ว.วิทย. มข. 42(4) 806-819 (2557) KKU Sci. J. 42(4) 806-819 (2014)

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus mutans* ของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอม

Anti-*Streptococcus mutans* activity of lupinifolin from ethanol extract of *Albizia myriophylla* Benth.

Nantiya Joycharat[1,2], Chancheera Boonma[1], Saranya Muangnua[1], Phakjira Poorisakpaisal[1], Chidhathai Suwannawong[1] and Surasak Limsuwan[1,2]*

บทคัดย่อ

ชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth.) เป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาอาการปวดฟันซึ่งมีสาเหตุจากฟันผุ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าตำรับยาดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุสำคัญในการก่อโรคฟันผุ (*Streptococcus mutans*) โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิดเป็นตัวออกฤทธิ์ที่สำคัญในชะเอมไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารลูปินิโฟลิน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อชนิดนี้ได้ดี งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมที่เพาะปลูกในประเทศไทย จาก 3 แหล่ง ได้แก่ ร้านขายยาแผนโบราณ จ.สงขลา (JB01), อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (JB02) และ อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว (JB03) โดยวิธี broth microdilution รวมถึงศึกษาปริมาณสารลูปินิโฟลินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณสารลูปินิโฟลินมีปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ดังนี้ 93.85 57.81 และ 0.04 mg/g สำหรับ JB01, JB02 และ JB03 ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) *S. mutans* ของสารสกัด JB01, JB02 และ JB03 มีค่าเท่ากับ 3.9 31.25 และ 500 µg/ml ตามลำดับ โดยสารสกัด JB01 ซึ่งมีปริมาณสารลูปินิโฟลินมากที่สุดมีฤทธิ์ดีที่สุด ในขณะที่สารสกัด JB03 ซึ่งมีปริมาณสารลูปินิโฟลินน้อยที่สุดมีฤทธิ์น้อยที่สุด ดังนั้นจึงอาจนำสารลูปินิโฟลินมาใช้เป็นสารเทียบของชะเอมไทยเพื่อการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรชนิดนี้ต่อไป

[1]Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand

[2]Natural Products Research Center of Excellence, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: nantiya.j@psu.ac.th

ABSTRACT

Albizia myriophylla Benth. is a medicinal plant composition in herbal formula used for remedy of toothache caused by dental caries. Previous research has revealed that such formula has antibacterial activity against *Streptococcus mutans*, the principal causative pathogen of tooth decay. Some substances belonging to flavonoids are shown to be the active ingredients in this plant species of which lupinifolin in particular has very good anti-*S. mutans* activity. In this study, anti-*S. mutans* activity of lupinifolin from ethanol extracts of three different collections of *A. myriophylla* cultivated in Thailand including those from herb shop in Songkhla (JB01), Hat Yai district of Songkhla (JB02), and Wang Nam Yen district of Sakaeo was carried out using broth microdilution. The quantitative test of lupinifolin from ethanol extracts of these 3 collections of *A. myriophylla* was performed herein by High Performance Liquid Chromatography. The result showed that each of the samples tested had the difference of lupinifolin content. The ethanolic wood extracts from 3 collections of *A. myriophylla* including JB01, JB02, and JB03 have 93.85, 57.81, and 0.04 mg/g of lupinifolin, respectively. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of JB01 JB02 and JB03 against *S. mutans* were 3.9, 31.25, and 500 µg/ml, respectively. JB01 containing the maximum quantity of lupinifolin showed the best activity while JB03 containing the minimum quantity of lupinifolin exhibited the lowest activity. Lupinifolin may be used as a marker compound of *A. myriophylla* for quality control of its raw materials as well as its herbal medicinal products in the future.

คำสำคัญ: ชะเอมไทย ลูปินิโฟลิน ฟันผุ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

Keywords: *Albizia myriophylla*, Lupinifolin, Dental caries, *Streptococcus mutans*

บทนำ

พืชสกุล *Albizia* (Leguminosae) มีทั้งสิ้นประมาณ 150 ชนิด กระจายอยู่ทั่วทั้งเอเชีย แอฟริกา อเมริกากลางและอเมริกาใต้ (Miyase et al., 2010) จากข้อมูลรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพืชสกุล *Albizia* เป็นแหล่งของสารสำคัญหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ สารกลุ่มไตรเทอร์ปีนซาโปนิน (triterpene saponins) สเปอร์มีนอัลคาลอยด์ (spermine alkaloids) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (นันทิยาและสุรศักดิ์, 2556) *Albizia myriophylla* Benth. (Leguminosae-Mimosoideae) มีชื่อท้องถิ่นว่า ชะเอมไทย พืชนี้เป็นตัวยาสมุนไพรที่ปรากฏอยู่ในคัมภีร์แพทย์แผนไทย และในตำรายาหมอพื้นบ้านภาคใต้ของไทย โดยมีการนำมาใช้ทั้งรูปแบบของยาเดี่ยวและยาตำรับ เนื้อไม้มีรสหวาน สรรพคุณ แก้โรคในลำคอ แก้ลม แก้เลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุและบำรุงกำลัง บำรุงกล้ามเนื้อให้เจริญ แก้ไอ ขับเสมหะ แก้น้ำลายเหนียว (เสงี่ยม, 2508) หมอพื้นบ้าน 3 จังหวัดภาคใต้ ใช้ส่วนรากของพืชสมุนไพรชนิดนี้ในการรักษาอาการอักเสบภายในช่องปากที่มีสาเหตุจากบาดแผล หรือการเน่าเปื่อยของแผลในช่อง

