L1

flow rate: 1.0 ml/min

injection volume: 20 µl

mobile phase: tetrahydrofuran: 1 mg/ml of citric acid in water (4:6)

system suitability

suitability requirement

sample: standard solution A และ standard solution B, the relative retention times สำหรับ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin เท่ากับ 1.0, 1.2 and 1.4 ตามลำดับ

chromatogram similarity: the chromatogram of standard solution A เหมือนกับ reference chromatogram ของ USP curcuminoids RS

resolution: มากกว่า 2.0 between curcumin and desmethoxycurcumin peaks and desmethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin peaks, standard solution B

tailing factor: น้อยกว่า 1.5 for bisdemethoxycurcumin, desmethoxycurcumin, and curcumin peaks, standard solution B

relative standard deviation: น้อยกว่า 2.0% for the desmethoxycurcumin peak, in replicate injection, standard solution B

การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ตามข้อกำหนดของ USP 42 NF 37 เนื่องจากวิธีดังกล่าวเป็นวิธีวิเคราะห์มาตรฐานตาม USP จึงทำการ verification วิธีวิเคราะห์ดังกล่าว โดยทดสอบ parameter ดังต่อไปนี้ accuracy, precision, specification, linearity และ range

การเตรียมสารละลายตัวอย่างดัดแปลงจากการศึกษา Takenaka และคณะ (Takenaka et al., 2013, 655-659) มีการใช้น้ำมันชนิดกินได้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารเคอร์คิวมินอยด์ กล่าวถึงการวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ โดยใช้ HPLC มีวิธีการเตรียมน้ำมันชนิดต่าง ๆ ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยการนำน้ำมันชนิดต่าง ๆ ไปเจือจาง 10 เท่า ด้วย methanol และกรองผ่าน PTFE filters (pore size 0.5 µm) ก่อนนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Malviya, Bansal, Pal, & Sharma, 2009, 22-26) เป็น column chromatography ชนิดหนึ่ง ใช้สำหรับวิเคราะห์ทางชีวเคมี การแยกสาร การทำสารให้บริสุทธิ์ การระบุเอกลักษณ์ของสาร รวมไปถึงการวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญ หลักการทำงานของ HPLC คือ กระบวนการในการแยกสารของสารผสม ที่เกิดขึ้นระหว่าง stationary phase กับ mobile phase เป็นไปตามหลัก like dissolve like สารชนิดไหนที่เข้ากันได้ดี

กับ stationary phase หรือไม่เข้ากับ mobile phase สารนั้นจะออกจากคอลัมน์ช้ากว่า และมีค่า retention time ที่มากกว่า

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC ได้แก่

1. pump ทำหน้าที่สูบ mobile phase เข้าสู่คอลัมน์

2. column เป็นส่วนประกอบหลักของ HPLC ซึ่งจะบรรจุ stationary phase หรือเฟสอยู่กับที่ไว้ภายใน

3. detector ตัวตรวจวัดสัญญาณ โดยแสดงผลเป็น retention time โดยค่า retention time ขึ้นกับแรงที่กระทำกันระหว่างโมเลกุลของสารกับ stationary phase และตัวทำละลาย

4. injector อุปกรณ์ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์

ประเภทของ HPLC แบ่งตามระบบวัฏภาคที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์ ประกอบด้วย

1. normal phase chromatography เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยความมีขั้วโดย stationary phase จะเป็นสารที่มีขั้ว เช่น silica แต่ mobile phase จะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว

2. reverse phase มี stationary phase เป็นสารที่ไม่มีขั้ว และสาร mobile phase เป็นสารที่ขั้วปานกลาง ซึ่งวิธีนี้จะถูกใช้เป็นอย่างมากในทางเภสัชกรรม

3. size exclusion chromatography การแยกสารโดยอาศัยขนาดของอนุภาค วิธีนี้ถูกใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของ polysaccharides

4. ion exchange chromatography การแยกสารอาศัยการจับกันของไอออนของตัวถูกละลายกับประจุบน stationary phase วิธีนี้ถูกใช้มากสำหรับการทำน้ำให้บริสุทธิ์, ligand-exchange chromatography, ion-exchange of protein, high-pH anion-exchange chromatography of carbohydrate and oligosaccharide เป็นต้น

5. bio-affinity chromatography การแยกสารอาศัยหลัก การกระทำต่อกันอย่างเฉพาะเจาะจงของโปรตีนและลิแกนด์

chromatography parameter

system suitability (Sneha Lakshmi R.P., 2015) เป็นการทดสอบความเหมาะสมของระบบที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์ ประกอบด้วย

1. efficiency หรือ number of theoretical plates (N) หมายถึงประสิทธิภาพในการแยกสารของคอลัมน์ มีสูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$N = 5.54 \frac{t_R^2}{W_h^2}$$

โดยที่ t_R คือ retention time ของสาร

W_h คือ ความกว้างของ peak ที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

2.capacity factor (D_m) พิจารณาจากการถูกเหนี่ยวนำของตัวถูกละลาย คำนวณได้จากสูตรนี้

$$D_m = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

โดยที่ t_R คือ retention time ของตัวถูกละลาย

t_M คือ retention time ของสารที่ไม่ถูกหน่วงไว้ในคอลัมน์

หากค่า D_m ต่ำ แสดงว่าพีคของตัวถูกละลายอยู่ใกล้กับ solvent front

3. resolution factor (Rs) เป็นการวัดการแยกออกจากกันของสารผสมสองชนิด และการแยกออกจาก baseline โดยมีสูตรในการคำนวนดังนี้

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

โดยที่ t_{R1} และ t_{R2} คือ retention time ของสารทั้ง 2 ชนิด

W_{b1} และ W_{b2} คือ ความกว้างของพีค

4. relative retention คือ การแยกสาร 2 ชนิดออกจากกันในสภาวะที่เหมาะสม คำนวณโดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

โดยที่ t_{R2} คือ retention time ของพีคที่ต้องการวิเคราะห์

T_{R1} คือ retention time ของพีคอ้างอิง

t_M คือ retention time ของตัวถูกละลายที่ไม่ถูกไว้ในคอลัมน์

5. retention time คือ ความแตกต่างระหว่างเวลาที่ตัวถูกละลายที่ฉีดเข้าสู่คอลัมน์กับเวลาที่พีคสูงสุดของตัวถูกละลาย

6. tailing factor (T) เป็นการวัดความสมมาตรของพีค ถ้าค่า T เท่ากับ 1 แสดงว่าพีคนั้นมีความสมมาตร

การอักเสบ

การอักเสบ (Pahwa, Singh, & Jialal, 2018) เป็นกลไกที่ซับซ้อน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองของร่างกายหรือเนื้อเยื่อต่อการได้รับบาดเจ็บ หรือเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในกำจัดสิ่งอันตรายต่อร่างกาย รวมไปถึงกระบวนการรักษาตัวเอง อาจแสดงอาการต่อไปนี้ เช่น อาการปวด อาการแดง มีความร้อนเกิดขึ้น และมีอาการบวม การอักเสบแบ่งออกเป็น การอักเสบเฉียบพลัน และการอักเสบเรื้อรัง

การอักเสบเฉียบพลัน เกิดการเนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บเนื่องจาก trauma, microbial invasion หรือ noxious compound ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อาจจะเกิดขึ้นในระยะเวลาอันสั้น และอาจพัฒนาเป็นอาการที่รุนแรงได้ในระยะเวลาอันสั้น หากเป็นการอักเสบกึ่งเรื้อรัง จะใช้เวลาประมาณ 2 – 6 สัปดาห์

การอักเสบเรื้อรัง เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เป็นการอักเสบเป็นระยะเวลานาน อาจใช้เวลาเป็นเดือนหรือปี ซึ่งผลของการเกิดการอักเสบเรื้อรังเป็นระยะเวลานานอาจเป็นสาเหตุทำให้ร่างกายไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ เกิดความเสียหายต่อร่างกาย ส่งผลให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้มากมาย

กระบวนการอักเสบและฤทธิ์ต้านการอักเสบมีหลายกลไกด้วยกัน โดยกระบวนการหลัก คือ เมื่อเกิดสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบ จะเกิดสาร cytokines จำนวนมากเกิดขึ้น ส่งผลต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น phospholipase A_2 ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะไปกระตุ้นการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ เกิด extravasation และ vasodilation แล้วเกิด cell migration และสุดท้ายเกิดการทำลายอวัยวะหรือเนื้อเยื่อ เกิดการอักเสบเกิดขึ้น (Ghasemian, Owlia, & Owlia, 2016, 1-11)

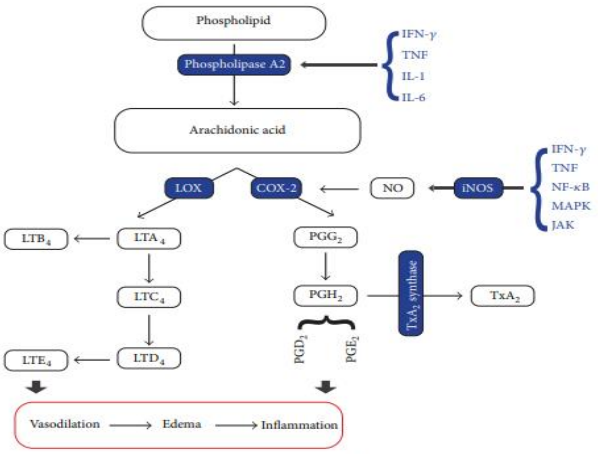


FIGURE 1: Inflammation pathway. COX, cyclooxygenase; LOX, lipoxygenase; PG, prostaglandin; LT, leukotriene; TX, thromboxane; NO, nitric oxide; iNOS, inducible NO synthase; IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor; NF-κB, nuclear factor-κB; MAPK, mitogen activated protein kinase; JAK, janus kinase; IL, interleukin.

ภาพประกอบ 2 กระบวนการอักเสบ

ที่มา Ghasemian, Owlia & Owlia, 2016

สารสื่อกลางในการอักเสบ (mediator inflammatory)

เนื่องจากผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชัน สำหรับสรรพคุณบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย จึงศึกษาเกี่ยวกับสารสื่อกลางในการอักเสบที่สำคัญที่พบเกี่ยวข้องกับอาการปวด (Júnioe, Junior, & Cohen, 2016, 35-42) ได้แก่

bradykinins เป็นสารกลุ่ม nonapeptide, low molecular weight สาร bradykinins ทำหน้าที่กระตุ้นผ่านตัวรับ 2 ชนิด ได้แก่ B_1 (B_1R) และ B_2 (B_2R) ก่อให้เกิดการการอักเสบผ่านการหลั่ง cytokine เพิ่มการเกิด vascular patency โดย จะพบว่าการออกฤทธิ์จับกับตัวรับชนิด B_2 จะก่อให้เกิดอาการปวด และการอักเสบอย่างเฉียบพลัน หากกระตุ้นผ่านตัวรับ B_1 และ B_2 จะเกี่ยวกับการปวดเรื้อรัง

eicosanoids เป็นสาร long-chain polyunsaturated fatty acid oxygenation สารสำคัญที่พบคือ arachidonic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสาร arachidonic acid เกิดกระบวนการที่สำคัญ 4 กระบวนการ โดยกระตุ้นผ่านกระบวนการ cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), epoxygenase และ isoprostane เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการกระตุ้นโดย phospholipase A_2 จะเกิดเป็นสาร arachidonic acid หลังจากนั้นสาร arachidonic acid จะเปลี่ยนเป็นสาร prostaglandin โดยเอนไซม์ cyclooxygenase และจะเปลี่ยนเป็นสาร leukotrienes โดยเอนไซม์ lipoxygenase

cyclooxygenase (COX) enzyme กระบวนการ COX ประกอบด้วยการทำงานของเอนไซม์ 2 isoforms ได้แก่ COX-1 และ COX-2 โดยเอนไซม์ COX-1 จะพบได้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จะพบในสภาวะปกติของร่างกาย สำหรับเอนไซม์ COX-2 จะพบได้น้อยเมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะปกติ แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเกิดการอักเสบ สาร prostaglandin หลักที่พบในกระบวนการนี้คือ PGE_2 และ PGI_2 โดยกระตุ้นผ่านตัวรับ PE1-4 เพื่อผลิตสาร PGE_2 และกระตุ้นผ่านตัวรับ PI เพื่อผลิตสาร PGI_2

nitric oxide (NO) สาร NO จะถูกสร้างจาก L-arginine ซึ่งจะพบสาร L-arginine ในเซลล์หลาย ๆ ชนิด เกิดการกระตุ้น nitric oxide synthase (cNOS) ด้วย แคลเซียมหรือสารกระตุ้นปัจจัยร่วมอื่น ๆ โดยสาร NO จะเปลี่ยนกระบวนการทำงานของเซลล์ผ่านการกระตุ้น glunylate cyclase ทำให้สร้าง cGMP เพิ่มขึ้น โดยระหว่างกระบวนการอักเสบจะผลิต cNOS และ inducible nitric oxide (iNOS) ออกมา และพบว่า สาร iNOS มีบทบาทสำคัญในการออกฤทธิ์ของ cyclooxygenase และการสร้างสาร pro-inflammatory prosanoids

