



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน

(A Study of anti-osteoporotic activity of Thai medicinal plants)

โดย นางสาวนิตา ไทรชมพู และคณะ

พฤษภาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ด้านกระดูกพรุน

คณะผู้วิจัย สังกัด

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| 1. นางสาววนิดา ไทรชมภู | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| 2. นางสาวประสพอร รินทอง | คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| 3. นางสาวอรรชนี มหรรฆานุเคราะห์ | คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับโครงการวิจัยนี้
ภายใต้ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ พ.ศ. 2551

Abstract

The study of anti-osteoporotic activity aim to collect of the medicinal plants which have been traditionally used as improved tendon functions, the relief muscle fatigue, the nourishment of bone joint and bone tissue and also tonic about 9 medicinal plants such as *Siphonodon celastrineus* Griff, *Ficus hispida* Linn, *Strychnos axillaries* Colebr., *Jasminum anodontum* Gagnep, *Sambucus javanica* Reinw., *Sophora tomentosa* Linn., *Entada glandulosa* Pierre ex Gagnep, *Achyranthes aspera* Linn. and *Morinda citifolia* Linn. Different solvents including dichloromethane, ethyl acetate and ethanol were used to extract and to evaluate a preliminary phytochemical screening and to present a TLC separation of these plants. Total phenolic contents were determined using spectrophotometric technique, based on Folin-ciocalteu colorimetric method and calculate as gallic acid equivalents GAE/g extract. The results showed that the crude extract of medicinal plants were obtained different the percentage of yield. The dichloromethane, ethyl acetate and ethanol extract from *M. citifolia* were obtained highest the percentage of yield about 5.11, 6.55 and 20.98, respectively. The phytochemical screening of the dichloromethane extract showed the presence of alkaloid, phenolic and tannin. All of the ethyl acetate and ethanol extract from medicinal plants showed the presence of alkaloid, phenolic and tannin. Moreover, the extract from *M. citifolia* and *E. glandulosa* showed the presence of flavonoid. The high total phenolic contents of the ethanol extract from *S. javanica* was obtained 258.27 ± 3.341 mg GAE/g extract and the less total phenolic contents of the ethanol extract from *S. axillaries* was obtained 19.46 ± 11.25 mg GAE/g extract. The thin layer chromatogramme of the dichloromethane, ethyl acetate and ethanol extract of *A. aspera*, *F. hispida*, *J. anodontum*, *M. citifolia* and *S. axillaries* developed using an optimized solvent system with chloroform : methanol (9 : 1) and chloroform : methanol (8 : 2) but dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2) for *E. glandulosa* *S. celastrineus* and *Sambucus javanica*. Conclusion, the study showed only preliminary phytochemical screening and total phenolic contents from medicinal plants but the antiosteoporotic activity test was not report.

Keyword: Osteoporosis, Total phenolics, herbal medicine, Phytochemical screening

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ มะดูก มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไล่ไก่ สะพานก๊ก สารพัดพิษ สะบ้ายี่ กล้วยพังกู และยอบ้าน โดยศึกษาพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอล หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetric คำนวณให้อยู่ในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 1 กรัมของสารสกัด และการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารสำคัญ ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเอทานอลมีค่าร้อยละของสารสกัดหยาบมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.11, 6.55 และ 20.98 ตามลำดับ ผลการตรวจสอบพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นพบว่า สมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนส่วนใหญ่จะพบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต และเอทานอลของตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดนี้พบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟีนอลิกและแทนนินเป็นส่วนใหญ่ และยอบ้านและสะบ้ายี่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ผลการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดด้วยเอทานอลพบว่า สารสกัดจากต้นสะพานก๊กมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 258.27 ± 3.341 mg GAE/g สารสกัด และสารสกัดจากขวากไก่มีค่าน้อยสุดเท่ากับ 19.46 ± 11.25 มก. GAE/กรัมของสารสกัด ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมพบว่า โดยใช้ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (9 : 1) และ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล (8 : 2) สามารถที่ใช้แยกสารสกัดหยาบของกล้วยพังกู มะเดื่อปล้อง ไล่ไก่ ยอบ และ ขวากไก่ ส่วนต้นสะบ้ายี่ มะดูก และสะพานก๊กสามารถใช้ระบบตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน : เอทิลอะซิเตต (8 : 2) จากผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบพิษวิทยาเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรพื้นบ้านอีสานและปริมาณสารฟีนอลิกรวม แต่ยังขาดผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยากระดูกพรุนเบื้องต้นในหลอดทดลอง

คำสำคัญ โรคกระดูกพรุน ปริมาณสารฟีนอลิกรวม สมุนไพรพื้นบ้านอีสาน พิษวิทยาเคมีเบื้องต้น

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน (A Study of anti-osteoporotic activity of Thai medicinal plants)

ชื่อหัวหน้าโครงการ นางสาววนิดา ไทรชมภู

หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็นจากตำรายาไทย ตำราสมุนไพรต่างๆ จากวารสารและบทความทางวิชาการต่างๆ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) และฤทธิ์ลดการสลายกระดูก (Bone resorption) เบื้องต้นของสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรที่มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) และฤทธิ์ลดการสลายกระดูก (bone resorption)

สิ่งที่ได้จากการดำเนิน

1. จากการคัดเลือกสมุนไพรพื้นบ้านอีสานที่มีสรรพคุณแก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะดูก มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไส้ไก่ สะพานกัน สารพัดพิษ เขี้ยวงู สะบ้าลิง หญ้าพันงู และยอบ้าน พบปัญหาอุปสรรคคือเมื่อไปหาแหล่งต้น authentic sample ของสมุนไพรจริงพบว่า สมุนไพรพื้นบ้านอีสานจะพบในป่าเป็นส่วนใหญ่ และต้องมีการสอบถามจากหมอพื้นบ้านที่รู้จักสมุนไพรชนิดนั้นๆ จึงรวมทั้งยังมีเรียกชื่อสมุนไพรที่แตกต่างกันแต่อาจเป็นต้นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ต้นเขี้ยวงู มีชื่ออื่นว่า ขวากไก่ และมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นชื่อพ้อง synonym กันคือ *Strychnos axillaries* Colebr. (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) เป็นต้น ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถหาพืชสมุนไพรได้ครบตามที่กำหนดและสมุนไพรที่หาได้มีปริมาณน้อย จึงไม่เพียงพอในการทำวิจัยซึ่งสมุนไพรดังกล่าวไม่มีตัวอย่างพืชแห้งจำหน่ายในร้านขายยาแผนโบราณ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างต้น authentic sample ได้จำนวน 9 ชนิดเท่านั้น ส่วนของพืชที่ใช้แตกต่างกัน เช่น ทั้งต้น ใบ ราก นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ผลการสกัดพบว่าได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดสีน้ำตาลอ่อน ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน มีค่า %yield ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า หากสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol จะได้ %yield ค่อนข้างสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น แต่สมุนไพรบางชนิดก็สามารถสกัดได้สารสกัดหยาบที่มี %yield สูงทุกตัวทำละลาย เช่น ใบยอบ

2. การหาปริมาณสารสำคัญและการตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มต่างๆ พบว่า การตรวจสอบพิษเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่ม alkaloid, flavonoid, anthraquinone, saponin, phenolic, tannin และ terpenoid พบว่า สมุนไพรพื้นบ้านทั้ง 9 ต้นนั้น ส่วนใหญ่พบสารกลุ่ม alkaloid, phenolic และ tannin มีเพียงต้น สะบ้าลิง ยอบ้าน และสะพานกันที่พบสารกลุ่ม flavonoid โดยที่สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ ethanol มีกลุ่มสารสำคัญที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid, phenolic, tannin และ flavonoid ดังนั้น จึงนำสารสกัดหยาบด้วย ethanol มาหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic) โดยจากการทบทวนงานวิจัยพบว่า สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญหลายฤทธิ์ด้วยกัน เช่น ฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระฤทธิ์เพิ่มการสร้างเซลล์สร้างกระดูก เป็นต้น ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethanol รายงานเป็นค่าเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน gallic acid (mg of gallic acid equivalent/g of extract) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากต้นสะพ้านก้นมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 258.27 ± 3.341 mg GAE/g สารสกัด และสารสกัดจากขวากโก้นี้น้อยสุดเท่ากับ 19.46 ± 11.25 mg GAE/g

นอกจากนั้น ได้ทราบระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยวิธีทางThin layer chromatography โดยนำสารสกัดหยาบด้วย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ของสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด (ยกเว้น สารพัดพิษ) มาหา solvent system ได้แก่ dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2), chloroform : methanol (9 : 1), chloroform : methanol (8 : 2), ethanol : ethyl acetate (8 : 2), chloroform : acetic acid : water (5 : 4.5 : 0.5) และ toluene : ethyl acetate (7 : 3) มาหา ระบบตัวทำละลายในการแยกสารสำคัญ และตรวจสอบด้วย 2 วิธีคือ ดูด้วยตาเปล่า ส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm

ผลการศึกษาพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ chloroform : methanol (9 : 1) และ chloroform : methanol (8 : 2) สามารถใช้แยกสารสกัดหยาบของหญ้าพันงูขาว (A) มะเดื่อปล้อง (F) ไล่ไก่ (J) ยอ (M) และขวากโก้น (ST) ส่วนต้นสะพ้านก้น (E) มะตูม (SI) และสะพ้านก้น (SA) สามารถใช้ระบบตัวทำละลาย dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2) โดยส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm

ผลการศึกษาพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ chloroform : methanol (9 : 1) และ chloroform : methanol (8 : 2) สามารถใช้แยกสารสกัดหยาบของหญ้าพันงูขาว มะเดื่อปล้อง ไล่ไก่ ยอ และ ขวากโก้น ส่วนต้นสะพ้านก้น และมะตูม สามารถใช้ระบบตัวทำละลาย dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2)

ผลการศึกษาที่ไม่ครบตามวัตถุประสงค์

ผลการศึกษาที่ไม่ครบตามวัตถุประสงค์คือ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนคือฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) และฤทธิ์ลดการสลายกระดูก (bone resorption) ได้แก่

- ผลการศึกษาเซลล์ osteoblast ด้วยวิธี MTT assay และ ALP activity ไม่สามารถนำมาใช้ได้
- ขาดผลการศึกษาเซลล์ osteoclast ด้วยวิธี TRAP assay
- ขาดการนำเฉพาะ active fractions ของสมุนไพรที่ศักยภาพดีที่สุดไปทำการทดสอบ NF- κ B ligand (RANKL) กระตุ้นให้เกิด bone resorption โดยการเพิ่ม osteoclast differentiation osteoprotegerin (OPG) ใน osteoblastic

ผลงานวิชาการอื่นๆ

1. นำเสนอผลงานวิชาการเรื่อง Determination of total phenolic compounds and phytochemical screening from Thai medicinal plants รูปแบบโปสเตอร์ (รหัส GA-00664) ในงานประชุมวิชาการ 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research, Freie University Berlin ระหว่างวันที่ 27 สิงหาคม – 3 กันยายน 2553 ณ กรุงเบอร์ลิน ประเทศเยอรมัน (บทคัดย่อใน Planta Med 2010; 76 - P103 Ol: 10.1055/s-0030-1264401)
2. บทความวิชาการเรื่อง ฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน (Antiosteoporotic from Herbal Medicine) ตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม Vol 29(2);Apr-Jun 2010: 217-223
3. ผลงานตีพิมพ์อื่นที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรต้านกระดูกพรุน นอกจากผลงานจากทุนวิจัยฯ ได้แก่

- การสำรวจสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้รักษาโรคกระดูกพรุนในอำเภอเมือง จ.มหาสารคาม (The ethnobotanical survey of plants used for treatment of bone disorder in Amphur Muang, Mahasarakham Province) ตีพิมพ์ในวารสาร Thai Pharm Health Sci 2011;6(1):7-11. (ฐานข้อมูล สกอ.)

- Phytochemical Screening of a Traditional formula used to Improve bone. ตีพิมพ์ในวารสาร IJPR 2012;4(1):95-100. (ฐานข้อมูล Scopus)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทที่ 1 บทนำ	8
1.1 ความเป็นมาของโครงการ	8
1.2 วัตถุประสงค์	11
1.3 แผนการดำเนินการ	11
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	35
บทที่ 4 ผลการศึกษา และบทสรุป	42
บทที่ 5 ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย	57
5.1 ผลที่ได้จากงานวิจัย	57
5.2 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยและการนำไปใช้ประโยชน์	57
5.3 ความเป็นไปได้ในการต่อยอดงานวิจัย	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	63

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการ

ปัจจุบันโรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ ตลอดระยะเวลาสิบปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาระบาดวิทยาและพยาธิสรีรวิทยาของโรคพบว่า โรคกระดูกพรุนส่วนใหญ่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของกระดูกผิดปกติ พบว่ามีประชากรทั่วโลกประมาณ 100 ล้านคนที่เป็นโรคนี้ ซึ่งจะพบในหญิงมากกว่าชาย (1, 2) การเจริญเติบโตของคนเราจะมีการสะสมเพิ่มปริมาณของมวลกระดูกหรือเนื้อกระดูกอยู่ตลอดเวลา เห็นได้จากการที่เด็กโตขึ้นสูงใหญ่ขึ้นนั่นเอง การสะสมของมวลกระดูกจะเร็วหรือช้าต่างกันในแต่ละช่วงอายุโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงก่อนเข้าสู่วัยรุ่นจะมีการเจริญและสะสมมวลกระดูกมากและเร็วที่สุด หลังจากนั้นการสะสมของมวลกระดูกจะเริ่มช้าลง จนเมื่อเข้าสู่ช่วงที่เป็นผู้ใหญ่เต็มที่คือ ช่วงประมาณอายุ 25-30 ปี การสะสมของมวลกระดูกจะหยุดลง ซึ่งในเพศหญิงจะมีปรากฏการณ์ที่ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูกเพิ่มมากขึ้นอีกคือ ภาวะหมดประจำเดือน (Menopause) ซึ่งเป็นตัวเร่งทำให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูกเร็วขึ้น โดยที่แต่ละคนจะมีอัตราการสูญเสียมวลกระดูกไม่เท่ากัน เริ่มจากการจะสูญเสียมวลกระดูกจนถึงระดับที่กระดูกมีความเสี่ยงต่อการเกิดกระดูกหักหรือที่เราเรียกว่า "กระดูกพรุน" (Nature Foam โรคกระดูกพรุน)

โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) คือภาวะที่กระดูกทั่วร่างกายมีมวลกระดูกลดลงและมีการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูก จนทำให้กระดูกเปราะบางและแตกหักง่ายกว่าปกติ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ให้คำจำกัดความของโรคกระดูกพรุนโดยอาศัยผลการตรวจความหนาแน่นมวลกระดูก (Bone Mass Density; BMD) ว่า ถ้าวัดค่าความหนาแน่นมวลกระดูกได้ต่ำกว่า -1 ถึง -2.5 แสดงว่ามีภาวะเป็นโรคกระดูกบาง (Osteopenia) หรือกระดูกเสื่อม สาเหตุของโรคกระดูกพรุนแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ โรคกระดูกพรุนปฐมภูมิ (Primary osteoporosis) ได้แก่ กลุ่มแรกคือผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน (Post-menopausal women) และกลุ่มสองคือคนสูงอายุ (Senile osteoporosis) โรคกระดูกพรุนทุติยภูมิ (Secondary osteoporosis) คือ โรคกระดูกพรุนที่ได้รับผลกระทบต่างๆ ซึ่งมีผลทำให้มวลกระดูกลดลงอาจเนื่องจากได้รับประทานยาบางชนิด เช่น ยากลุ่มสเตียรอยด์ เป็นโรคบางชนิด เช่น มะเร็งที่กระดูก หรือความผิดปกติของฮอร์โมน (Zizic TM, 2004)

แนวทางการรักษาโรคกระดูกพรุนของแพทย์แผนปัจจุบัน นอกจากจะให้แคลเซียมและวิตามินดีที่เพียงพอแล้วยังให้ยารักษาด้วย ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) มักให้ในกลุ่มผู้ป่วยตัดรังไข่ กลุ่ม SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) เป็นยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยสามารถลดการสูญเสียมวลกระดูกและลดอุบัติการณ์กระดูกเปราะหักได้ ฮอร์โมนแคลซิโทนิน (Calcitonin) และยาบิสฟอสเฟต (Bisphosphonate) ออกฤทธิ์ยับยั้งการสลายตัวของกระดูก ช่วยลดความเสี่ยงของกระดูกสันหลังหักยุบ ซึ่งการใช้ยาแผนปัจจุบันในการรักษานี้ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วย เช่น เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมและมะเร็งเยื่อบุช่องปาก และยาบางประเภทอาจมีโอกาสดึงดูดที่หลอดเลือดอาหาร เป็นต้น (Kim DH และคณะ, 2006)

ในขณะเดียวกันแนวทางการรักษาโรคกระดูกพรุนนอกจากจะใช้ยาแผนปัจจุบันแล้วยังมีการคิดค้นและพัฒนาจากสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน จากการสืบค้นข้อมูลการใช้ยาสมุนไพรจากตำรายาแพทย์แผนไทยกล่าวว่า พืชสมุนไพรที่มีรสขมมีสรรพคุณมีฤทธิ์ซึมซาบไปตามเส้นเอ็น แก้เส้นเอ็นพิการ บำรุงเส้นเอ็น แก้