ปาก (Neamsuvan et al., 2012) คำ “ชะเอม” มาจากคำ “เฌอเอม” ในภาษาเขมร ซึ่งแปลว่า ต้นไม้ที่มีรสหวาน ชะเอมที่ใช้ในยาไทยมี 3 ชนิด คือ ชะเอมไทย ชะเอมจีน และชะเอมเทศ (ชยันต์และวิเชียร, 2556) โดยพบว่าชะเอมไทยที่หาซื้อได้ตามร้านขายเครื่องยาทั่วไปมักมีการนำส่วนเถาของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ซึ่งมีรสที่คล้ายคลึงกันมาใช้ทดแทนอยู่บ่อยครั้ง (ธนภัทร, 2537) โดยชะเอมเหนือ เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae ลักษณะเป็นไม้เลื้อยหรือไม้เถาเนื้อแข็งขนาดกลาง เถาเป็นปุ่มปม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกปลายใบคี่ แผ่นใบรูปหอก ใบย่อยมีประมาณ 5 ใบ ช่อดอกเป็นแบบช่อแยกแขนง กลีบดอกรูปดอกถั่ว สีขาวถึงขาวแกมม่วงอ่อน ผลเป็นฝักแห้งแตก (เต็ม, 2523) และมีสรรพคุณพื้นบ้านในการแก้ไอ และขับเสมหะคล้ายคลึงกับชะเอมไทย (สมิตาและคณะ, 2548) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าชะเอมเหนือมีสารสำคัญหลายชนิดในกลุ่ม prenylated flavanones และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์เป็นพิษกับเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านเชื้อเริม (Mahidol et al., 1997; นพมาศและคณะ, 2551) จากผลการวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับการตรวจเอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางโครมาโทกราฟีฉาบบาง (TLC) พบว่าเครื่องยาที่มีชื่อว่าชะเอมไทยจากแหล่งต่าง ๆ ที่มีขายตามร้านขายยาแผนโบราณเป็นต้นชะเอมเหนือ (ธนภัทร, 2537) ทั้งนี้ชะเอมไทยชนิดที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *A. myriophylla* มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย โดยเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณป่าลุ่มต่ำ หรือบริเวณป่าโปร่ง และยังพบได้ตามป่าธรรมชาติทั่วไป เช่น ป่าดิบเขา ป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณหรือป่าที่ดัดแปลงโดยมนุษย์และธรรมชาติ (Smitinand and Larsen, 1985) จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบสารกลุ่ม tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, sterols, lignans และ triterpenoids (สุรางค์, 2528; Asano et al., 2005; Joycharat et al., 2013; Rasila et al., 2013) และพบข้อมูลงานวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านยีสต์ (anticandidal activity) และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) (Amornchat et al., 2006; Rukayadi et al., 2008; Steinrut et al., 2011; Joycharat et al., 2012; 2013) เป็นต้น นอกจากนี้ในทางการแพทย์พื้นบ้านในภาคใต้ของไทย มีการใช้ชะเอมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยารักษาโรคหลายตำรับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำรับยารักษาอาการปวดฟันซึ่งมีสาเหตุจากฟันผุ (ประกอบ, 2547) จากรายงานวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย สนับสนุนการใช้ตำรับยาที่มีชะเอมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบในการต้านเชื้อสาเหตุสำคัญในการก่อโรคฟันผุ (*Streptococcus mutans*) โดยพบว่าตำรับยาดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ดีที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimum inhibitory concentration; MIC) 250 μg/ml (Joycharat et al., 2012) ต่อมาคณะผู้วิจัยได้รายงานฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสำคัญหลายกลุ่มที่พบใน *A. myriophylla* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่ชื่อว่าสารลูปินิโฟลิน ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 1 สารนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อชนิดนี้ได้ดีโดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1 และ 2 μg/ml ตามลำดับ (Joycharat et al., 2013)

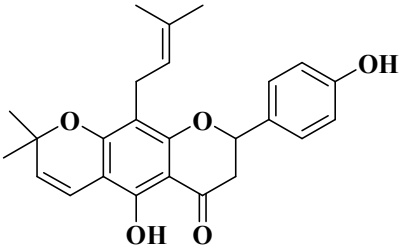
ฟันผุเป็นโรคในช่องปากที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยในประเทศไทยพบอุบัติการณ์การการเกิดโรคในประชากรทุกกลุ่มอายุมากกว่าร้อยละ 57 ในปี พ.ศ. 2540 พบว่าเด็กอายุ 3 ปี ในจังหวัดอุบลราชธานี เป็นโรคฟันผุถึง 88.7% ปัญหาโรคฟันผุในเด็กก่อนวัยเรียนในประเทศไทยยังคงรุนแรงและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ถือเป็นปัญหารุนแรงเมื่อเทียบกับเป้าหมายขององค์การอนามัยโลกที่กำหนดว่า เด็กอายุ 5-6 ปี อย่างน้อย 50% ควร

ปราศจากฟันผุ ซึ่งโรคฟันผุในเด็กอายุต่ำกว่า 6 ปี จะส่งผลกระทบต่อการผุของฟันน้ำนมซี่อื่นในปากและการผุของฟันแท้เมื่อเด็กอายุมากขึ้น (สุปรีดา, 2554) ฟันผุอาจเกิดขึ้นจากหลายๆ สาเหตุร่วมกัน (multifactorial disease) ปัจจัยสำคัญ 3 ประการที่ทำให้เกิดฟันผุ ได้แก่ ปัจเจกบุคล (host factors) เช่น พื้นผิวของตัวฟัน และปริมาณน้ำลาย อาหารที่รับประทาน (diet) โดยเฉพาะน้ำตาลและอาหารที่ค่อนข้างเหนียว จะเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดฟันผุได้มาก และคราบจุลินทรีย์ (plaque microorganisms) โรคฟันผุที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในคราบจุลินทรีย์โดยเชื้อที่จะทำให้เกิดฟันผุได้มากคือ *S. mutans* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก จัดเป็น normal flora ที่พบในช่องปากของมนุษย์ ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจนในการเจริญเติบโต มีรูปร่างเป็นแท่ง โดยมีกลไกการก่อโรค 3 ประการ คือ 1) ความสามารถในการยึดเกาะ (adhesion) โดยเชื้อ *S. mutans* สามารถสร้างเอนไซม์ glucosyltransferase ออกฤทธิ์สลายน้ำตาลซูโครสในอาหารจนเกิดเป็นสารเมือกเหนียวไม่ละลายบนเคลือบผิวฟันทำให้เชื้อเจริญเป็นคราบแผ่นฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย ที่เรียกว่า plaque 2) ความสามารถในการสร้างกรด (acidogenicity) โดยเชื้อ *S. mutans* สามารถสร้างกรดทำให้ช่องปากมีความเป็นกรดมากขึ้น เป็นผลให้เกิดการสลายของแร่ธาตุของเคลือบฟัน และ 3) ความสามารถในการทนกรด (acid-tolerance) โดยเชื้อ *S. mutans* สามารถเจริญเติบโตได้แม้สภาวะความเป็นกรดต่ำถึง 4.0 (Xiao et al., 2007)