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสมุนไพร

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสมุนไพร สามารถทำได้ทั้ง *In Vivo* model และ *In Vitro* model การศึกษาในสัตว์ทดลองต้องคำนึงถึงจริยธรรมในสัตว์ทดลอง และการลดการใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้น การศึกษา *In Vitro* model จะช่วยให้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของการตอบสนองของเซลล์ในสภาวะการทดลองที่เหมาะสม และช่วยให้เข้าใจกลไกการอักเสบของสารสำคัญในสมุนไพรได้เช่นกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วย *In Vitro* model

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดสมุนไพร สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธี inhibition of protein denaturation assay, membrane stabilization method, assay of cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition, assay of proteinase inhibition และ hyaluronidase inhibition assay เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสมุนไพร จะต้องใช้วิธีทดสอบมากกว่า 1 วิธีขึ้นไปในการทดสอบ ซึ่งนักวิจัยส่วนใหญ่ นิยมใช้ 3 วิธีขึ้นไปในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและสารอ้างอิงมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ diclofenac, acetyl salicylic acid และ indomethacin เป็นต้น

ยาสมุนไพร จำนวนมากมายที่มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ซึ่งมีผลงานวิจัยทั้งทางคลินิกหรือทางพลีคลินิก จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยพบว่า ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี สามารถใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบได้จำนวนมาก เช่น rheumatoid

arthritis, uveitis และ inflammatory bowel disease เป็นต้น (Sarveswaran, Jayasuriya, & Suresh, 2017, 131-141)

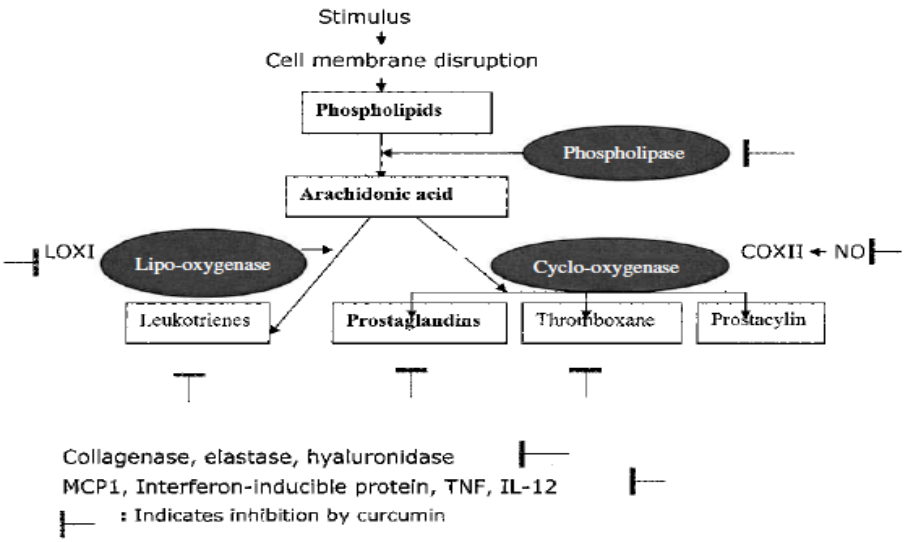
ฤทธิ์ต้านการอักเสบของขมิ้นชัน

จากการศึกษาของ Chainani-WU (Chainani-WU, 2003, 161-168) พบข้อมูล *In Vitro* studies ของสารเคอร์คิวมิน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดังต่อไปนี้

ลดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phospholipase A_2 และ phospholipase C ดังนั้นจะช่วยลดการปลดปล่อย arachidonic acid จาก cellular phospholipid

ยับยั้งเอนไซม์ phospholipase D, cyclooxygenase -2, 5-lipoxygenase

ยับยั้ง lipopolysaccharide, nitric oxide, nitric oxide synthetase, tumor necrosis factor, interleukin 1α, TNFα, platelet-activating factor, T_H1 cytokine in $CD4^+$ T –cell, cyclosporine A-resistant CD28



ภาพประกอบ 3 Site of action ของสารเคอร์คิวมินในกระบวนการอักเสบ

ที่มา Chainani-WU, 2003

สารอนุพันธ์ของสารเคอร์คิวมิน ได้แก่ สารเดสเมทอกซีเคอร์คิวมิน และ สารบิสเดสเมทอกซีเคอร์คิวมิน พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบเช่นเดียวกันกับสาร curcumin (Sandur et al., 2007, 1765-1773)

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดน้ำมันขมิ้นชัน เลือกใช้วิธี rapid method เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และมีความเฉพาะเจาะจงสูง

ผู้วิจัยศึกษาเกี่ยวกับขมิ้นชันที่ใช้ในตำรับยาบรรเทาอาการปวดเมื่อยตามร่างกาย ดังนั้น การคัดเลือกวิธีที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของขมิ้นชันนั้น จึงทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ เกี่ยวกับการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 และ nitric oxide synthase เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ

cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition assay

เป็นการวัดการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 โดยใช้ COX-2 inhibitor screening assay kit (Cayman, Item No 701080) โดยมี celecoxib เป็น positive control มีวิธีการทดสอบเป็นไปตามที่ผู้บริษัทผู้ผลิตเป็นผู้กำหนด ข้อสรุปเกี่ยวกับวิธีการทดสอบนี้ ดังนี้ cyclooxygenase enzyme หรือ prostaglandin-endoperoxide synthase เป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์ prostanoid (prostaglandin, prostacyclin และ thromboxane) จาก arachidonic acid โดยเครื่องมือนี้ จะวัดปริมาณของ $PGF_{2}\alpha$ ที่เกิดจากปฏิกิริยา COX การวัดปริมาณ prostanoids ที่เกิดขึ้นโดยใช้ ELISA อาศัยวิธีการจับกันอย่างเฉพาะเจาะจงของ antiserum กับ $PGF_{2}\alpha$

nitric oxide synthase (NOS) activity assay

เป็นการวัดการยับยั้งเอนไซม์ nitric oxide synthase โดยใช้วิธี NOS activity assay kit (Abcam, Item No. ab211086) โดยมี Nomega-Nitro-L-arginine (L-NNA), nitric oxide synthase inhibitor เป็น positive control วิธีการทดสอบเป็นไปตามที่ผู้บริษัทผู้ผลิตเป็นผู้กำหนด ข้อสรุปเกี่ยวกับวิธีการทดสอบนี้ nitric oxide synthase (NOS) เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้าง nitric oxide (NO) และนำไปทำปฏิกิริยากับ fluorescent probe เพื่อสร้างสัญญาณที่สเถียรในการวัดผลที่ความยาวคลื่น excitation/emission (Ex/Em) 360/450 nm ซึ่งเป็นการวัดสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ NOS ที่เกิดขึ้น หากเกิดการยับยั้งเอนไซม์ NOS ได้ ปริมาณของ NO จะลดลง ส่งผลให้ความเข้มข้นของ fluorescence ลดลง

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. รวบรวมข้อมูลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม และวิธีสมัยใหม่ จากตำรายาแผนโบราณตามที่รัฐมนตรีประกาศ รายงานการประชุมต่าง ๆ ความเห็นของผู้เชี่ยวชาญด้านการแพทย์แผนไทย และประกาศฯ ที่เกี่ยวข้อง

2. การคัดเลือกขมิ้นชัน โดยซื้อขมิ้นชันจากร้านขายสมุนไพรในจังหวัดเชียงใหม่ เก็บเมื่อเดือนมีนาคม 2565 และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของขมิ้นชันโดยรองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อวิธีการสกัด

4. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีสมัยใหม่ ทำซ้ำ จำนวน 3 ครั้งต่อวิธีการสกัด

5. การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินในน้ำมันขมิ้นชันทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ซ้ำวิธีละ 3 ครั้ง ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมิน ตาม Thai Herbal Pharmacopoeia 2020

6. การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ในน้ำมันขมิ้นชันทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ซ้ำวิธีละ 2 ครั้ง ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ตาม USP 42 NF 37

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธี COX-2 inhibitor screening assay และ NOS activity assay วิเคราะห์ 3 ซ้ำของแต่ละวิธี โดยใช้ assay test kit

8. การเปรียบเทียบปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของของสารสกัดขมิ้นชัน ทั้ง 2 ชนิด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย one way ANOVA

เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ

1. analytical balance 4 digit (Mettler Toledo, Switzerland)
2. analytical balance 5 digit (Mettler Toledo, Switzerland)
3. column C18 (Mightysil, Japan)
4. HPLC (Shimadzu SIL-20A IND)
5. incubator (Memmert, Germany)

6. micropipette 20, 100, 200, 1000 µl (Gibson, France)

7. microplate reader (Spectra Max M3, USA)

8. sonicate (Power sonic 405, Korea)

9. UV-Vis spectrophotometry (1800, Japan)

สารเคมี

1. absolute ethanol (Merck, Germany)

2. acetone HPLC grade (Honeywell, USA)

3. bisdesmethoxycurcumin (ChromaDex, USA)

4. citric acid (Kemaus, Australia)

5. curcumin (Sigma Aldrich, USA)

6. curcuminoids (ChromaDex, USA)

7. desmethoxycurcumin (ChemFaces, PRC)

8. tetrahydrofuran HPLC grade (Honeywell, USA)

9. water HPLC grade (Merck, Germany)

10. น้ำมันมะพร้าว ตราโลตัส

การคัดเลือกขมิ้นชัน

1. คัดเลือกขมิ้นชัน โดยซื้อขมิ้นชันจากร้านขายสมุนไพรในจังหวัดเชียงใหม่ เก็บเมื่อเดือนมีนาคม 2565

2. วัตถุดิบขมิ้นชันได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยรองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

เตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม ทำซ้ำ จำนวน 3 ครั้งต่อวิธีการสกัด เตรียมวิธีการต่อไปนี้

นำเหง้าขมิ้นชันสด ล้างทำความสะอาด ผึ่งลมจนสะเด็ดน้ำ

↓

หั่นขมิ้นชัน เป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดสม่ำเสมอ ขนาดโดยประมาณ กว้างxยาวxลึก 1.0x3.0x0.2 เซนติเมตร และชั่งน้ำหนัก 200 กรัม

↓

นำน้ำมันมะพร้าว 100 มิลลิลิตร ตั้งไฟร้อนปานกลาง อุณหภูมิประมาณ 160 °C

↓

เมื่อน้ำมันเริ่มร้อน (160 °C)ใส่ขมิ้นชันที่หั่นเป็นชิ้น 200 กรัม ทอดเคี่ยวเป็นระยะเวลา 3 และ 4 ชั่วโมง แล้วใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก (อัตราส่วนขมิ้นชันต่อน้ำมันมะพร้าว เท่ากับ 2 ต่อ 1)

↓

ยกลงจากเตา กรอง และวัดปริมาณน้ำมันที่ได้ และบันทึกเก็บไว้

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีสมัยใหม่

เตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการสมัยใหม่ ทำซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง ต่อวิธีการสกัด

นำเหง้าขมิ้นชันสด ล้างทำความสะอาด ผึ่งลมจนสะเด็ดน้ำ

↓

หั่นขมิ้นชัน เป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้มีขนาดสม่ำเสมอ ขนาดโดยประมาณ กว้างxยาวxลึก 1.0x3.0x0.2 เซนติเมตร และชั่งน้ำหนัก 200 กรัม