ปวดเมื่อย บำรุงไขข้อ บำรุงเยื่อกระดูก เป็นยาอายุวัฒนะ ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย พืชสมุนไพรที่มีรสมัน ได้แก่ เมล็ดงา เมล็ดถั่วลิสง หัวแห้ว หัวถั่วพู เป็นต้น (อุบล มณีกุล และคณะ, วุฒิ วุฒิธรรมเวช) และข้อมูลจากตำรากายาอิสานกล่าวว่า ไล่ไก่ มะตุ๊ก ขวากไก่ เขี้ยววู หนุ้าพันงูขาว ฯลฯ เป็นสมุนไพรพื้นบ้านอิสานที่มีสรรพคุณใช้แก้ตับพิษในกระดูก แก้ปวดกระดูก ปวดข้อ บำรุงกระดูก เส้นเอ็นพิการ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการใช้โกฐกระดูก หรือหัวข้าวเย็นร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในตำรับยารักษากระดูกอีกด้วย เป็นต้น (วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542) ด้านทฤษฎีแพทย์แผนจีนได้กล่าวว่า พืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงไตจะใช้รักษาโรคกระดูกในสมัยโบราณซึ่งจะตรงกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในปัจจุบันคือมีฤทธิ์ต้านโรคกระดูกพรุนได้ เนื่องจากหลักความคิดที่ว่าไตเป็นแหล่งกำเนิดของกระดูกและช่วยสร้างไขกระดูก เพราะฉะนั้นถ้าการทำงานของไตบกพร่องก็อาจจะเป็นสาเหตุให้การสร้างไขกระดูกลดน้อยลงซึ่งอาจจะเกิดได้ตั้งแต่ในวัยเด็กและจะส่งผลไปถึงเมื่อสูงวัยขึ้น (Changgao W, 2002) ผลของ She-shuang-zi (*Cnidium monnieri*) เป็นสมุนไพรจีนที่สมัยโบราณใช้บำรุงไตบกพร่อง (Kidney-yang deficiency) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุนในปัจจุบันพบว่า สาร coumarin ซึ่งเป็นสารสำคัญมีฤทธิ์เพิ่มการสร้างและลดการสลายตัวของกระดูกได้ (Zhang QY และคณะ, 2007) ส่วนผลของ Nu-zhen-zi (*Ligustrum lucidum* Ait) มีฤทธิ์ bone turnover เมื่อนำมาทดสอบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ovariectomized (Zhang Y และคณะ, 2006) เป็นต้น รวมทั้งจากรายงานการวิจัยสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อลดหรือต้านโรคกระดูกพรุนพบว่า กลุ่มสารสำคัญจากพืชที่มีฤทธิ์ดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) คูมาริน (coumarins) ลิกแนน (lignans) และไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นต้น (Carlo GD และคณะ, 1999; Qin LP และคณะ, 2006; Yang Q และคณะ, 2002; Yin J และคณะ, 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรที่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และอนุพันธ์เป็นองค์ประกอบจึงที่เป็นสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อลดหรือต้านกระดูกพรุน ยกตัวอย่างเช่น สารสกัด flavonoids ที่ได้จากต้น *Epimedium brevicornum* Maxim. สามารถกระตุ้น cell proliferation และเพิ่ม ALP activity ของเซลล์ osteoblastic UMR-106 ใน *in vitro* และให้สารสกัด *E. brevicornum* Maxim. (110 mg/kg/day) กับหนูเพศเมียที่ถูกเหนี่ยวนำจาก ovariectomized เป็นเวลาสามเดือนพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถเพิ่ม osteoblastic activity และลดขบวนการ osteoclastogenesis ใน *in vivo* นอกจากนั้น icariin, epimedin B และ epimedin C ที่แยกได้จาก *E. brevicornum* Maxim. ยังมีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ osteoblastic proliferation ได้อีกด้วย เป็นต้น (Meng FH และคณะ, 2005)

ด้วยเหตุ โรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาที่สำคัญและประชากรทั่วโลกมีแนวโน้มที่จะเกิดภาวะโรคกระดูกเสื่อมหรือกระดูกพรุนเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือนและกลุ่มคนผู้สูงอายุ ดังนั้น เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมและป้องกันภาวะการเกิดโรคดังกล่าวในคนกลุ่มเสี่ยง จึงมีการวิจัยและพัฒนาจากสมุนไพรมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน เหล่านี้จึงเป็นปัญหาที่น่าสนใจศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ตับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น เนื่องจากพืชสมุนไพรดังกล่าวมีการใช้กันมาโดยการเรียนรู้จากภูมิปัญญาพื้นบ้านที่ได้รับการสั่งสมมาจากบรรพบุรุษ แต่ยังคงขาดความรู้ใหม่ทางด้านวิทยาศาสตร์ ดังนั้น ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ตับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุนในหลอดทดลอง (*in vitro*) ครั้งนี้จำนวน 10 ชนิด ได้แก่

1. มะดูก (*Siphonodon celastrineus* Griff) วงศ์ Celastraceae ยาพื้นบ้านอีสานใช้เปลือกต้นผสมสมุนไพรอื่น ต้มน้ำดื่มรักษาโรคตับอักเสบ รากรักษาโรคผิวหนัง บำรุงกระดูก ดับพิษในกระดูก เส้นเอ็นพิการ (อุบล มณีกุล และคณะ, วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)

2. มะเดื่อปล้อง (*Ficus hispida* Linn.) วงศ์ Moraceae เปลือกต้นและรากมีสรรพคุณแก้พิษในกระดูก แก้เม็ดผื่นคัน (6) ส่วนรายงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุนของพืชในสกุล *Ficus* พบว่า ใบของต้น *Ficus erecta* Linn. เป็นสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระดูกของประเทศเกาหลีมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุน พบว่าสามารถลดการสลายกระดูกใน osteoclast RAW 264.7 cells (Yoon WJ และคณะ, 2007)

3. ขวากไก่ (*Strychnos axillaries* Colebr.) วงศ์ Loganiaceae ตำรายาไทยใช้ลำต้นแก้โลหิตเป็นพิษในการคลอดบุตร แก้ปวดพิการ ดับพิษในข้อ ในกระดูกเส้นเอ็น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดใบแห้งด้วยเอทานอล 95% ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542)

4. ไล่ไก่ (กระดูกงู) (*Jasminum anodontum* Gagnep) วงศ์ Oleaceae เป็นไม้พุ่มเลื้อย ยาพื้นบ้านอีสานใช้ส่วนรากต้มน้ำดื่มแก้ปวดกระดูก (วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542)

5. สะฟ้านก้น (*Sambucus javanica* Reinw.) วงศ์ Samburaceae ทั้งต้นมีสรรพคุณทำให้เลือดเดินสะดวก แก้ปวดบวมตามข้อ ต้นต้มน้ำดื่มแก้ข้ออักเสบ แก้ปวดเนื่องจากกระดูกหัก (7) ส่วนรายงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุนของพืชในสกุล *Sambucus* พบว่า *Sambucus williamsii* Hance. เป็นสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระดูกของประเทศจีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุน โดนทดสอบฤทธิ์เพิ่มมวลกระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ (Xie F และคณะ, 2005)

6. สารพัดพิษ (*Sophora tomentosa* Linn.) วงศ์ Leguminosae รากรสฝืดเย็น แก้ปวดเมื่อยตามร่างกายแก้ไข้ ถอนพิษ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช.)

7. เขี้ยวงู (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) วงศ์ Loganiaceae เป็นไม้เถา เถามีสรรพคุณรสเมาร้อนดับพิษในข้อ กระดูกและในเส้นเอ็น แก้โลหิตเป็นพิษ (วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542)

8. สะบ้ายิง (*Entada glandulosa* Pierre ex Gagnep) วงศ์ Leguminosae ไม้เถาเลื้อยพัน ยาพื้นบ้านอีสานใช้ทั้งต้นทำลูกประคบแก้ปวดข้อ (วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542)

9. หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera* Linn.) วงศ์ Amaranthaceae ทั้งต้นมีสรรพคุณแก้พิษ บำรุงกระดูก แก้ปวดเมื่อยจากไขข้ออักเสบ (อุบล มณีกุล และคณะ)

10. ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* Linn.) วงศ์ Rubiaceae ใบมีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อ แก้ปวดบวม (6)

รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ต่อฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนต่อไป ทั้งนี้เพื่อนำสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรไปพัฒนาเป็นยาที่มีฤทธิ์ลดหรือต้านการเกิดโรคกระดูกพรุนต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็นจากตำรายาไทย ตำราสมุนไพรต่างๆ จากวารสารและบทความทางวิชาการต่างๆ

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) และฤทธิ์ลดการสลายกระดูก (bone resorption) เบื้องต้นของสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น

3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรที่มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) และฤทธิ์ลดการสลายกระดูก (bone resorption)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนได้ทบทวนความรู้พื้นฐานและวรรณกรรม (literature) ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ดังนี้

- 2.1 โรคกระดูกพรุน
- 2.2 สมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงกระดูกและเส้นเอ็น
- 2.3 การสกัดสารสำคัญจากพืช
- 2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน
- 2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคกระดูกพรุน

โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) คือภาวะที่กระดูกทั่วร่างกายมีมวลกระดูกลดลงและมีการเสื่อมสลายของเนื้อเยื่อกระดูก จนทำให้กระดูกเปราะบางและแตกหักง่ายกว่าปกติ องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ให้คำจำกัดความของโรคกระดูกพรุนโดยอาศัยผลการตรวจความหนาแน่นมวลกระดูก (Bone Mass Density; BMD) ว่า ถ้าวัดค่าความหนาแน่นมวลกระดูกได้ต่ำกว่า -1 ถึง -2.5 แสดงว่ามีภาวะเป็นโรคกระดูกบาง (Osteopenia) หรือกระดูกเสื่อม

กระดูกเป็นอวัยวะที่มีการสร้างและการสลายตัวอยู่ตลอดเวลาอย่างสมดุล โดยมีเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (Osteoblast) ทำหน้าที่พาเอาแร่ธาตุเข้ามา และมีเซลล์ออสติโอคลาสต์ (Osteoclast) ทำหน้าที่สลายเนื้อกระดูก กล่าวคือ ในขณะที่มีการสร้างกระดูกใหม่โดยใช้แคลเซียมจากอาหารที่รับประทานเข้าไป ก็จะมีการสลายแคลเซียมในเนื้อกระดูกเก่าออกมาสู่เลือดและถูกขับออกมาทางปัสสาวะและอุจจาระวันละประมาณ 600-700 มิลลิกรัม เพื่อให้เกิดความสมดุลเราจึงต้องได้รับแคลเซียมให้เพียงพอกับที่เสียไป มิฉะนั้นร่างกายจะดึงแคลเซียมจากกระดูกมาใช้ตลอดเวลา มีผลทำให้กระดูกถูกทำลายมากกว่าการสร้าง เนื้อกระดูกจึงบางลงในที่สุด สาเหตุของโรคกระดูกพรุนแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ

1. โรคกระดูกพรุนปฐมภูมิ (Primary osteoporosis) ได้แก่ โรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (Postmenopausal osteoporosis หรือ Osteoporosis type I) เกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนจากภาวะหมดประจำเดือนในผู้หญิง ซึ่งจะเริ่มมีอัตราเร่งของการสลายตัวของกระดูกในช่วง 10-20 ปี หลังหมดประจำเดือน พบได้ในผู้หญิงอายุประมาณ 50-65 ปี หรือ 60-70 ปี มักพบกระดูกหักบริเวณกระดูกแขนส่วนปลายและกระดูกสันหลังที่สุด โรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ (Senile osteoporosis หรือ Osteoporosis type II) เกิดจากความเสื่อมตามอายุที่มีการสะสมอย่างค่อยเป็นค่อยไปและยาวนานของการเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการสลายของกระดูก พบได้ทั้งในผู้หญิงและผู้ชายที่มีอายุมากกว่า 70-75 ปี มักพบกระดูกหักได้บ่อยบริเวณต้นขา ต้นแขน และสะโพก (Nature Foam Kim DH และคณะ, 2006)

2. โรคกระดูกพรุนทุติยภูมิ (Secondary osteoporosis) มีสาเหตุหลักมาจากระบบอื่นที่ส่งผลกระทบมาที่กระดูก เช่น ภาวะต่อมไทรอยด์ทำงานเกิน ต่อมพาราไทรอยด์ทำงานเกิน ต่อมหมวกไตทำงานน้อยผิดปกติ ภาวะขาดเอสโตรเจน โรคเนื้องอกของต่อมใต้สมอง โรคเบาหวาน โรคคุชชิง มะเร็ง (เต้านม เม็ดเลือดขาว ต่อมไทรอยด์) โรคตับเรื้อรัง โรคปวดข้อรูมาตอยด์ ต่อมพาราไทรอยด์ทำงานน้อยผิดปกติ น้ำหนักรุนแรง (ผอม) ภาวะขาดสารอาหารและ

แคลอรี การขาดแร่ธาตุและวิตามินที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูก (เช่น ขาดแคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินดี โปรตีน) การใช้ยาสเตียรอยด์ ยาขับปัสสาวะ (เช่น ฟuroซีไมด์) หรือฮอร์โมนอื่นๆ หรือใช้ฮอร์โมนไทรอยด์มากเกินไป การสูบบุหรี่ (ทำให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดลดลง) การเสพติดแอลกอฮอล์ การขาดการออกกำลังกาย การขับเคลื่อนไหวร่างกายน้อย หรือการไม่ได้เคลื่อนไหวร่างกายเป็นเวลานานๆ (เช่น ผู้ป่วยพิการที่นอนติดเตียงตลอดเวลา) เป็นต้น

การรักษาโรคกระดูกพรุนของแพทย์แผนปัจจุบัน A National Osteoporosis Foundation³ ได้แนะนำวิธีป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนดังนี้

1. Bisphosphonates

Bisphosphonates เป็นยาในกลุ่ม antiresorptive agents ใช้ยับยั้งการสลายตัวของกระดูกทำให้แคลเซียมจับกับกระดูกได้ดี ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ risedronate, alendronate และ ibandronate โดยยา risedronate และ alendronate ใช้รับประทานเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีหลังหมดประจำเดือน และยา alendronate ยังสามารถใช้รักษาโรคกระดูกพรุนในผู้ชายด้วย การใช้ยาในกลุ่มนี้ควรใช้ร่วมกับแคลเซียม (1,500 มก./วัน) และวิตามินดี (800 ยูนิต/วัน) (Philip S และคณะ, 2006; Zizic TM และคณะ, 2004; lacona MV, 2007)

2. Hormone therapy

การใช้ฮอร์โมนเป็นการป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุนในสตรีหลังหมดประจำเดือน ฮอร์โมนที่ใช้ ได้แก่ กลุ่มฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) มักให้ในกลุ่มผู้ป่วยตั้งครรภ์ กลุ่ม SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) เป็นยาที่สังเคราะห์ขึ้นมาคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น raloxifene และยังมี teriparatide เป็น Human Parathyroid Hormone (rhPTH) เป็นยาที่มีประสิทธิภาพการเพิ่มมวลกระดูกสูงสุด กระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่และช่วยควบคุมขบวนการเมตาบอลิซึมของแคลเซียมและวิตามินดีในกระดูก แต่เนื่องจากมีอาการข้างเคียง เช่น เป็นตะคริวที่ขา วิงเวียนศีรษะ และอาจทำให้เกิดมะเร็งกระดูก ข้อจำกัดในการใช้ยานี้คือยังไม่มีผลการศึกษาในการใช้ยามากกว่า 2 ปี และมีราคาแพง ส่วนฮอร์โมน calcitonin ใช้ยับยั้งการสลายตัวของกระดูกในสตรีหลังหมดประจำเดือนภายใน 5 ปี (Philip S และคณะ; lacona MV, 2007)

แนวทางการรักษาโรคกระดูกพรุนของแพทย์แผนปัจจุบัน นอกจากจะให้ยารักษาแล้วยังใช้แคลเซียมและวิตามินดีที่เพียงพอร่วมด้วย ซึ่งการใช้ยาแผนปัจจุบันในการรักษาอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้ป่วย เช่น การใช้ฮอร์โมนเพศในการรักษา อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมและมะเร็งเยื่อบุมดลูก และยาในกลุ่ม bisphosphonates และยาบางประเภทอาจมีโอกาสดึงแคลเซียมที่หลุดออกจากกระดูก เป็นต้น (lacona MV, 2007)

2.2 สมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงกระดูกและเส้นเอ็น

จากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่า มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านกระดูกพรุนของสมุนไพรเดี่ยวจำนวนมากรวมทั้งตำรับยาสมุนไพรซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นตำรับยาที่ใช้กันในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี จากข้อมูลการใช้ยาสมุนไพรในการแพทย์แผนจีนพบว่า มีการใช้ทั้งสมุนไพรเดี่ยวและตำรับสมุนไพร การเลือกสมุนไพรชนิดใดมาใช้รักษามักอาศัยหลักทฤษฎีการแพทย์แผนจีนที่ว่า ไต (kidney: 肾) ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณเอว ทำหน้าที่เป็นแหล่งของสารจำเป็นในการดำรงชีวิต การสืบพันธุ์รวมทั้งอสุจิและไข่ นอกจากนั้น ไตยังเป็นแหล่งกำเนิดของกระดูกและช่วยสร้างไขกระดูก ดังนั้น ถ้าการทำงานของไตไม่สมดุลหรือบกพร่อง (kidney deficiency: 肾不足) อาจจะเป็นสาเหตุให้การสร้างไขกระดูกน้อยลง ซึ่งอาจเกิดตั้งแต่เด็กและส่งผลถึงเมื่อสูงอายุขึ้น โดยเฉพาะในเพศชายที่เสื่อมสมรรถภาพทางเพศจะหมายรวมถึงการทำงานของไตบกพร่องซึ่งอาจส่งผลต่อการสร้างไขกระดูกลดลงด้วย

ตามหลักทฤษฎีดังกล่าวจึงมีการนำพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงไตมาใช้รักษาโรคกระดูกตั้งแต่โบราณกาล ในปัจจุบันได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรเหล่านี้และพบว่ามียุทธิต้านโรคกระดูกพรุนได้ (Changgao W, 2002)

นอกจากนั้น ในตำรายาแพทย์แผนไทยได้กล่าวว่า พืชสมุนไพรที่มีรสขมมีสรรพคุณมีฤทธิ์ซึมซาบไปตามเส้นเอ็น แก้เส้นเอ็นพิการ บำรุงเส้นเอ็น แก้ปวดเมื่อย บำรุงไขข้อ บำรุงเยื่อกระดูก เป็นยาอายุวัฒนะ ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย พืชสมุนไพรที่มีรสขม ได้แก่ เมล็ดงา เมล็ดถั่วลิสง หัวเหว้ หัวถั่วพู เป็นต้น และข้อมูลจากตำรากกยาอีสานกล่าวว่า ไส้ไก่ (กระดูกงู, จะอั้งปี้วะ) (*Jasminum anodontum* Gagnep) มะดูก (*Siphonodon celastrineus* Griff) ขวากไก่ (*Strychnos axillaries* Colebr.) หล้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera* Linn.) ฯลฯ เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้แก้ดับพิษในกระดูก แก้ปวดกระดูก ปวดข้อ บำรุงกระดูก เส้นเอ็นพิการ เป็นต้น (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540; วงศ์สถิต ฉั่วกุล, 2542) ตัวอย่างสมุนไพร ได้แก่

1. มะดูก

ชื่อวิทยาศาสตร์

Siphonodon celastrineus Griff

ชื่ออื่น

บักคัก (เขมร-สุรินทร์); มะดูก (ทั่วไป); ยายปลวก (สุราษฎร์ธานี)

วงศ์

Celastraceae



ภาพที่ 1 มะดูก (<http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx>)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ต้น สูงได้ถึง 30 ม. หน่อบางขนาดเล็ก ใบเรียงเวียน รูปรี รูปขอบขนาน หรือแกมรูปไข่ ยาว 6.5-20 ซม. ปลายแหลมหรือแหลมยาว ขอบจักซี่ฟันหรือจักมนตื้นๆ ก้านใบยาว 0.5-1.5 ซม. ช่อดอกแบบช่อกระจุก ออกสั้นๆ ตามซอกใบ บางครั้งลดรูปมีดอกเดียว ก้านดอกยาว 0.3-1 ซม. กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มม. กลีบดอก 5 กลีบ เรียงซ้อนเหลื่อมที่โคน รูปไข่ปลายมน ยาว 2.5-3.5 มม. เกสรเพศผู้ 5 อัน ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 1 มม. แบนๆ เชื่อมติดกันที่โคน แกนอับเรณูแผ่กว้างแยกอับเรณู วงเกสรเพศเมียแนบติดจานฐานดอก ปลายเว้าลึก เกสรเพศเมียเป็นแท่งสั้น ๆ ติดที่โคน รังไข่มีหลายช่องกระจายอยู่แต่ช่องมีออวุลเม็ดเดียว ผลคล้ายผลผนังชั้นในแข็ง รูปรีหรือรูปไข่กลับ ยาว 3-5 ซม. ผิวขรุขระ มีหลายไพริน แข็ง เมล็ดรูปรี แบน ยาวประมาณ 8 มม.