การพัฒนายาแผนโบราณและยาพื้นบ้านซึ่งมีตัวยาเป็นสมุนไพร มักพบปัญหาในเรื่องการแสดงหลักฐานคุณภาพและประสิทธิภาพ ซึ่งเกณฑ์หนึ่งที่สำคัญซึ่งใช้ประเมินความปลอดภัยและประสิทธิภาพของสมุนไพรคือข้อมูลทางเคมี โดยจะต้องมีการศึกษาวิจัยสารสำคัญ (active compound) โดยเฉพาะสารสำคัญหลักในสมุนไพรซึ่งอาจบ่งบอกถึงศักยภาพด้านฤทธิ์ทางชีวภาพหรือความเป็นพิษของสมุนไพร สารสำคัญที่แสดงคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาสนับสนุนประสิทธิภาพของสมุนไพร เมื่อนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรจะเรียกสารดังกล่าวว่า specific marker compound (นพมาศและคณะ, 2551; วีณา, 2554) ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีคุณภาพดีใช้ได้ผลต้องมีสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่เพียงพอซึ่งจะต้องเริ่มจากวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพดีเท่านั้น ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรจึงสำคัญต่อการออกฤทธิ์และความสม่ำเสมอของคุณภาพของสมุนไพร การควบคุมคุณภาพของสมุนไพรสามารถดำเนินการตามข้อกำหนดมาตรฐานของสมุนไพรหากสมุนไพรชนิดใดมีข้อกำหนด (specification) ในเภสัชตำรับของประเทศต่าง ๆ หรือในตำรามาตรฐานยาของสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) แต่หากสมุนไพรชนิดใดยังไม่มีการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานไว้จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาวิจัยเพื่อจัดทำข้อกำหนดคุณภาพ (quality specification) ของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ ไว้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร (อรสา, 2551)

สมุนไพรชนิดเดียวกันจะมีปริมาณสารสำคัญมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุกรรมพืช ส่วนต่าง ๆ ของพืช การเก็บเกี่ยว ตลอดจนสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ของพืชซึ่งหมายรวมถึงแหล่งปลูก ซึ่งจะสัมพันธ์กับสภาพดิน ปริมาณน้ำและสารอาหารในดิน (รัตนา, 2547; วีณา, 2554) ทั้งนี้ความไม่สม่ำเสมอของปริมาณสารสำคัญจะส่งผลต่อความแปรปรวนของคุณภาพของวัตถุดิบพืชสมุนไพรและในที่สุดจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยผลการวิจัยเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมไทยจากร้านขายยาและจากแหล่งธรรมชาติมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบสารลูปินิโฟลินที่แยกจาก *A. myriophylla* แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคฟัน

ผุ *S. mutans* ได้ในระดับดีมาก (Joycharat et al., 2013) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารลูปินิโฟลินจะสามารถนำมาใช้เป็น specific marker compound ของชะเอมไทยหรือพืชอื่น ๆ ในกลุ่มชะเอมที่เคยมีรายงานพบสารชนิดนี้ได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมที่เพาะปลูกในประเทศไทย จากสถานที่แตกต่างกัน 3 แห่ง ได้แก่ ร้านขายยาแผนโบราณ จ.สงขลา (JB01), อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (JB02) และ อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว (JB03) รวมถึงศึกษาปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของตัวอย่างชะเอมที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ดังกล่าว องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดชะเอมไทย ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาตำรับยาแผนไทยในภาคใต้ที่มีชะเอมเป็นสมุนไพรองค์ประกอบ เพื่อใช้ในเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากต่อไปในอนาคต



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารลูปินิโฟลิน

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างเนื้อไม้จากส่วนลำต้นของชะเอมได้มาจากสถานที่ต่างกัน 3 แห่ง ดังนี้ 1) จากร้านขายยาแผนโบราณ จ.สงขลา (JB01) 2) จากแหล่งธรรมชาติ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา (JB02) และ 3) จากแหล่งธรรมชาติ อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว (JB03) ในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม 2556 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของตัวอย่าง JB02 และ JB03 โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรทัย เนียมสุวรรณ อาจารย์ผู้เชี่ยวชาญทางด้านอนุกรมวิธานพืช สาขาเภสัชกรรมไทย คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พร้อมทั้งจัดทำพรรณพืชแห้ง (herbarium specimens) ของตัวอย่างทั้งสอง (JB02 และ JB03) และเก็บรักษาไว้ที่คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการตรวจเอกลักษณ์ตัวอย่าง JB01 ทำโดยการศึกษาลักษณะทางเภสัชเวท ได้แก่ ลักษณะทางจุลทรรศน์ (microscopical characters) และมหทรรศน์ (macroscopical characters) เปรียบเทียบกับข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาของชะเอมไทย (นฤมลและภัสสรา, 2529)

2. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1100, Germany) เครื่อง variable wavelengh detector (Agilent Technologies, Germany) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) (Buchi, Switzerland) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) เครื่องเขย่า (shaker) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง ไมโครไทเทอร์เพลท (microtiter plate) ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) กระบอกตวง (measuring cylinder) จานเพาะเชื้อ (petri dish) หลอดทดลอง (test tube) methanol HPLC grade (Merck, Germany) glacial acetic acid HPLC grade (Merck,

Germany) dimethyl sulfoxide (Merck, Germany) อาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion (BHI) (Difco, USA) สารมาตรฐานลูปินิโฟลิน เครื่องเตรียมน้ำปราศจากไอออน (deionized water; DI) ultra pure water type I (ELGA, UK)