↓

นำน้ำมันมะพร้าว 100 มิลลิลิตร ตั้งไฟร้อนปานกลาง อุณหภูมิประมาณ 160 °C เมื่อน้ำมันเริ่มร้อน ที่ 160 °C ใส่ขมิ้นชันที่หั่นเป็นชิ้น 100 กรัม ทอดจนเนื้อขมิ้นชันแห้ง กรอบ เป็นสีน้ำตาล นาน 35, 40 และ 45 นาที

↓

ใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก เติมขมิ้นชันที่เหลืออีก 100 กรัม ลงไปในน้ำมันเดิม ทอดจนเนื้อขมิ้นชันแห้งกรอบ เป็นสีน้ำตาล นาน 35, 40 และ 45 นาที ปิดไฟ ใช้ตะแกรงตักเฉพาะเนื้อขมิ้นชันออก (อัตราส่วนขมิ้นชันต่อน้ำมันมะพร้าว เท่ากับ 2 ต่อ 1)

↓

ยกลงจากเตา กรอง และวัดปริมาณน้ำมันที่ได้ และบันทึกเก็บไว้

การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมิน ด้วย UV-Vis spectrophotometry

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมิน ดัดแปลงจากวิธีตาม THP 2020 ทำการ verification วิธี โดยทำ linearity, precision, accuracy และ range โดยใช้ absolute ethanol เป็น blank วัดค่าที่ความยาวคลื่น 425 nm

linearity: **เกณฑ์ที่ยอมรับได้**: correlation coefficient **ไม่น้อยกว่า** 0.995

standard curcumin solution

ละลายสารมาตรฐาน curcumin RS 10 mg ใส่ volumetric flask 100 ml

↓

เติม absolute ethanol 100 ml (100 µg/ml)

↓

ปิเปต 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ml ใส่ volumetric flasks 10 ml จำนวน 6 ขวด ตามลำดับ

(1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml, 5 µg/ml และ 6 µg/ml ตามลำดับ)

↓

เจือจาง absolute ethanol จนครบปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

↓

วัดค่า absorbance ที่ 425 nm

precision: **เกณฑ์ที่ยอมรับได้**: %RSD **น้อยกว่า** 2

ละลายสารมาตรฐาน curcumin RS 10 mg ใส่ volumetric flask 100 ml

↓

เติม absolute ethanol 100 ml (100 µg/ml)

↓

ปิเปต 0.4 ml ใส่ volumetric flask 10 ml จำนวน 6 ขวด (4 µg/ml)

↓

เจือจางด้วย absolute ethanol จนครบปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

↓

วัดค่า absorbance ที่ 425 nm

accuracy: **เกณฑ์ที่ยอมรับได้**: %recovery: 95-105%

ละลายสารมาตรฐาน curcumin RS 10 mg ใส่ volumetric flask 100 ml

↓

เติม absolute ethanol 100 ml (100 µg/ml)

↓

ปิเปต 0.1, 0.3 และ 0.6 ml ใส่ volumetric flask 10 ml (1, 3 และ 6 µg/ml)

↓

เจือจางด้วย absolute ethanol จนครบปริมาตร และผสมให้เข้ากัน

↓

วัดค่า absorbance ที่ 425 nm, วัด 3 ซ้ำของแต่ละความเข้มข้น

assay preparation

ปิเปต *Curcuma longa* L. extract 50 µl ใส่ volumetric flask 100 ml

↓

ปรับปริมาตรด้วย absolute ethanol จนครบ 100 ml และผสมให้เข้ากัน

↓

วัดค่า absorbance ที่ 425 nm โดยใช้ absolute ethanol เป็น blank วัดซ้ำ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์

วิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ในน้ำมันขมิ้นชันทั้ง 2 วิธี วิเคราะห์ซ้ำวิธีละ 2 ครั้ง ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ตาม USP 42 NF 37

การทำ system suitability

เกณฑ์ที่ยอมรับได้

chromatogram: chromatogram ของ standard solution A เหมือนกับ chromatogram ของ curcuminoids RS ใน USP

relative retention times: สาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin เท่ากับ 1.0, 1.2 และ 1.4 ตามลำดับ

resolution: มากกว่า 2.0 ของสาร standard solution B

tailing factor: น้อยกว่า 1.5 ของสาร standard solution B

relative standard deviation: น้อยกว่า 2%

chromatographic system

model: LC

detector: Vis 420 nm

column: 4.6-mm x 25-cm; 5-µm packing L1

flow rate: 1.0 ml/min

injection volume: 20 µl

mobile phase: tetrahydrofuran: 1 mg/ml of citric acid in water (4:6)

standard solution

standard solution A:

40 µg/ml of USP curcuminoids RS in mobile phase

ชั่งสาร curcuminoids USP จำนวน 10 mg ใส่ volumetric flask 25 ml (400 µg/ml)

↓

เติม mobile phase จำนวน 15 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 25 ml

↓

ปิเปตสารละลายจำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (40 µg/ml)

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

standard solution B:

สาร curcumin USP

ชั่งสาร curcumin USP จำนวน 10 mg ใส่ volumetric flask 25 ml (400 µg/ml)

↓

เติม mobile phase จำนวน 15 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 25 ml

↓

ปิเปตสารละลายจำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (40 µg/ml)

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

สาร desmethoxycurcumin USP

ชั่งสาร desmethoxycurcumin USP จำนวน 10 mg ใส่ volumetric flask 25 ml (400 µg/ml)

↓

เติม mobile phase จำนวน 15 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 25 ml

↓

ปิเปตสารละลาย 2.5 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (100 µg/ml)

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 10 ml

↓

ปิเปตสารละลาย 1 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (10 µg/ml)

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 10 ml

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

สาร bisdesmethoxycurcumin USP

ชั่งสาร bisdesmethoxycurcumin USP จำนวน 10 mg ใส่ volumetric flask 25 ml

(400 µg/ml)

↓

เติม mobile phase จำนวน 15 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 25 ml

↓

ปิเปตสารละลาย 2.5 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (100 µg/ml)

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 10 ml

↓

ปิเปตสารละลาย 0.2 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (2 µg/ml)

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 10 มล.

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

การทดสอบ accuracy, precision, specificity, linearity **และ** range

specificity

เกณฑ์ที่ยอมรับได้

ไม่มีสิ่งรบกวน (no interference)

ทำการทดสอบ ดังนี้

1. sample solution

นำสารละลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้น 0.5 µg/ml เจือจางด้วย mobile phase 1:5 นำไปวิเคราะห์ ฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

2. standard solution

นำสารละลายมาตรฐาน solution B ที่มีความเข้มข้น 40 µg/ml นำไปวิเคราะห์ ฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

3. mobile phase

นำ mobile phase ไปวิเคราะห์ ฉีดซ้ำ 2 ครั้ง

linearity

เกณฑ์ที่ยอมรับได้ correlation coefficient ไม่น้อยกว่า 0.995

เตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของสาร curcumin 10-60 µg/ml จำนวน 6 ความเข้มข้น (10, 20, 30, 40, 50 และ 60 µg/ml) และวิเคราะห์ 2 ซ้ำต่อความเข้มข้น
2. ความเข้มข้นของสาร desmethoxycurcumin 0.5-20 µg/ml จำนวน 6 ความเข้มข้น (0.5, 1, 5, 10, 15 และ 20 µg/ml) และวิเคราะห์ 2 ซ้ำต่อความเข้มข้น
3. ความเข้มข้นของสาร bisdesmethoxycurcumin 0.5-10 µg/ml จำนวน 6 ความเข้มข้น (0.5, 1, 2, 3, 4 และ 10 µg/ml) และวิเคราะห์ 2 ซ้ำต่อความเข้มข้น

accuracy

เกณฑ์ที่ยอมรับได้ %recovery: 95-105%

เตรียมสารละลาย curcumin ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 µg/ml, สารละลาย desmethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 15 และ 20 µg/ml และสารละลาย bisdesmethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 10 µg/ml

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

↓

ฉีดซ้ำจำนวน 2 ครั้ง ต่อความเข้มข้น

precision

เกณฑ์ที่ยอมรับได้ RSD น้อยกว่า 2%

ชั่งสาร curcuminoids USP จำนวน 10 mg ใส่ volumetric flask 25 ml (400 µg/ml)

↓

เติม mobile phase จำนวน 15 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร 25 ml

↓

ปิเปตสารละลายจำนวน 1 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml (40 µg/ml)

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

↓

ฉีดซ้ำจำนวน 6 ครั้ง

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชัน

ทำการเจือจางสารสกัดขมิ้นชัน ด้วย acetone HPLC Grade ก่อนนำไปใช้

ชั่งสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณ curcumin 500 mg ใส่ volumetric flask 10 ml (50,000 µg/ml)

↓

เติม acetone จำนวน 5 ml แล้วนำไป sonicate นาน 15 นาที

↓

ปรับปริมาตรด้วย acetone จนครบปริมาตร 10 ml

↓

ปิเปตสารละลายจำนวน 2 ml ใส่ใน volumetric flask 10 ml ปรับปริมาตรด้วย mobile phase จนครบปริมาตร (10,000 µg/ml)

↓

กรองสารละลายด้วย PTFE membrane filter 0.22 µm

* หมายเหตุ เนื่องจากสารเคอร์คิวมิน ไม่คงตัวเมื่อสัมผัสแสงแดด ควรเตรียมใน volumetric flask สีชา และเก็บในที่มืด

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธี COX-2 inhibition assay และ nitric oxide synthase (NOS) activity assay วิเคราะห์ 3 ซ้ำของแต่ละวิธี โดยใช้ rapid test เนื่องจากชุดทดสอบมีจำนวนมากมาย โดยจะคัดเลือกจากราคาที่เหมาะสม วิธีที่ใช้ในการทดสอบเหมาะสมกับเครื่องมือที่มี การเก็บรักษาชุดทดสอบ ประสิทธิภาพของชุดทดสอบ เป็นต้น

cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วย COX-2 inhibitor screening assay kit วิธีการทดสอบขึ้นกับบริษัทผู้ผลิตกำหนด วิธี COX-2 inhibitor screening kit (ELISA) ของบริษัท Cayman (Item No. 701080) มีขั้นตอนการทดสอบโดยสรุปดังนี้

1. เติม ELISA buffer จำนวน 100 µl ในหลุม NSB จำนวน 3 ซ้ำ และเติม ELISA buffer จำนวน 50 µl ในหลุม B_0 จำนวน 3 ซ้ำ
2. เติม prostaglandin screening ELISA standard ทั้ง 8 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ
3. เติมตัวอย่าง จำนวน 50 µl จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง เป็น background sample
4. สำหรับ COX 100% initial activity sample เติมตัวอย่าง จำนวน 50 µl จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง
5. สำหรับ COX inhibitor sample เติมตัวอย่าง จำนวน 50 µl จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง
6. เติม PG screening AChE tracer จำนวน 50 µl ทุกหลุม ยกเว้น หลุม TA และ หลุม background
7. เติม prostaglandin screening ELISA antiserum จำนวน 50 µl ทุกหลุม ยกเว้น หลุม TA และ หลุม background

ตาราง 1 สรุปการเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ COX-2 inhibition assay

Component	Background control, BC (µl)	Total activity, TA (µl)	Non-Specific Blinding, NSB (µl)	Maximum Blinding, B_0 (µl)	Standard, std (µl)	Sample, S (µl)
ELISA Buffer	0	0	100	50	0	0
Standard	0	0	0	0	50	50
Sample	0	0	0	0	0	0
Tracer	0	5*	50	50	0	0
Antiserum	0	0	0	50	0	0

*เติมในขั้นตอน development plate

1. การ incubate plate ปิดเพลตด้วยฝาปิดเพลต incubate 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
2. การ development plate
3. เทสารละลายออกแล้วล้างด้วย wash buffer จำนวน 5 ครั้ง
4. เติม Ellman's reagent ในทุกหลุม จำนวน 200 µl
5. เติม tracer ในหลุม TA จำนวน 5 µl
6. ปิดเพลต ขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 60-90 นาที
7. การอ่านผล
8. เช็ดทำความสะอาดด้านบน plate ให้สะอาดด้วยกระดาษทิชชู เพื่อกำจัดลายนิ้วมือหรือฝุ่นต่าง ๆ
9. วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 และ 420 nm โดยค่า absorbance อาจจะต้องตรวจสอบให้ค่า B_0 ขึ้นไปถึง 0.3 A.U. และควรอ่านค่า absorbance เมื่อค่า B_0 อยู่ระหว่าง 0.3-0.8 A.U. หากค่า absorbance เกิน 1.5 ให้ล้างเพลต แล้วเติม Ellman's reagent และ develop plate ตามขั้นตอนเดิมอีกครั้ง

nitric oxide synthase (NOS) activity assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ด้วย NOS activity assay kit วิธีการทดสอบขึ้นกับบริษัทผู้ผลิตกำหนด วิธี NOS activity assay kit (fluorometric) ของบริษัท Abcam (Ab 211086) มีขั้นตอนการทดสอบโดยสรุปดังนี้

