



รายงานการวิจัย

การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูล
ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

**Evaluation of active compound and cytotoxicity of
Benjakul on cholangiocarcinoma cancer cell lines.**

กัญญารัตน์ เดือนหงายและคณะ
สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2565

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้ง เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

Evaluation of active compound and cytotoxicity of Benjakul on cholangiocarcinoma cancer cell lines.

กัญญารัตน์	เดือนหงาย	สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
อัญชลี	เตชะเสน	กลุ่มงานจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
สุภาพร	วิสูงเร	สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ศุมาลีน	ดีจันทร์	สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
นวรรตน์	มีชัย	สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ผกามาศ	ประระทั้ง	สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
ลักษณ์คณา	กิจจรัส	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ทุนอุดหนุนงานวิจัย พัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2565

(ก)

ชื่องานการวิจัย	การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี Evaluation of active compound and cytotoxicity of Benjakul on cholangiocarcinoma cancer cell lines.
ผู้วิจัย	ดร.กัญญารัตน์ เตือนหงาย
ผู้ร่วมวิจัย/ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.อัญชลี เตชะเสน, ผศ.สุภาพร วิสูงเร, ศุมาลิณ ดีจันทร์, นวรัตน์ มีชัย ผกามาศ ประระทั้ง, ลักษณ์คณา กิจจรัส
สาขาวิชา	การแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ 2565

บทคัดย่อ

เบญจกูล พิกัดยาไทย ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ดิปลี รากข้าวพุด เกาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง และขิง ในทางการแพทย์แผนไทย ใช้ยาในการทำให้อหังค์ประกอบหลักทั้งห้าอยู่ในสภาวะสมดุล และควบคุมการทำงานทางสรีรวิทยาภายในร่างกายมนุษย์ เพื่อคืนความสมดุล การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารสำคัญจากตำรับยาเบญจกูลโดยการสกัดสารสำคัญซึ่งใช้วิธีทางเคมี (Ethanollic Extract) และนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ผลการวิจัยพบว่าเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับได้แก่ ขิง รากเจตมูลเพลิงแดง ผลดิปลี ตำรับยาเบญจกูล รากข้าวพุด และเกาสะค้าน ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลที่เวลา 48 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 89.94 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ร้อยละ 50 และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 80.16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ การทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค Flow cytometry พบว่าเซลล์มะเร็งมีอัตราการตายแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay) พบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัด 200 μM ที่ 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นและกลุ่มควบคุม

คำสำคัญ : สารสำคัญ, ตำรับยาเบญจกูล, ฤทธิ์ยับยั้ง, มะเร็งท่อน้ำดี

Title Evaluation of active compound and cytotoxicity of Benjakul on cholangiocarcinoma cancer cell lines..

Author Dr. Kunyarat Duenngai

Co-author Asst. Prof. Dr. Anchalee Techasen, Asst. Prof. Supaporn Wisungre, Sumalin Deejun, Nawarat Meechai, Phakamas Paratung. Luckana Kitjaras

Abstract

Benjakul, a traditional Thai medicine, is composed of five plants: *Piper chaba* fruit, *Piper sarmentosum* root, *Piper interruptum* stem, *Plumbago indica* root, and *Zingiber officinale* rhizome. It has been used since ancient time to keep balance of physiological function of the human body which is the key to long life free from disease. This study aims to investigate the activity of extracts from Benjakul medicinal formula in inhibiting cholangiocarcinoma cells. The findings demonstrated that when cytotoxicity in cholangiocarcinoma cell cultures was tested, it was discovered that the percentage of cholangiocarcinoma cell viability. These include *Zingiber officinale* rhizome, *Piper sarmentosum* root, *Piper chaba* fruit, Benjakul remedy, *Plumbago indica* root, and *Piper interruptum* stem, in that sequence. Furthermore, the concentration of Benjakul extract inhibited cholangiocarcinoma cells by IC₅₀ at 48 hours at 89.94 g/mL, and at a concentration of 80.16 g/mL at 72 hours. According to the flow cytometry apoptosis test of cholangiocarcinoma cells, there was difference in mortality between the cholangiocarcinoma cells and the control group. Additionally, the wound healing assay on cholangiocarcinoma cells indicated that the extract concentration of 200 µM at 24 hours can suppress cancer cell motility the best compared to other concentrations and the control group.

Keywords: Active compound, Benjakul, Cytotoxicity, Cholangiocarcinoma cancer

(ก)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อ
น้ำดี ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนงานวิจัย พัฒนาวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ผ่านสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ รหัสโครงการ ๖๕A๑๔๕๐๐๐๐๐๓ ประจำปี
งบประมาณ 2565

โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกลุ่มวิชาจุลชีววิทยา
คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการ
ทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ สำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้

กัญญารัตน์ เดือนหงายและคณะ

1 ธันวาคม 2565

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่ออังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานงานวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	4
1.6 นิยามศัพท์.....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ความหมายและความเป็นมา.....	6
2.2 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี.....	7
2.3 การวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี.....	11
2.4 การรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี.....	16
2.5 ตำรับยาเบญจกูล.....	18
2.6 ข้อมูลสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยาเบญจกูล.....	19
2.7 การเลือกตัวทำละลาย	37

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
	2.8 หลักการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	39
	2.9 การทำให้สารสกัดจากตัวอย่างให้เข้มข้น (preconcentration).....	41
	2.10 เครื่อง Flow cytometry.....	42
	2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	43
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย.....	53
	3.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาเบญจกูล	54
	3.2 การระเหยตัวทำละลาย.....	57
	3.3 การระเหยแห้ง (Freeze dry).....	58
	3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ท่อน้ำดี	59
	3.5 การทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้ เทคนิค Flow cytometry	60
	3.6 ศึกษาผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay)	61
บทที่ 4	ผลการวิจัย.....	63
	4.1 สารสกัดหยาบจากสมุนไพรตำรับยาเบญจกูล.....	63
	4.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี.....	64
	4.3 การทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้ เทคนิค Flow cytometry	67
	4.4 ผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay)	68

(น)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5	
สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	70
อภิปรายผลการศึกษา.....	70
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป.....	73
บรรณานุกรม	74
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก (รูปภาพประกอบการดำเนินงานวิจัย)	81
ภาคผนวก ข (หลักฐานการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์)	92
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	95

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 คำรับเบญจกุลประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด แสดงชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และวงศ์	18
2-2 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของคิปลิ.....	20
2-3 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของข้าวปลู.....	25
2-4 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของสะก้าน.....	27
2-5 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของเจตมูลเพลิงแดง.....	30
2-6 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของเหง้าชิง.....	33
2-7 คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร.....	39
2-8 รายชื่ออนุพันธ์ของพืชที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง.....	44
4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัด หยาบจากสมุนไพร 5 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของคำรับยาเบญจกุล	64

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2-1 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ทั่วโลก	8
2-2 อุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ประเทศไทย	9
2-3 อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย (เพศชาย).....	10
2-4 อุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย (เพศหญิง).....	10
2-5 ลักษณะของดีป्ली.....	19
2-6 ลักษณะของซ้ำพลู.....	24
2-7 ลักษณะของเถาสะค้าน.....	26
2-8 ลักษณะของรากเจตมูลเพลิงแดง.....	29
2-9 ลักษณะของเหง้าขิงแห้ง.....	32
3-1 สมุนไพรในตำรับยาเบญจกูล หลังจากอบแห้ง ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ a) ผลดีป्ली b) รากซ้ำพลู c) เถาสะค้าน d) รากเจตมูลเพลิงแดง และ e) เหง้า ขิงแห้ง	54
3-2 การบดสมุนไพรโดยใช้เครื่องบดสมุนไพรแบบละเอียด.....	56
3-3 การกรองสารสกัดสมุนไพรโดยกรองผ่านผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman No.1	57
3-4 การระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศ (Rotary evaporator)	57
3-5 การระเหยแห้งสารสกัดโดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Freeze dryer)	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
3-6	ซั่งน้ำหนักสารที่ได้แต่ละชนิดเพื่อกำนวณปริมาณสารสกัดเป็นร้อยละของ..... น้ำหนักแห้งของผงยาที่ซั่งเมื่อเริ่มต้น	59
3-7	ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี.....	60
3-8	ทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis..... โดยใช้เทคนิค Flow cytometry	61
4-1	เทคนิค MTT assay ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อ..... เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง : (A) K KU-213B (B) K KU- 100	65
4-2	ความสามารถของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง ท่อน้ำดีโคลน K KU-213B และ K KU-100 ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง	66
4-3	ฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis.... ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213B ภายใน 48 ชั่วโมง	67
4-4	ฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis.... ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-100 ภายใน 48 ชั่วโมง	68
4-5	ฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการทดสอบการเคลื่อนที่ของ..... เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด K KU-213B และ K KU-100 ภายใน 24 ชั่วโมง	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงที่เกิดขึ้นในระบบท่อน้ำดีภายในตับ พบมากที่สุดเป็นอันดับสองของมะเร็งตับ พบว่ามีผู้ป่วยด้วยมะเร็งชนิดนี้ถึงร้อยละ 30 ของมะเร็งตับทั่วโลก มะเร็งท่อน้ำดีได้รับการขนานนามว่าเป็น "ฆาตรกรเงียบ" เนื่องจากช่วงระยะเวลาช่วงแรกของการเกิดโรคนั้น ผู้ป่วยมีการดำเนินชีวิตปกติเหมือนคนทั่วไป เนื่องจากตัวผู้ป่วยไม่พบความผิดปกติเกิดขึ้นแก่ร่างกาย แต่มะเร็งยังคงเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไป และจะแสดงอาการก็ต่อเมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของมะเร็งท่อน้ำดี ทำให้การรักษาให้หาย เป็นไปได้ยาก และร้อยละของการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีอัตราที่ต่ำ [1] อาการที่เกิดกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จะมีอาการ ปวดท้อง ตัวเหลืองตาเหลือง หรือคัน น้ำหนักลด มีอาการคันทั่วไป มีไข้ และมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น คือสีของอุจจาระหรือปัสสาวะจะมีสีซีด มะเร็งที่เกิดจากเยื่อหุ้มของท่อน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับ ถูกแบ่งโดยยึดตำแหน่งทางกายวิภาคศาสตร์มะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับ (intrahepatic cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic cholangiocarcinoma) ซึ่งยังถูกแบ่งออกเป็นส่วนที่อยู่ระดับขั้วตับ (hilar) ส่วนกลางท่อน้ำดี (middle) และท่อน้ำดีส่วนล่าง (distal common bile duct) การรักษา มะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับค่อนข้างจะตรงไปตรงมา คือการผ่าตัดเอามะเร็งและเนื้อตับออกเท่านั้น การแยกชนิดของมะเร็งท่อน้ำดี มีความสำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยาและพื้นฐานทางด้านคลินิก [2]

อุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีทั่วโลกนั้น มีความแตกต่างกันอย่างมากในแต่ละภูมิภาคซึ่งพบว่าภูมิภาคที่มีอุบัติการณ์มากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยซึ่งมีรายงานอุบัติการณ์สูงสุดคือผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีจำนวนสูงถึง 115 คนต่อประชากร 100,000 คนในเพศชาย [3] ส่วนข้อมูลทางด้านภูมิศาสตร์พบว่ามะเร็งท่อน้ำดีที่มีอุบัติการณ์สูงสัมพันธ์กับการติดพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงปัจจัยเสี่ยงของโรคมะเร็งท่อน้ำดี มีหลายปัจจัยแต่ที่ชี้ให้เห็นบ่อยครั้งคือการติดพยาธิใบไม้ตับ ชนิด *Opisthorchis viverrini* และ

Clonorchis sinensis ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญและมีบทบาทต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีในเอเชีย โดยเฉพาะในประเทศไทย นอกจากการติดพยาธิใบไม้ตับที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ยังรวมถึง ท่อน้ำดีอักเสบและเกิดการแข็งตัว (sclerosing cholangitis) ถุงน้ำในทางเดินน้ำดีท่อน้ำดี, นิ่วในตับ (hepatolithiasis) และสารพิษต่างๆ นอกจากนี้ปัจจัยเสี่ยงอื่นที่มีรายงานการศึกษา รวมไปถึง กลุ่มโรคที่มีการอักเสบของระบบทางเดินอาหาร (Inflammatory bowel disease, IBD) ไวรัสตับอักเสบ ซี (Hepatitis C virus, HCV), ไวรัสตับอักเสบ บี (Hepatitis B virus, HBV), ตับแข็ง เบาหวาน โรคอ้วน การดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และประวัติบุคคลในครอบครัวเสียชีวิตจากการเป็นโรคมะเร็งอีกด้วย [4,5]

ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) สูงเป็นอันดับหนึ่งของโลก และมะเร็งชนิดนี้เป็นสาเหตุการตายอันดับต้นของคนไทย จากงานวิจัยพบว่ามีผู้เป็นมะเร็งชนิดนี้สูงถึงแปดล้านคน ปัจจุบันการรักษาโดยใช้สมุนไพรนอกจากจะให้ผลในการรักษาที่ดีแล้ว ผลข้างเคียงหรืออันตรายที่จะเกิดจากการใช้สมุนไพรนั้นมีน้อยกว่า ทำให้ปลอดภัยต่อสุขภาพผู้ใช้ การใช้ยาเบญจกูลเป็นตำรับยาที่ใช้กันมาเป็นระยะเวลายาวนาน เป็นยาที่อยู่ในตำรับการรักษาของแพทยศาสตร์สงเคราะห์ และอยู่ในตำรับยาแพทย์แผนไทย การใช้ตำรับยาเบญจกูลมีข้อดีคือไม่พบการเกิดพิษต่อการทำงานของระบบตับและไต หมอพื้นบ้านภาคใต้ นิยมใช้ตำรับยาเบญจกูลเป็นยาปรับธาตุให้กับผู้ป่วยมะเร็งก่อนจะทำการรักษา แต่ยังไม่มีความรู้ข้อมูลการศึกษาตำรับยาเบญจกูลในการยังยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งทำให้ผู้วิจัยจึงสนใจที่นำตำรับยาเบญจกูล มาทำการศึกษาสารสำคัญ โดยการสกัดสารสำคัญซึ่งใช้วิธีทางเคมี (Ethanol Extract) และนำมาวิเคราะห์สารสำคัญโดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง รวมถึงสามารถทราบคุณสมบัติของสารสำคัญทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การนำตำรับยานี้มาพัฒนาต่อยอดเพื่อแก้ปัญหาระยะโรคที่เป็นปัญหา 1 ใน 3 ของประเทศคือโรคมะเร็ง และสามารถนำงานวิจัยนี้ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต ซึ่งการศึกษานี้เป็นแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถเชื่อมโยงกับนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาด้านการแพทย์แผนไทย ด้านเภสัชกรรม ด้านการแพทย์ ตลอดจนโรงพยาบาลและศูนย์วิจัยมะเร็ง ดังนั้นการผลิตยาตำรับไทยที่ได้จากสมุนไพร