3. การเตรียมสารสกัดหยาบเอทานอลจากเนื้อไม้ส่วนลำต้นของชะเอม

ตัวอย่างเนื้อไม้ส่วนลำต้นของชะเอมล้างให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C บดละเอียด ชั่งผงตัวอย่างแห้งมา 200 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 800 มิลลิลิตร ด้วยวิธีแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เขย่าเป็นระยะ ๆ กรองแยกกากและสารสกัดด้วยกระดาษกรอง นำสารสกัดมาทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ระเหยแห้งต่อด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ได้สารสกัดหยาบเอทานอล ชั่งน้ำหนัก คำนวณ % yield ของสารสกัด และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดพืชสมุนไพร}}{\text{น้ำหนักของสมุนไรแห้งที่ใช้ในการสกัด}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารลูปินิโฟลินด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC)

วิเคราะห์ปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลจากตัวอย่างชะเอมด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งใช้ตัวตรวจวัดเป็น UV–detector และใช้สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ คอลัมน์: Zorbax Eclipse XDB-C8 (4.6×150 mm, 5μm) เฟสเคลื่อนที่ methanol: 15% glacial acetic acid (90:10 %v/v) อัตราการไหล: 1.2 ml/min ปริมาตรในการฉีด: 5 μl อุณหภูมิของคอลัมน์: 25°C ความยาวคลื่นของการตรวจวัด: 254 nm สารมาตรฐานลูปินิโฟลินที่ใช้ในการทดลองนี้ได้รับมาจากงานวิจัยที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัย (Joycharat et al., 2013) การระบุสารลูปินิโฟลินในสารสกัด จะพิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าเวลาการคงอยู่ (retention time) ของพีคในโครมาโทแกรมของสารสกัด และสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน การวิเคราะห์หาปริมาณสารลูปินิโฟลิน จะใช้พื้นที่ใต้พีค (peak area) และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน ทำการวิเคราะห์สารสกัดละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณค่าที่ได้เป็นมิลลิกรัมของสารลูปินิโฟลินต่อ 1 กรัมน้ำหนักสารสกัด

สร้างกราฟมาตรฐานสารลูปินิโฟลิน โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานลูปินิโฟลิน 6 ค่าความเข้มข้น ดังนี้ 1.0 2.5 5.0 10.0 25.0 และ 50.0 mg/L โดยการเจือจาง stock solution ของสารมาตรฐานด้วยตัวทำละลาย methanol จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำค่าพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาพล็อตกราฟเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) หรือกำลังสองสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ของกราฟมาตราฐานที่สร้างขึ้น

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*

เชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC25175 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานวิจัยความเป็นเลิศด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. mutans* ATCC25175 ของสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยการหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution (CLSI, 2009) โดยมีวิธีการวิจัยดังนี้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและชนิดแข็ง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในอัตราส่วน BHI:DW (น้ำกลั่น) = 3.7:100 ผสมอาหารและน้ำกลั่นเข้าด้วยกันนำไปต้มเป็นเวลา 5–10 นาที ให้ละลายเข้า

กัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ผสมเข้ากันดีแล้วแบ่งบรรจุใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเตรียม ในอัตราส่วน BHI:Agar:DW = 3.7:1.5:100 นำไปต้มพร้อมกับคนด้วยแท่งแก้วจนวุ้นละลายหมด บรรจุใส่ขวดและนำไปกำจัดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ จากนั้นบรรจุอาหารที่เตรียมเสร็จในขณะที่ยังร้อนลงในจานเพาะเชื้อ

ภายหลังจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเสร็จแล้ว ทดสอบการปราศจากเชื้อโดยนำไปอบในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จัดเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยและพร้อมใช้ที่อุณหภูมิ 4°C ระบุวันที่เตรียมและวันหมดอายุ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย S. mutans

นำเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 จาก stock นำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำ BHI agar ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5-10% CO_2 เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อ *S. mutans* จำนวน 3-5 โคโลนีจาก BHI agar มาเพาะใน BHI broth จำนวน 1 หลอด นำไปบ่มภายใต้สภาวะเดียวกัน จากนั้นนำเชื้อ *S. mutans* ใน BHI broth มาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับสารละลายแบเรียมซัลเฟต (McFarland no. 0.5) ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1.5×10^8 CFU/ml เจือจางต่อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ให้มีเชื้อประมาณ 1.0×10^6 CFU/ml

การทดสอบหาค่า MIC

เตรียมสารสกัดชะเอมให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ (1000 µg/ml) เจือจางสารสกัดแบบลำดับสองให้มีความเข้มข้น 1000–0.46 µg/ml ใน microtiter plate แบบ 96 หลุม ให้มีปริมาตรหลุมละ 20 µl ดูด BHI broth ใส่ลงใน microtiter plate หลุมละ 160 µl ดูดเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 20 µl จะได้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของแบคทีเรียประมาณ 5×10^5 CFU/ml เขย่าเบา ๆ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี 5-10% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง การอ่านผลโดยอ่านผลความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เป็นค่า MIC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมี 1% DMSO แทนสารสกัด

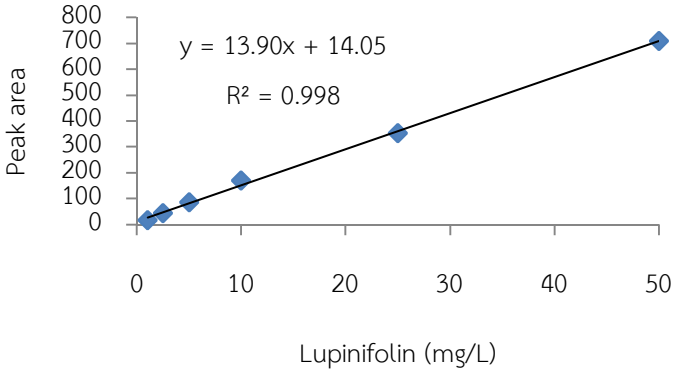
ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของเนื้อไม้ชะเอม