1. **การเตรียมสาร** NOS solution

เติม NOS enzyme 4 µl ในหลุมที่ต้องการ และเติม NOS assay buffer สำหรับเป็น background control จำนวน 30 µl

2. **การเตรียมสารละลายตัวอย่าง**, inhibitor control, enzyme control

ละลายสารตัวอย่างในตัวทำละลายที่เหมาะสม เจือจางด้วย NOS assay buffer 4 เท่า

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่าง 10 µl เติม NOS enzyme 4 µl และ NOS assay buffer

↓

การเตรียม enzyme control นำ NOS enzyme 4 µl ผสมกับ NOS assay buffer 26 µl

↓

ใช้ NOS assay buffer จำนวน 30 µl เป็น background control

↓

incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

3. **ขั้นตอนการผสม เติม** reaction mix

ขั้นตอนการผสม เติม reaction mix จำนวน 11 µl ซึ่งประกอบด้วย diluted NOS cofactor 1 จำนวน 3 µl, diluted NOS cofactor 2 จำนวน 1 µl, NOS substrate จำนวน 2 µl และ nitrate reductase จำนวน 5 µl

เติม reaction mix จำนวน 11 µl ทุกหลุม

↓

ผสมให้เข้ากัน และ incubate plate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. ขั้นตอนการวัดผล

เติม NOS assay buffer จำนวน 110 µl ทุกหลุม และเติม enhancer จำนวน 5 µl ทุกหลุม ผสมในเข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

↓

เติม probe จำนวน 10 µl ทุกหลุม ผสมในเข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

↓

เติม NaOH จำนวน 5 µl ทุกหลุม ผสมในเข้ากัน และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

↓

วัดการดูดกลืนแสง fluorescence Ex/Em ที่ 360/450 nm ใช้ endpoint mode

ตาราง 2 สรุปการเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบ NOS activity assay

Component	Sample, S (µl)	Solvent control, SC (µl)	Enzyme Control, EC (µl)	Inhibitor Control, IC (µl)	Background Control, BC (µl)
NOS Enzyme	4	4	4	4	0
Test compound	10	0	0	0	0
Solvent	0	10	0	0	0
Assay buffer	16	16	26	16	30
incubate 15 min ที่อุณหภูมิห้อง					
เติม reaction mix 11 µl ผสมให้เข้ากัน และ incubate ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง					
เติม NOS assay buffer 110 µl					
เติม enhancer 5 µl และ incubate 10 min ที่อุณหภูมิห้อง					
เติม probe 10 µl และ incubate 10 min ที่อุณหภูมิห้อง					
เติม NaOH 5 µl และ incubate 10 min ที่อุณหภูมิห้อง					

5) **การคำนวณ**

การคำนวณหา % relative inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Relative Inhibition} = \frac{\Delta RFU_{EC} - \Delta RFU_S}{\Delta RFU_{EC}} \text{ X } 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบปริมาณสารเคอร์คิวมิน, เคอร์คิวมินอยด์ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของของสารสกัดขมิ้นชัน ทั้ง 2 ชนิด วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 26.0

บทที่ 4

ผลการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้เพื่อให้ได้มาซึ่งผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่ ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขอบเขตงานวิจัย และวิธีการวิจัยต่าง ๆ จนได้ผลการวิจัยและเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยตามที่กำหนดไว้ รายละเอียดดังนี้

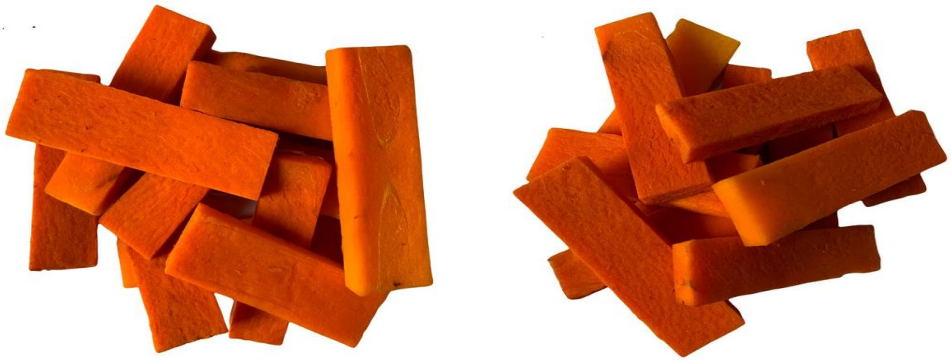
1. การคัดเลือกสมุนไพรขมิ้นชัน และการเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรขมิ้นชัน
2. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม
3. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีสมัยใหม่
4. การหาปริมาณสารเคอร์คิวมินในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry
5. การหาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี HPLC
6. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่
7. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ NOS ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การคัดเลือกสมุนไพรขมิ้นชัน และการเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ เดือนมีนาคม 2565

ภาพประกอบ 4 ขมิ้นชัน

ชิ้นส่วนขมิ้นชันขนาด กว้างxยาวxลึก 1.0x3.0x0.2 เซนติเมตร หั่นให้มีขนาดสม่ำเสมอ



ภาพประกอบ 5 ชิ้นส่วนขมิ้นชัน

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ทอดเคี่ยวนาน 3 ชั่วโมง

ตาราง 3 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดเคี่ยวนาน 3 ชั่วโมง

ครั้งที่	น้ำหนักขมิ้นชัน (กรัม)	ปริมาณน้ำมันมะพร้าว (มล.)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (มล.)	ลักษณะสารสกัด	สารสกัด
1	200.04	100	82	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
2	200.02	100	80	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
3	200.04	100	84	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	

* ความเข้มของสารละลาย

ภาพประกอบ 6 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดเคี่ยวในน้ำมันมะพร้าวนาน 3 ชั่วโมง

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ทอดเคี่ยวนาน 4 ชั่วโมง

ตาราง 4 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดเคี่ยวนาน 4 ชั่วโมง

ครั้งที่	น้ำหนักขมิ้นชัน (กรัม)	ปริมาณน้ำมันมะพร้าว (มล.)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (มล.)	ลักษณะสารสกัด	สารสกัด
1	200.03	100	82	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม ++* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
2	200.03	100	84	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม ++* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
3	200.04	100	82	น้ำมันสีน้ำตาลส้ม ++* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	

* ความเข้มของสารละลาย

ภาพประกอบ 7 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดเคี่ยวในน้ำมันมะพร้าวนาน 4 ชั่วโมง

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีสมัยใหม่

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ทอดกรอบนาน 35 นาที

ตาราง 5 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 35 นาที

ครั้งที่	น้ำหนักขมิ้นชัน (กรัม)	ปริมาณน้ำมันมะพร้าว (มล.)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (มล.)	ลักษณะสารสกัด	สารสกัด
1	200.00	100	82	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
2	200.01	100	84	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
3	200.01	100	82	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	

* ความเข้มของสารละลาย

ภาพประกอบ 8 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 35 นาที

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ทอดกรอบนาน 40 นาที

ตาราง 6 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 40 นาที

ครั้งที่	น้ำหนักขมิ้นชัน (กรัม)	ปริมาณน้ำมันมะพร้าว (มล.)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (มล.)	ลักษณะสารสกัด	สารสกัด
1	200.03	100	80	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
2	200.01	100	80	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
3	200.01	100	82	น้ำมันสีเหลือง +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	

* ความเข้มของสารละลาย

ภาพประกอบ 9 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 40 นาที

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ทอดกรอบนาน 45 นาที

ตาราง 7 ผลการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่ทอดกรอบนาน 45 นาที

ครั้งที่	น้ำหนักขมิ้นชัน (กรัม)	ปริมาณน้ำมันมะพร้าว (มล.)	ปริมาณสารสกัดที่ได้ (มล.)	ลักษณะสารสกัด	สารสกัด
1	200.02	100	84	น้ำมันสีเหลืองน้ำตาล +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
2	200.03	100	82	น้ำมันสีเหลืองน้ำตาล +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	
3	200.02	100	84	น้ำมันสีเหลืองน้ำตาล +* มีกลิ่นขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าว	

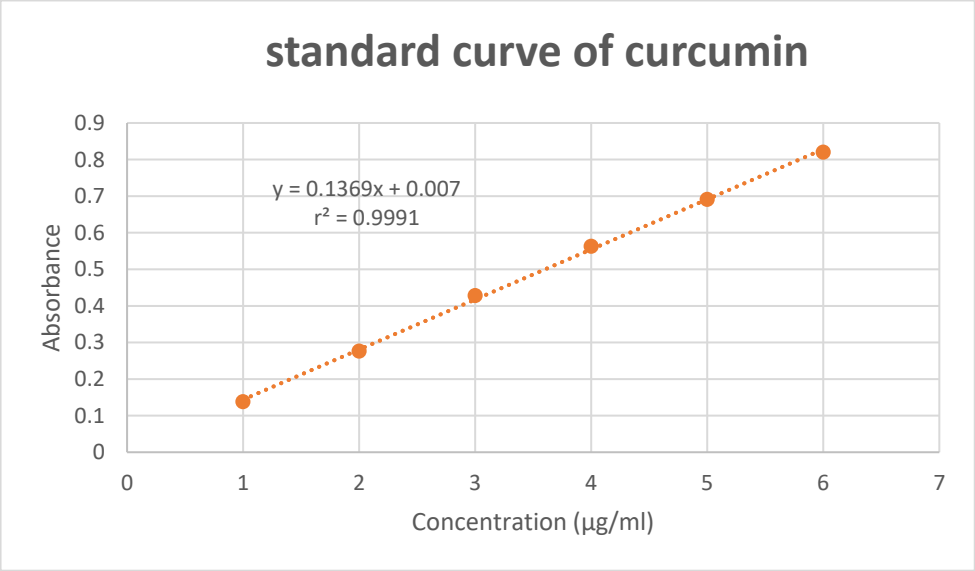
* ความเข้มของสารละลาย

ภาพประกอบ 10 กากชิ้นส่วนขมิ้นชัน ที่ทอดกรอบในน้ำมันมะพร้าวนาน 45 นาที

การหาปริมาณสารเคอร์คิวมินในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry ใช้ absolute ethanol เป็น blank วัดที่ความยาวคลื่น 425 nm และทำการ verification method ด้วยการทำ linearity, range, accuracy และ precision ผลการวิจัย ดังนี้

linearity and range



ภาพประกอบ 11 standard curve of curcumin

จากสมการเชิงเส้น สามารถคำนวณปริมาณสารเคอร์คิวมิน จากสมการเส้นตรง y = 0.1369x + 0.007 โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9991 และช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1 - 6 µg/ml

Accuracy

ตาราง 8 ผลการวิเคราะห์ accuracy สำหรับวิธี UV-Vis spectrophotometry

Replication	Absorbance (Mean ±SD) N= 3	Concentration of curcumin added (µg/ml)	Concentration of curcumin measured (µg/ml)	% Recovery (Mean ± SD)
Concentration 1 µg/ml	0.138 ± 0.000	1.000	0.957	95.690 ± 0.000
Concentration 2 µg/ml	0.276 ± 0.000	2.000	1.965	98.247 ± 0.000
Concentration 3 µg/ml	0.428 ± 0.000	3.000	3.075	102.508 ± 0.000
Concentration 4 µg/ml	0.536 ± 0.000	4.000	4.061	101.534 ± 0.000

Concentration 5 µg/ml	0.691 ± 0.000	5.000	5.996	99.927 ± 0.000
Concentration 6 µg/ml	0.820 ± 0.000	6.000	5.939	98.977 ± 0.000

precision

ทำการวิจัยที่ความเข้มข้น 4 µg/ml ซ้ำทั้งหมดจำนวน 6 ครั้ง เพื่อคำนวณหาค่า %RSD ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ precision