ธรรมชาติ นอกจากลดความเสี่ยงหรืออันตรายที่จะเกิดขึ้นจากสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อผลิตยา รักษาแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยมะเร็งได้อย่างมาก เนื่องจากสมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตตำรับยาเบญจกูลมีราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับยาที่ผลิตขึ้นเพื่อรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกจากประโยชน์ด้านการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ยังสามารถส่งเสริมเกษตรกรที่ปลูก สมุนไพรให้มีรายได้เพิ่มขึ้นและเป็นการประกอบอาชีพที่ยั่งยืน จะเห็นได้ว่า งานวิจัยนี้สามารถต่อ ยอดได้หลายด้าน เช่น ด้านสาธารณสุข เกษตรกรรม เกษตรกรรม รวมถึงด้านอุตสาหกรรมการผลิต ยาอีกด้วย และสามารถสร้างความร่วมมือกับผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ เพื่อวิเคราะห์สารสำคัญในเชิง ลึก ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาสู่เป้าหมายเซลล์มะเร็งอย่างตรงจุด ดังนั้นการศึกษานี้เป็น การหาแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจาก สารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยวิเคราะห์ความเป็นพิษ ของตำรับยาเบญจกูลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เมื่อใช้ตำรับยาเบญจกูล

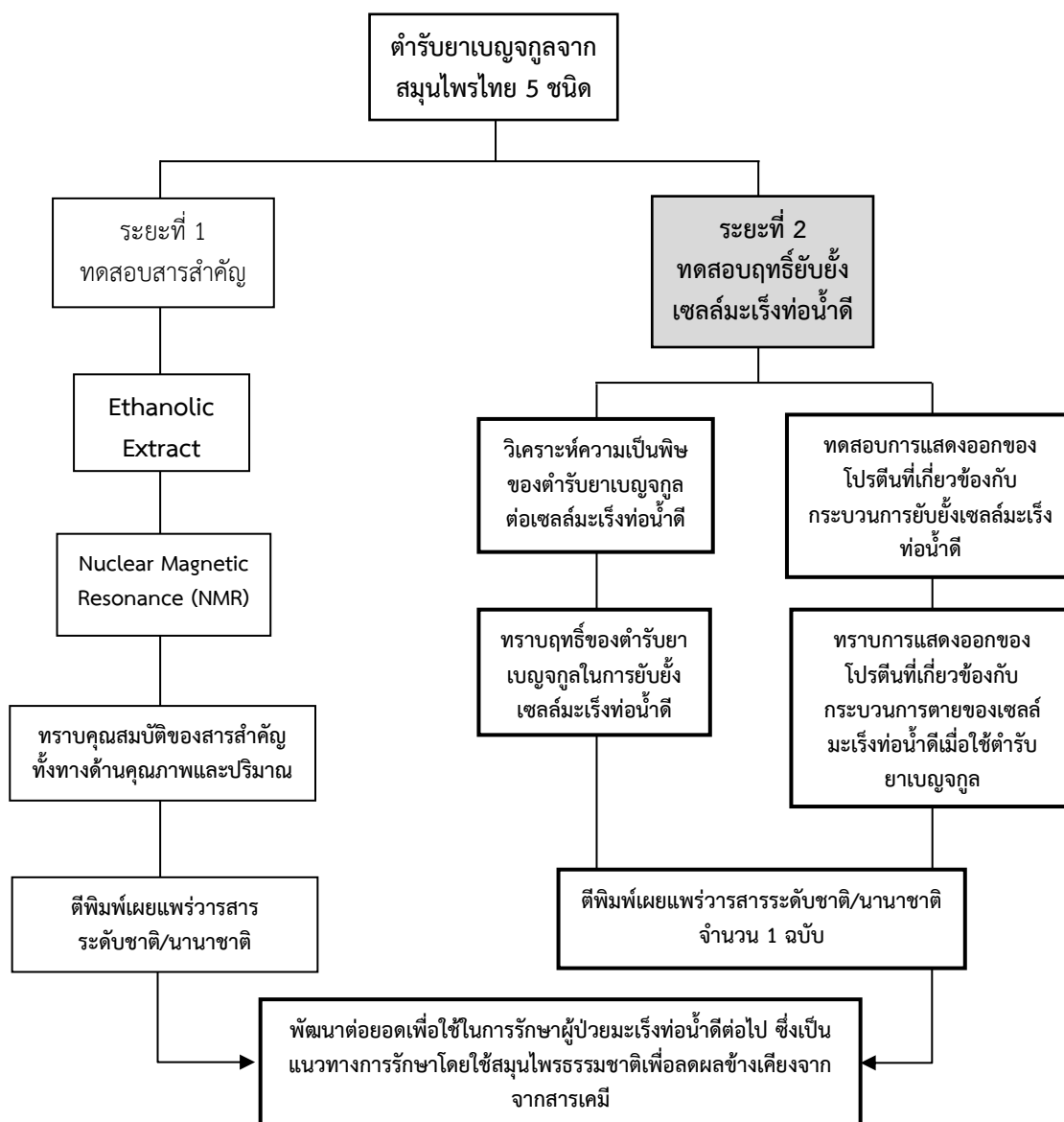
1.3 สมมติฐานงานวิจัย

ตำรับยาเบญจกูลมีสารสำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้ อาศัยห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ในการสกัดสารสำคัญ และใช้ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เพื่อทดสอบฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูล รวมถึงการหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1.5 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



1.6 นิยามศัพท์

1.6.1 สารสำคัญ หมายถึง ส่วนที่มีลักษณะทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์ในพืชที่ไม่สามารถแยกออกอย่างชัดเจนทางสัณฐานวิทยา หรืออีกนัยหนึ่งคือเอกลักษณ์ทางเคมีขององค์ประกอบของสารทุติยภูมิที่แตกต่างกันในพืช

1.6.2 ตำรับยาเบญจกูล หมายถึง พืชเบญจกูล เป็นตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ควบคุมธาตุทั้ง 4 และอากาศธาตุของมนุษย์ให้คงอยู่ในภาวะสมดุล ถือเป็นตำรับใหญ่ที่แพทย์แผนโบราณให้

ความสำคัญและจำเป็นต้องรู้ ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด คือ ดีปลี รากข้าวพุด เกาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง และขิงแห้ง

1.6.3 การยับยั้ง หมายถึง การต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

1.6.4 เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี หมายถึง เซลล์มะเร็งที่เกิดในท่อน้ำดี โดยมะเร็งท่อน้ำดี คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดี ซึ่งรวมถึงท่อน้ำดี ภายในและภายนอกตับ แต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดี แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สาเหตุของมะเร็งชนิดนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการรับประทานปลาน้ำจืดที่มีเกล็ดแบบดิบๆ ซึ่งจะทำให้ได้รับตัวอ่อนของพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งจะเจริญเติบโตอยู่ในท่อน้ำดีและพบว่ารับประทานอาหารหมักดองของชาวอีสาน เช่น ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม รวมทั้งปลาสามชั่ง มีสารไนโตรซามีน จะเร่งให้เกิดมะเร็งได้เร็วขึ้น