จากกราฟมาตรฐานของสารลูปินิโฟลิน (รูปที่ 2) ที่ได้แสดงโดยสมการเส้นตรง y = 13.903x+14.058 เมื่อค่า x คือ ความเข้มข้นของสารลูปินิโฟลินมีหน่วยเป็น mg/L และ y คือ พื้นที่ใต้พีค และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เชิงเส้น เท่ากับ 0.999 ลักษณะ HPLC chromatogram ของสารสกัด JB01 เมื่อเจือจาง 10 เท่าของความเข้มข้นเริ่มต้น (รูปที่ 3ก) จะเห็นพีคขนาดใหญ่ที่เวลาการคงอยู่ 2.260 นาที ซึ่งตรงกับพีคของสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน (รูปที่ 3ข) และสามารถหาปริมาณสารลูปินิโฟลินในสารสกัดหยาบเอทานอลของตัวอย่างชะเอมที่ศึกษาโดยนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้ไปคำนวนค่าความเข้มข้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน พบว่าปริมาณสารลูปินิโฟลินต่อน้ำหนัก 1 กรัมของสารสกัด JB01 สารสกัด JB02 และสารสกัด JB03 เท่ากับ 93.85 57.81 และ 0.04 mg ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดย %yield ของสารสกัดหยาบเอทานอลของตัวอย่าง JB01 JB02 และ JB03 มีค่าเท่ากับ 2.45 1.61 และ 0.99 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ค่า %yield ปริมาณสารลูปินิโฟลิน และฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของชะเอมไทย

สารสกัดชะเอมไทย	yield (%)	lupinifolin (mg/g)	MIC (µg/ml)
JB01	2.42	93.85	3.9
JB02	1.61	57.81	31.25
JB02	0.99	0.04	500



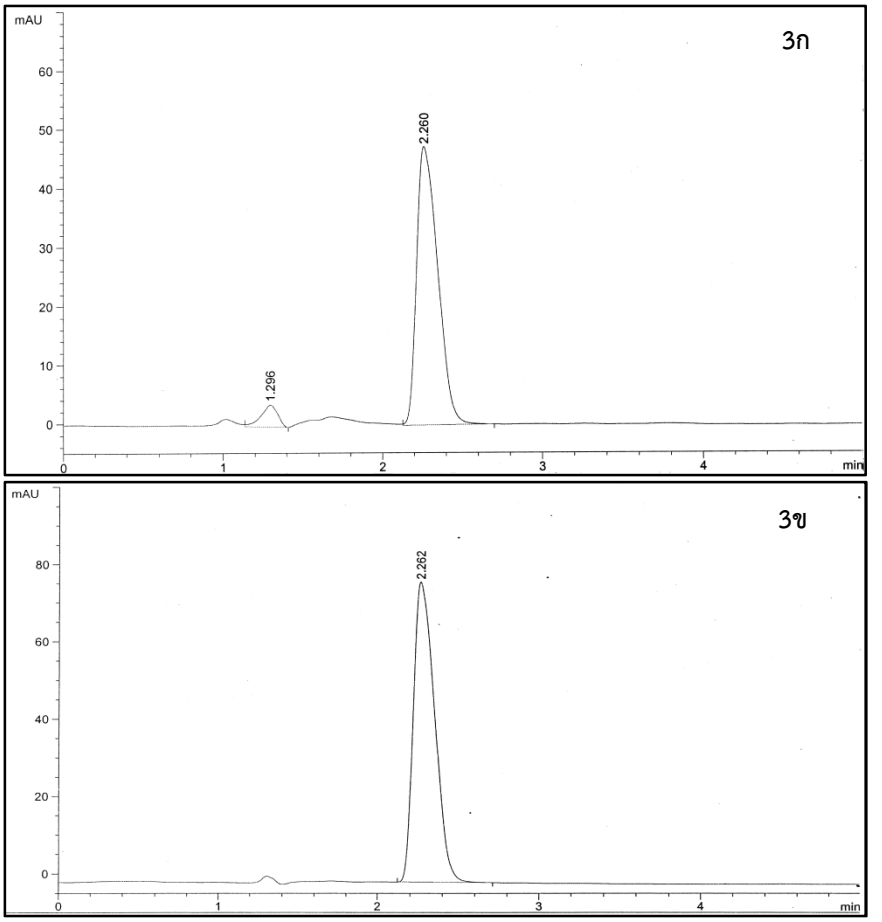
รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารลูปินิโฟลินในช่วงความเข้มข้น 1.0 ถึง 50 mg/L

2. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans*

จากการทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 โดยวิธี broth microdilution แสดงให้เห็นว่าสารสกัดชะเอมจาก 3 แหล่งที่ศึกษา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. mutans* ที่ต่างกัน โดยสารสกัด JB01 สารสกัด JB02 และสารสกัด JB03 มีค่า MIC เท่ากับ 3.9 31.25 และ 500 µg/ml (ตารางที่ 1) ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัด JB01 ซึ่งมีปริมาณสาร ลูปินิโฟลินสูงที่สุด มีฤทธิ์ดีที่สุด และจากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารลูปินิโฟลินและฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมทั้ง 3 ตัวอย่างในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างปริมาณสารลูปินิโฟลินและฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของตัวอย่างชะเอมที่ทดสอบ

วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุปผลการวิจัย

ชะเอมไทย (*A. myriophylla*) เป็นพืชสมุนไพรองค์ประกอบในตำรับยาสมุนไพรไทย ที่ใช้รักษาโรคฟันผุในการแพทย์พื้นบ้านภาคใต้ของประเทศไทย (ประกอบ, 2547) และมีรายงานวิจัยพบว่าพืชสมุนไพรนี้มีสารองค์ประกอบต่างๆที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ประกอบด้วย สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด (lupinifolin, 8-methoxy-7,3',4'-trihydroxyflovone, 7,8,3',4'-tetrahydroxyflavone) สารกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ (lupeol) และสารกลุ่มสเตอรอยด์ 4 ชนิด (β-sitosterone, stigmasta-5,22-dien-3-one, β-sitosterol, stigmasterol) โดยพบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ สารลูปินิโฟลินเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ซึ่งมีศักยภาพมากที่สุดของพืชสมุนไพรนี้ (Joycharat et al., 2013)