สรรพคุณ ยาพื้นบ้านอีสานใช้เปลือกต้นผสมสมุนไพรรื่น ต้มน้ำดื่มรักษาโรคตับอักเสบ รักษาโรคผิวหนัง บำรุงกระดูก ขับพิษในกระดูก เส้นเอ็นพิการ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540; วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

2. มะเดื่อปล้อง

ชื่อวิทยาศาสตร์

Ficus hispida Linn.

ชื่ออื่น

เดื่อปล้อง (นครศรีธรรมราช, สระบุรี, ภาคเหนือ); เดื่อป่อง (กรุงเทพฯ); เดื่อสาย (เชียงใหม่); ตะเอน่า (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน); มะเดื่อปล้อง (ภาคกลาง); เอาหน่น (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน); สะกอสะนียา (มาเลย์-นราธิวาส)

วงศ์

Moraceae



ภาพที่ 2 มะเดื่อปล้อง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มหรือไม้ต้น สูงได้ถึง 15 ม. ปล้องกลาง กิ่งมีขนสาก หูใบยาวได้ถึง 2.5 ซม. ร่วงเร็ว ใบเรียงเวียนหรือเรียงเกือบตรงข้าม รูปรี รูปขอบขนาน หรือรูปไข่กลับ ยาว 5-35 ซม. แผ่นใบมีขนสากทั้งสองด้าน ด้านล่างมีผลึก crystalolith ก้านใบยาว 1-10 ซม. ดอกอยู่ภายในฐานดอกที่ขยายออกเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ ตามซอกใบหรือตามกิ่งเป็นช่อแยกแขนงที่ออกจากลำต้นเป็นกระจุก กลมหรือแบนเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-3.5 ซม. ไร่ก้านหรือมีก้านสั้นๆ ช่องเปิดกว้าง 2-4 มม. ไม่มีขน ใบประดับ 5-6 ใบ

สรรพคุณ เปลือกต้นและรากมีสรรพคุณแก้พิษในกระดูก แก้เม็ดผื่นคัน (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540; วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

3. ขวากไก่

ชื่อวิทยาศาสตร์

ชื่ออื่น

วงศ์

Strychnos axillaries Colebr. (*S. viridiflora* A.W.Hill)

ขอเบ็ด (หนองคาย) ขี้แรด (ปราจีนบุรี) เขี้ยววู (ชุมพร) เบน เบนขอ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เล็บครุฑ (จันทบุรี) หนามเข็ม (ชัยภูมิ) ต้นโรคแดงเขี้ยววู

Loganiaceae



ภาพที่ 3 ขวากไก่

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถาเนื้อแข็ง มีมือเกาะ ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม ดอกช่อ กลีบดอก สีเขียวแกมเหลืองหรือขาวแกมเขียว ออกที่ง่ามใบและปลายกิ่ง ผลสด รูปกลม เมื่อสุกสีแดง

สรรพคุณ ตำรายาพื้นบ้านอีสานใช้ลำต้นผสมพริกไทยและหัวกระเทียม ต้มน้ำดื่มบำรุงร่างกาย แก่นบำรุงโลหิต ดิบพิษไข้ แก้กษัย แก้ไตพิการ ตำรายาไทยใช้ลำต้นแก้โลหิตเป็นพิษในการคลอดบุตร แก้ปวดพิการ ดับพิษในข้อ ในกระดูกเส้นเอ็น รากตำพอก แก้ฝี แก้กิดสีดวงลำไส้ ผลเป็นยาถ่ายสำหรับเด็ก ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดใบแห้งด้วยเอทานอล 95% ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

4. ไล่ไก่ (กระดุกงู)

ชื่อวิทยาศาสตร์

Jasminum anodontum Gagnep

ชื่ออื่น

กระดุกงู (สุรินทร์)

วงศ์

Oleaceae



ภาพที่ 4 ไล่ไก่ (สารานุกรมสมุนไพร เล่ม 4)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มรอเลื้อยสูงได้ถึง 3 เมตร กิ่งก้านมีขน ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปไข่แกมวงรี กว้าง 3.5-5.5 ซม. ยาว 6-9 ซม. ท้องใบมีขนที่เส้นใบ ดอกช่อกระจุก ออกที่ซอกใบดอกย่อย 2-3 ดอก กลีบดอกสีขาว เชื่อมติดกันเป็นหลอดยาว กลิ่นหอม ผลสดรูปทรงรี

สรรพคุณ

ยาพื้นบ้านอีสานใช้ส่วนรากต้มน้ำดื่มแก้ปวดกระดูก (วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

5. สะฟ้านกัน

ชื่อวิทยาศาสตร์

Sambucus javanica

ชื่ออื่น

อุณน้ำ สะฟ้านกัน น่อ แสงกะบลิ

วงศ์

Samburaceae



ภาพที่ 5 สะฟ้านก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่ม สูง 1-2 เมตร. ใบ ประกอบแบบขนนก ออกตรงข้าม ใบย่อย 4-5 คู่ รูปไข่หรือ รูปใบหอก กว้าง 2-5 ซม. ยาว 9-18 ซม. ดอก ออกเป็นช่อแบบช่อแยกแขนง ที่ปลายกิ่ง ช่อดอกมีต่อม สีเหลืองลักษณะคล้ายรูปถ้วยเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. ดอกย่อย เส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 0.4 ซม. สีขาว ผล สด สีดำ รูปไข่ กว้าง 2 มม. ยาว 2.5 มม.

สรรพคุณ ทั้งต้นมีสรรพคุณทำให้เลือดเดินสะดวก แก้ปวดบวมตามข้อ ต้นต้มดื่มแก้ข้ออักเสบ แก้ปวดเนื่องจากกระดูกหัก (วงศ์สิดิต ฉั่วกุล, 2542) ส่วนรายงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุนของพืชในสกุล *Sambucus* พบว่า *Sambucus williamsii* Hance. เป็นสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคกระดูกของประเทศจีนมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านกระดูกพรุน โดนทดสอบฤทธิ์เพิ่มมวลกระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ (Xie F, 2005)

6. สารพัดพิษ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Sophora tomentosa* Linn.

ชื่ออื่น -

วงศ์ Leguminosae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มขนาดย่อมสูงราว 1-3 ม. ใบกลมรีขนาดใบมะยม สีเขียวเข้ม ผลกลมเท่าพริกไทย ติดตามง่าม ใบเป็นแถวยาวสีแดง-ดำ สีเหลืองส้ม เกิดตามป่าเบญจพรรณ ป่าละเมาะทั่วไป ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

สรรพคุณ รากรสเฝื่อนเย็น แก้ปวดเมื่อยตามร่างกายแก้ไข้ ถอนพิษ ลูกระสเ็น แก้ไข้เซื่องซึม ดับพิษไข้บิดเรื้อรัง

7. เขี้ยววง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Strychnos viridiflora* A.W.Hill

ชื่ออื่น -

วงศ์ Loganiaceae

จากการทบทวนเอกสารวิชาการพบว่า บางแหล่งระบุว่า ต้นเขี้ยววง มีชื่ออื่นว่า ขวากไก่ และมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นชื่อพ้อง synonym กันคือ *Strychnos axillaries* Colebr. (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) ดังนั้น สมุนไพรชื่อนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ให้ชัดเจนต่อไป เพื่อไม่ให้นำมาใช้ผิดต้น

สรรพคุณ เป็นไม้เถา เถามีสรรพคุณรสเฝื่อนดับพิษในข้อ กระดูกและในเส้นเอ็น แก้โลหิตเป็นพิษ (วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

8. สะบ้ายิง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Entada glandulosa* Pierre ex Gagnep

(*Entada tamarindifolia* Gagnep.)

ชื่ออื่น มะบ้าออก (เหนือ), ผักตีนแลน, มะบ้ายิง (เชียงใหม่), มะบ้าปน (เชียงใหม่, ลำพูน), ทบทวน, ลิ่นแลน, มะขามเครือ (ชัยภูมิ), หมากแทน (ยโสธร), บ้าปนใหญ่ (อุบลราชธานี), สะบ้ายาย (กลาง)

วงศ์ Leguminosae-Mimosoideae



ภาพที่ 6 สะบ้าลิง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยพาดพันต้นไม้ใหญ่ กิ่งมีขน ใบประกอบแบบขนนกสองชั้น ปลายใบคู้ เรียงสลับ ช่อใบประกอบที่มีใบย่อย 2 คู่ ใบประกอบคู่ปลายเปลี่ยนรูปร่างเป็นมือเกาะ ใบย่อยมี 5-8 คู่ เรียงตรงข้าม รูปวงรีถึงรูปขอบขนาน กว้าง 0.5-1.7 เซนติเมตร ยาว 1.2 – 4 เซนติเมตร ฐานใบเบี้ยวเล็กน้อย ปลายใบกลมมีติ่ง ขอบใบเรียบมีขน ผิวใบด้านบนมีขน ผิวใบด้านล่างเกลี้ยง ก้านใบยาว 1.8-4 ซม. แกนกลางใบประกอบยาว 4.5-10 ซม. ดอกช่อ กระจะเชิงลด ออกที่ซอกใบและเหนือซอกใบ ยาว 7-12 เซนติเมตร มีขนละเอียด ก้านดอกย่อยเกือบไร้ก้าน กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง มี 5 กลีบ ยาว 4.5-5.5 มม. ด้านนอกช่วงล่างมีแนวต่อมขนาดเล็ก 2 แนว รูปขอบขนานแกมรูปหอก ปลายแหลม ขอบเรียบ โคนเชื่อมกัน ปลายแยก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ เชื่อมกันเป็นรูปถ้วย ผิวด้านนอกมีขนละเอียด ผิวด้านในเกลี้ยง ยาวประมาณ 2-2.5 มม. ปลายแยกเป็น 5 แฉก รูปสามเหลี่ยมตื้นๆ เกสรเพศผู้มี 10 อัน เชื่อมกันที่ฐาน ยาว 9 อัน สั้น 1 อัน ก้านชูอับเรณูยาวประมาณ 1 ซม. หรือยาวกว่าเล็กน้อย เกสรเพศเมีย มีรังไข่เหนือวงกลีบ ผิวเรียบ รังไข่เกลี้ยง ยาวประมาณ 3 มม. ผลเป็นฝัก รูปขอบขนาน โค้งงอ สีนํ้าตาล ยาวได้ถึง 35 ซม. กว้าง 2.2-2.6 ซม. มีรอยเว้าระหว่างเมล็ด ผงด้านนอกค่อนข้างหนา เมื่อแก่หักเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนมี 1 เมล็ด รูปเกือบกลม แบน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.8 ซม. เปลือกนอกแข็งสีน้ำตาลดำ

สรรพคุณ

ยาพื้นบ้านอีสานใช้ทั้งต้นทำลูกประคบแก้ปวดข้อ (วงศ์สฤติ ฉั่วกุล, 2542)

9. หญ้าพันงูขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์

Achyranthes aspera Linn.

ชื่ออื่น

หญ้าพันงู หญ้าพันงูเขา หญ้าตีนงูขาว ควยงู หญ้าโคยงู

วงศ์

Amaranthaceae



ภาพที่ 7 หญ้าพันงูขาว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุกอายุหลายปี สูงประมาณ 30 - 100 ซม. หรือมากกว่า แตกกิ่งก้านเป็นคู่ๆ และสามารถทอดกึ่งนอนไปตามพื้นดินแล้วเกิดรากบริเวณข้อได้ ใบเดี่ยวรูปรีแกมขอบขนานหรือไข่กลับ ปลายใบเรียวแหลมถึงกลม โคนสอบ แฉกมน ผิวใบมีขนสั้นละเอียดสีขาวนวลเกาะติดจำนวนมาก ดอกออกเป็นช่อยาวที่ปลายกิ่ง ดอกย่อยเกาะติดห้อยหัวแน่นกับก้านช่อ และมีจำนวนมาก ดอกย่อยมีกลีบเลี้ยงที่ส่วนปลายเป็นหนามแหลมแข็ง ผลมีผิวเรียบรูป

ทรงกระบอกปลายตัด เมล็ดรูปทรงกระบอกรีหัวและท้ายเรียว ผิวเรียบสีน้ำตาลเหลือง

สรรพคุณ ทั้งต้นมีสรรพคุณแก้พิษ บำรุงกระดูก แก้ปวดเมื่อยจากไขข้ออักเสบ (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)

10. ยอบ้าน

ชื่อวิทยาศาสตร์

Morinda citrifolia Linn.

ชื่ออื่น

วงศ์

Rubiaceae



ภาพที่ 8 ยอบ้าน

(<http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx?wordsLinkno=4766&words=%E0%B8%A2%E0%B8%AD&typeword=word>)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้พุ่มหรือไม้ต้น อาจสูงได้ถึง 10 ม. ใบรูปไข่ ยาว 0.5-1.5 ซม. ใบรูปรีหรือรูปไข่ ยาว 10-25 ซม. ปลายแหลมหรือมน โคนแหลมหรือเรียวสอบ เส้นแขนงใบข้างละ 5-7 เส้น มักมีตุ่มใบเป็นขน ก้านใบยาว 0.5-3.5 ซม. ก้านช่อยาว 1-1.5 ซม. ช่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ซม. บางครั้งมีแผ่นคล้ายใบประดับสีขาว 1-3 ใบ รูปรี ยาว 0.5-1.5 ซม. ดอกรูปแตรแคบๆ หลอดกลีบดอกยาว 0.8-1.5 ซม. ด้านในมีขนหนาแน่น มี 5-6 กลีบ รูปใบหอกแกมรูปไข่ ยาว 2-6 มม. ก้านเกสรเพศเมียยาว 0.8-1 ซม. ช่อผลแก่สีขาว รูปไข่หรือกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-5 ซม. ผลย่อยจำนวนมากเชื่อมติดกัน

สรรพคุณ ใบบีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อ แก้ปวดบวม (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)

2.3 การศึกษาสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใดจะได้สารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร

2.3.1 วิธีการสกัด

(1) การหมัก (maceration) เป็นวิธีการสกัดด้วยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลาย จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่มและน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในสมุนไพรออกมาได้ การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะปิดสนิท จะทำเป็นเวลา 7 วัน ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้นควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดจึงกรอง แยกกาก ออกจากน้ำยาสกัด วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก จัดเป็นวิธีที่ใช้ น้ำยาสกัดน้อย จึงประหยัด และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน

(2) เพอร์โคเลชัน (percolation) เป็นวิธีการสกัดโดยการปล่อยให้ น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้าๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบของสมุนไพรออกมา โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (percolator) วิธีนี้จัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่มีข้อเสีย คือ เปลืองน้ำยาสกัดและใช้เวลาในการสกัดนาน

(3) การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) เป็นการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรคล้ายกับวิธี percolation แต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยและใช้ซอกซ์เลตเอ็กซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ น้ำยาสกัดในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ น้ำยาสกัดจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อยๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา

(4) การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) มีหลายวิธีเลือกใช้ตามความเหมาะสมของพืชที่ใช้

- การกลั่น (distillation) ในทางอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ การกลั่นโดยใช้น้ำ (water distillation) การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) การกลั่นโดยใช้ไอน้ำ (steam distillation)

- การบีบหรือการอัด (expression) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยที่ใช้กับวิธีการกลั่นไม่ได้ เนื่องจากถูกทำลายได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

- วิธีเอ็นฟลอยเรนซ์ (enfleurage) ใช้กับน้ำมันหอมระเหยของกลีบดอกไม้ต่างๆ เป็นวิธีที่เก็บความหอมได้ดี

- การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (extraction with solvent) ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ปีโตเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) อาจใช้ตัวทำละลายอื่น เช่น แอซีโตน (acetone) เมทานอล แอลกอฮอล์ เป็นต้น วิธีนี้จะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการกลั่นที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง ทำให้องค์ประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลง และมีกลิ่นผิดไปจากธรรมชาติ จึงนำวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายนี้มาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ต้นทุนการผลิตสูงกว่าวิธีการกลั่น

2.3.2 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (Ghias Uddin and คณะ, 2012)

สารกลุ่มแอลคาลอยด์ (alkaloid) : เป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างและมี N เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ตรวจสอบด้วยน้ำยา ได้แก่ Dragendorff's reagent (potassium bismuth iodide) เกิดตะกอนสีแดงส้ม Hager's reagent (picric acid) เกิดตะกอนสีเหลือง Mayer's reagent (potassium mercuric iodide) เกิดตะกอนสีขาว

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) : Shinoda test เป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของ flavonoids หากมีโครงสร้างเป็น benzo- γ -pyrone ที่เป็นโครงสร้างสำคัญใน flavones, flavonols, flavanones, flavanonols และ isoflavones จะเกิดปฏิกิริยากับ Mg และ กรด HCl เข้มข้นช่วยละลาย Mg และเร่งปฏิกิริยา ได้ผลบวกเป็นสารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู

สารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) : มีคุณสมบัติละลายได้ดีในด่างและเกิดเป็นสีชมพูหรือแดง ทดสอบโดย Borntrager's test ทำการ hydrolyse anthraquinone glycoside ด้วยกรดหรือด่างให้กลายเป็น aglycone ของ anthraquinone แล้วสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่างจะได้สีชมพู-แดง

สารกลุ่มซาโปนิน (saponin) : มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวเมื่อละลายน้ำจึงเกิดฟองได้ เป็นฟองรูปหกเหลี่ยม และคงอยู่นานกว่า 15 นาที และคุณสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงออก

สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) : ตรวจสอบโดยทำปฏิกิริยากับกรด phosphomolybdic และอามโมเนีย NH_3 มีกลุ่ม phenol จะเกิดสีน้ำเงิน

สารกลุ่มแทนนิน (tannin) : เป็นสารพวก polyphenols แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1) Hydrolysable tannins มีโครงสร้างประกอบด้วย phenolic acid และน้ำตาล 2) Condense tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer ที่มี monomer เป็น catechins (flavan-3-ol) เป็น proanthocyanidins ของ flavonoids เมื่อต้มกับกรดจะเกิดตะกอนสีแดง 3) Pseudotannins เป็นสารเชิงเดี่ยวที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก การตรวจสอบ tannins อาศัยการตกตะกอนดังนี้

- ตรวจสอบกับ gelatin สารจำพวก true tannins จะเกิดตะกอนคงตัวกับ gelatin
- ตรวจสอบกับ bromine water ถ้าเป็น Condense tannins จะเกิดสีเหลืองกับ bromine water
- ตรวจสอบกับ FeCl_3 ถ้าเป็น Hydrolysable tannins จะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน ถ้าเป็น Condense tannins จะเกิดตะกอนสีแดง

- ตรวจสอบกับ vanillin reagent และกรด HCl เข้มข้น พบว่า Condense tannins จะเกิดสีแดง

สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) : Liebermann-Burchardt test ใช้ทดสอบเพื่อระหว่าง steroid nucleus กับ terpenoid nucleus โดยถ้ามี steroid nucleus จะให้สีฟ้าอมเขียว ถ้ามี terpenoid nucleus จะให้สีชมพูแดง

2.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic) (Feng-Lin Song และคณะ 2010)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Method กระบวนการนี้เป็นการหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดย ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีในปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) ทำให้เกิดสารประกอบ เชิงซ้อนสีน้ำเงินดังสมการ และนำสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

สารฟีนอล + Na_2CO_3 + Folin-Ciocalteu reagent $\longrightarrow$ สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน

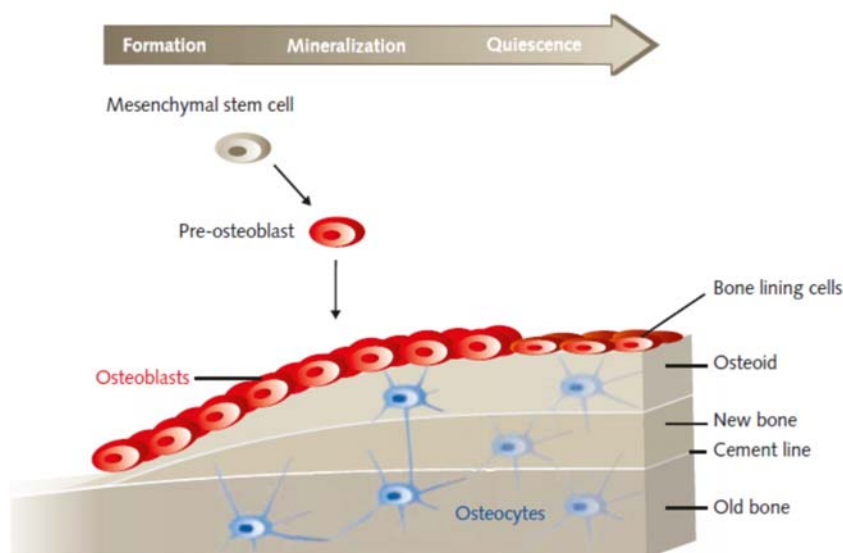
2.4.1 กระบวนการสร้างและสลายกระดูก (Jane B. Lian and Gary S. Stein; สิทธิศักดิ์ ธรรมชาติ, 2550)

กระดูกมีส่วนประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ เซลล์กระดูก และสารที่เชื่อมระหว่างเซลล์กระดูก (intercellular substance)

1. เซลล์กระดูก ประกอบด้วย เซลล์สร้างกระดูก ได้แก่ osteoprogenitor cell, osteoblast และ osteocyte และเซลล์สลายกระดูก ได้แก่ osteoclast การสร้างและการกระตุ้นเซลล์เหล่านี้จะถูกควบคุมโดย cytokine และ growth factor เช่น bone morphogenetic protein (BMP), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived factor (PDGF) และ transforming growth factor- β (TGF- β) เซลล์สร้างกระดูก osteoblast มีหน้าที่สังเคราะห์สารอินทรีย์ให้เนื้อกระดูก (bone matrix) เซลล์จะยังไม่มีกระบวนการสะสมของแคลเซียม (calcification) ในระยะแรกเนื้อกระดูกจึงมีลักษณะอ่อนนุ่ม ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen) ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ โดยมีเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) ฝังตัวอยู่ในเนื้อกระดูกตรงส่วนที่เป็นแอ่ง

หรือลาคูน่า (lacuna) เมื่อมีผลึกแคลเซียมและฟอสฟอรัสมาสะสมที่เนื้อกระดูกในขบวนการสร้างกระดูก (ossification) เซลล์สร้างกระดูกจึงเปลี่ยนเป็นเซลล์กระดูก (osteocyte or bone cell) เซลล์กระดูกประเภทนี้จะไม่มีการแบ่งตัวอีกต่อไป แต่จะทำหน้าที่รักษาเนื้อกระดูกโดยมีการสะสมแคลเซียม และมีการสลายของเนื้อกระดูก (osteolysis) เพื่อปลดปล่อยแคลเซียมที่สะสมไว้ที่เนื้อกระดูกออกไปสู่ระบบไหลเวียนของเลือดในรูปของแคลเซียมอิสระ สำหรับเซลล์ออสทีโอคลาส (osteoclast or bone eating cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเนื้อกระดูกเพื่อปรับแต่งรูปร่างของกระดูกโดยจะหลั่งเอนไซม์หลายชนิดออกมาทำให้มีการย่อยเส้นใยคอลลาเจน และมีการละลายของผลึกแคลเซียมออกจากเนื้อกระดูก กระดูกจึงเป็นอวัยวะที่เกิดกิจกรรมทั้งการสังเคราะห์และการทำลายเพื่อดึงแคลเซียมอิสระไปใช้ในประโยชน์ในขบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ของเซลล์ในร่างกายต่อไป

2. สารที่เชื่อมระหว่างเซลล์ (intercellular substance) เป็นส่วนของของแข็งที่เกิดจากการเกาะตัวกันของธาตุแคลเซียม ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของเนื้อกระดูก คือธาตุแคลเซียม ที่อยู่ในรูปของแคลเซียมฟอสเฟต (calcium phosphate) และแคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate) ส่วนที่เหลือเป็นสารอนินทรีย์ที่อยู่ในรูปของแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ (magnesium hydroxide) ฟลูออไรด์ (fluoride) และ ซัลเฟต (sulphate) เป็นต้น



ภาพที่ 10 เซลล์กระดูกชนิด osteoblast (www.promocell.com; osteoblast differentiation and mineralization)

จะกล่าวถึงเซลล์สร้างและสลายกระดูกเพิ่มเติม ดังนี้

เซลล์สร้างกระดูก osteoblast พบอยู่บนผิวของ bone matrix มี receptors ของโปรตีนหลายชนิดอยู่บนผิวเซลล์ เช่น hormone receptors (parathyroid hormone, vitamin D, estrogen), cytokine receptors, growth factor receptors และ extracellular matrix protein receptors นอกจากนี้ บนผิวของ osteoblasts มีโปรตีนอีก 2 ชนิดที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของ osteoblasts ได้แก่ โปรตีนที่ชื่อว่า low-density lipoprotein receptor-related protein 5 และ leptin hormone โดยทั่วไป osteoblasts จะมีอายุการทำงาน

ประมาณ 3 เดือน หลังจากนั้นอาจจะเกิดขึ้นได้ 3 แบบคือ ตายลงโดยขบวนการ apoptosis หรือกลายเป็น osteocytes หรือกลายเป็นเซลล์อื่นๆ ล้อมรอบเนื้อกระดูก

เซลล์สลายกระดูก osteoclast เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สลายเนื้อกระดูก เจริญเติบโตมาจากเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic progenitor cells) ชนิดเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดของ monocytes และ macrophages การเจริญเติบโตของเซลล์ osteoclast ในมนุษย์พบว่า cytokines และ growth factors ที่มีความจำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงและการเจริญเติบโตของ osteoclasts ได้แก่ interleukin (IL)-1, IL-3, IL-6, IL-11, tumor necrotic factor (TNF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), และ macrophage colony stimulating factor (M-CSF) เป็นต้น สารต่างๆ เหล่านี้มีกลไกการทำงานต่างกัน แบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

- กระตุ้นเซลล์ต้นกำเนิดของ osteoclasts (osteoclast progenitor cells)
- มีส่วนร่วมในระบบ paracrine (paracrine system) ซึ่งเป็นระบบที่มีความจำเป็นต่อ ขบวนการ metabolism ของกระดูก เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อระบบ paracrine ได้แก่ osteoblasts และ เซลล์ที่คอยค้ำจุนไขกระดูก (marrow stromal cells) โมเลกุลที่ทำหน้าที่ในระบบ paracrine ได้แก่ receptor activator for nuclear factor KB (RANK), RANK ligand (RANKL), และ osteoprotegerin (OPG)
 - **RANK** เป็น receptor ชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่บนผิวของเซลล์ในสายพันธุ์ macrophage, monocyte, และ proosteoclast (เซลล์ที่จะเจริญเติบโตไปเป็น osteoclast) เมื่อ RANK เชื่อมต่อกับ ligand ที่เฉพาะเจาะจง (RANKL) จะเกิดการกระตุ้นให้ proosteoclast พัฒนาเป็น osteoclast หรือเรียกว่า เกิดขบวนการสร้าง osteoclast (osteoclastogenesis)
 - **RANKL** ถูกสร้างขึ้นใน cytoplasm ของเซลล์ 2 ชนิด คือ osteoblast และ marrow stem cell หลังจากนั้น RANKL ออกไปอยู่บนผิวของเซลล์ดังกล่าว RANKL มีบทบาทสำคัญในการสร้าง การรวมตัว การพัฒนาการ การทำงาน และ การมีชีวิตอยู่ ของ osteoclast
 - **OPG** เป็น receptor ชนิดหนึ่ง ซึ่งพบบนผิวเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก เซลล์ไขกระดูก และเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน RANKL และ OPG สามารถเชื่อมต่อกันได้ ดังนั้น OPG จึงเปรียบเสมือนโมเลกุลที่คอยยับยั้งขบวนการสร้าง osteoclast เนื่องจาก OPG ขัดขวางการเชื่อมต่อของ RANK และ RANKL

กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์กระดูกประกอบด้วย การสร้างกระดูก ซึ่งอาศัยการทำงานของเซลล์กระดูกชนิด osteoblast เซลล์ osteoblast ทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งสารอินทรีย์ เช่น collagen, osteocalcin และ alkaline phosphatase (ALP) เป็นต้น ส่วนการสลายกระดูก อาศัยการทำงานของเซลล์กระดูกชนิด osteoclast ซึ่งจะหลั่ง acid phosphatase (ACP) โดยมีฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ควบคุมการสลายตัวของกระดูก ถ้าปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงจะพบการสลายตัวของกระดูกเพิ่มขึ้น ดังนั้น การวัดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ที่หลั่งโดยเซลล์กระดูกโดยเฉพาะเอนไซม์ phosphatase ควบคู่กับการตรวจปริมาณแคลเซียมในเซรัม (สัทธิศักดิ์ หรรษาเวท)

กระบวนการ bone modeling เป็นการปรับเปลี่ยนรูปร่างเพื่อตอบสนองต่อการทำหน้าที่ของกระดูก เหล่านั้น โดยกลไก bone resorption และ bone formation มักเกิดกับ long bone เกิดมากในช่วงวัยเด็กและลดลงจนหยุดเมื่อหยุดการเจริญเติบโต (นาวาอากาศเอก พญ.สุรีย์พร บุญจง, 2001)

กระบวนการ Bone remodeling เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดชีวิต มีการเปลี่ยนแปลงเนื้อกระดูกทดแทนกันตลอดเวลาในระดับไมโครเพื่อให้กระดูกมีสุขภาพดี และมีความแข็งแรงของกระดูกไว้ การสลายกระดูก (bone resorption) จะเกิดขึ้นก่อนการสร้างกระดูก (bone formation) จะเกิดขึ้นในตำแหน่งนั้น ผลลัพธ์คือกระดูกใหม่ที่แข็งแรงทดแทนกระดูกเก่าที่สุขภาพด้อยลงแล้ว ส่วน bone formation จะสามารถซ่อมส่วนของกระดูกที่ถูก resorption ไปได้ทั้งหมดหรือไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมภายในร่างกาย และการเคลื่อนไหวร่างกายของบุคคลนั้น

Bone remodeling cycle เกิดขึ้นเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ (นาวาอากาศเอก พญ.สุรียพร บุญจง, 2001)

Activation มีการกระตุ้นให้เกิดเซลล์ osteoclasts ขึ้นจาก bone marrow แล้วเคลื่อนที่มายังตำแหน่งที่จะเกิด bone remodeling ซึ่งเรียกว่า bone remodeling unit (BRU) ซึ่งเดิมอยู่ในระยะ quiescence มี bone lining cells ปกคลุมอยู่ bone lining cells จะแยกออกจากกันเปิดทางให้ osteoclast ลงไปทำการสลายเนื้อกระดูก (resorption)

Resorption เซลล์ osteoclasts เริ่มทำการย่อยสลายเนื้อกระดูกเก่าออกไปเกิดเป็นหลุมเล็กๆ

Reversal เมื่อการย่อยสลายสิ้นสุด มีกลุ่ม mononuclear cells (proosteoblasts) แทรกตัวเข้ามาทำการเริ่มสร้างเนื้อกระดูก

Formation เซลล์ osteoblasts สร้างเนื้อกระดูกจนเต็ม และมีแคลเซียมมาเกาะจนได้กระดูกใหม่ที่แข็งแรง

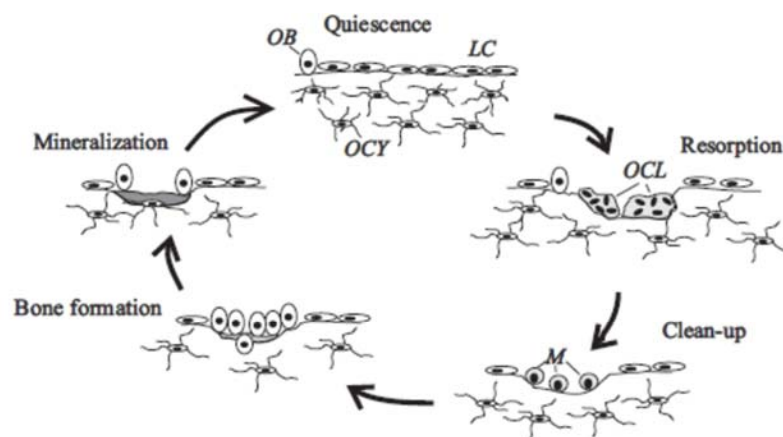


Figure 3. The bone remodelling cycle is started with bone resorption by osteoclasts (OCL), followed by smoothing of erosion cavities by mononuclear cells (M), continued with formation of new osteoid by osteoblasts (OB), and finally mineralization of newly formed osteoid. During bone formation some osteoblasts are captured into the osteoid and they become osteocytes (OCY). In the resting phase newly formed bone is lined with bone lining cells (LC).