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบความเป็นพิษของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และทราบผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่เมื่อใช้ตำรับยาเบญจกูลนำไปสู่การวิจัยต่อยอดเพื่อการแก้ปัญหาภาระโรคที่เป็นปัญหา 1 ใน 3 ของประเทศ คือ โรคมะเร็ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายและความเป็นมา

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงที่เกิดขึ้นในระบบท่อน้ำดีในตับ น้ำดีภายในตับ พบมากที่สุดเป็นอันดับสองของมะเร็งตับ พบว่ามีผู้ป่วยด้วยมะเร็งชนิดนี้ถึงร้อยละ 30 ของมะเร็งตับทั่วโลก มะเร็งท่อน้ำดีได้รับการขนานนามว่าเป็น "ฆาตกรเงียบ" เนื่องจากช่วงระยะเวลาช่วงแรกของการเกิดโรคนั้น ผู้ป่วยมีการดำเนินชีวิตปกติเหมือนคนทั่วไป เนื่องจากตัวผู้ป่วยไม่พบความผิดปกติเกิดขึ้นแก่ร่างกาย แต่มะเร็งยังคงเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไป และจะแสดงอาการก็ต่อเมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของมะเร็งท่อน้ำดี ทำให้การรักษาให้หายเป็นไปได้ยาก และร้อยละของการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจึงมีอัตราที่ต่ำ อาการที่เกิดกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี จะมีอาการ ปวดท้อง ตัวเหลืองตาเหลือง หรือคัน น้ำหนักลด มีอาการคันทั่วไป มีไข้ และมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น คือสีของอุจจาระหรือปัสสาวะจะมีสีซีด มะเร็งที่เกิดจากเยื่อหุ้มของท่อน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับ ถูกแบ่งโดยยึดตำแหน่งทางกายวิภาคศาสตร์มะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับ (intrahepatic cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic cholangio-carcinoma) ซึ่งยังถูกแบ่งออกเป็น ส่วนที่อยู่ระดับขั้วตับ (hilar) ส่วนกลางท่อน้ำดี (middle) และท่อน้ำดีส่วนล่าง (distal common bile duct) การรักษามะเร็งท่อน้ำดีในเนื้อตับค่อนข้างจะตรงไปตรงมา คือการผ่าตัดเอามะเร็งและเนื้อตับออกเท่านั้น การแยกชนิดของมะเร็งท่อน้ำดี มีความสำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยาและพื้นฐานทางด้านคลินิก ประเทศไทยมีอุบัติการณ์ การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma, CCA) สูงเป็นอันดับหนึ่งของโลก และมะเร็งชนิดนี้เป็นสาเหตุการตายอันดับต้นของคนไทย จากงานวิจัยพบว่ามีผู้เป็นมะเร็งชนิดนี้สูงถึงแปดล้านคน

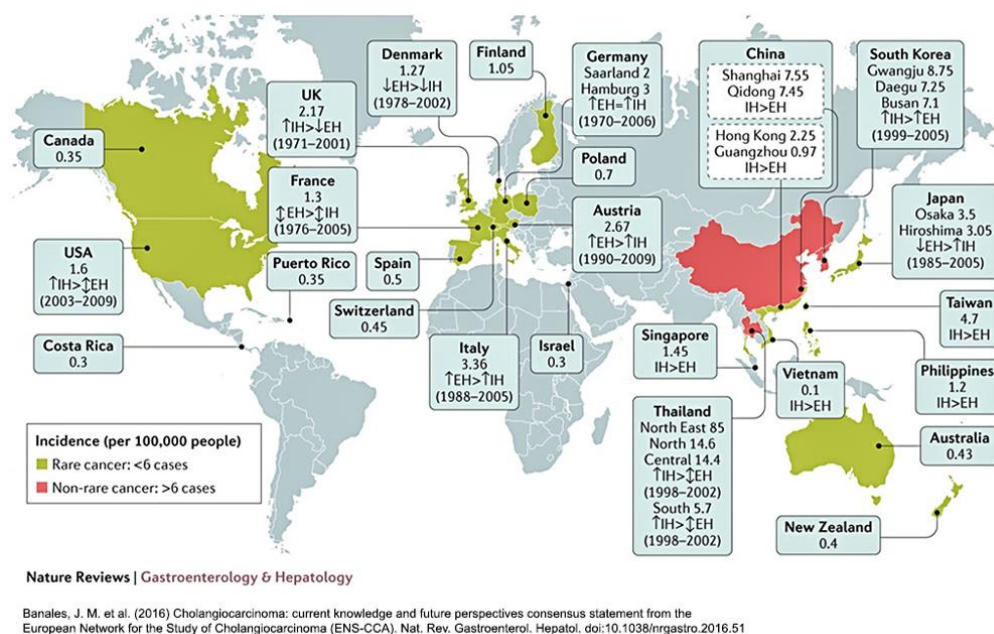
ปัจจุบันการรักษาโรคต่างๆ โดยใช้สมุนไพรนอกจากจะให้ผลในการรักษาที่ดีแล้ว ผลข้างเคียงหรืออันตรายที่จะเกิดจากการใช้สมุนไพรนั้นมีน้อยกว่า ทำให้ปลอดภัยต่อสุขภาพผู้ใช้ การใช้ยาเบญจกูลเป็นตำรับยาที่ใช้กันมาเป็นระยะเวลายาวนาน เป็นยาที่อยู่ในตำรับการรักษาของแพทย์ศาสตร์สงเคราะห์ และอยู่ในตำรับยาแพทย์แผนไทย การใช้ตำรับยาเบญจกูลมีข้อดีคือไม่พบการเกิดพิษต่อการทำงานของระบบตับและไต หมอพื้นบ้านภาคใต้ นิยมใช้ตำรับยาเบญจกูลเป็นยาปรับธาตุให้กับผู้ป่วยมะเร็งก่อนจะ

ทำการรักษา แต่ยังไม่มีการศึกษาการรับประทานเบญจกูลในการยังยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งทำให้ผู้วิจัยจึงสนใจที่นำมารับยาเบญจกูล มาทำการศึกษาค้นคว้าสำคัญโดยการสกัดสารสำคัญซึ่งใช้วิธีทางเคมี (Ethanollic Extract) และนำมาวิเคราะห์สารสำคัญโดยใช้เทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำสูง รวมถึงสามารถทราบคุณสมบัติของสารสำคัญทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การนำมารับยานี้มาพัฒนาต่อยอดเพื่อแก้ปัญหาการะโรคที่เป็นปัญหา 1 ใน 3 ของประเทศคือโรคมะเร็ง และสามารถนำงานวิจัยนี้ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต ซึ่ง การศึกษานี้เป็นแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถเชื่อมโยงกับนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญในสาขาวิชาด้านการแพทย์แผนไทย ด้านเภสัชกรรม ด้านการแพทย์ ตลอดจนโรงพยาบาลและศูนย์วิจัยมะเร็ง ดังนั้นการผลิตยาตำรับไทยที่ได้จากสมุนไพรธรรมชาติ นอกจากลดความเสี่ยงหรืออันตรายที่จะเกิดขึ้นจากสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อผลิตยารักษาแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยมะเร็งได้อย่างมาก เนื่องจากสมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตตำรับยาเบญจกูลมีราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับยาที่ผลิตขึ้นเพื่อรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกจากนี้ประโยชน์ด้านการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ยังสามารถส่งเสริมเกษตรกรที่ปลูกสมุนไพรให้มีรายได้เพิ่มขึ้นและเป็นการประกอบอาชีพที่ยั่งยืน จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้สามารถต่อยอดได้หลายด้าน เช่น ด้านสาธารณสุข เภสัชกรรม เกษตรกรรม รวมถึงด้านอุตสาหกรรมการผลิตอีกด้วย และสามารถสร้างความร่วมมือกับผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ เพื่อวิเคราะห์สารสำคัญในเชิงลึก ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาสู่เป้าหมายเซลล์มะเร็งอย่างตรงจุด ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการหาแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง

2.2 อับัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

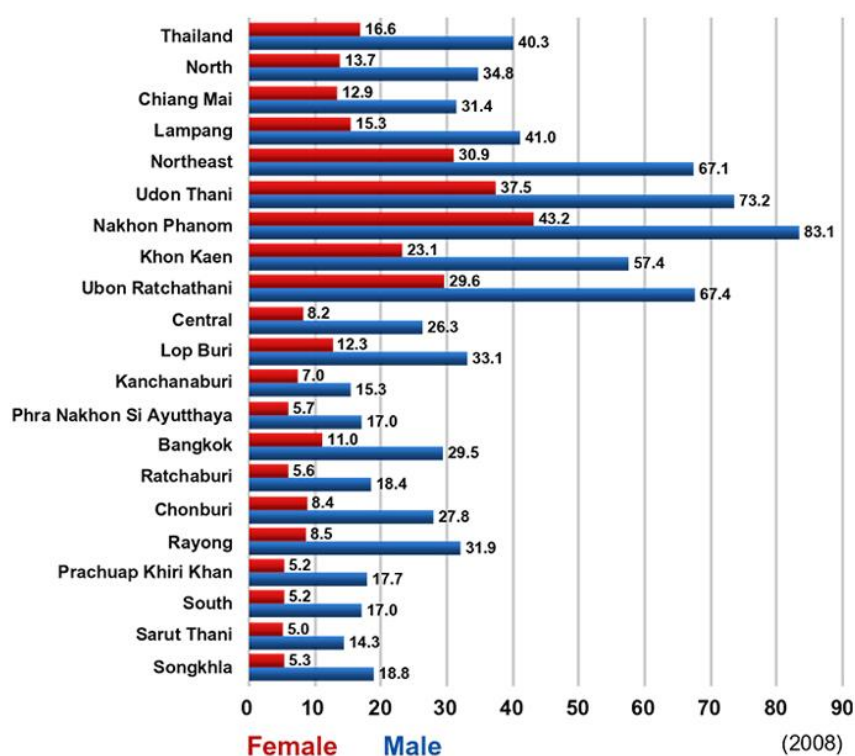
มะเร็งท่อน้ำดีพบว่าสาเหตุเกิดจากการติดพยาธิใบไม้ตับจากการรับประทานปลาดิบ หรือปลาสุก ๆ ดิบ ๆ โดยมะเร็งชนิดนี้มีความชุกของการเกิดโรคสูงในประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอับัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในโลก (รูปที่ 2-1) การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับจะเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังซึ่งจะนำไปสู่การเกิดความเสียหายแก่ดีเอ็นเอของเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

น้ำดีที่ติดเชื้อ จากนั้นจึงกลายเป็นมะเร็ง ดังนั้นการกำจัดพยาธิและการตรวจกรองประชากรกลุ่มเสี่ยงจึงเป็นเรื่องที่สำคัญมาก



รูปที่ 2-1 แสดงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ทั่วโลก (ที่มา: Banales, J.M. et al., 2016)

ประเทศไทยมีความผันแปรของการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างกันตามสภาพภูมิประเทศพื้นที่ (รูปที่ 2-2) ที่มีการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่นซึ่งมีรายงานอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงที่สุดในโลก อัตราการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งท่อน้ำดี สูงสุดพบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีประมาณ 70% ของมะเร็งที่เกิดขึ้นที่ตับและเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ในตับสูง และประชากรในพื้นที่นี้ส่วนใหญ่มีฐานะยากจน

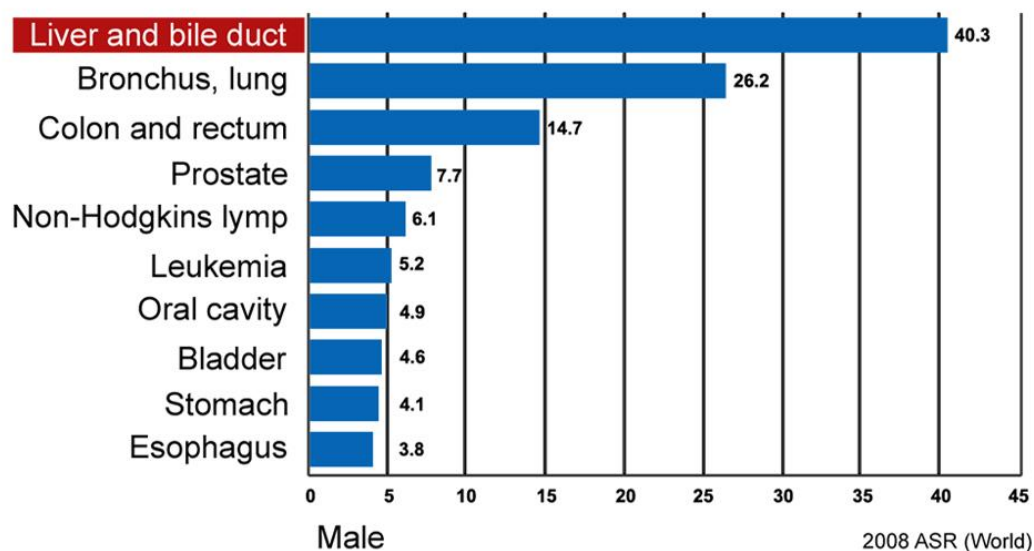


Data was reported by The National Cancer Institute in 2013.

รูปที่ 2.2 แสดงอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งท่อน้ำดี ประเทศไทย

(ที่มา: The National Cancer Institute, 2013)

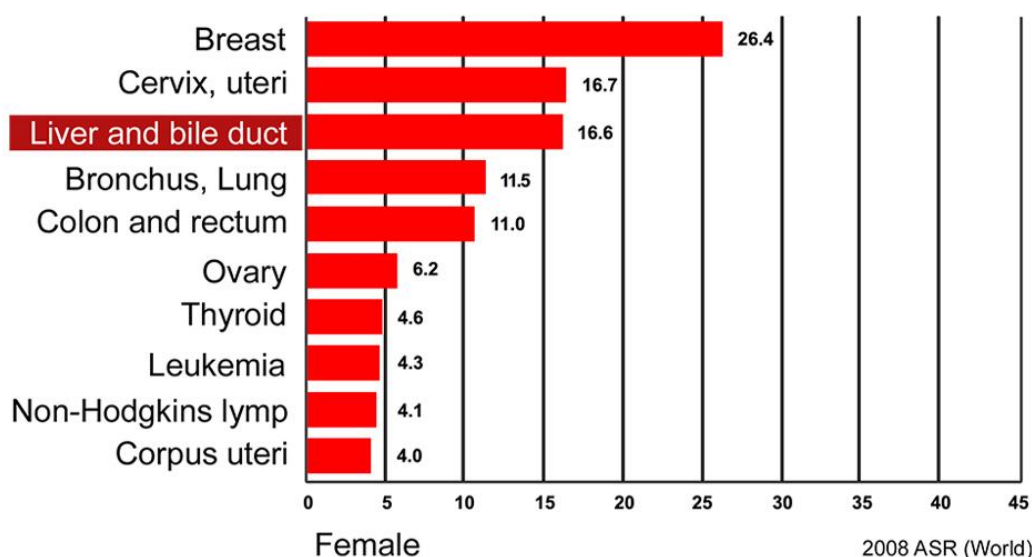
มะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคมะเร็งที่มีการดำเนินโรคไม่ดีและทำให้เกิดการเสียชีวิตในผู้ป่วยสูงมาก มะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดีถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 5 ของโรคที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตมากที่สุดในประเทศไทย จำนวนที่เสียชีวิตจากมะเร็งท่อน้ำดีทั้งเพศชาย (รูปที่ 2-3) และเพศหญิง (รูปที่ 2-4) โดยประมาณอยู่ที่ 14,000 ต่อปี (ข้อมูลในปี 2555) โรคมะเร็งท่อน้ำดียังทำให้เกิดภาวะทุพพลภาพและความสามารถในการใช้ชีวิตประจำวันลดลงอย่างมาก ภาวะทุพพลภาพอันเกิดเนื่องจากโรคมะเร็ง เรียกว่า disability adjusted life year (DALYs) โรคมะเร็งท่อน้ำดีทำให้เกิด DALYs สูงที่สุดในบรรดามะเร็งชนิดอื่น และมีการรายงานในปี 2547 ว่า มี DALYs ในเพศชาย 280,000 และ 124,000 ในเพศหญิง