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของสารสกัด JB01 (3ก) และสารมาตรฐานลูปินิโฟลิน (3ข)

การที่จะสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภคว่าสมุนไพรที่ใช้นั้นมีทั้งประสิทธิภาพและความปลอดภัย สิ่งสำคัญที่ต้องดูแลอย่างต่อเนื่องก็คือคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรที่ถูกนำมาผลิตในแต่ละครั้ง เนื่องจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณสารสำคัญในพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งส่งผลให้สมุนไพรมีคุณภาพแตกต่างกัน ปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อมหลายประการที่มีอิทธิพลต่อชนิดและปริมาณของสารสำคัญในพืชสมุนไพร ได้แก่ แสง อุณหภูมิ อากาศ น้ำ ธาตุอาหารและดิน (ทศพร, 2555) ตัวอย่างงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าปริมาณสารสำคัญในต้นชา *Camellia sinensis* จากถิ่นกำเนิดในภูมิภาคที่แตกต่างกัน จะมีปริมาณสารสำคัญแตกต่างกัน โดยประเมินผลจากชา 13 ตัวอย่างที่ปลูกในภูมิภาคที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าปริมาณสาร chakasaponins I-III จะมีปริมาณสูงในตัวอย่างของชาจากทางตะวันตกของประเทศจีน เช่น มณฑลฝูเจี้ยน และมณฑลเสฉวน และปริมาณสาร floratheasaponins-F จะมีปริมาณสูงในตัวอย่างของชาจากภาคตะวันออกของจีน เช่น มณฑลอานฮุย และประเทศญี่ปุ่น (Morikawa et al., 2011) แสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูกที่ต่างกันจะมีผลกระทบต่อองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารสำคัญในสมุนไพรนั้น ๆ และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสมุนไพรแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันได้แม้เป็นพืชชนิดเดียวกัน ดังนั้นการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐาน จึงเป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพร ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่

ผลิตในแต่ละครั้งมีคุณภาพสม่ำเสมอในทุกครั้งที่บริโภค ทั้งนี้การควบคุมปริมาณสารสาคัญหรือสารออกฤทธิ์ให้มีปริมาณไม่ต่ำกว่าที่กาหนด จัดเป็นข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรที่สำคัญประการหนึ่ง (WHO, 2000; สมภพและพร้อมจิต, 2547) ในการควบคุมคุณภาพของยาจากสมุนไพรนั้นกระทำได้ยากกว่ายาแผนปัจจุบันมาก เนื่องจากสมุนไพรแต่ละตัวจะมีองค์ประกอบเป็นสารประกอบทางพฤกษเคมีที่ซับซ้อน ดังนั้นการเลือกสารเทียบ (marker compounds) จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณจะใช้สารเทียบที่เลือกจากสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสมุนไพรมาเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของสมุนไพรนั้น สำหรับการควบคุมคุณภาพประกอบด้วยการวิเคราะห์หาปริมาณของสารเทียบและใช้สารนี้เป็นตัวเปรียบเทียบหลักกับส่วนประกอบอื่น ๆ ในสมุนไพร สำหรับคุณสมบัติที่ดีของสารเทียบ คือเป็นสารที่ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แน่นอน และสารนั้นควรมีความสัมพันธ์กับสรรพคุณของสมุนไพรนั้น ๆ ด้วย (นพมาศและนงลักษณ์, 2551)

ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยมากมายที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ และคัดเลือกสารเทียบในสมุนไพรหรือตำรับยาสมุนไพรโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (Li et al., 2008) โดยดีเทกเตอร์ประเภท ultraviolet-visible เช่น variable-wavelength detectors และ diode array detectors จัดเป็นดีเทกเตอร์สำหรับ HPLC ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าว ได้แก่ การวิเคราะห์เชิงปริมาณของ *Lepidium meyenii* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรของเปรูโดยใช้สารเทียบในกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิด (Ganzera et al., 2002) การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารเทียบในตำรับยา Soshiho-tang ซึ่งใช้โดยแพทย์พื้นบ้านของประเทศเกาหลี (Yang et al., 2012) การตรวจหาและคัดเลือกสารเทียบจากสารสกัดกะทกรก (ดวงกมล, 2551) การวิเคราะห์สารเทียบใน *Ostericum koreanum* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรสำหรับรักษาอาการข้ออักเสบ (arthritis) ของเกาหลีใต้ (Lee et al., 2008) การใช้โครมาโทแกรมของฟลาโวนอยด์เป็นสารเทียบสำหรับระบุชนิดพืชต้นกำเนิดของน้ำผึ้ง European unifloral (Tomas-Barberan et al., 2001) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ตำรับยาเบาหวานโดยใช้สาร curcumin เป็นสารเทียบ (ยุพาภรณ์และคณะ, 2554) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยใช้สารเทียบบางชนิดในกลุ่มแลคโตนสำหรับใช้การควบคุมคุณภาพฟ้าทะลายโจร (Pholpana et al., 2004) และการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารสำคัญบางชนิดในสารสกัดเอทานอลของตำรับยาเบญจกุล (Itharat and Sakpakdeejaroen, 2010) จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเทคนิค HPLC-UV เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารสำคัญในพืชสมุนไพร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่เลือกใช้เทคนิค HPLC มาวิเคราะห์หาปริมาณสารและคัดเลือกสารเทียบในสารสกัดเอทานอลของชะเอมไทย

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำคัดกรองสารองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ดีที่สุด จากสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอมจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างที่ได้จากร้านขายยาแผนโบราณจำนวน 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 2 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็นสารเทียบของสารสกัดชะเอมไทยโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณสารลูปินิโฟลินและฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของสารสกัดหยาบเอทานอลของชะเอม 3 ตัวอย่างที่ศึกษา มีความสัมพันธ์ในเชิงบวก โดยปริมาณสารลูปินิโฟลินต่อน้ำหนัก 1 กรัมของสารสกัด JB01 JB02 และ JB03 เท่ากับ 93.85 57.81 และ 0.04 mg ตามลำดับ และมีค่า MIC ต่อเชื้อ *S. mutans* เท่ากับ 3.9