ภาพที่ 11 วงจรการปรับเปลี่ยนรูปร่างของกระดูก (bone remodelling cycle) (Sari Alatalo, 2004)

2.4.2 สารชีวโมเลกุล (biochemical) ที่เป็นตัวบ่งชี้ของการสร้างและการสลายของกระดูก

- การสร้างกระดูก bone formation สารชีวโมเลกุลที่เป็นตัวบ่งชี้ตรวจจาก serum ทุกอย่าง ได้แก่
 - เอนไซม์ - Enzyme - alkaline phosphatase
 - bone specific alkaline phosphatase
 - โปรตีน - osteocalcin
 - breakdown products
 - procollagen type I carboxyl-terminated propeptide
- การสร้างกระดูก bone resorption สารชีวโมเลกุลที่เป็นตัวบ่งชี้ตรวจจาก
 - เอนไซม์ - Tartrate resistant acid phosphatase ตรวจจาก plasma
 - breakdown products - pyridinoline ตรวจจากปัสสาวะ
 - deoxypyridinoline ตรวจจากปัสสาวะ
 - N-telopeptide degradation products ตรวจจากปัสสาวะ
 - C-telopeptide degradation products ตรวจจาก plasma

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน

จากการทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า การศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนมีการทดสอบทั้ง in vitro (วิชชุดา จริยะพันธ์ และคณะ, 2556) ได้แก่

1. MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

การตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) มีหลายวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ (วิชชุดา จริยะพันธ์, 2556)

1. Dye exclusion เช่น trypan blue, naphthalene black เป็นการย้อมเซลล์จากการที่เซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม เนื่องจาก cell membrane จะทำหน้าที่ขับสีย้อมออกมา ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีย้อม เนื่องจากการเสื่อมสภาพของ cell membrane

2. Dye inclusion เช่น neutral red assay อาศัยหลักการวัดปริมาณสีย้อมใน lysosome ของเซลล์ ด้วย spectrophotometric analysis

3. MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นปฏิกิริยารีดักชัน วัดการเกิดสารที่ให้สีจากปฏิกิริยารีดักชันของเซลล์ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นสารสีเหลืองเมื่อถูกรีดิวซ์แล้วให้สาร formazan ที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องเติมน้ำยา solubilizing solution (ซึ่งอาจประกอบด้วย DMSO หรือ acidified ethanol solution หรือ SDS ในสารละลาย HCl เจือจาง) จึงจะเกิดสารละลายสีม่วงให้วัดค่าการดูดกลืนแสงได้

4. Fluorescein diacetate assay อาศัยหลักการ fluorescein diacetate เข้าไปในเซลล์และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ esterase และทำให้ไม่สามารถปล่อย fluorescein ออกมานอกเซลล์ได้เนื่องจากถูกปกป้องด้วย cell membrane เซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรวจสอบหาเซลล์ที่มี fluorescein ภายได้

1.2 Alkaline phosphatase activity assay

Alkaline phosphatase (ALP) ใน serum ประกอบด้วย 4 genotype คือ liver-bone-kidney type, intestinal type, placental type และ germ cell variant form สามารถพบ ALP ได้ในเซลล์ไขกระดูก เซลล์ของตับ เม็ดเลือดขาว ไต ม้าม รก ต่อมลูกหมาก และลำไส้อ่อน โดยที่ liver-bone-kidney type เป็น type ที่มี

ความสำคัญที่สุด การเกิดการอุดตันในถุงน้ำดีโดยเฉพาะ obstructive jaundice จะทำให้ปริมาณ ALP สูง รวมไปถึงในโรคกระดูก เช่น Paget's disease, hyperparathyroidism, rickets, osteomalacia , fracture และ malignant tumor ก็จะทำให้ค่าสูงได้เช่นกัน ภาวะที่พบ ALP activity สูงยังอาจพบได้ในช่วงวัยเด็กจนถึงวัยรุ่นเนื่องจากมีการเพิ่ม activity ของ osteoblast ในขบวนการเร่งการเจริญเติบโตของกระดูก

ในการตรวจ ALP activity ใช้ optimized substrate concentration โดยใช้ 2-amino-2-methyl-1-propanol เป็น buffer ร่วมกับ magnesium และ zinc ion เป็น biomarker ของเซลล์ osteoblast ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก (bone formation)

1.3 Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเป็น cytochemical marker ที่สำคัญของเซลล์ osteoclast ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของกระดูก (bone resorption)

1.4 การศึกษา ovariectomy ของสัตว์ทดลองเพศเมีย in vivo

การศึกษาฤทธิ์ด้านกระดูกพรุนในสัตว์ทดลองใช้ animal model ใช้วิธี ovariectomy โดยการผ่าตัดเอารังไข่ของสัตว์ทดลองเพศเมียออกไป เพื่อการทดสอบต่างๆ เช่น การขาดฮอร์โมน estrogen ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในสัตว์ทดลอง หนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง เรียกว่า ovariectomized rat (OVX)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สมุนไพรเดี่ยวและตำรับที่มีรายงานทดสอบฤทธิ์ด้านกระดูกพรุน ได้แก่

ผลของ She-shuang-zi (*Cnidium monnieri* (L.) Cusson.) เป็นสมุนไพรจีนที่สมัยโบราณใช้บำรุงการทำงานของไตบกพร่อง รักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (Yanfu Z, 2003) มีการทดสอบฤทธิ์ด้านกระดูกพรุนในปัจจุบันพบว่า สาร coumarin จากผลของ She-shuang-zi มีฤทธิ์เพิ่มการสร้างและลดการสลายตัวของกระดูกได้ (Zhang QY และคณะ, 2007)

ผลของ Wu-wei-zi (*Schisandra chinensis* Turcz.) เป็นสมุนไพรจีนที่มีสรรพคุณช่วยบำรุงสมรรถภาพทางเพศและบำรุงไต พบว่าสารสกัด 90 % แอลกอฮอล์จากส่วนผลที่ความเข้มข้น 3 มก./มล. ประกอบด้วยสาร lignans ได้แก่ schisandrin, deoxyschisandrin และ γ -schisandrin สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) และเพิ่ม ALP activity ของเซลล์ osteoblastic UMR-106 ใน *in vitro* (Caichompoo W และคณะ, 2009)

ผลของ Nu-zhen-zi (*Ligustrum lucidum* Ait) มีฤทธิ์ bone turnover เมื่อนำมาทดสอบในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ (Zhang Y และคณะ, 2006) สารสกัด flavonoids ที่ได้จากต้น *Epimedium brevicornum* Maxim. สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ และเพิ่ม ALP activity ของเซลล์ osteoblastic UMR-106 ในหลอดทดลอง และให้สารสกัด *E. brevicornum* Maxim. (110 มก./กก./วัน) กับหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่เป็นเวลาสามเดือนพบว่า สารสกัดดังกล่าวสามารถเพิ่มเซลล์สร้างกระดูก และลดขบวนการสร้างเซลล์สลายกระดูกในสัตว์ทดลอง นอกจากนั้น icariin, epimedin B และ epimedin C ที่แยกได้จาก *E. brevicornum* Maxim. ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มเซลล์สร้างกระดูกได้อีกด้วย (Meng FH และคณะ, 2005)

ตำรับยาต้ม Er-xian เป็นตำรับยาต้มประกอบด้วยสมุนไพร 6 ชนิด ได้แก่ *Epimedium sagittatum*, *Curculigo orchioides*, *Morinda officinalis*, *Angelica sinensis*, *Phellodendron chinensis* และ

Anemarrhena asphodeloides ชนิดละ 250 กรัม ใช้ในการรักษาโรคกระดูกและในสตรีหลังหมดประจำเดือนในประเทศจีนมานาน ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ด้วยขนาด 300 และ 600 มก./กก./วัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์พบว่า สามารถลดการเพิ่ม body weight, serum BGP และ ALP ได้ (Hua N และคณะ, 2002)

ตำรับ Bushen Ningxin decoction (BSNXD) ประกอบด้วย Er-xian decoction และ Zhi Bai Dihuang ใช้รักษาอาการของสตรีหลังหมดประจำเดือน ใช้รักษาและป้องกันการเกิดกระดูกพรุนมานานอีกด้วย ซึ่ง Er-xian decoction นั้นเป็นตำรับยาที่มีชื่อเสียงในการรักษาโรคกระดูกพรุนมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ส่วน Zhi Bai Dihuang จะช่วยรักษาสมดุลของไตหยิน (kidney-yin) และระบบหัวใจหยาง (heart-yang) ตามทฤษฎีการแพทย์แผนจีนจึงมักใช้ป้องกันอาการนอนไม่หลับ วิงเวียนศีรษะ เหงื่อออกตอนกลางคืนของสตรีหลังหมดประจำเดือน ตำรับนี้ประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ Adhesive Rehmannia (*Radix Rehmanniae*; Dihuang) 15 ก., Longspur epimedium (*Herba Epimedii*; Xian-Ling-Pi) 15 ก., เหง้าของ *Anemarrhena* (*Rhizoma anemarrhenae*; Zhi-Mu) 12 ก., ผลของ *Malaytea scurfpea* (*Fructus Psoraleae*; Bu-Gu-Zhi) 12 ก., *Cuscuta chinensis* (Tu-Si-Zi) 9 ก., เมล็ดของ Spine Date (*Semen Ziziphi spinosae*; Suan-Zao-Ren) 9 ก., เปลือกของ Amur.corktree (*Cortex Phellodendri*; Huang-Bo) 2 ก., และรากของ *Glabrosfruit Licorice* (*Radix Glycyrrhizae*; Gan-Cao) 3 ก. เติมน้ำ 10 เท่าต้มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 60 นาที ต้ม 3 ครั้ง ความเข้มข้น 1 ก./มล. (w/v) นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน ผลการศึกษาพบว่า ตำรับ BSNXD สามารถป้องกันโรคกระดูกพรุนในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ โดยไม่มีผลข้างเคียงกับมดลูก และค่า BMD ของกระดูก vertebra L3-4 และ femus เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังได้รับยา BSNXD 12 สัปดาห์ (Wang YD และคณะ, 2009)

ตำรับ Er Zhi Wan (EWZ) เป็นตำรับยาที่พบในตำรา Yi Bian สมัยราชวงศ์หมิงประกอบด้วยสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ *Herba Ecliptae Fructus* (*Eclipta prostrata*) และ *Ligustri Lucidi* (*Ligustrum lucidum* Ait.) อัตราส่วน 1:1 ใช้บำรุงตับและไตหยิน นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนพบว่า ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ของทั้ง primary cell osteoblast และ UMR-106 cell lines แต่ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ของ RAW246.7 cells และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สลายกระดูกได้ด้วยความเข้มข้น 0.45, 1.8 และ 7.2 ก./กก. (Zhang H และคณะ, 2008)

ตำรับ Hachimi-jiao-gan, Juzen-taiho-to และ Unkei-to ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนใน senile osteoporosis model ใช้ senescence-accelerated mice P6 (SAMP6) โดยป้อน 0.05% ของสารสกัดด้วยน้ำ จากทั้ง 3 ตำรับให้หนูวันละ 0.5 มล. เป็นเวลา 3 เดือนพบว่า ในหนูกลุ่มควบคุมค่า BMD ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า ระดับของชีรั่ม estradiol สูงขึ้นในหนูกลุ่มที่ป้อนตำรับ Unkei-to ส่วนหนูที่ได้รับตำรับ Hachimi-jiao-gan และ Juzen-taiho-to มีค่ามวลกระดูกและ bone forming เพิ่มขึ้น รวมทั้งเซลล์ osteoblast และ osteoclast ปกติ แสดงให้เห็นว่า ตำรับ Hachimi-jiao-gan และ Juzen-taiho-to สามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกในหนู SAMP6 ได้ ส่วนตำรับ Unkei-to เพียงแค่ช่วยเพิ่มการทำงานของรังไข่ให้ดีขึ้น (Chen Y และคณะ, 2005)

ตำรับ Chujo-to เป็น OTC ในประเทศญี่ปุ่น ประกอบด้วยสมุนไพร 16 ชนิด ได้แก่ Angelica root, Paeony root, Cinnamon bark, Cnidium rhizome, Moutan bark, Poria sclerotium, Atractylodes Lancea rhizome, Bitter orange peel, Rehmannia root, Cyperus rhizome, Glycyrrhiza, Reach karnel, Copptis rhizome, โสม ขิง และกานพลู ใช้รักษาโรคสตรีเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ เช่น ประจำเดือนผิดปกติ และรักษาอาการ

หลังสตรีหมดประจำเดือน เช่น ร้อนๆ หนาวๆ นอนไม่หลับ ปวดหลัง เป็นต้น ได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ที่ขนาด 90 มก./กก./วัน เป็นเวลา 49 วัน พบว่าสามารถป้องกันการเกิด periodontium ได้ (Hidaka S และคณะ, 2000)

ตำรับ Honghwain-Jahage (HJ) ประกอบด้วย *Carthamus tinctorius* L. (50 ก.) และ *Hominis placenta* (50 ก.) สามารถยับยั้ง IL-1 β ที่กระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลายของกระดูกของเซลล์ osteoclast ในหนู (Hong HK และคณะ, 2002) นอกจากนั้นตำรับ Yukmi-jihang-tang-Jahage (YJ) ประกอบด้วยสมุนไพร 7 ชนิด *Rehmannia glutinosa* Libosch, *Dioscorea japonica* THUNB, *Cornus officinalis* STEB et. ZUCC, *Smilax glabra* ROXB, *Paeimonia suffruticosa* ANDR, *Alisma platago-aquatica* var. *oriental* SAMUELS และ *Hominia placenta* เป็นตำรับที่ใช้รักษาอาการอักเสบ โรคสตรีเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ เช่น ประจำเดือนผิดปกติ อาการปวดท้อง โรคกระดูกพรุน และช่วยบำรุงตับและไตหทัย ได้ศึกษาผลของตำรับ YJ ต่อการยับยั้งการเสื่อมสลายของกระดูกและ collagen ใน calvarial ของเซลล์กระดูกหนู พบว่า ตำรับ YJ สามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์กระดูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย parathyroid hormone-induced (IC₅₀ 16 ไมโครกรัม/มล.) และยังสามารถลด hypercalcemia ในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่อีกด้วย (Jin UH และคณะ, 2006)

สมุนไพรไทยที่มีการทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน ได้แก่ กวาวเครือ เป็นสมุนไพรที่มี phytoestrogen ซึ่งได้รับความสนใจนำมาศึกษาทดสอบฤทธิ์ในการต้านกระดูกพรุนที่เกิดจากผลของการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่พบว่า สารสกัดจากกวาวเครือขาวสามารถป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุนที่มีสาเหตุมาจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลง (Urasopon N และคณะ, 2008) และยังมีรายงานว่าสารสกัดในกวาวเครือขาวสามารถป้องกันการสลายของกระดูกในหนูทดลองเพศผู้ด้วย (Urasopon N และคณะ, 2007) จากรายงานการวิจัยสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อลดหรือต้านโรคกระดูกพรุนทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มสารสำคัญจากพืชที่มีฤทธิ์ดังกล่าวได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เช่น icariin, epimedin B และ epimedin C สารคูมาริน (coumarins) ได้แก่ osthole, imparatorin, bergapten สารลิกแนน (lignans) เช่น shisandrin, deoxyschisandrin และ γ -schisandrin, สาร berberine (isoquinoline alkaloids) สามารถยับยั้งการลดค่า BMD ในหนู SAMP6 ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (Chen Y และคณะ, 2005) และไกลโคไซด์ (glycosides) เป็นต้น (Zhang QY และคณะ, 2007; Caichompoo W และคณะ, 2009; Zhang Y และคณะ, 2006) ทั้งยังพบว่าสาร isoflavones ที่พบในถั่ว ได้แก่ กลุ่ม genistein, daidzein และ glycitein เป็น phytoestrogen พบว่า ซึ่งสามารถเพิ่ม anabolic effect ในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่ การทดสอบในสัตว์ทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากถั่วสามารถเพิ่มมวลกระดูกโดยวัดจากค่า ALP และปริมาณแคลเซียมเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Carusi D และคณะ, 2007)

ด้วยเหตุดังกล่าว จึงจัดทำวิจัยการศึกษาฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนในสมุนไพรพื้นบ้านอีสานดังที่กล่าวข้างต้น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองทางห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยการศึกษารวบรวมพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษบำรุงกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็นจากรายยาไทย ตำราสมุนไพรต่างๆ จากวารสารและบทความทางวิชาการต่างๆ การคัดเลือกตัวอย่างสมุนไพร การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดหยาบ การสกัดแยกสารออกฤทธิ์และ/สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างพืช การศึกษาวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. การศึกษาและรวบรวมพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น

2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านโรคกระดูกพรุน

3.3.1 การศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (Bone formation)

3.3.2 การศึกษาฤทธิ์ลดการทำลายกระดูก (Bone resorption)

3.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. Dichloromethane (Carlo erba reagents, France)
2. Ethyl acetate (Carlo erba reagents, France)
3. 95% ethanol (SCV company limited, Thailand)
4. Chloroform
5. Methanol
6. Gallic acid (Fluka, Switzerland)
7. Quercetin (Fluka, Switzerland)
8. Dragendorff' reagent
9. Sulphuric acid (Carlo erba, Italy)
10. Borntrager reagent
11. Folin-Ciocalteu's reagent (Fluka, Switzerland)
12. Ferric chloride (FeCl_3)
13. Hydrochloride acid (HCl)
14. Sodium hydroxide (NaOH)
15. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
16. Bromine water
17. Vanillin reagent
18. Liebermann-Burchardt
19. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

20. Fetal bovine serum (FBS)
21. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Gibco BRL, Scotland)
22. 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis. MO, USA)
23. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. แผ่น Thin layer chromatography (Silica gel GF₂₅₄) (Merck, Germany)
2. Thin layer chromatography tank (Camag, Switzerland)
3. UV carbinet (Camag, Switzerland)
4. Microplate reader
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Satorius AG gottingen, germany)
6. เครื่อง Vortex
7. Ultrasonicator
8. 96-well plate

3.2 วิธีทดลอง

3.2.1 การศึกษาและรวบรวมพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้แก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น

(1) ทำการทบทวนเอกสารและงานวิจัยสมุนไพรพื้นบ้านอีสานที่มีสรรพคุณแก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น จึงได้คัดเลือกตัวอย่างพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณดังกล่าว จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะตูม มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไส้ไก่ สะพ้านก้น สารพัดพิษ เขี้ยววูง สะบ้ายิง หล้าพันงู และยอบ้าน

(2) เก็บตัวอย่างพืช (authentic samples) โดยสอบถามและได้รับการพิสูจน์ชนิดของพืชจากหมอพื้นบ้าน ได้แก่ นายชอย สุขพินิจ จังหวัดสุรินทร์ และนายประภาส มาสขาว จังหวัดยโสธร แต่สามารถหาต้น authentic samples ได้จำนวน 9 ชนิด ดังนี้

ตาราง 1 แสดงชนิดสมุนไพรและแหล่งที่เก็บ

ลำดับ	สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่เก็บ
1	หล้าพันงูขาว (<i>A. aspera</i> วงศ์ Amaranthaceae : A)	ทั้งต้น	อ.เมือง จ.สุรินทร์
2	สะบ้ายิง (<i>E. glandulosa</i> วงศ์ Leguminosae : E)	ทั้งต้น	อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์
3	มะเดื่อปล้อง (<i>F. hispida</i> วงศ์ Moraceae : F)	เปลือกต้น	อ.เมือง จ.สุรินทร์
4	ไส้ไก่ (กระดูกงู) (<i>J. anodontum</i> วงศ์ Oleaceae : J)	ราก	อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์
5	ยอบ้าน (<i>M. citrifolia</i> วงศ์ Rubiaceae : M)	ใบ	อ.เมือง จ.สุรินทร์
6	สะพ้านก้น (<i>Sambucus javanica</i> Reinw. วงศ์ Samburaceae : SA)	ทั้งต้น	อ.เมือง จ.เชียงใหม่

ลำดับ	สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	แหล่งที่เก็บ
7	มะตูม (<i>Siphonodon celastrineus</i> Griff วงศ์ Celastraceae : SI)	ราก	อ.เมือง จ.สุรินทร์
8	ขวาไก่ (<i>Strychnos axillaries</i> Colebr. วงศ์ Strychnaceae / Loganiaceae : ST)	ทั้งต้น	อ.เมือง จ.สุรินทร์
9	สารพัดพิษ (<i>Sophora tomentosa</i> Linn. วงศ์ Leguminosae : SO)	ราก	อ.กาบเชิง จ.สุรินทร์
10*	เขี้ยวจู (<i>Strychnos viridiflora</i> A.W.Hill วงศ์ Loganiaceae : SV)	เถา	-

หมายเหตุ : ไม่สามารถหา authentic ได้

3.2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีตัวอย่างพืชสมุนไพร

(1) การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืชสมุนไพร

1. นำตัวอย่างพืชมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50°C ใช้เวลาประมาณ 24-72 ชั่วโมง หรือจนแห้งสนิท หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชแห้งจากข้อ 1 มาบดเป็นผง