ครั้งที่	**absorbance**
1	0.553
2	0.555
3	0.551
4	0.553
5	0.553
6	0.549
ค่าเฉลี่ย	0.552
%RSD	0.374

จากสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารเคอร์คิวมินกับค่าการดูดกลืนแสง สามารถนำไปคำนวณหาปริมาณสารเคอร์คิวมิน รายละเอียดตามตารางที่ 19

ตาราง 10 ปริมาณร้อยละของสารเคอร์คิวมินของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว

สารสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ	**%w/v curcumin (mg/ml) (mean ± SD)**
35 นาที	0.245 ± 0.003*
40 นาที	0.256 ± 0.003*
45 นาที	0.284 ± 0.002*
3 ชั่วโมง	0.400 ± 0.014*

สารสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ	%w/v curcumin (mg/ml) (mean ± SD)
4 ชั่วโมง	0.363 ± 0.007*

* หมายเหตุ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง

การหาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ ในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์ดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ ด้วยวิธี HPLC

ผลการทำ system suitability

chromatogram: chromatogram of standard A เหมือนกับ chromatogram ของ curcuminoids RS ใน USP

relative retention time: สาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 1.0, 1.1 และ 1.3 ตามลำดับ

resolution, tailing factor, %relative standard deviation of standard B: resolution มากกว่า 2, tailing factor น้อยกว่า 1.5, %relative standard deviation น้อยกว่า 2 ของ standard B: รายละเอียดตามตารางที่ 19

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ accuracy

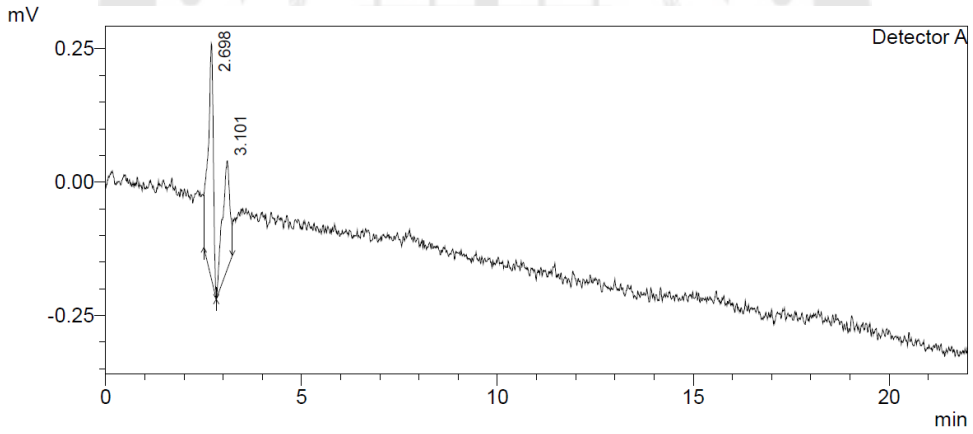
รายการ	Peak area (mean±SD)	Concentration measured (µg/ml)	Concentration added (µg/ml)	%Recovery
curcumin	1,041,458.00 ± 3,645.00	8.94	10.10	88.22
	3,306,820.00 ± 1,174.00	29.20	30.40	96.08
	6,813,434.00 ± 41,582.00	60.56	60.80	99.64
desmethoxy curcumin	314,470.50 ± 775.50	0.26	0.50	50.05
	1,594,121.00 ± 1,460.00	5.58	5.20	107.32
	4,946,729.50 ±	20.87	20.80	100.41

	42,188.50			
bisdesmethoxy	299,519.00 ±	0.24	0.50	47.11
curcumin	2,119.00			
	846,336.50 ±	2.19	2.00	106.97
	555.50			
	3,047,407.50 ±	10.06	10.20	98.64
	11525.50			

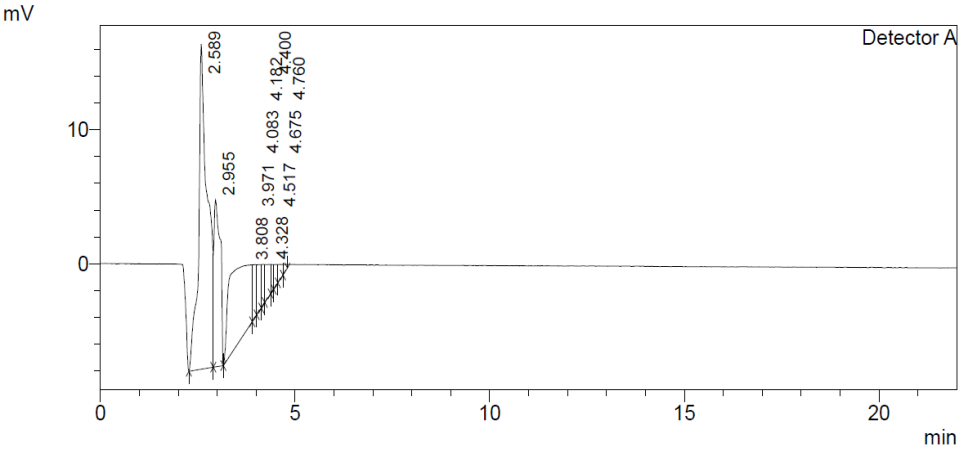
การทำ accuracy พบว่า มีค่า %recovery บางความเข้มข้นไม่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

การทำ precision ผลพบว่าค่า %RSD ของสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ desmethoxycurcumin เท่ากับ 0.960, 0.970 และ 1.090 ตามลำดับ

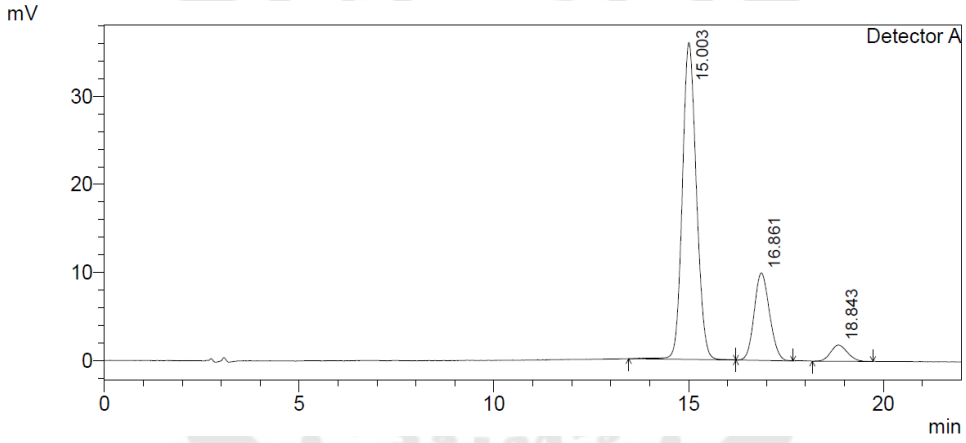
การทำ specificity ของ mobile phase, methanol, สารละลายมาตรฐาน A, สารละลายมาตรฐาน B และสารละลายตัวอย่าง



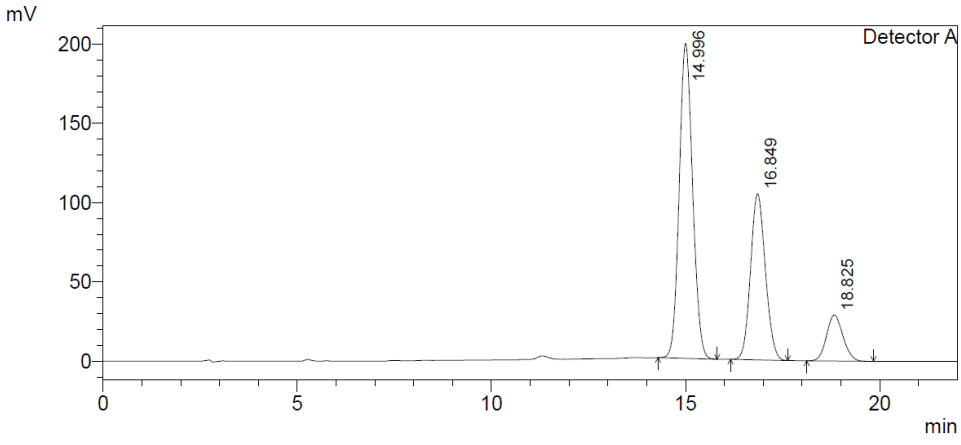
ภาพประกอบ 12 โครมาโตแกรมของ mobile phase



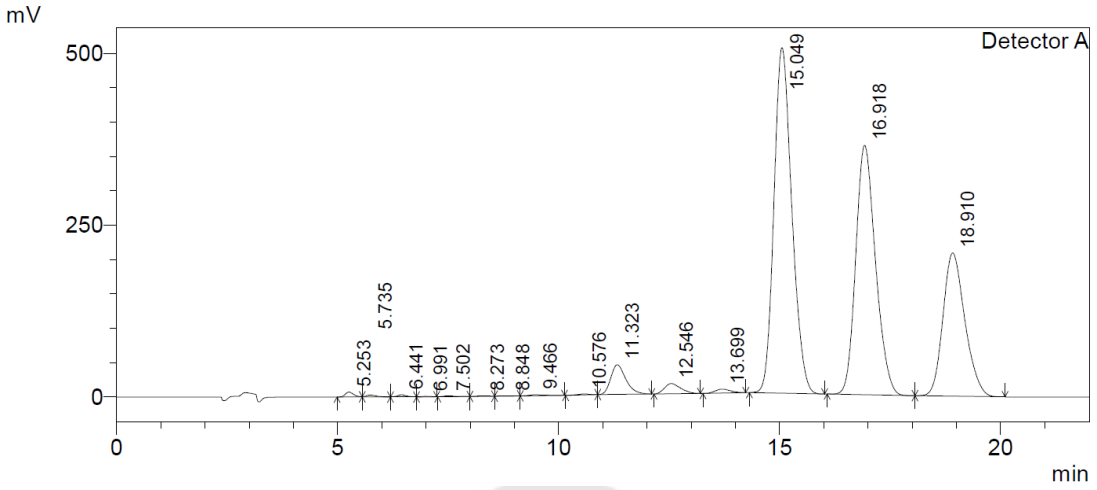
ภาพประกอบ 13 โครมาโตแกรมของ methanol



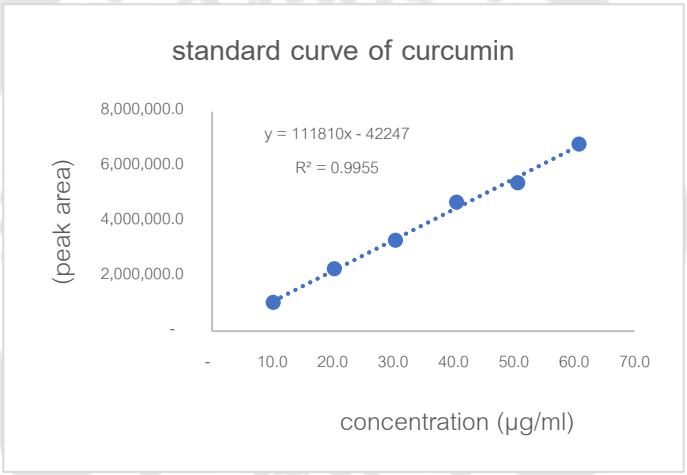
ภาพประกอบ 14 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน A



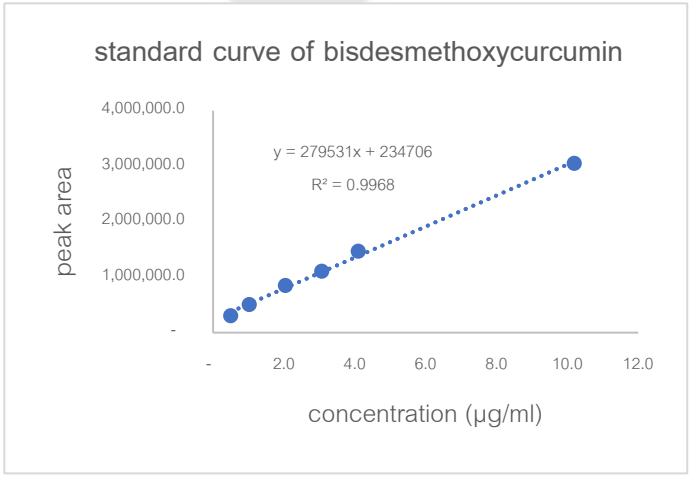
ภาพประกอบ 15 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน B