Data was reported by The National Cancer Institute in 2013.

รูปที่ 2.3 แสดงอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย (เพศชาย)

(ที่มา: The National Cancer Institute, 2013)



Data was reported by The National Cancer Institute in 2013.

รูปที่ 2-4 แสดงอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย (เพศหญิง)

(ที่มา: The National Cancer Institute, 2013)

โรคมะเร็งท่อน้ำดีถือเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก ซึ่งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีอุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดในโลก โรคมะเร็งท่อน้ำดีเป็นโรคที่วินิจฉัยยาก เนื่องจากอาการเริ่มแรกจะมีการคล้ายกับโรคอื่น ซึ่งอาจทำให้วินิจฉัยผิดพลาดได้ จะทราบได้ก็ต่อเมื่อโรคได้ดำเนินมาถึงระยะสุดท้าย ปัจจุบันจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีอัตราการเสียชีวิตสูง จากข้อมูลทางสถิติแสดงให้เห็นว่าอุบัติการณ์ของโรคนี้นับได้สูงในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง แต่โรคนี้นี้ก็มีผลกระทบต่อทั้งประเทศ สถิตินี้เป็นข้อมูลได้มาจากประชากรจริงที่ได้รับผลกระทบจากโรคนี้

2.3 การวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี

ผู้ป่วยโรคมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการจนกว่าจะเดินทางมาพบแพทย์ เนื่องจากท่อน้ำดีเป็นอวัยวะที่อยู่ลึกภายในร่างกาย ดังนั้นมะเร็งที่เกิดขึ้นในระยะแรกๆ มักไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยการตรวจร่างกายทั่วไป และยังไม่มีการตรวจกรองทางเลือดหรือการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ที่น่าเชื่อถือได้ ด้วยเหตุนี้มะเร็งท่อน้ำดีจึงตรวจพบได้ก็ต่อเมื่อมะเร็งมีการเจริญมากพอจนทำให้มีสัญญาณหรืออาการของโรค

แนวทางในการวินิจฉัยโรคมะเร็งท่อน้ำดี มีดังนี้:

2.3.1 การซักประวัติและตรวจร่างกาย:

แพทย์จะทำการซักประวัติทางการแพทย์อย่างละเอียดกับผู้ป่วยที่อาจมีความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีและเฝ้าติดตามอาการ นอกจากนี้ต้องมีการตรวจร่างกายประกอบกันไปด้วย ซึ่งหากผู้ป่วยมีผลของการตรวจร่างกายที่ชี้ว่าอาจจะเป็นมะเร็งท่อน้ำดี แพทย์จะสั่งทำการตรวจอื่นๆ เพิ่มเติม ทั้งการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ, การเอ็กซเรย์ อัลตราซาวด์และการตรวจอื่น ๆ

2.3.2 การตรวจเลือด:

2.3.2.1 การตรวจการทำงานของตับและถุงน้ำดี:

แพทย์อาจจะสั่งให้ทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาค่าบิลิรูบินในเลือด, ตรวจหาโปรตีนอัลบูมิน, ตรวจหาค่าเอนไซม์ในตับ รวมทั้งสารอื่นๆ ในเลือด ซึ่งการ

ทดสอบเหล่านี้สามารถบอกการเกิดโรคของท่อน้ำดี, ถุงน้ำดี หรือตับ ซึ่งหากตรวจพบว่าปริมาณสารต่างๆเหล่านี้มีค่าอยู่ในระดับที่สูงกว่าปกติ ก็แสดงว่าน่าจะมีการอุดตันของท่อน้ำดี แต่ไม่สามารถบอกสาเหตุของการอุดตันว่าเกิดจากมะเร็งหรือสาเหตุอื่นๆ

2.3.2.2 ตัวบ่งชี้มะเร็ง

ตัวบ่งชี้มะเร็งคือ สารที่สร้างจากเซลล์มะเร็งซึ่งบางครั้งสามารถตรวจพบได้ในเลือด ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มักพบว่ามียกระดับของสาร CEA และ CA-19-9 ในเลือดสูงขึ้น การมีสารเหล่านี้ในระดับสูงบ่งบอกว่ามีมะเร็งเกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งการทดสอบนี้มีประโยชน์สำหรับผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งถ้าหากพบว่ามียาเหล่านี้ในระดับสูงผู้ที่ที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดี ก็สามารถใช้ประโยชน์จากสารนี้เพื่อเป็นตัวติดตามอาการและผลการรักษาในผู้ป่วยได้

2.3.3 การตรวจด้วยการถ่ายภาพ

2.3.3.1 การอัลตราซาวด์ช่องท้อง (Abdominal ultrasound)

วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความเจ็บปวดน้อยที่สุด ซึ่งการตรวจโดยวิธีไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนพิเศษ ซึ่งจะให้ผลชัดเจนในผู้ที่รับประทานอาหารมาแล้วอย่างน้อย 6 ชั่วโมง การอัลตราซาวด์ช่องท้องมักใช้เป็นวิธีแรกในการวินิจฉัยผู้ที่มีความเสี่ยงจะเป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดี บางครั้งจะสามารถตรวจพบก้อนมะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมในช่องท้องได้ด้วยจากการตรวจด้วยวิธีนี้ การอัลตราซาวด์ช่องท้องยังสามารถทำให้มองเห็นการแพร่กระจายของมะเร็งไปที่ตับซึ่งจะพบลักษณะเป็นร่องรอยของก้อนกลมก้อนเดียวหรือหลายก้อน อันเนื่องมาจากการสะท้อนกลับที่แตกต่างกันของสัญญาณจากการอัลตราซาวด์.