2. ชั่งตัวอย่างผงยาสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดๆ ละ 25 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 100 มล. สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ปริมาตร 800 มล. ด้วยวิธีการหมักเป็นเวลา 3 วัน

3. นำกรองและนำไประเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยตั้งบน water bath นำสารสกัดที่ได้เก็บในภาชนะปิดสนิท และเก็บไว้ในตู้เย็น คำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อนำไปตรวจสอบพบพิษเคมีเบื้องต้นต่อไป

(2) การตรวจสอบพบพิษเคมีเบื้องต้น

วิธีการตรวจสอบพบพิษเคมีเบื้องต้นโดยดัดแปลงวิธีของ (Ghias Uddin and คณะ, 2012) นำสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันไปตรวจสอบพบพิษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid, flavonoids, anthraquinone, saponin, phenolic, tannin และ terpenoid ดังนี้

ตาราง 2 แสดงวิธีทดสอบพบพิษเคมีเบื้องต้น

กลุ่มสารสำคัญ	การทดสอบ	ผลบวก
alkaloids	สารสกัดหยาบ 0.2 กรัม นำมาผสมกับกรด 2% H ₂ SO ₄ 15 มล. แล้วอุ่นให้ร้อนประมาณ 2 นาที แล้วหยดน้ำยา Dragendorff's สังเกตสีของตะกอนที่เกิดขึ้น	เกิดตะกอนสีส้มแดง

กลุ่มสารสำคัญ	การทดสอบ	ผลบวก
flavonoids	Cyanidin reaction : สารสกัดหยาบ 0.2 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลาย methanol 3 มล. ใส่ขดลวด Mg 2-3 ชิ้น และเติมกรด HCl เข้มข้น สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้น	สารละลายสีส้ม แดง หรือชมพู
anthraquinone	Borntrager's test : สารสกัดหยาบทำปฏิกิริยากับกรดหรือได้เป็น aglycone ของ anthraquinone แล้วสกัดออกมาด้วยตัวทำละลาย CHCl ₃ นำชั้นตัว CHCl ₃ ทำละลายอินทรีย์มาทดสอบกับด่าง สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้น	สารละลายสีชมพู-แดง
saponin	สารสกัดหยาบ 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำแล้วเขย่า สังเกตการเกิดฟอง	เกิดฟอง เป็นฟองรูปหกเหลี่ยมและคงอยู่นานกว่า 15 นาที
phenolics	สารสกัดหยาบมาผสมกับน้ำแล้วนำไปต้ม หลังจากนั้นเติม FeCl ₃ สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้น	สารละลายสีเขียวเข้มถึงดำ
tannin	- ตรวจสอบกับ gelatin - ตรวจสอบกับ bromine water - ตรวจสอบกับ FeCl₃ - ตรวจสอบกับ vanillin reagent และกรด HCl เข้มข้น สังเกตสีหรือตะกอนที่เกิดขึ้น	เกิดตะกอน สีเหลือง ตะกอนสีน้ำเงิน สีแดง
terpenoids	สารสกัดหยาบ 0.2 กรัม ละลายด้วยตัวทำละลาย chloroform 2 มล. และค่อยๆ เติมกรด H ₂ SO ₄ เข้มข้น 3 มล. สังเกตสารละลายจะแยกชั้น สีของสารละลายที่เกิดขึ้น	สารละลายสีแดงน้ำตาลอยู่ระหว่างชั้น

ตาราง 3 แสดงสารสกัดหยาบของสมุนไพรด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

No.	สมุนไพร	สารสกัดหยาบ		
		CH ₂ Cl ₂	EtOAc	EtOH
1	หญ้าพันงูขาว	A1	A2	A3
2	สะบ้ายี่	E1	E2	E3
3	มะเดื่อปล้อง	F1	F2	F3
4	ไผ่ไก่	J1	J2	J3
5	ยอบ้าน	M1	M2	M3

No.	สมุนไพร	สารสกัดหยาบ		
		CH ₂ Cl ₂	EtOAc	EtOH
6	สะพ้านก้น	SA1	SA2	SA3
7	มะดูก	SI1	SI2	SI3
8	ขวากไก่	ST1	ST2	ST3
9	สารพัดพิษ	SO1	SO2	SO3

(3) การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic)

วิธีหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic) ดัดแปลงจากวิธีของ Feng-Lin Song และคณะ 2010 ใช้วิธี Folin-ciocalteu colorimetric method

1. นำสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 200 mg/mL ตูตมาปริมาตร 20 μ L (0.1-1 mg/mL) ใส่ใน 96-well plate
2. เติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μ L เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 7.5% Sodium carbonate (Na₂CO₃) ปริมาตร 80 μ L ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 nm

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid

ปริมาณฟีนอลิกรวมที่หาได้จะถูกคำนวณเทียบสารฟีนอลิกมาตรฐาน คือ gallic acid โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2.0 mg/mL ปริมาตร 20 μ L ใส่ใน 96-Well plate
2. เติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 μ L เขย่าให้เข้ากัน
3. เติม 7.5% Sodium carbonate (Na₂CO₃) ปริมาตร 80 μ L ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 760 nm

การสร้างกราฟมาตรฐาน gallic acid

นำค่า A₇₆₀ และสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟมาตรฐานและหาค่าสมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณ gallic acid equivalent (GAE) ของสารสกัด (mg/mL) จากนั้นคำนวณให้อยู่ในหน่วยของมิลลิกรัมของ GAE ต่อ 1 กรัมของสารสกัด (mg GAE/g)

หมายเหตุ : ในแต่ละสภาวะการทดลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านกระดูกพรุน

(1) การศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (Bone formation)

- วัด cell proliferation ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจากวิธีของ Wanida และคณะ 2009 โดยใช้เซลล์ Human osteosarcoma cell line (HOS) (2x10⁶, 1 vial) และ Osteoblast-like UMR-106 cells

1. นำเซลล์ osteoblaste มาเพาะเลี้ยงด้วย 10%FCS-DMEM (100 U/mol penicillin and 100

µg/ml streptomycin) แล้วบ่มเซลล์ (incubate) ที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 15 วัน

2. จากนั้นนำเซลล์ osteoblaste ที่สมบูรณ์มาใส่ใน 96-well culture plates แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม.

3. เตรียมตัวอย่างที่จะทำการทดสอบโดยละลายตัวอย่างด้วย DMSO จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ละลายเรียบร้อยแล้วลงใน 96-well culture plates แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม.

4. หลังจากนั้นทำการเติม MTT reagent 20 µL นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชม.

5. หลังจากนั้นดูดสารละลายในหลุมทิ้งไป แล้วเติม DMSO 150 µL นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณค่าร้อยละของ cell proliferation

$$\text{Cell proliferation (\%)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

- วัดปริมาณ alkaline phosphatase ด้วยวิธี Total protein โดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm คำนวณเป็นค่า *p*-nitrophenol มีหน่วยเป็น nanomole ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อหลุม

1. เตรียมตัวอย่างที่จะทำการทดสอบโดยละลายตัวอย่างด้วย DMSO จากนั้นใส่ตัวอย่างที่ละลายเรียบร้อยแล้วลงใน 96-well culture plates แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชม.

2. หลังจากนั้นทำการเติม 50 mmol/L diethanolamine 20 µL และสารละลาย 2.5 mM *p*-nitrophenyl phosphate 100 µL นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (ชนิด 5% CO₂) อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม 0.3 M NaOH 100 µL เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm คำนวณเป็นค่า *p*-nitrophenol มีหน่วยเป็น nanomole ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อหลุม

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูลสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ร้อยละ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม การทดสอบจะทำซ้ำ 3 ครั้ง และแสดงผลข้อมูลด้วยค่าเฉลี่ย (mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

บทที่ 4

ผลการศึกษา สรุปล และวิจารณ์

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

จากการคัดเลือกสมุนไพรพื้นบ้านอีสานที่มีสรรพคุณแก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะดูก มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไส้ไก่ สะพานกัน สารพัดพิษ เขี้ยวงู สะบ้าลิง หนุ่ยพันธุ์ และยอบ้าน เมื่อไปสำรวจเพื่อเก็บตัวอย่างต้น authentic sample ของสมุนไพรพบปัญหาอุปสรรคคือสมุนไพรจำนวน 8 ชนิดเป็นพื้นบ้านอีสาน เช่น มะดูก มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไส้ไก่ สารพัดพิษ เขี้ยวงู สะบ้าลิง หนุ่ยพันธุ์ ส่วนสะพานกัน เป็นสมุนไพรที่พบมากที่ภาคเหนือของประเทศไทย โดยสมุนไพรทั้งหลายจะพบในป่าเป็นส่วนใหญ่ซึ่งไม่มีตัวอย่างพืชแห้งจำหน่ายในร้านขายยาแผนโบราณ ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถหาพืชสมุนไพรได้ครบตามที่กำหนด และบางต้นเมื่อสอบถามหมอพื้นบ้านอีสานยังมีเรียกชื่อสมุนไพรที่แตกต่างกันแต่อาจเป็นต้นเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ต้นเขี้ยวงู มีชื่ออื่นว่า ขวากไก่ และมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นชื่อพ้อง synonym กันคือ *Strychnos axillaries* Colebr. (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) ดังนั้น สมุนไพรชื่อนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ให้ชัดเจนต่อไป เพื่อไม่ให้นำมาใช้ผิดต้นแต่สามารถหาต้น authentic samples

เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างต้น authentic sample ได้จำนวน 9 ชนิด ส่วนของพืชที่ใช้แตกต่างกัน เช่น ทั้งต้น ใบ ราก นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ผลการสกัดพบว่าได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดสีน้ำตาลอ่อน ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน โดยมีค่า %yield ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ดังแสดงในตาราง 4 จะพบว่าตัวทำละลายด้วย ethanol สามารถสกัดสารสกัดหยาบได้ปริมาณ %yield ที่ดีกว่าตัวละลายอีก 2 ชนิด โดยที่สารสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc) และ ethanol ให้ปริมาณ %yield ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 5.51, 6.55 และ 20.89 ตามลำดับ

ตาราง 4 แสดงร้อยละของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ

No.	สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	% yield (ร้อยละ)		
			CH_2Cl_2 extract	EtOAc extract	Ethanol extract
1	หนุ่ยพันธุ์ขาว	ทั้งต้น	A1 (0.99)	A2 (1.00)	A3 (7.38)
2	สะบ้าลิง	ทั้งต้น	E1 (0.68)	E2 (0.84)	E3 (4.03)
3	มะเดื่อปล้อง	เปลือกต้น	F1 (0.44)	F2 (0.76)	F3 (1.88)
4	ไส้ไก่	ราก	J1 (0.75)	J2 (0.88)	J3 (5.32)
5	ยอบ้าน	ใบ	M1 (5.51)	M2 (6.55)	M3 (20.89)
6	สะพานกัน	ทั้งต้น	SA1 (2.56)	SA2 (3.62)	SA3 (4.28)
7	มะดูก	ราก	SI1 (0.68)	SI2 (0.56)	SI3 (3.28)
8	ขวากไก่	ทั้งต้น	ST1 (2.03)	ST2 (2.39)	ST3 (2.95)

No.	สมุนไพร	ส่วนที่ใช้	% yield (ร้อยละ)		
			CH ₂ Cl ₂ extract	EtOAc extract	Ethanol extract
9	สารพัดพิษ	ราก	SO1 (1.03)	SO2 (2.31)	SO3 (3.48)

ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น

จากการนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิด จำนวน 27 ตัวอย่าง มาตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid, flavonoids, anthraquinone, saponin, phenolic, tannin และ terpenoid ผลการตรวจสอบแยกตามสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol โดยผลบวกของแต่ละกลุ่มสารสำคัญใช้วิธีการทดลองตามที่กล่าวในบทที่ 3 ดังนี้

(1) พฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane

ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของตัวอย่างสมุนไพรส่วนใหญ่พบสารกลุ่ม alkaloid เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบ (ยกเว้น มะเดื่อปล้อง และสะพ้านกั้น) ตามวิธีที่ระบุไว้ในบทที่ 3 และมีเพียงสารสกัดหยาบจากขวากไก่ที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบสารกลุ่ม phenolic ส่วนสารสกัดหยาบจากต้นสะบ้าลิง ยอบ้าน และสารพัดพิษพบสารกลุ่ม tannin โดยที่สารสกัดหยาบด้วย dichloromethane ของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดให้ผลลบกับการทดสอบสารกลุ่ม anthraquinone และ saponin ดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 แสดงพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane

No.	สมุนไพร	alkaloid	flavonoid	anthraquinone	saponin	phenolic	tannin	terpenoid
1	หญ้าพันธุ์ขาว	+	-	-	-	-	-	-
2	สะบ้าลิง	+	-	-	-	-	+	+
3	มะเดื่อปล้อง	-	-	-	-	-	-	-
4	ไส้ไก่	+	-	-	-	-	-	-
5	ยอบ้าน	+	-	-	-	-	+	-
6	สะพ้านกั้น	-	-	-	-	-	-	-
7	มะดูก	+	-	-	-	-	-	-
8	ขวากไก่	+	-	-	-	+	-	-
9	สารพัดพิษ	+	-	-	-	-	+	-

(2) พฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate

ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate ของตัวอย่างสมุนไพรส่วนใหญ่พบสารกลุ่ม alkaloid (ยกเว้น มะเดื่อปล้อง และสะพ้านกั้น) ซึ่งให้ผลคล้ายกับสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane สารสกัดหยาบจากสะบ้าลิงและยอบ้านพบสารกลุ่ม flavonoid และพบว่าสารสกัดหยาบของสมุนไพรส่วนใหญ่พบสารกลุ่ม phenolic และ tannin ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane ที่พบสารกลุ่ม alkaloid เป็นส่วนใหญ่ ส่วนสารสกัดหยาบด้วย ethyl acetate

ของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดให้ผลลบกับการทดสอบสารกลุ่ม anthraquinone และ saponin เช่นกัน ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 แสดงผลพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate

No.	สมุนไพร	alkaloid	flavonoid	anthraquinone	saponin	phenolic	tannin	terpenoid
1	หญ้าพังกา	+	-	-	-	-	+	-
2	สะบ้ายี่	+	+	-	-	+	+	+
3	มะเดื่อปลั่ง	-	-	-	-	+	-	-
4	ไผ่ไก่	+	-	-	-	+	+	-
5	ยอบ้าน	+	+	-	-	+	+	-
6	สะพ้านก้น	-	-	-	-	-	+	-
7	มะดูก	+	-	-	-	+	-	-
8	ขวากไก่	+	-	-	-	+	+	-
9	สารพัดพิษ	+	-	-	-	-	+	-

(3) ผลพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethanol

ผลการตรวจสอบผลพิษเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบด้วย ethanol ของตัวอย่างสมุนไพรส่วนใหญ่พบกลุ่มสารสำคัญที่คล้ายกับสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จึงสรุปได้ว่าตัวอย่างสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดนี้พบสารกลุ่ม alkaloid, phenolic และ tannin เป็นองค์ประกอบ และพบว่าสารสกัดหยาบจากสะบ้ายี่ ยอบ้าน และสะพ้านก้น พบสารกลุ่ม flavonoid โดยที่มีเพียงสารสกัดหยาบจากต้นสะบ้ายี่พบสารกลุ่ม saponin และ terpenoid ส่วนสารสกัดหยาบด้วย ethanol ของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดให้ผลลบกับการทดสอบสารกลุ่ม anthraquinone ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 แสดงผลพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethanol

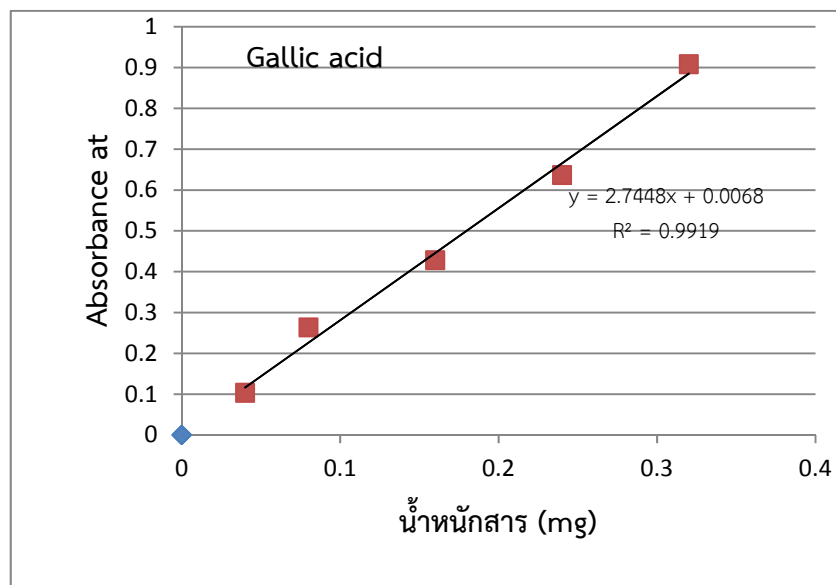
No.	สมุนไพร	alkaloid	flavonoid	anthraquinone	saponin	phenolic	tannin	terpenoid
1	หญ้าพังกา	+	-	-	-	-	+	-
2	สะบ้ายี่	+	+	-	+	+	+	+
3	มะเดื่อปลั่ง	+	-	-	-	+	-	-
4	ไผ่ไก่	+	-	-	-	+	+	-
5	ยอบ้าน	+	+	-	-	+	+	-
6	สะพ้านก้น	+	+	-	-	+	+	-
7	มะดูก	+	-	-	-	+	-	-
8	ขวากไก่	+	-	-	-	+	+	-
9	สารพัดพิษ	+	-	-	-	-	+	-

การหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic)

จากผลการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดพบว่า สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ ethanol มีกลุ่มสารสำคัญที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid, phenolic, tannin และ flavonoid จึงนำสารสกัดหยาบด้วย ethanol มาหาปริมาณสารสำคัญ โดยหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic)