31.25 และ 500 μg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารลูปินิโฟลินมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 และเชื้อ *S. mutans* สายพันธุ์อื่นที่แยกได้จากรอยโรคฟันผุอีก 10 ชนิด ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานคลอเฮกซิดีน (chlorhexidine) ที่ใช้ควบคุมคราบจุลินทรีย์ (Joycharat et al., 2013) ดังนั้นสารลูปินิโฟลินจึงอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารเทียบเพื่อการควบคุมคุณภาพของสารสกัดชะเอมไทย ซึ่งจะบ่งชี้ถึงคุณภาพของชะเอมไทยที่จะนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร (herbal medicinal products) ในการรักษาโรคในช่องปากได้ ทั้งนี้สารสกัด JB01 เป็นเครื่องยาที่ได้มาจากร้านขายยาแผนโบราณ และการพิสูจน์เอกลักษณ์ทำได้ค่อนข้างยาก โดยในงานวิจัยนี้ใช้เพียงการตรวจทางเภสัชเวชเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อจากกล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานวิจัยที่ผ่านมาของชะเอมไทย ทั้งนี้การพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่าง JB01 ยังต้องการการยืนยันโดยใช้เทคนิคอื่น ๆ เช่น โครมาโทกราฟี ร่วมด้วย การศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มความหลากหลายและจำนวนตัวอย่างของชะเอมไทยที่ใช้ในการศึกษาให้มากขึ้น โดยเก็บตัวอย่างพืชที่ศึกษาทั้งหมดจากแหล่งธรรมชาติ ทั้งในส่วนใบ ดอก และผล เนื่องจากโครงสร้างเหล่านี้เป็นหลักฐานสำคัญในการตรวจระบุชนิดพืช รวมทั้งศึกษาพัฒนาต่อไปถึงสภาวะของระบบ HPLC ที่เหมาะสมมากขึ้น น่าจะเป็นหลักฐานเชิงวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของชะเอมไทย นอกจากนี้การศึกษาต่อไปในการเปรียบเทียบปริมาณสารลูปินิโฟลินและฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* ของพืชในกลุ่มชะเอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดที่เคยมีรายงานพบสารลูปินิโฟลินเหมือนกับชะเอมไทย จึงน่าจะเป็นแนวทางในการคัดกรองพืชวัตถุดิบในกลุ่มชะเอมที่มีคุณภาพดีที่สุดเพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาโรคในช่องปากได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ TTM560753S และขอขอบคุณนางสาวสุจรรยา จิตรหลัง สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC

เอกสารอ้างอิง

ชยันต์ พิเชียรสุนทร และวิเชียร จีรวงศ์. (2556). คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย เล่ม 1: น้ำกระสายยา. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง. หน้า 32-35.

ดวงกมล ภูมิราช. (2551). การตรวจหาและคัดเลือกสารเครื่องหมายจากสารสกัดกะทกรกด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลคิวิด โครมาโทกราฟีและการทดสอบการจับกับตัวรับและตัวขนส่งโดปามีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: 107 หน้า.

เต็ม สมิตินันทน์. (2523). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย: ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง. กรุงเทพฯ: ฟันนี่พับลิชชิ่ง. หน้า 184.

ทศพร แสงสว่าง และสุพัตรา ดวงเดือน. (2555). ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช. แหล่งข้อมูล: http://dongsuta.wikispaces.com/ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช. ค้นเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์ 2557.

ธนภัทร ทรงศักดิ์. (2537). พฤกษเคมีของเปลือกเถาและลักษณะทางเภสัชเวทของชะเอมเหนือ. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 267 หน้า.

นันทิยา จ้อยชะรัด และสุรศักดิ์ ลิ้มสุวรรณ. (2556). ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Albizia* . ว. วิทย. มข. 41(3): 542-566.

นพมาศ สุนทราเจริญนนท์ และนงลักษณ์ เรืองวิเศษ. (2551). วิเคราะห์ วิจัย คุณภาพเครื่องยาไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. คอนเซ็พท์ เมดิคัส. หน้า 114.

นพมาศ สุนทราเจริญนนท์ อุทัย โสธนะพันธุ์ และประไพ วงศ์สินคงมั่น. (2551). ทีแอลซี วิธีอย่างง่ายในการวิเคราะห์

คุณภาพเครื่องยาไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. นนทบุรี: มหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมกับกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. สำนักงานส่งเสริมวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม (สสว.). หน้า 128-131.

นฤมล มงคลชัยภักดี และภัสสรา เงินดี. (2529). รายงานผลการวิจัย เรื่องการศึกษาทางเภสัชเวทของสมุนไพรที่ใช้ในยาแผนโบราณ. แหล่งข้อมูล: http://budgetitc.dmsc.moph.go.th/research/show_detail.php?rs_id=415. ค้นเมื่อวันที่ 11 พฤศจิกายน 2556.

ประกอบ อุบลขาว จิตตะเสน เจริญ และจำรูญ วงศ์กระจ่าง. (2547). ศึกษาภูมิปัญญาด้านการใช้สมุนไพรบำบัดโรคด้วยตนเองของหมอชาวบ้าน ในจังหวัดสงขลา. รายงานวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวัฒนธรรมแห่งชาติ กระทรวงวัฒนธรรม. กรุงเทพฯ. 192 หน้า.

ยุพาภรณ์ สำเภาพันธ์ เสาวภาคย์ วชิรวงกวินศ์ และสุรพจน์ วงศ์ใหญ่. (2554). การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารบ่งคุณภาพในตำรับยาไทยรักษาโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงด้วยวิธีรีเวิร์สเฟส เอช พี เอล ซี. ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 23 ณ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน. จัดโดย สภาคณบดีบัณฑิตวิทยาลัยแห่งประเทศไทย (สคบท.) ร่วมกับคณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน, นครราชสีมา. 355-361.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 7-17.

วีณา จิรัจฉริยากุล. (2554). พฤกษเภสัชภัณฑ์ (Phytopharmaceuticals). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 3-7.