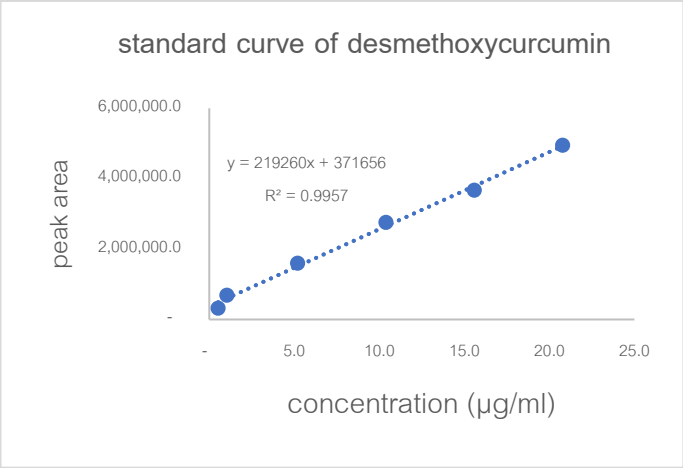
ภาพประกอบ 16 โครมาโตแกรมของสารละลายตัวอย่าง



ภาพประกอบ 17 standard curve of curcumin



ภาพประกอบ 18 standard curve of desmethoxycurcumin



ภาพประกอบ 19 standard curve of bisdesmethoxycumin

จากการวิเคราะห์สมการเส้นตรงของสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin พบว่าได้สมการเส้นตรงดังนี้ y = 111810 – 42247 (r^2 = 0.9955), y = 219260x + 371656 (r^2 = 0.9957) และ y = 279531x + 234706 (r^2 = 0.9968) ตามลำดับ รายละเอียดตามตารางที่ 20 รูปภาพที่ 17, 18 และ 19

ทำการคัดเลือกวิธีการสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ที่มีปริมาณสารเคอร์คิวมินมากที่สุด คือ วิธีสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง และ 45 นาที ตามลำดับ จึงนำสารสกัดขมิ้นชันที่ได้จากทั้ง 2 วิธี มาวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ด้วยวิธี HPLC ต่อไป

การเปรียบเทียบ peak area ของพีคที่เกิดขึ้นก่อนพีคหลัก พบว่า peak area ของสารสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาทีกับสารสกัดนาน 3 ชั่วโมง ที่มีค่า retention time เท่ากับ 11.4, 12.7 และ 13.8 นาที ตามลำดับ มี peak area ไม่แตกต่างกัน รายละเอียดตามตารางที่ 20

ตาราง 12 ผล % w/w curcumin ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวของทั้ง 2 วิธี

สารสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ	**%w/w curcumin mg/mg (mean ± SD)**
45 นาที	
สาร curcumin	0.0309 ± 0.0002*
สาร desmethoxycurcumin	0.0112 ± 0.0002*
สาร bisdesmethoxycurcumin	0.0063 ± 0.0002*

สารสกัดที่ระยะเวลาต่าง ๆ	%w/w curcumin mg/mg (mean ± SD)
3 ชั่วโมง	
สาร curcumin	0.0479 ± 0.0014*
สาร desmethoxycurcumin	0.0172 ± 0.0003*
สาร bisdesmethoxycurcumin	0.0083 ± 0.0002*

* หมายเหตุ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่

ตาราง 13 ผลการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ที่ 420 nm ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว

รายการ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	% Relative inhibition**
blank control	0.172	0.172	-*	0.168	0.004	-
NSB	0.204	0.204	-*	0.207	0.002	-
B_0	1.523	1.523	1.523	1.588	0.053	
45 นาที (N1)	0.823	0.816	0.802	0.814	0.009	55.369
45 นาที (N2)	0.799	0.803	0.798	0.800	0.002	60.520
45 นาที (N3)	0.812	0.865	0.869	0.849	0.026	52.357
ค่าเฉลี่ย % relative inhibition (mean ± SD) = 56.082 ± 4.128**						
3 ชั่วโมง (N1)	0.828	0.857	0.822	0.836	0.351	54.651
3 ชั่วโมง (N2)	0.738	0.781	0.771	0.763	0.018	61.095
3 ชั่วโมง (N3)	0.795	0.763	0.809	0.789	0.019	59.835
ค่าเฉลี่ย %relative inhibition (mean ± SD) = 60.115 ± 3.215**						

* ทำการทดสอบ 2N ตามคู่มือการใช้ชุดทดสอบ

**หมายเหตุ $p > 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ NOS ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้งวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่

ตาราง 14 ผลการยับยั้งเอนไซม์ NOS ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว

รายการ	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD	% Relative inhibition*
blank control	519.235	539.020	563.037	540.431	17.910	24.532
enzyme control	680.409	696.878	704.420	693.902	10.026	3.101
solvent control	760.665	707.404	680.253	716.107	33.400	
45 นาที (N1)	64.565	64.900	59.199	62.888	2.612	91.218
45 นาที (N2)	68.242	67.538	73.002	69.594	2.427	90.282
45 นาที (N3)	73.020	66.569	65.662	68.417	3.276	90.446
ค่าเฉลี่ย % relative inhibition (mean ± SD) = 90.649% ± 0.340*						
3 ชั่วโมง (N1)	45.272	39.814	43.183	42.756	2.249	94.029
3 ชั่วโมง (N2)	49.082	40.705	44.613	44.800	3.422	93.744
3 ชั่วโมง (N3)	45.112	51.230	46.493	47.612	2.620	93.351
ค่าเฉลี่ย % relative inhibition (mean ± SD) = 93.708% ± 0.500*						

* หมายเหตุ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมิน ด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one way ANOVA สรุปผลได้ดังนี้ วิธีการสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว นาน 3 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารเคอร์คิวมินมากที่สุดคือ 0.400 ± 0.014 %w/v อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และวิธีการสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว นาน 35 นาที มีค่าเฉลี่ยปริมาณสารเคอร์คิวมินน้อยที่สุดคือ 0.245 ± 0.003 % w/v ซึ่งความแตกต่างของวิธีการสกัดทั้ง 5 วิธีการสกัดนี้ พบว่ามีวิธีการสกัดอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F = 258.309$, $df = 4, 10$, p-value < 0.001) เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปทำการทดสอบเพื่อหาคู่ที่แตกต่างกันด้วย Borferroni test ผลพบว่า วิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณเฉลี่ยของสารเคอร์คิวมินมากกว่าวิธีการสกัดวิธีสกัดนาน 35, 40, 45 นาที และ

4 ชั่วโมงเท่ากับ 0.155 ± 0.006, 0.144 ± 0.006, 0.116 ± 0.006, และ 0.038 ± 0.006 % w/v ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) แต่พบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 40 นาที มีปริมาณเฉลี่ยของสารเคอร์คิวมินมากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 35 นาที เท่ากับ 0.010 ± 0.006 % w/v แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value > 0.05)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ด้วยวิธี HPLC

ทำการคัดเลือกวิธีการสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม และวิธีสมัยใหม่ที่มีปริมาณสารเคอร์คิวมินมากที่สุด คือ วิธีสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง และ 45 นาที ตามลำดับ จึงนำสารสกัดขมิ้นชันที่ได้จากทั้ง 2 วิธี มาวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ ด้วยวิธี HPLC ต่อไป เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ one way ANOVA สำหรับสารเคอร์คิวมิน ผลพบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณสารเคอร์คิวมินเฉลี่ย (0.048 ± 0.002 % w/w) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที (0.031 ± 0.003 % w/w) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 301.874, df = 1,4, p-value < 0.05) สำหรับสาร desmethoxycurcumin ผลพบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณสาร desmethoxycurcumin เฉลี่ย (0.014 ± 0.005 % w/w) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที (0.011 ± 0.000 % w/w) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 1.150, df = 1,4, p-value > 0.05) สำหรับสาร bisdesmethoxycurcumin ผลพบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีปริมาณสาร bisdesmethoxycurcumin เฉลี่ย (0.007 ± 0.001 % w/w) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที (0.006 ± 0.000 % w/w) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 109.441, df = 1,4, p-value < 0.05)

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2)

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ one way ANOVA ผลพบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 เฉลี่ย (56.082% ± 4.128) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที (60.115% ± 3.215) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 1.783, df = 1, 4, p > 0.05)

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS)

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ one way ANOVA ผลพบว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ nitric oxide synthase เฉลี่ย (93.708 % ± 0.340) มากกว่าวิธีการสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที (90.649 % ± 0.500) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 76.776, df = 1, 4, p-value < 0.05)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่อง การเปรียบเทียบวิธีการสกัดและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่ ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านการอักเสบในสารสกัดขมิ้นชัน ที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ หลังจากได้ผลการวิจัยเรียบร้อยแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อ สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ รายละเอียดดังนี้

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีการสมัยใหม่ สารสกัดขมิ้นชันที่เตรียมได้ จะมีสารสกัดสีเหลืองไปจนถึงสารสกัดสีน้ำตาลส้ม มีกลิ่นของขมิ้นชันและน้ำมันมะพร้าวอย่างชัดเจนทุกวิธีการสกัด จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใช้เวลาในการสกัดที่นานขึ้น สีของสารกัดขมิ้นชันจะมีสีเข้มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของสารเคอร์คิวมินที่วิเคราะห์ได้ ยิ่งสารสกัดมีสีเข้มขึ้น จะพบว่าจะมีปริมาณของสารเคอร์คิวมินเพิ่มมากขึ้น ยกเว้นสารสกัดขมิ้นชันที่ 4 ชั่วโมง ที่มีสีของสารสกัดเข้มมากเป็นสีน้ำตาลส้ม อาจเกิดจากการใช้ระยะเวลาที่นานเกินไป อาจเกิดการเสื่อมสลายของสารสำคัญเป็นสารอื่นได้ จึงทำให้ปริมาณของสารสำคัญน้อยกว่าสารสกัดที่ 3 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมิน ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่วิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Vis spectrophotometry และวิธี HPLC สรุปได้ว่าสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม (3 ชั่วโมง) มีปริมาณสารเคอร์คิวมิน มากกว่าวิธีการเตรียมตามวิธีการสมัยใหม่ (45 นาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีปริมาณสารเคอร์คิวมินเพิ่มขึ้นร้อยละ 29 จากวิธีการสกัดนาน 45 นาที เนื่องจากสารเคอร์คิวมิน เป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน เมื่อสัมผัสกับน้ำมันมะพร้าว ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถละลายสารเคอร์คิวมินออกมาได้เพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณสารเคอร์คิวมินที่พบโดยวิธีวิเคราะห์ด้วย UV-Vis และ HPLC อาจมีปริมาณที่แตกต่าง โดยพบว่าสารเคอร์คิวมินที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีปริมาณน้อยกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เนื่องจากการวิเคราะห์หาปริมาณไม่ได้ทำพร้อมกัน แต่วิเคราะห์ด้วย HPLC หลังจากที่วิเคราะห์ด้วย UV-Vis spectrophotometry

เป็นเวลา 6 เดือน ดังนั้นสารเคอร์คิวมินอาจเสื่อมสลายไปบ้าง จากการศึกษาวิจัยของ Kanchanathawornviboon และคณะ (Kanchanathawornviboon, Monton, & Urairong, 2021, 71-89) นำขมิ้นชันจำนวน 6 กรัม ในน้ำมันมะพร้าว 20 กรัม สกัดด้วยวิธี microwave-assisted extraction ผลพบว่าหากระยะเวลาในการสกัดนานขึ้น ปริมาณผงขมิ้นชันจำนวนน้อย และรอบ irradiation ยิ่งสูง ส่งผลให้ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ยิ่งเพิ่มมากขึ้น และเมื่อทำการทดสอบความคงตัว เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40°C เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ในน้ำมันมะพร้าวเกิดการเสื่อมสลายตัวจากตอนเริ่มแรก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และนอกจากนี้อาจเกิดจากการสัมผัสแสงแดด เนื่องจากไม่ได้เตรียมสารละลายใน volumetric flask สีชา จากงานวิจัยของ Hamidpour และคณะ (Hamidpour et al., 2015, 37-45) พบว่าสารเคอร์คิวมิน สามารถสลายตัวประมาณร้อยละ 90 เมื่อสัมผัสกับแสงแดดนานมากกว่า 30 นาที