เมื่อพิจารณาจากบททบทวนงานวิจัยพบว่า สารกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงฤทธิ์เพิ่มการสร้างเซลล์สร้างกระดูกนั้น เป็นสารกลุ่ม flavonoid แต่จากการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสมุนไพรทั้ง 9 ชนิดมีเพียง 3 ชนิดที่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบสารกลุ่ม flavonoid ผู้วิจัยได้เลือกหาปริมาณสารสำคัญกลุ่ม phenolic ในสมุนไพรดังกล่าว เนื่องจากสารกลุ่ม phenolic เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างวง aromatic และมีหมู่ hydroxyl (OH) อย่างน้อย 1 หมู่ โดยอนุพันธ์ของสารประกอบ phenolic มีการแทนที่ด้วยหมู่ functional ต่างๆ เช่น lignin กรด cinnamic เป็นต้น โดยเฉพาะสาร flavonoid เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบ phenolic ถึงแม้ว่างานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจะไม่ระบุว่าสารประกอบ phenolic จะมีฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนชัดเจน แต่ยังมีสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นที่สำคัญ จึงเลือกหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic) ในการศึกษา

ผลการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมใช้วิธี Folin-Ciocalteu โดยวัดค่า A ที่ 760 nm ของสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตาราง 8 และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมได้จากการเส้นตรงของ standard curve ของ gallic acid คือ $y = 2.7448x + 0.0068$, $R^2 = 0.9919$ ดังแสดงภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงสมการเส้นตรงของ standard curve ของสารมาตรฐาน gallic acid

ตาราง 8 แสดงค่า absorbance ของสารมาตรฐาน gallic acid

No	ความเข้มข้น gallic acid (mg/mL)	ค่า absorbance (A) ที่ 760 nm			
		A1	A2	A2	A (เฉลี่ย)
1	0.4	0.1028	0.1029	0.1040	0.1032
2	0.8	0.2697	0.2607	0.2600	0.2635
3	1.2	0.4271	0.4292	0.4280	0.4281
4	1.6	0.6369	0.6390	0.6344	0.6368
5	2.0	0.9064	0.9091	0.9087	0.9081

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethanol รายงานเป็นค่าเทียบเท่ากับสารมาตรฐาน gallic acid (mg of gallic acid equivalent/g of extract) พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสารสกัดจากสะพ้านก้นมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 258.27 ± 3.341 mg GAE/g สารสกัด และสารสกัดจากขวากไก่อมีค่าน้อยสุดเท่ากับ 19.46 ± 11.25 mg GAE/g สารสกัด ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 แสดงปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic) ของสมุนไพร

No.	สมุนไพร	Total phenolic (mg GAE/g สารสกัด) (mean $\pm$ SD)
1	หญ้าพังก้าว	104.14 $\pm$ 6.62
2	สะบั้ง	160.20 $\pm$ 11.41
3	มะเดื่อปล้อง	ND
4	ไผ่ไก่	156.07 $\pm$ 7.79
5	ยอบ้าน	227.73 $\pm$ 9.91
6	สะพ้านก้น	258.27 $\pm$ 3.34
7	มะดูก	62.94 $\pm$ 17.99
8	ขวากไก่อ	19.46 $\pm$ 11.25
9	สารพัดพิษ	114.99 $\pm$ 17.26

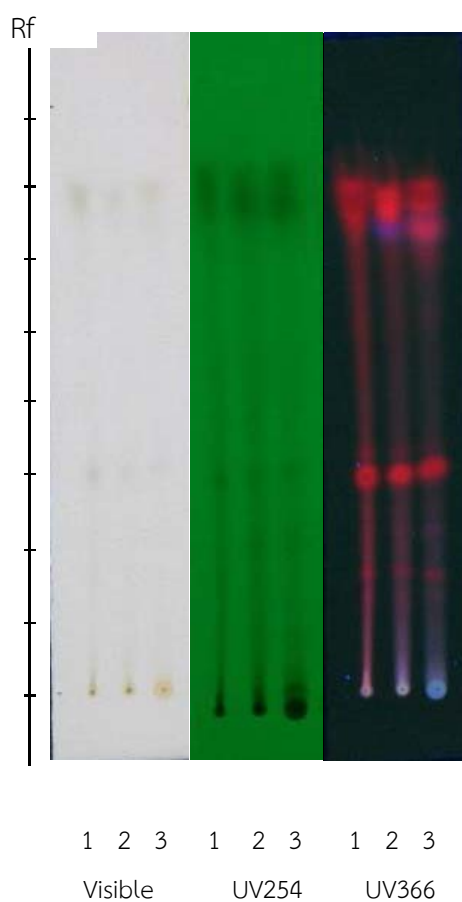
หมายเหตุ: ND = not determined

การหาระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสม

การหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในสมุนไพรแต่ละชนิดด้วยวิธีทางทึนเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin layer chromatography) โดยนำสารสกัดหยาบด้วย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ของสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด (ยกเว้น สารพัดพิษ) มาหา solvent system ได้แก่ dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2), chloroform : methanol (9 : 1), chloroform : methanol (8 : 2), ethanol : ethyl acetate (8 : 2), chloroform : acetic acid : water (5 : 4.5 : 0.5) และ toluene : ethyl acetate (7 : 3) มาหาระบบตัวทำละลายในการแยกสารสำคัญ และตรวจสอบด้วย 2 วิธีคือ ดูด้วยตาเปล่า ส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm

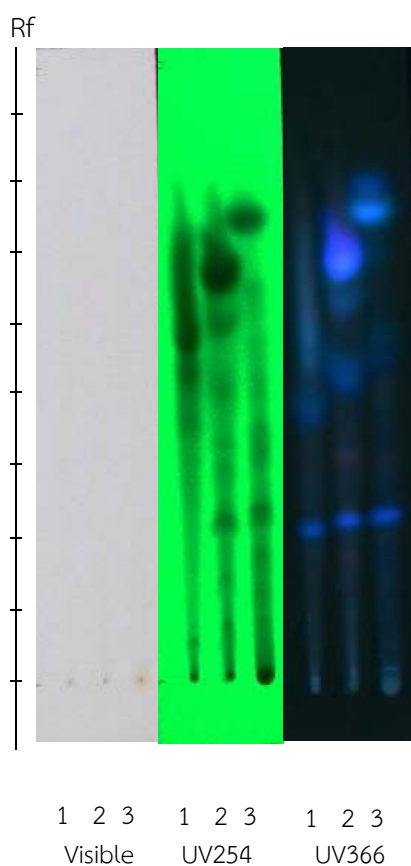
ผลการศึกษาพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ chloroform : methanol (9 : 1) และ chloroform : methanol (8 : 2) สามารถที่ใช้แยกสารสกัดหยาบของหญ้าพันธุ์ขาว (A) มะเดื่อปล้อง (F) ไล่ไก่ (J) ยอ (M) และขวกไก่ (ST) ส่วนต้นสะบ้าลิง (E) มะตูม (SI) และสะพ้านกิน (SA) สามารถใช้ระบบตัวทำละลาย dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2) โดยส่องภายใต้แสง UV 254 และ 366 nm รายละเอียดดังนี้

(1) หญ้าพันธุ์ขาว (A) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ chloroform : methanol (9 : 1) มีรูปแบบ TLC chromatogram ไม่ต่างกันของสารสกัดทั้ง 3 ตัวทำละลาย เมื่อส่องด้วยตาเปล่าพบสารเคมีจำนวน 3 spots และเมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ UV 366 พบสารเคมีจำนวน 7 spots ดังแสดงในภาพที่ 13



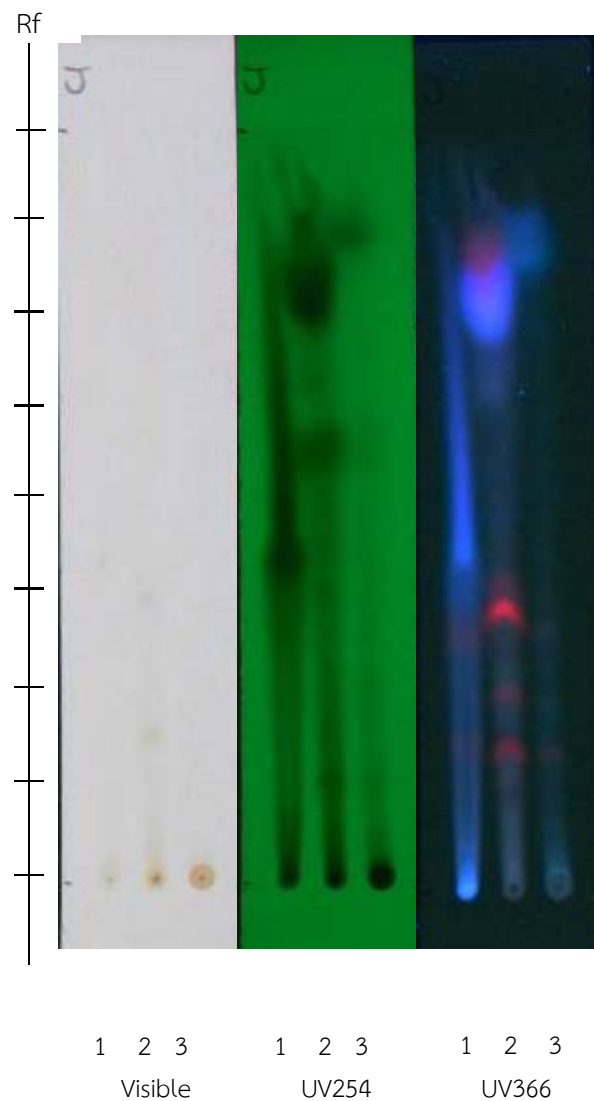
ภาพที่ 13 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของหญ้าพันธุ์ขาว (A)
Solvent system : chloroform : methanol (9 : 1)

(2) มะเดื่อปล้อง (F) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ chloroform : methanol (9 : 1) ไม่พบ spot สารเคมีได้เมื่อดูด้วยตาเปล่า แต่เมื่อส่องภายใต้ UV 254 พบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate และ ethanol พบจำนวน spot ของสารเคมีมากกว่าสารสกัดด้วย dichloromethane และเมื่อส่องภายใต้ UV 366 พบว่า สารสกัดด้วย ethanol พบจำนวน spots สารเคมีน้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของมะเดื่อปล้อง (F)
Solvent system : chloroform : methanol (9 : 1)

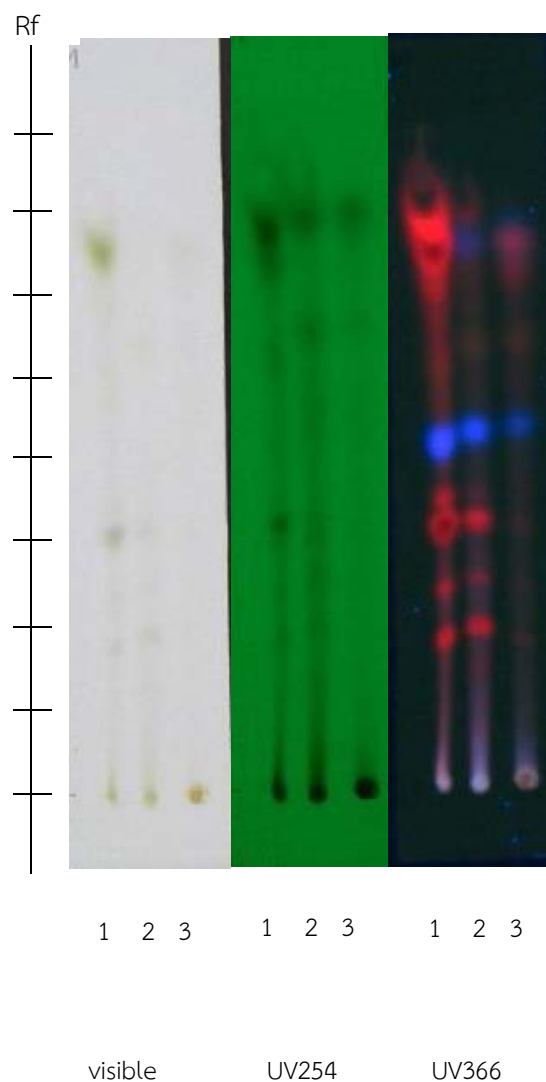
(3) ไล่ไก่ (J) พบว่า ระบบตัวทำละลายคือ chloroform : methanol (9 : 1) เหมาะสมกับสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เท่านั้น เมื่อส่องด้วยตาเปล่าสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เท่านั้นพบสารจำนวน 2 spots และเมื่อส่องภายใต้ UV 366 พบสารเคมีจำนวน 7-10 spots ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของไส้ไก่ (J)

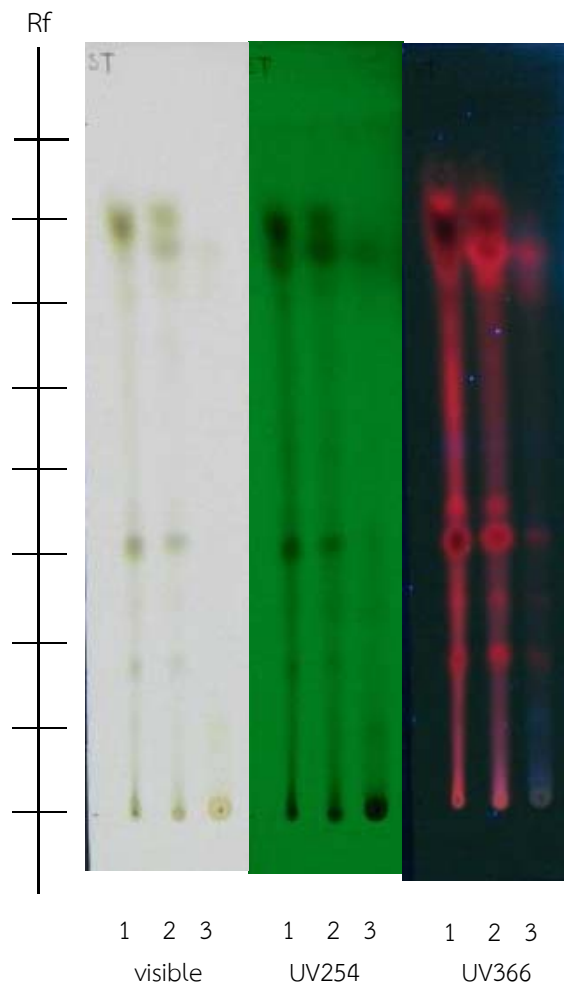
Solvent system : chloroform : methanol (9 : 1)

(4) ยอ (M) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ chloroform : methanol (9 : 1) เมื่อส่องด้วยตาเปล่าพบสารเคมีจำนวน 3 spots ในสารสกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ ethyl acetate เมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ UV 366 พบสารเคมีจำนวนใกล้เคียงกันแต่ค่า Rf ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 16



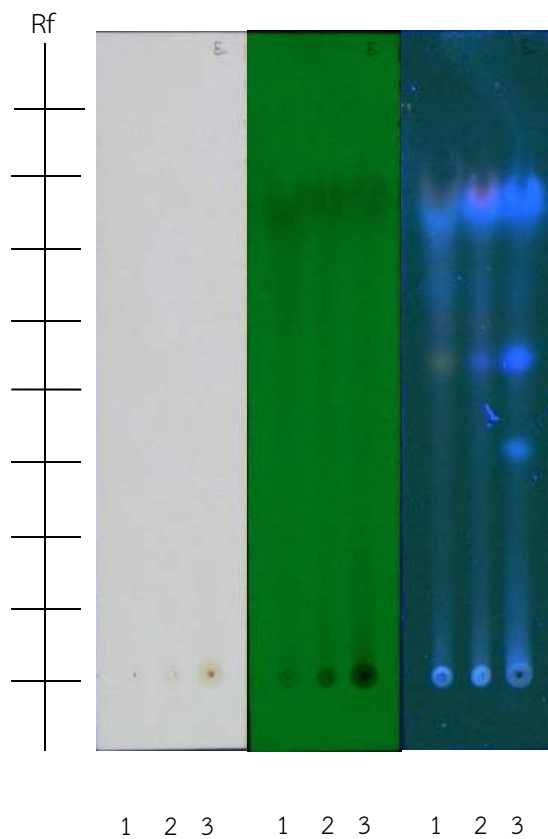
ภาพที่ 16 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของยอ (M)
Solvent system : chloroform : methanol (9 : 1)

(5) ขวากไก่ (ST) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ chloroform : methanol (9 : 1) เมื่อส่องด้วยตาเปล่าพบรูปแบบ TLC chromatogram ที่คล้ายคลึงกันทั้งสารสกัดด้วย dichloromethane และ, ethyl acetate แต่สารสกัดด้วย ethanol ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า เมื่อส่องภายใต้ UV 254 และ UV 366 พบรูปแบบ TLC chromatogram ที่คล้ายคลึงกันทั้งสารสกัดด้วย dichloromethane และ, ethyl acetate แต่สารสกัดด้วย ethanol ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเช่นเดียวกัน ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของขมิ้นชัน (ST)
Solvent system : chloroform : methanol (9 : 1)

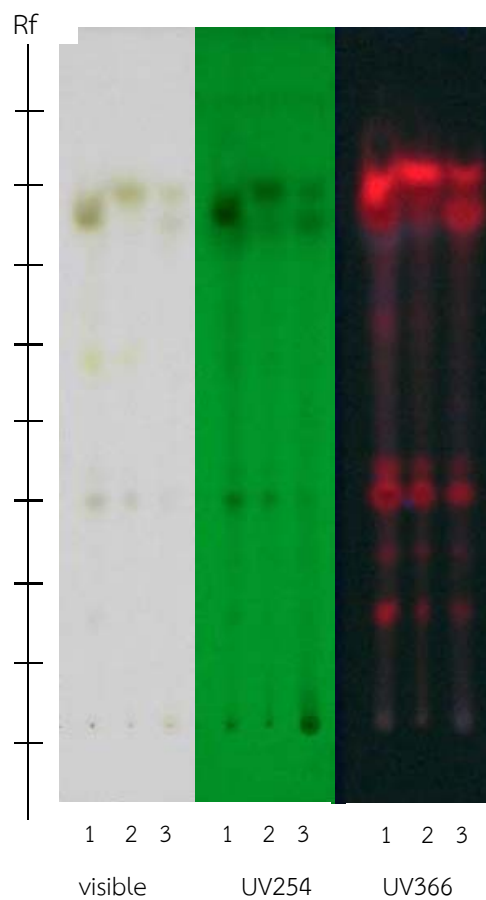
(6) สะบ้าย้อย (E) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2) เมื่อส่องด้วยตาเปล่าไม่พบ spot สาร และเมื่อส่องภายใต้ UV 254 พบสารเคมีจำนวน 2-3 spots แต่เมื่อส่องภายใต้ UV 366 พบจำนวนสารเคมีมาก ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่ 18 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของสะบ้าลิง (E)

Solvent system : dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2)