สมภพ ประธานธุรารักษ์ และพร้อมจิต ศรลัมพ์. (2547). สมุนไพร: การพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. หน้า 13-30.

สมิตา วิเศษสุทธิชัย สุวภาพ เตชะมหามณีรัตน์ วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ และนพมาศ สุนทรเจริญนนท์. (2548). การพัฒนาเจลสารสกัดชะเอมเหนือเป็นสารต้านเริม. วารสารสมุนไพร. 12(2): 11-22.

สุปรีดา อดุลยานนท์. (2554). การป้องกันโรคฟันผุในเด็กอายุ 9-18 เดือนด้วยการทาฟลูออไรด์วานิชโดยเจ้าหน้าที่สาธารณสุข. แหล่งข้อมูล: http://www2.mtec.or.th/th/search_sys/search_proj/detail.asp?proj_id=MT-S-43-BMD-12-041-G&lang=1. ค้นเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2556.

สุรางค์ หอมจันทร์. (2528). การศึกษาทางพฤกษเคมีของเปลือกต้นชะเอมป่า. วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ: 68 หน้า.

เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. (2508). ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ: เกษมบรรณกิจ. หน้า 187.

อรสา ดิสถาพร. (2551). การพัฒนาการปลูกและการใช้พืชสมุนไพรจีนในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 10.

Amornchat, C., Kraivaphan, P., Dhanabhumi, C., Tandhachoon, K., Trirattana, T. and Choonhareongdej, S. (2006). Effect of Cha-em Thai mouthwash on salivary levels of mutans streptococci and total IgA. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37(3): 528-531.

Asano, N., Yamauchi, T., Kagamifuchi, K., Shimizu, N., Takahashi, S. and Takatsuka, H. (2005). Iminosugar-production Thai medicinal plant. J Nat prod. 68: 1238-1242.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard, CLSI Document M07-A8. 8th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Ganzera, M., Zhao, J., Muhammad, I. and Kha, I.A. (2002). Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. Chem Pharm Bull. 50(7): 988-991.

Itharat, A. and Sakpakdeejaroen, I. (2010). Determination of cytotoxic compounds of Thai traditional medicine called Benjakul using HPLC. J Med Assoc Thai. 93: S198-203.

Joycharat, N., Limsuwan, S., Subhadhirasakul, S., Voravuthikunchai, S.P., Pratumwan, S., Madahin, I., Nuankaew, W. and Promsawat, A. (2012). Anti-*Streptococcus mutans* efficacy of Thai herbal formula used as a remedy for dental caries. Pharm Biol. 50(8): 941-947.

Joycharat, N., Thammavong, S., Limsuwan, S., Homlaead, S., Voravuthikunchai. S.P., Yingyongnarongkul, B., Dej-adisai, S. and Subhadhirasakul, S. (2013). Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. Arch Pharm Res. 36(6): 723-730.

Lee, M.K., Ling, J.H., Chun, M.H., Jeong, J.H., Na, Y.C., Lee, K.W., Jung, J.H. and Hong J. (2008). Simultaneous determination of biological marker compounds in *Ostericum koreanum* by HPLC method and discrimination by principal component analysis. Bull Korean Chem Soc. 29(12): 2465-2470.

Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C.L. and Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. Chinese Medicine. 3: 7.

Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., Lihkitwitayawuid, K., Lin, L., Cordell, G.A. (1997). Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. Phytochemistry. 45(4): 825-829.

Miyase, T., Melek, F.R., Ghaly, N.S., Warashina, T., El-Kady, M. and Nabil, M. (2010). Echinocystic acid 3, 16-O-bisglycosides from *Albizia procera*. Phytochemistry. 71(11-12): 1375-1380.

Morikawa, T., Miyake, S., Miki, Y., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., and Muraoka, O. (2011). Quantitative analysis of acylated oleanane-type triterpene saponins, chakasaponins I–III and floratheasaponins A–F, in the flower buds of *Camellia sinensis* from different regional origins. J Nat Med. 66(4): 608-613.

Neamsuvan, O., Tuwaemaengae, T., Bensulong, F., Asae, A. and Mosamae, K. (2012). A survey of folk remedies for gastrointestinal tract diseases from Thailand's three southern border provinces. J Ethnopharmacol. 144: 11-21.

Pholphana, N., Rangkadilok, N., Thongnest, S., Ruchirawat, S., Ruchirawat, M. and Satayavivad, J. (2004). Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. Phytochem Anal. 15(6): 365-371.

Rasila, D. M., Bawari, M. and Bushan P.S. (2013). Neurotoxic effect of *Albizia myriophylla* Benth. a medicinal plant in male mice. Int J Pharm Sci. 3: 243-248.

Rukayadi, Y., Shim, J.S. and Hwang, J.K. (2008). Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. Mycoses. 51(4): 308-312.

Smitinand, T. and Larsen, K. (1985). Flora of Thailand. Vol. 4 part 2. Bangkok: TISTR Press. pp. 198-200.

Steinrut, L., Itharat, A. and Ruangnoo, S. (2011). Free radical scavenging and lipid peroxidation of Thai medicinal plants used for diabetic treatment. J Med Assoc Thai. 7: 178-182.

Tomas-Barberan, F., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S. and Anklam, Elke. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. J Sci Food Agric. 81: 485-496.

World Health Organization. (2000). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva WHO/EDM/

TRM/ 2000.1. แหล่งข้อมูล: http://www.ncarboretum.org/assets/File/PDFs/Research/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf ค้นเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2554

Xiao, J., Zhou, X.D., Feng, J., Hao Y.Q. and Li, J.Y. (2007). Activity of *Nidus vespae* extract and chemical fractions against *Streptococcus mutans* biofilms. Lett Appl Microbiol. 45(5): 547-552.

Yang, H.J., Ma, J.Y., Weon, J.B., Lee, B. and Ma, C.J. (2012). Qualitative and quantitative simultaneous determination of six marker compounds in Soshiho-tang by HPLC-DAD-ESI-MS. Arch Pharm Res. 35(10): 1785-1791.

❑❑❑❑❑