นอกจากนี้จากโครมาโตแกรมของสารสกัดขมิ้นชันทั้งสองวิธี เมื่อนำโครมาโตแกรมมาเปรียบเทียบกัน พบว่าลักษณะโครมาโตแกรมของสารสกัดขมิ้นชันทั้ง 2 วิธีไม่แตกต่างกัน และยังพบว่ามีพีคเกิดขึ้นจำนวน 3 พีค ที่ retention time 11.4, 12.7 และ 13.8 ตามลำดับ ก่อนที่จะพบพีคของสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin โดยพีคเล็ก ๆ ที่พบ อาจเกิดจากการเสื่อมสลายหรือการเปลี่ยนโครงสร้างของสารเคอร์คิวมิน เมื่อได้รับความร้อน จากงานวิจัยของ Nidhi และคณะ (Bhatia et al., 2016, 103275-103288) พบว่าสารเคอร์คิวมินมี 2 tautomeric form คือ keto form และ enol form ซึ่งสารเคอร์คิวมิน สามารถเกิด tautomerism และเกิด isomeric form ได้อย่างหลากหลาย และเกิดเป็นสารใหม่เกิดขึ้นโดย conformation equilibrium ของ keto form และ enol form ที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และความมีขั้วของสารละลาย เป็นต้น ซึ่งอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นสิ่งสำคัญในการเกิด keto-enol equilibrium ดังนั้นพีคที่ retention time 11.4, 12.7 และ 13.8 ตามลำดับ น่าจะเป็น tautomer ของสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสภาวะอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น และจากงานวิจัยของ Suresh และคณะ (Suresh, Gurudutt, & Srinivasan, 2009, 807-812) พบว่าสารเคอร์คิวมินเมื่อโดนความร้อนจะทำให้สารเคอร์คิวมินเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือเกิดการเสื่อมสลาย แบ่งออกเป็น 1. เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เกิด conjugated double bond ของสารเคอร์คิวมิน ทำให้ maximum absorption ของสารเคอร์คิวมินเกิดการ shift เกิดขึ้น 2. การเกิด polymerization ของสารเคอร์คิวมิน ทำให้ absorption profile ของสารเคอร์คิวมิน เกิดการเปลี่ยนแปลง 3. เกิดการเสื่อมสลายของสารเคอร์คิวมิน เกิดสารใหม่ที่มีโมเลกุลเล็กลง โดยสาร

หลัก ๆ 4 ชนิดที่พบหลักจากให้ความร้อนแล้วเกิดการเสื่อมสลาย ได้แก่ ferulic acid, vanillin, vanillic acid และสารอื่น ๆ ที่ไม่สามารถระบุเอกลักษณ์ได้ (curcumin isoform) ซึ่งสาร ferulic acid, vanillin, vanillic acid มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Chainoglou และ Hadjipavlou-Litina (Chainoglou & Hadjipavlou-Litina, 2019, 821-842) พบว่างานวิจัยตั้งแต่ปี 2008-2018 มีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์อนุพันธ์ของสารเคอร์คิวมินเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีสารจำนวนมากที่มีฤทธิ์ anti-proliferative และฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าวให้เกิดความชัดเจนมากยิ่งขึ้น เช่น สาร furanyl ring และ vanillin moiety จะยับยั้งการสร้าง prostagrandib E_2 สาร diarylpentanoids analogs จะยับยั้งการสร้าง NO เป็นต้น

เมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวทั้ง 2 วิธี ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวัดการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NOS สรุปได้ว่า สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว ที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม (3 ชั่วโมง) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ($p > 0.05$) และ NOS ($p < 0.05$) มากกว่าสารสกัดขมิ้นชันที่เตรียมตามวิธีการสมัยใหม่ (45 นาที) ดังนั้นสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมและวิธีสมัยใหม่ พบว่ามีปริมาณสารเคอร์คิวมินเป็นหลัก มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NOS ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Chainani-WU (Chainani-WU, 2003, 161-168) โดยวิธีการสกัดที่ได้ปริมาณสารเคอร์คิวมินเพิ่มมากขึ้น จะสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ

จากการวิจัยสรุปได้ว่าการเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว โดยนำไปทอดที่อุณหภูมิประมาณ 160 °C นาน 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิมเป็นวิธีที่ได้ปริมาณสารเคอร์คิวมิน และฤทธิ์ต้านการอักเสบในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 และ NOS ได้มากที่สุด จากข้อมูลงานวิจัยนี้สามารถนำไปกำหนดแนวทางในการพิจารณาการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนไทยที่มีสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าว สำหรับยาใช้ภายนอก สำหรับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา หรือ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก โดยแนะนำให้นำขมิ้นชันสดไปทอดในน้ำมันมะพร้าว ที่อุณหภูมิ ประมาณ 160 °C นาน 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีการเตรียมตามวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเตรียมสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำมันมะพร้าวใหม่ เพื่อทดสอบหาปริมาณของสารสำคัญด้วย HPLC และเพื่อทดสอบว่าพบสารอื่นที่นอกเหนือจากสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เกิดสารใหม่ตั้งแต่แรกหรือไม่
2. ควรแยกและวิเคราะห์สารที่เกิดขึ้นนอกเหนือจากสาร curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว เนื่องจากอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้
3. ควรมีการศึกษาความคงสภาพของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม เพื่อสามารถกำหนดวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสม
4. ควรทำ full method validation ของวิธีวิเคราะห์สาระสำคัญของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าวที่เตรียมวิธีการแพทย์แผนไทยดั้งเดิม ด้วยวิธี HPLC เพื่อให้ความแม่นยำและน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

บรรณานุกรม

Amalraj, A., Pius, A., Gopi, S., & Gopi, S. (2017). Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. *Journal of Traditional Complement Medicine, 7*(2),205-233. doi:10.1016/j.jtcme.2016.05.005

Ashraf, K. S., Sadia (2017). A comprehensive review on *Curcuma longa* Linn.: Phytochemical, pharmacological, and molecular study. *International Journal of Green Pharmacy, 11*(4),672-685.

Bhatia, N. K., Kishor, S., Katyal, N., Gogoi, P., Narang, P., & Deep, S. (2016). Effect of pH and temperature on conformational equilibria and aggreation behaviour of curcumin in aqueous binary mixture of wthanol. *The Royal Soiety of Chemistry, 6*(105),103275-103288.

Bhowmik, D., Chiranjib, Kumar, K. P. S., Chandira, M., & B.Jayakar. (2009). Turmeric: A Herbal and Traditional Medicine. *Archives of Applied Science Research, 1*(2),86-108.

Chainani-WU, N. (2003). Safety and Anti-inflammatory activity of Curcumin: A component of turmeric (*Curcuma longa*). *The jouranal of alternative and complementary medicine, 9*(1),161-168.

Chainoglou, E., & Hadjipavlou-Litina, D. (2019). Curcumin analoges and derivatives with anti-proliferative and anti-inflammatory activity: Structral characeristics and molecular targets. *Expert Opinion on Drug Discovery, 14*,821-842. doi:10.1080/17460441.2019.1614560

Esatbeyoglu, T., Katrin, U., Clemens, R., & Gerald, R. (2015). The thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activit y of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Function, 6*,887-893. doi:10.1039/c4fo00790e

Ghasemian, M., Owlia, S., & Owlia, M. B. (2016). Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Advances in Pharmacological Sciences, 2016*,1-11. doi:10.1155/2016/9130979

Guimarães, A. F., Vinhahs, A. C. A., Gomes, A. F., Souza, L. H., & Kreepsky, P. B. (2020). Essential oil of *Curcuma longa* l. Rhizomes chemical composition, yield variation and stabilit y. *Química Nova, 43*(7),909-1013. doi:10.21577/0100-4042.20170547

Hamidpour, R., Hamidpour, S., Hamodpour, M., Sohraby, M., & Hamidpour, R. (2015). Turmeric (*Curcuma longa*): From a Variety of Traditional Medicinal Applications to its Novel Roles as Active Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Cancer and Anti-Diabetes. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine, 1*,37-45. doi:10.18052/www.scipress.com/IJPPE.1.37

Júnioe, J. O. d. O., Junior, C. S. A. P., & Cohen, C. P. (2016). Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Revista Dor. São Paulo, 17*(1),35-42. doi:10.5935/1806-0013.20160045

Kanchanathawornviboon, X., Monton, C., & Urairong, H. (2021). Microwave-assisted extraction of curcuminoids from organic *Curcuma longa* L. in diferent oil type for cosmetic purpose: An optimization approach. *Journal of current Science and Technology, 11*(11),71-89.

Khalandar, S. D., Adithya, T. N., Basha, S. J., & Koshma, M. (2018). A Current review on *Curcuma longa* Linn. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 8*(1),68-73.

Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2009). High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology, 2*(5),22-26.

Oommen, B. B. A. Y. T. O. V. (2004). From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. Expert Opin. *Investigational Drugs 13*(10),1327-1338.

Pahwa, R., Singh, A., & Jialal, I. (2018). *Chronic inflammation*: StatPearls Publishing.

Prafulla Sabale, A. M. V. S. (2013). *Curcuma longa* linn. A Phytochemical and Phytopharmacological Review. *Research Journal of Pharmacognosy and*

Phytochemistry, 5(2),59-68.

Radha, A., Ragavendran, P., Thomas, A., & Kumar, S. D. (2016). A cost effective HPLC method for the analysis of curcuminoids. *H ygeia journal for drugs and medicines, 8*(1),1-15. doi:10.15254/H.J.D.Med.8.2016.152

Rathore, S., Mukim, M., Sharma, P. D., Siwani , & Nagar, J. C. K., Mohammad (2020). Curcumin: A re view for health benefits. *International Journal of Research and Review, 7*(1),273-290.

Sandur, S. K., Pandey, M. K., Sung, B., Ahn, K. S., Murakamai, A., Sethi, G., . . . Aggarwal, B. B. (2007). Curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially, regulate anti-inflammatory and anti-poliferative responses through a ROS-independent machanism. *Carcinogenesis, 28*(8),1765-1773.

Sarveswaran, R., Jayasuriya, W. J. A. B. N., & Suresh, T. S. (2017). In Vitro assays to investigate the anti-inflammatory activity of herbal extract: A review. *World Journal of Pharmaceutical Research, 6*(17),131-141. doi:10.20959/wjpr201717-10058

Shirwaikar, S. K. A., & Shirwaikar, A. (2015). Coconut oil a review of potential applicatios. *Hygeia journal for drugs and medicines, 7*(2),34-41. doi:10.15254/H.J.D.Med.7.2015.149

Suresh, D., Gurudutt, K. N., & Srinivasan, K. (2009). Degradation of bioactive spice compound: curcumin during domestic cooking. *European Food Research and Technology, 228*,807-812.

Takenaka, M., Ohkubo, T., Okadome, H., Sotome, I., Itoh, T., & Isobe, S. (2013). Effective Extraction of Curcuminoids by Grinding Turmeric (*Curcuma longa*) with Medium-chain Triacylgl ycerols. *Food Science Technology Research, 19*(4),655-659.

Wallace, T. C. (2019). Health Effects of Coconut Oil - A Narrative Review of Current Evidence. *Journal of the American College of Nutrition, 38*(2),97-107. doi:10.1080/07315724.2018.1497562

Wongpoowarak, W., Pichayakorn, W., Oungbho, K., & Boontaweesakul, W. (2009). Model of Degradation Kinetics for Coconut oil at Various Heating Temperature. *Silpakorn*

University of Sciences and Technology Journal, 2(2),43-49. doi:10.14456/sustj.2008.10

กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2560). ขมิ้นชัน. ตำราสรรพคุณยา ชุดตำราภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย ฉบับอนุรักษ์ (47). กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อและสิ่งพิมพ์แก้วเจ้าจอม มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). ขมิ้นชัน. *Thai Herbal Pharmacopoeia 2020* (141-149). กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

กระทรวงสาธารณสุข. (2552). ขมิ้นชัน. ตำราอ้างอิงยาสมุนไพร เล่ม *1* (121-127). กรุงเทพมหานคร: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง (มหาชน).