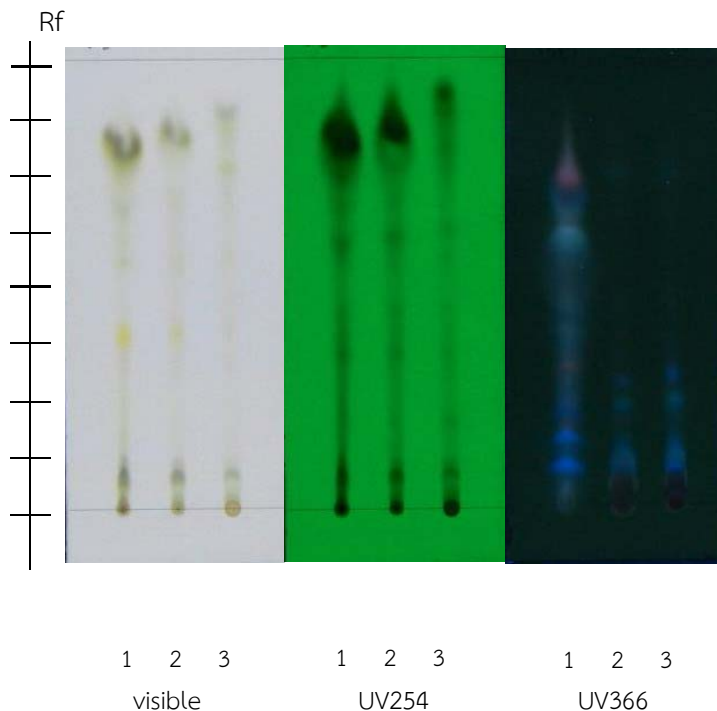
(7) มะตูม (SI) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2) พบรูปแบบ TLC chromatogram ที่คล้ายคลึงกันทั้งสารสกัดด้วย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ทั้งดูด้วยตาเปล่าและส่องภายใต้ UV 254 และ UV 366 ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) มะตูม (SI)

Solvent system : dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2)

(8) สะท้อนกัน (SA) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ chloroform : methanol (9 : 1) พบรูปแบบ TLC chromatogram ที่คล้ายคลึงกันทั้งสารสกัดด้วย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ทั้งดูด้วยตาเปล่าและส่องภายใต้ UV 254 และ UV 366 ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 แสดง TLC chromatogram ของสารสกัดด้วย dichloromethane (1), ethyl acetate (2) และ ethanol (3) ของสะฟ้านก (SA)
Solvent system : dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2)

ผลการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมทำให้ทราบจำนวน spot ของสารเคมีที่พบในสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย dichloromethane, ethyl acetate และ ethanol ของสมุนไพรแต่ละชนิด แต่มีข้อด้อยคือไม่มีสารมาตรฐานเทียบกับสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิด จึงทำให้ไม่สามารถหาปริมาณสารสำคัญเฉพาะของสมุนไพรแต่ละชนิด

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน

การศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูก (bone formation) วัด cell proliferation ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ Human osteosarcoma cell line (HOS) (2×10^6 , 1 vial) และ UMR-106 cell line และวัดปริมาณ alkaline phosphatase ด้วยวิธี Total protein โดยวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 405 nm คำนวณเป็นค่า *p*-nitrophenol มีหน่วยเป็น nanomole ต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อหลุม โดยความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้นที่ 20 mg/mL

ผลการศึกษาไม่สามารถรายงานได้ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ Human osteosarcoma cell line (HOS) (2×10^6 , 1 vial) และทำการเปลี่ยนเป็นใช้ UMR-106 cell line มีปัญหาในการเจริญ เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบแล้ว ผลการศึกษาค่าที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ จึงขาดผลการศึกษาฤทธิ์เพิ่มการสร้างกระดูกดังกล่าว

No.	สมุนไพร	ความเข้มข้น (mg/mL)	A_{570nm} (mean $\pm$ SD)	Proliferation (%)	A_{405nm} (mean $\pm$ SD)	ALP activity (nmol/well)
1	หญ้าพันธุ์ขาว					
2	สะบ้ายี่					
3	มะเดื่อปล้อง					
4	ไผ่ไก่					
5	ยอบ้าน					
6	มะดูก					
7	ขวากไก่					

บทที่ 5

ผลลัพธ์และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัย

5.1 ผลที่ได้จากการวิจัย

1. จากการคัดเลือกสมุนไพรพื้นบ้านอีสานที่มีสรรพคุณแก้ปวดข้อและกระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูก และเส้นเอ็น จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะดูก มะเดื่อปล้อง ขวากไก่ ไล่ไก่ สะพานกัน สารพัดพิษ เขี้ยวงู สะบ้าลิง หนุ่ย พันงู และยอบ้าน แต่สามารถหาตัวอย่างต้น authentic sample ได้ จำนวน 9 ชนิดเท่านั้น เนื่องจากต้นเขี้ยวงู มีชื่ออื่นว่า ขวากไก่ และมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นชื่อพ้อง synonym กันคือ *Strychnos axillaries* Colebr. (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) เป็นต้น ทำให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถหาพืชสมุนไพรได้ครบตามที่กำหนด

ผลการสกัดพบว่าได้สารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดสีน้ำตาลอ่อน ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้แตกต่างกัน โดยมีค่า %yield ของสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า หากสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol จะได้ %yield ค่อนข้างสูงกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น แต่สมุนไพรบางชนิดก็สามารถสกัดได้สารสกัดหยาบที่มี %yield สูง ทุกตัวทำละลาย เช่น ใบยอ

2. การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารกลุ่มต่างๆ พบว่า สมุนไพรพื้นบ้านทั้ง 9 ต้นนั้น ส่วนใหญ่พบสารกลุ่ม alkaloid, phenolic และ tannin มีเพียงต้นสะบ้าลิง ยอบ้าน และสะพานกันที่พบสารกลุ่ม flavonoid โดยที่สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ ethanol มีกลุ่มสารสำคัญที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid, phenolic, tannin และ flavonoid

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากสะพานกันมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 258.27 ± 3.341 mg GAE/g สารสกัด และสารสกัดจากขวากไก่มีค่าน้อยสุดเท่ากับ 19.46 ± 11.25 mg GAE/g สารสกัด

ผลการศึกษาพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยใช้ chloroform : methanol (9 : 1) และ chloroform : methanol (8 : 2) สามารถที่ใช้แยกสารสกัดหยาบของหนุ่ยพันงูขาว มะเดื่อปล้อง ไล่ไก่ ยอ และ ขวากไก่ ส่วนต้นสะบ้าลิง และมะดูก สามารถใช้ระบบตัวทำละลาย dichloromethane : ethyl acetate (8 : 2)

5.2 ประโยชน์ที่ได้รับและการนำไปใช้ประโยชน์

1. จากการทบทวนเอกสารวิชาการพบว่า บางแหล่งระบุว่า ต้นเขี้ยวงู เป็นไม้เถา เถามีสรรพคุณรสเมาร้อน ดับพิษในข้อ กระดูกและในเส้นเอ็น แก้โลหิตเป็นพิษ มีชื่ออื่นว่า ขวากไก่ และมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่เป็นชื่อพ้อง synonym กันคือ *Strychnos axillaries* Colebr. (*Strychnos viridiflora* A.W.Hill) ซึ่งชื่อวิทยาศาสตร์ที่พ้องกันนั้นตรงกับชื่อวิทยาศาสตร์ของต้น ขวากไก่ (ขอเบ็ด (หนองคาย) ขี้แรด (ปราชินบุรี) เขี้ยวงู (ชุมพร)) อีกชนิดหนึ่ง ดังนั้น สมุนไพรชนิดนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ให้ชัดเจนต่อไป เพื่อไม่ให้นำมาใช้ผิดต้น

2. ทราบกลุ่มสารสำคัญเบื้องต้นและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสมุนไพรพื้นบ้านทั้ง 9 ชนิด

5.3 ความเป็นไปได้ในการต่อยอดงานวิจัย

เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังไม่มีผลการศึกษาว่าสมุนไพรพื้นบ้านอีสาน ทั้ง 9 ชนิดนั้นต้นใดมีศักยภาพในการช่วยเพิ่มเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และชนิดใดช่วยลดเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) เพราะผลการศึกษาไม่สำเร็จนั้น แต่อย่างไรก็ตามผลการตรวจสอบกลุ่มสารและการหาปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิก ทำให้ทราบว่า สมุนไพรพื้นบ้านอีสานทั้ง 9 ชนิด ได้แก่ หนุ่ยพันงูขาว มะเดื่อปล้อง ไล่ไก่ ยอ ขวากไก่ สะบ้าลิง

มะตุก สะพ้านกัน และสารพัดพิษ ที่ระบุใช้ในตำรายาพื้นบ้านอีสานว่ามีสรรพคุณ ใช้แก้ปวดข้อและ
กระดูก ดับพิษกระดูก บำรุงกระดูกและเส้นเอ็น มีกลุ่มกลุ่มฟีนอลิกที่นำไปหาสารออกฤทธิ์ (active
compound) ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิชชุดา จรรย์พันธ์, สุภาพร ภคิอมร และกนิษฐา ภูวนาถนรานูบาล. แนวทางการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เซลล์ต้นกำเนิดสำเร็จรูปห้องปฏิบัติการ. บ. FULL FORSE; สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2556.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ
- วงศ์สถิต ฉั่วกุล. สารานุกรมสมุนไพรไทย เล่ม 4 กกายาฮีสาน. แอ็ดวานซ์ อะโกร: มุลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล 2542.
- สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก. การพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูกสำหรับการผ่าตัดกระดูก. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาฯ 2550.
- สารานุกรมพืชในประเทศไทย (ฉบับย่อ) สำนักงานหอพรรณไม้ไทย (มะดูก)
(<http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx>)
- อุบล มณีกุล และคณะ. ตำราแพทย์แผนโบราณทั่วไป สาขาเภสัชกรรม. กองประกอบโรคศิลปะ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข
- Caichompoo W, Zhang QY, Qin LP. Optimization of extraction conditions and purification of the lignan compounds from *Schisandra chinensis* (Turcz.). *Phytother Res* 2009;23(2):289-292.
- Carlo GD, Mascolo N, Izzo AI and Capasso F. Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999;65(4):337-353.
- Changgao W. Basic theory traditional Chinese medicine. Shanghai: Shanghai University of TCM; 2002.
- Chen Y, Emura S, Isono S. Effects of traditional Chinese medicine on the bone loss in SMAP6: a murine model for senile osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 2005;28(5):865-869.
- Das AS, Das D, Murkherjee M and *et al*. Phytoestrogenic effects of black tea extract (*Camellia sinensis*) in an oophorectomized rat (*Rattus norvegicus*) model of osteoporosis. *Life Sciences* 2005;77:3049-3057.
- Feng-Lin Song, Ren-You Gan, Yuan Zhang. Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 2362-2372; doi:10.3390/ijms11062362
- Ghias Uddin and Abdur Rauf. Phytochemical Screening, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Aerial Parts of *Quercus robur* L. *Middle-East Journal of Medicinal Plants Research* 2012;1(1): 01-04.
- Hidaka S, Okamoto Y, Yamada Y. Alterations in the periodontium after ovariectomized rats: the effect of a Japanese herbal medicine, Chujo-to. *Phytother Res* 2000;14:527-533.
- Hong HK, Kim HJ, Lee TK. Inhibitory effect of Korean traditional medicine, Honghwain-Jahage (water extract of *Carthamus tinctorius* L. seed and *Hominis placenta*) on interleukin-1-mediated bone resorption. *J of Ethnopharmacol* 2002;79:143-148.
- Hua N, Qin LP, Zhang QY. Antiosteoporotic activity of Er Xian Decoction, a traditional Chinese

- herbal formula, in ovariectomized rat. J of Ethnopharmacol 2006;108:96-102.
- Iacona MV. 2007. Osteoporosis: A National Public Health Priority. J of PeriAnesthesia Nursing 22(3): 175-183.
- Jane B. Lian and Gary S. Stein. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1992;3(3):267-350.
- Jin UH, Kim DI, Lee TK. Herbal formulation, Yukmi-jihang-tang-Jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cyclooxygenase expression. J of Ethnopharmacol 2006;106:333-343.
- Kim DH, Vaccaro AR. Osteoporotic compression fractures of the spine; current options and considerations for treatment. The Spine Journal 2006; 6:479-487.
- Meng FH, Li YB, Xiong ZL, Jiang ZM, Li FM. Osteoblastic proliferative activity of *Epimedium brevicornum* Maxim. Phytomedicine. 2005, 12;189-193
- Nature Foam. โรคกระดูกพรุน. [online]. Available : www.naturefoam.com. (Retrieved 01/10/2007)
- Osteoblast differentiation and mineralization www.promocell.com;
- Philip S and Cyrus C. Osteoporosis. Lancet 2006;367:2010-2018.
- Qin LP, Zhang QY, Tian YP and *et al.* Total coumarins from fruits of *Cnidium monnieri* inhibit formation and differentiation of multinucleated osteoclasts of rats. Acta Pharmacol Sin 2003;24(2):181-186.
- Sari Alatalo. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b: a Serum Marker of Bone Resorption. The Department of Anatomy, Institute of Biomedicine, University of Turku, Turku, Finland, and TULES graduate school, 2004.
- Sun JS, Lin CY, Dong GC and *et al.* The effect of Gu-Sui-Bu (*Drynaria fortunei* J.Sm.) on bone cell activities. Biomaterials 2002;23:3377-3385.
- Shirwaikar A, Khan S and Malini S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rats. J of Ethnopharmacol 2003;89:254-250.
- Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas 2007;56:322-331.
- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas 2008;59:137-148.
- Vijayanarayana K, Rodrigues Rashmi S, Chandrashekhar KS and *et al.* Evaluation of estrogenic activity of alcoholic extract of rhizomes of *Curculigo orchoides*. J of Ethnopharmacol 2007.
- Wang D, Li F and Jiang Z. Osteoblastic proliferation stimulating activity of *Psoralea corylifolia*

- extracts and two its flavonoids. *Planta Med* 2001;67:748-749.
- Wang YD, Cui K, Zhao H. Bushen Ningxin decoction pharmacological serum promotes the proliferation and suppresses the apoptosis of murine osteoblasts through MAPK pathway. *J of Ethnopharmacol* 2009;122:221-226.
- Xie F, Wu C, Zhang Y and *et al.* Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* Hance. In ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28(10):1879-1885.
- Yanfu Z. Science of Chinese Materia Medica. Shanghai: Shanghai University of TCM; 2003.
- Yang Q, Populo SM, Zhang J, Yang G and Kodama H. Effect of *Angelica sinensis* on the proliferation of human bone cells. *Clinica Chimica Acta* 2002;324:89-97.
- Yin J, Tezuka Y, Subehan and *et al.* In vivo anti-osteoporotic activity of isotaxiresinol, a lignan from wood of *Taxus yunnanensis*. *Phytomedicine* 2006;13:37-42.
- Yoon WJ, Lee HJ, Kang GJ and *et al.* Inhibitory effects of *Ficus erecta* leaves on osteoporotic factors in vitro. *Arch Pharm Res* 2007;30(1):43-49.
- Zizic TM. Pharmacologic prevention of osteoporotic fractures. *American Family Physician* 2004;70(7):1293-1299 [online]. Available : www.aafp.org/afp. (Retrieved 30/9/2006)
- Zhang H, Xing WW, Li YS. Effects of a traditional Chinese herbal preparation on osteoblasts and osteoclasts. *Maturitas* 2008;61:334-339.
- Zhang QY, Qin LP, He WD and *et al.* Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity. *Planta Med* 2007;73:13-19.
- Zhang Y, Yu L, Ao M and Jin W. Effect of ethanol extract of *Lipedium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *J of Ethnopharmacol* 2006;105:274-279.
- Zhang Y, Lai W, Leung P and *et al.* Effect of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull* 2006;29(2):291-296.
- Zhang Y, Li XL, Lai WP and *et al.* Antiosteoporotic effect of *Erythrina variegata* L. in ovariectomized rats. *J of Ethnopharmacol* 2007;109:165-169.

ภาคผนวก

1. ค่า absorbance ของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol ของสมุนไพรแต่ละชนิด ความเข้มข้น 200 mg/mL โดยดูมาทำปฏิกิริยา 20 μ L แล้วนำไปวัดค่า A ที่ 760 nm

ตาราง 9 แสดงค่า absorbance ของของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ethanol ของสมุนไพรแต่ละชนิด

No	ความเข้มข้น gallic acid (mg/mL)	ค่า absorbance (A) ที่ 760 nm			
		A1	A2	A2	A (เฉลี่ย)
1	หญ้าพันงูขาว	0.2213	0.2010	0.2209	0.2144
2	สะบ้ายี่	0.3279	0.3200	0.2900	0.3126
3	มะเดื่อปล้อง	0.0110	0.0110	0.0150	0.0123
4	ไผ่ไก่	0.3102	0.2900	0.3160	0.3054
5	ยอบ้าน	0.4216	0.4203	0.4510	0.4310
6	สะพ้านก้น	0.4915	0.4814	0.4806	0.4845
7	มะตูม	0.1607	0.1601	0.1058	0.1422
8	ขวกไก่	0.0670	0.0650	0.0700	0.0673
9	สารพัดพิษ	0.2378	0.2612	0.2012	0.2334

2. นำเสนอผลงานวิชาการเรื่อง **Determination of total phenolic compounds and phytochemical screening from Thai medicinal plants** รูปแบบโปสเตอร์ (รหัส GA-00664) ในงานประชุมวิชาการ 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research, Freie University Berlin ระหว่างวันที่ 27 สิงหาคม – 3 กันยายน 2553 ณ กรุงเบอร์ลิน ประเทศเยอรมัน (บทความย่อใน Planta Med 2010; 76 - P103 OI: 10.1055/s-0030-1264401)

3. บทความวิชาการเรื่อง **ฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน (Antiosteoporotic from Herbal Medicine)** ตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม Vol 29(2);Apr-Jun 2010: 217-223

ผลงานตีพิมพ์อื่นที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรต้านกระดูกพรุน นอกจากผลงานจากทุนวิจัยฯ ได้แก่

- การสำรวจสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้รักษาโรคกระดูกพรุนในอำเภอเมือง จ.มหาสารคาม (The ethnobotanical survey of plants used for treatment of bone disorder in Amphur Muang, Mahasarakham Province) ตีพิมพ์ในวารสาร Thai Pharm Health Sci 2011;6(1):7-11. (ฐานข้อมูล สกอ.)

- Phytochemical Screening of a Traditional formula used to Improve bone. ตีพิมพ์ในวารสาร IJPR 2012;4(1):95-100. (ฐานข้อมูล Scopus)