2.3.3.2 การถ่ายภาพรังสีส่วนตัดโดยอาศัยคอมพิวเตอร์ (Computed tomography scan; CT scan)

CT scan จะทำงานโดยอาศัยรังสีเอกซ์เรย์ทำให้เห็นภาพตามส่วนตัดขวางของร่างกาย ซึ่งจะได้ภาพหลายจากทุกส่วนของร่างกาย เนื่องจากการถ่ายภาพหมุนไปทั่วทุกส่วนของร่างกายคอมพิวเตอร์จะทำหน้าที่รวมภาพแต่ละส่วนของร่างกาย CT scans

สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ดังนี้ ช่วยในการวินิจฉัยมะเร็งท่อน้ำดีโดยแสดงให้เห็นขอบเขตของมะเร็ง ช่วยบอกระยะของโรคมะเร็ง รวมทั้งต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะอื่น ๆ ที่มะเร็งมีโอกาสปะทะกระจายไปได้ CT scans สามารถใช้เป็นตัวชี้นำ หากต้องมีการเจาะชิ้นเนื้อมะเร็งหรือมะเร็งที่แพร่กระจาย

2.3.3.3 การตรวจเอ็กซเรย์ด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic resonance imaging; MRI):

MRI สามารถแสดงให้เห็นภาพเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆในร่างกายได้ เช่นเดียวกับ CT scan แต่ MRI ใช้คลื่นวิทยุและแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งมีความแรงมากกว่ารังสีเอ็กซเรย์ ซึ่งบางครั้ง อาจจะมีการฉีดสารเพิ่มความคมชัดที่เรียกว่า gadolinium เข้าทางหลอดเลือดเพื่อเพิ่มความชัดเจนของภาพ การทำ MRI scan จะช่วยเห็นภาพของท่อน้ำดีและอวัยวะอื่นๆ ได้ชัดเจนมากขึ้น บางครั้งอาจทำให้สามารถตรวจพบเนื้องอกและมะเร็งระยะเริ่มแรก การทำ MRI scan จะมีความยุ่งยากมากกว่า CT scan เล็กน้อย เนื่องจากต้องใช้เวลานาน มักใช้เวลาเป็นชั่วโมงในการทำหนึ่งครั้ง รวมทั้งต้องเข้าไปอยู่ในอุปกรณ์ที่มีลักษณะเป็นท่อแคบๆ บางครั้งจึงไม่เหมาะสมสำหรับผู้ที่มีความกลัวที่แคบซึ่งบางครั้งอาจมีการใช้เครื่อง MRI แบบพิเศษแทน

2.3.3.4 การถ่ายภาพรังสีในท่อน้ำดี(Cholangiography)

เป็นวิธีการถ่ายภาพรังสีท่อน้ำดีเพื่อดูว่าเกิดการอุดตันของท่อ, การตีบแคบ หรือมีการขยายของท่อหรือไม่ วิธีนี้จะมีประโยชน์เมื่อมีการอุดตันของท่อน้ำดีเนื่องจากก้อนมะเร็ง และช่วยในการวางแผนเพื่อทำการผ่าตัด ซึ่งการถ่ายภาพรังสีของท่อน้ำดีมีหลากหลายวิธีการ ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป .

2.3.3.5 การตรวจหาความผิดปกติของท่อน้ำดีด้วยเครื่อง MRI (Magnetic resonance cholangiopancreatography; MRCP)

วิธีนี้เป็นวิธีตรวจที่ไม่สร้างความเจ็บปวดให้แก่ผู้ป่วย โดยการใช้อุปกรณ์เครื่องมือเดียวกันกับการทำ MRI ซึ่งแพทย์มักเลือกใช้วิธีนี้ในกรณีเพื่อถ่ายภาพท่อน้ำดี

2.3.3.6 การส่องกล้องตรวจท่อน้ำดี (Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; ERCP)

การตรวจวิธีนี้ แพทย์จะใช้อุปกรณ์ที่เป็นกล้องที่มีลักษณะเป็นท่อยาวที่เรียกว่า (endoscope) สอดเข้าไปในปาก ผ่านลำคอ หลอดอาหาร และกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็ก ซึ่งระหว่างที่ทำการตรวจต้องมีการวางยานอนหลับก่อน แล้วจึงทำการสอดกล้องเข้าไป โดยส่วนปลายของกล้องจะไปสิ้นสุดที่ท่อน้ำดี และจะมีการฉีดสีที่ช่วยเพิ่มความคมชัดผ่านกล้องเข้าไปด้วย เพื่อจะทำให้ภาพของท่อน้ำดีและตับอ่อนมีความคมชัดมากขึ้น และยังทำให้สามารถมองเห็นท่อน้ำดีในกรณีที่มีการตีบแคบหรืออุดตันได้

2.3.3.7 การเอ็กซเรย์ดูภาพท่อน้ำดี (Percutaneous transhepatic cholangiography; PTC)

วิธีนี้แพทย์จะทำการแทงเข็มกลวงและบาง ผ่านทางท่อน้ำท่อน้ำดีที่อยู่ใต้ตับ ซึ่งผู้ป่วยจะได้รับยานอนหลับผ่านทางหลอดเลือดดำก่อนที่ทำการตรวจ และให้ยาชาตรงบริเวณที่จะสอดเข็มเข้าไป และทำการฉีดสารเพิ่มความคมชัดเข้าไปด้วย จากนั้นจึงทำการถ่ายภาพเอ็กซเรย์ตามบริเวณที่สารดังกล่าวนี้ เคลื่อนที่ผ่านเนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วยได้ ดังนั้นแพทย์จะใช้วิธี PTC ก็ต่อเมื่อใช้วิธี ERCP แล้วแต่ได้ผลไม่ชัดเจนหรือไม่สามารถทำได้ด้วยเหตุผลบางประการ

2.3.3.8 การอัลตราซาวด์โดยการนำกล้องเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยโดยผ่านทาง การผ่าตัดขนาดเล็ก (Laparoscopy)

เป็นการผ่าตัดเล็กประเภทหนึ่ง แพทย์จะทำการสอดท่อขนาดเล็กและบางซึ่งติดกับกล้องวิดีโอขนาดเล็กผ่านช่องที่ทำการผ่าตัดตรงบริเวณช่องหน้าท้องเพื่อตรวจดูท่อน้ำดี, ถุงน้ำดี, ตับ และอวัยวะอื่นๆ ในบริเวณนั้น วิธีนี้มักทำในห้องผ่าตัดในขณะที่ผู้ป่วยถูกวางยาสลบแล้ว Laparoscopy สามารถช่วยแพทย์วางแผนการผ่าตัดหรือการรักษาได้ และสามารถใช้บ่งชี้ระยะของมะเร็ง หากมีความจำเป็นต้องตัดชิ้นเนื้อ แพทย์อาจจะสอดอุปกรณ์ที่ใช้ตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปตรวจได้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้มักทำก่อนการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออก เพื่อให้มั่นใจว่ามะเร็งถูกตัดออกอย่างสมบูรณ์

2.3.3.9 การถ่ายภาพรังสีของท่อน้ำดี (Cholangioscopy)

การถ่ายภาพรังสีของท่อน้ำดีทำได้โดยวิธี ERCP (ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น) แพทย์จะสอดกล้องที่มีลักษณะเป็นท่อขนาดเล็กเข้าไปในท่อที่มีขนาดใหญ่กว่าที่ใช้ในวิธี ERCP ซึ่งจะทำให้กล้องสามารถไปยังท่อน้ำดีได้ง่ายขึ้น ซึ่งจะสามารถช่วยให้แพทย์มองเห็นการอุดตัน, ก้อนนิ่ว, ก้อนมะเร็ง หรือสามารถทำการตัดชิ้นเนื้อได้

2.3.4 การตัดชิ้นเนื้อ (Biopsy):