กลุ่มงานสนับสนุนการขึ้นทะเบียนยาและผลิตภัณฑ์สมุนไพร. (2564, 13 มกราคม). การประชุมผู้เชี่ยวชาญด้านการแพทย์แผนไทยและเภสัชกรรม "การเตรียมยาน้ำมันในตำรับยาแผนไทย". Retrieved from นนทบุรี:

เกษวราภรณ์ วงษ์พิมพ์. (2562). สรรพคุณยาแผนโบราณที่พบในคำขอขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณ กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก พ.ศ. *2559-2562*. กรมการแพทย์แผนไทยและการแแพทย์ทางเลือก.

ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต, & วิเชียร จีรวงส์. (2542). คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์ (117-138). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อมรินทร์.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ซึ่งการผลิตหรือนำเข้าเพื่อขาย ต้องได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับ ใบรับแจ้งรายละเอียดหรือใบรับจดแจ้ง และชื่อ ปริมาณ และเงื่อนไขของวัตถุที่อาจใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สมุนไพร สำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ขอจดแจ้ง พ.ศ. 2562. (2564, 31 พฤษภาคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 138 ตอนพิเศษ 116 ง 19-20.

พระราชบัญญัติผลิตภัณฑ์สมุนไพร พ.ศ. 2562. (2562, 30 เมษายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่มที่ 136 ตอนที่ 56 ก. 121-164.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). ขมิ้นชัน. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย (124). กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ accuracy สำหรับวิธี UV-Vis spectrophotometry

Replication	Absorbance (Mean ±SD) N= 3	Concentration of curcumin added (µg/ml)	Concentration of curcumin measured (µg/ml)	% Recovery (Mean ± SD)
Concentration 1 µg/ml	0.138 ± 0.000	1.000	0.957	95.690 ± 0.000
Concentration 2 µg/ml	0.276 ± 0.000	2.000	1.965	98.247 ± 0.000
Concentration 3 µg/ml	0.428 ± 0.000	3.000	3.075	102.508 ± 0.000
Concentration 4 µg/ml	0.536 ± 0.000	4.000	4.061	101.534 ± 0.000
Concentration 5 µg/ml	0.691 ± 0.000	5.000	5.996	99.927 ± 0.000
Concentration 6 µg/ml	0.820 ± 0.000	6.000	5.939	98.977 ± 0.000

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินในสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 35 นาที					
สารสกัด	Absorbance			Average Abs.	Conc. (µg/ml)*
ครั้งที่ 1	0.411	0.411	0.411	0.411	5,617.021
ครั้งที่ 2	0.411	0.411	0.411	0.411	5,617.021
ครั้งที่ 3	0.417	0.417	0.418	0.417	5,706.856
ความเข้มข้นเฉลี่ย (mean ± SD) = 5,646.966 ± 51.866					

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 40 นาที

สารสกัด	Absorbance			Average Abs.	Conc. (µg/ml)*
ครั้งที่ 1	0.439	0.439	0.439	0.439	6,014.184
ครั้งที่ 2	0.446	0.446	0.446	0.446	6,113.475
ครั้งที่ 3	0.439	0.439	0.439	0.439	6,014.184
ความเข้มข้นเฉลี่ย (mean ± SD) = 6,047.281 ± 57.326					

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 45 นาที

สารสกัด	Absorbance			Average Abs.	Conc. (µg/ml)*
ครั้งที่ 1	0.475	0.475	0.475	0.475	6,524.823
ครั้งที่ 2	0.480	0.480	0.480	0.480	6,595.745
ครั้งที่ 3	0.468	0.468	0.468	0.468	6,425.532
ความเข้มข้นเฉลี่ย (mean ± SD) = 6,515.366 ± 85.499					

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 3 ชั่วโมง

สารสกัด	Absorbance			Average Abs.	Conc. (µg/ml)*
ครั้งที่ 1	0.653	0.654	0.654	0.654	9,059.102
ครั้งที่ 2	0.69	0.691	0.691	0.691	9,583.924
ครั้งที่ 3	0.684	0.684	0.684	0.684	9,489.362
ความเข้มข้นเฉลี่ย (mean ± SD) = 9,377.463 ± 279.733					

สารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว 4 ชั่วโมง

สารสกัด	Absorbance			Average Abs.	Conc. (µg/ml)*
ครั้งที่ 1	0.617	0.617	0.616	0.617	8,534.279
ครั้งที่ 2	0.607	0.607	0.607	0.607	8,397.163
ครั้งที่ 3	0.600	0.600	0.600	0.600	8,297.872
ความเข้มข้นเฉลี่ย (mean ± SD) = 8,409.771 ± 118.707					

* Concentration เป็นค่าเฉลี่ยของการวัดทั้ง 3 ครั้ง (mean ±SD)

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ resolution, tailing factor, relative standard deviation

Item	Retention time*	Peak area*	Resolution	Tailing factor
		N 1		
CUR	15.0	4,767,406.0		1.1
DMC	16.8	2,789,384.0	2.8	1.1
BDMC	18.8	854,119.0	2.6	1.1
		N 2		
CUR	15.0	4,724,848.0		1.1
DMC	16.8	2,761,774.0	2.7	1.1
BDMC	18.8	844,221.0	2.6	1.1
		N 3		
CUR	15.0	4,730,672.0		1.1
DMC	16.8	2,772,714.0	2.6	1.1
BDMC	18.8	850,983.0	2.5	1.1
		N 4		
CUR	15.0	4,639,188.0		1.1
DMC	16.8	2,718,788.0	2.6	1.2
BDMC	18.8	829,196.0	2.5	1.2
		N 5		
CUR	15.0	4,694,467.0		1.1
DMC	16.9	2,745,629.0	2.6	1.2
BDMC	18.8	840,780.0	2.5	1.2
		N 6		
CUR	15.0	4,674,741.0		1.2
DMC	16.8	2,729,732.0	2.6	1.2
BDMC	18.8	836,971.0	2.5	1.2
%RSD	curcumin	1.0		
	desmethoxycurcumin	1.0		

bisdesmethoxycurcumin	1.1

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์สมการเชิงเส้น (linearity)

รายการ/ความเข้มข้น	ครั้งที่	Retention time	Peak area	Average ± SD
curcumin				
10.1 µg/ml	1	15.0	1,045,103.0	1,041,458.0 ±
	2	15.0	1,037,813.0	3,645.0
20.3 µg/ml	1	15.0	2,256,710.0	2,271,133.0 ±
	2	15.0	2,285,556.0	14,423.0
30.4 µg/ml	1	15.0	3,307,994.0	3,306,820.0 ±
	2	15.0	3,305,646.0	1,174.0
40.5 µg/ml	1	15.0	4,698,772.0	4,697,278.0 ±
	2	15.0	4,695,784.0	1,494.0
50.7 µg/ml	1	15.0	5,473,447.0	5,401,804.0 ±
	2	15.0	5,330,160.0	71,643.5
60.8 µg/ml	1	15.2	6,855,016.0	6,813,434.0 ±
	2	15.2	6,771,852.0	41,582.0
desmethoxycurcumin				
0.5 µg/ml	1	16.8	315,246.0	314,470.0 ±
	2	16.8	313,695.0	775.5
1.0 µg/ml	1	16.8	681,477.0	686,746.0 ±
	2	16.8	692,015.0	5,269.0
5.2 µg/ml	1	16.8	1,592,661.0	1,594,121.0 ±
	2	16.8	1,595,581.0	1,460.0
10.4 µg/ml	1	16.8	2,754,293.0	2,753,582.0 ±
	2	16.9	2,752,872.0	710.5
15.6 µg/ml	1	16.9	3,711,389.0	3,666,565.0 ±

รายการ/ความเข้มข้น	ครั้งที่	Retention time	Peak area	Average ± SD
	2	16.9	3,621,742.0	44,823.5
20.8 µg/ml	1	17.1	4,988,918.0	4,946,730.0 ±
	2	17.1	4,904,541.0	42,188.5
bisdesmethoxycurcumin				
0.5 µg/ml	1	18.8	145,015.0	144,544.0 ±
	2	18.8	144,073.0	471.0
1.0 µg/ml	1	18.8	297,400.0	299,519.0 ±
	2	18.8	301,638.0	2,119.0
2.0 µg/ml	1	18.8	504,969.0	502,839.0 ±
	2	18.8	500,709.0	2,130.0
3.1 µg/ml	1	18.8	846,892.0	846,336.5 ±
	2	18.8	845,781.0	555.5
4.1 µg/ml	1	18.8	1,116,687.0	1,103,399.0
	2	18.8	1,090,111.0	13,288.0
10.2 µg/ml	1	19.1	3,035,882	3,047,407.5 ±
	2	19.2	3,058,933	11525.5

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำมันมะพร้าว

	สารละลายตัวอย่าง			
รายการ	Retention time	Peak area	Average peak area	SD
สารสกัดขมิ้นชัน 45 นาที (N1) ครั้งที่ 1				
CUR	15.2	3,446,404.0	3,445,993.5	410.5
DMC	17.1	2,891,191.0	2,887,664.5	3,526.5
BDMC	19.1	2,058,656.0	2,058,811.5	155.5

สารละลายตัวอย่าง				
รายการ	Retention time	Peak area	Average peak area	SD
สารสกัดขมิ้นชัน 45 นาที (N1) ครั้งที่ 2				
CUR	15.2	3,445,583.0		
DMC	17.1	2,884,138.0		
BDMC	19.1	2,058,967.0		
สารสกัดขมิ้นชัน 45 นาที (N2) ครั้งที่ 1				
CUR	15.1	3,408,260.0	3,409,473.0	1,213.0
DMC	17.0	2,794,477.0	2,801,703.0	7,226.0
BDMC	19.0	1,950,804.0	1,963,734.0	12,930.0
สารสกัดขมิ้นชัน 45นาที (N2) ครั้งที่ 2				
CUR	15.1	3,410,686.0		
DMC	17.0	2,808,929.0		
BDMC	19.0	1,976,664.0		
สารสกัดขมิ้นชัน 45 นาที (N3) ครั้งที่ 1				
CUR	15.1	3,340,428.0	3,386,853.5	46,425.5
DMC	17.0	2,746,590.0	2,787,334.5	40,744.5
BDMC	19.0	1,896,058.0	1,928,707.5	32,649.5
สารสกัดขมิ้นชัน 45 นาที (N3) ครั้งที่ 2				
CUR	15.1	3,433,279.0		
DMC	17.0	2,828,079.0		
BDMC	19.0	1,961,357.0		
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N1) ครั้งที่ 1				
CUR	15.1	5,149,764.0	5,147,780.5	1,983.5
DMC	17.0	4,041,032.0	4,044,162.5	3,130.5
BDMC	19.0	2,532,741.0	2,536,740.5	3,999.5

สารละลายตัวอย่าง				
รายการ	Retention time	Peak area	Average peak area	SD
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N1) ครั้งที่ 2				
CUR	15.1	5,145,797.0		
DMC	17.0	4,047,293.0		
BDMC	19.0	2,540,740.0		
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N2) ครั้งที่ 1				
CUR	15.2	5,503,111.0	5,520,277.0	17,166.0
DMC	17.1	4,165,812.0	4,188,427.0	22,615.0
BDMC	19.2	2,476,950.0	2,502,518.5	25,568.5
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N2) ครั้งที่ 2				
CUR	15.2	5,537,443.0		
DMC	17.1	4,211,042.0		
BDMC	19.2	2,528,087.0		
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N3) ครั้งที่ 1				
CUR	15.2	5,297,416.0	5,289,794.5	7,621.5
DMC	17.1	4,188,793.0	4,183,493.5	5,299.5
BDMC	19.1	2,638,777.0	2,639,003.0	226.0
สารสกัดขมิ้นชัน 3 ชั่วโมง (N3) ครั้งที่ 2				
CUR	15.2	5,282,173.0		
DMC	17.1	4,178,194.0		
BDMC	19.1	2,639,229.0		

ตาราง 20 การเปรียบเทียบ peak area ของพีคที่เกิดขึ้นก่อนพีคสาระสำคัญ

Retention time	Average peak area	SD
	สารสกัดขมิ้นชันนาน 45 นาที	
11.4	379,269.5	5,437.4
12.7	182,853.7	2,392.6
13.8	52,808.2	1,461.1
	สารสกัดขมิ้นชันนาน 3 ชั่วโมง	
11.4	383,790.7	13,343.2
12.7	144,583.0	4,748.8
13.8	50,174.5	3,254.2

ประวัติผู้เขียน