การตรวจโดยการถ่ายภาพ (ultrasound, CT or MRI scans, cholangiography เป็นต้น) จะช่วยบอกว่ามีก้อนมะเร็งหรือไม่ แต่บางครั้งการตัดชิ้นเนื้อและนำไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์จะช่วยให้การวินิจฉัยมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น การตัดชิ้นเนื้อเพื่อเก็บตัวอย่างไปทำการวินิจฉัยมีวิธีการหลายวิธี ดังนี้

2.3.4.1 วิธีการตัดชิ้นเนื้อ

การตัดชิ้นเนื้อระหว่างที่ทำการถ่ายภาพรังสีของท่อน้ำดี เมื่อแพทย์ทำการตรวจด้วยวิธี ERCP หรือ PTC แพทย์อาจจะเก็บตัวอย่างน้ำดีไปด้วยระหว่างทำการตรวจเพื่อใช้ตรวจหาเซลล์มะเร็งในน้ำดีเซลล์ท่อน้ำดีและชิ้นส่วนเนื้อเยื่อต่างๆในน้ำดีอาจถูกเก็บเป็นตัวอย่างโดยใช้แปรง แพทย์จะใช้แปรงขนาดเล็กที่มีลักษณะยาวและยืดหยุ่นได้ ดัดเข้าไปกับกล้อง endoscope หรือเข็ม แล้วใช้แปรงนั้นขูดเอาเซลล์และเนื้อเยื่อชิ้นเล็กๆของท่อน้ำดีออกมาโดยการมองผ่านกล้อง

2.3.4.2 การเก็บชิ้นเนื้อโดยใช้เข็ม

การเก็บชิ้นเนื้อด้วยวิธีนี้ แพทย์จะใช้เข็มที่มีลักษณะกลวง บาง แทะผ่านผิวหนังไปยังก้อนมะเร็งโดยตรง โดยที่ไม่มีการผ่าตัดเพื่อเปิดชั้นผิวหนัง (มีการให้ยาชาก่อนที่จะแทงเข็ม) การแทงเข็มเข้าไปจะใช้การอัลตราซาวด์หรือ CT scan เพื่อดูตำแหน่งที่ถูกต้อง เมื่อเข็มแทงไปถูกบริเวณก้อนมะเร็ง ตัวอย่างจะถูกดูดขึ้นมาผ่านเข็มและส่งไปยังห้องห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนใหญ่ การเก็บตัวอย่างด้วยวิธีนี้จะใช้เทคนิคที่เรียกว่า fine needle aspiration (FNA) โดยจะใช้เข็มที่บางมากๆ ดัดกับไซริงค์แล้วดูดเอาเซลล์ตัวอย่างขึ้นมา แต่บางครั้งการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีนี้อาจได้

ตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัย ดังนั้นอาจมีการใช้เทคนิคที่เรียกว่า core needle biopsy ซึ่งเป็นการใช้เข็มที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มากขึ้น

2.4 การรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

ปัจจัยสำคัญของการตัดสินใจเลือกแนวทางการรักษามะเร็งท่อน้ำดีคือขอบเขตของมะเร็ง วิธีการที่รักษามะเร็งท่อน้ำดีนั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกิดโรคและขนาดของก้อนมะเร็ง รวมทั้งระยะการแพร่กระจายของมะเร็ง นอกจากนี้ เพศและสุขภาพของตัวผู้ป่วยเองก็เป็นอีกปัจจัยที่ต้องพิจารณาว่าสามารถรักษาโดยการผ่าตัดได้หรือไม่ โดยส่วนใหญ่ทีมแพทย์ผู้รักษาต้องมีการวางแผนการรักษาล่วงหน้า การผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกมาเป็นวิธีการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม การผ่าตัดก็ไม่สามารถทำได้ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทุกราย โดยทั่วไปแล้ว แพทย์จะแบ่งประเภทของมะเร็งตามการรักษาเป็น 2 ประเภท ได้แก่

2.4.1 มะเร็งที่สามารถทำการผ่าตัดได้

มะเร็งประเภทนี้คือมะเร็งที่แพทย์ให้ความเห็นว่าสามารถผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกมาได้อย่างสมบูรณ์ โดยอาศัยข้อมูลจากภาพถ่ายและการวินิจฉัยวิธีอื่นๆ มะเร็งที่อยู่ในระยะ 0, I และ II รวมทั้งผู้ป่วยบางคนในระยะ III ของระบบ TNM มีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถผ่าตัดเอามะเร็งออกไปได้ แต่ทั้งนี้ก็ต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น เช่น ตำแหน่งของก้อนมะเร็งและความพร้อมของผู้ป่วยด้วยเช่นกัน การผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกอย่างสมบูรณ์นั้นเป็นวิธีการรักษาที่ดีที่สุด เมื่อแพทย์พิจารณาให้รักษาโดยการผ่าตัด ก็จำเป็นที่จะต้องทำการตรวจระยะการดำเนินโรคก่อนโดยใช้วิธีส่องกล้องเข้าไปตรวจภายในช่องท้อง (laparoscopy) เพื่อดูว่ามะเร็งมีการแพร่กระจายหรือไม่ ซึ่งถ้าหากมีการแพร่กระจายหรือลุกลามไปแล้วก็จะไม่สามารถทำการผ่าตัดได้ ประเภทของการผ่าตัดขึ้นอยู่กับตำแหน่งและขอบเขตของมะเร็ง ถ้าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นก่อนที่จะได้รับการผ่าตัด ก็จำเป็นต้องมีการใช้ชดเชยหรือท่อเพื่อให้มีการระบายของน้ำดี ซึ่งจะช่วยบรรเทาอาการให้ดีขึ้นและอาจจะช่วยให้ผู้ป่วยมีร่างกายที่มีสภาพพร้อมที่จะได้รับการผ่าตัด Adjuvant chemotherapy คือการให้ยาเคมีบำบัดแก่ผู้ป่วยหลังจากที่ได้รับการผ่าตัด เพื่อลดความเสี่ยงและการกลับมาเกิดซ้ำของมะเร็ง แต่แพทย์ก็ยังไม่สามารถลงความเห็นได้ว่าวิธีจะได้ผลเต็มที่หรือไม่ การให้ยาเคมีบำบัดหลังผ่าตัดมักจะให้เมื่อแพทย์ค่อนข้างมั่นใจว่ามะเร็งที่ทำการผ่าตัดนั้นไม่สามารถผ่าตัดออกมาได้อย่างสมบูรณ์ (อาศัยข้อมูลจากการตรวจชิ้นเนื้อในห้องปฏิบัติการ) ถ้าพบว่ามีมะเร็งเหลืออยู่อย่างชัดเจน

แพทย์อาจลงความเห็นให้มีการผ่าตัดครั้งที่สองในผู้ป่วยบางราย แต่ในบางกรณีที่ข้อมูลจากการถ่ายภาพยังไม่ชัดเจนว่ามะเร็งนั้นจะถูกผ่าตัดออกไปอย่างสมบูรณ์หรือไม่ มะเร็งประเภทนี้จะถูกเรียกว่า borderline resectable แพทย์อาจลงความเห็นให้ทำรังสีรักษาหรือให้ยาเคมีบำบัดก่อนรับการผ่าตัดเพื่อลดขนาดของก้อนมะเร็ง ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า neoadjuvant treatment ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะมีประโยชน์ต่อการรักษามะเร็งบางประเภท แต่ก็ยังไม่มีข้อมูลชัดเจนว่าจะได้ผลเต็มที่หรือไม่ในการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

2.4.2 มะเร็งที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดได้

มะเร็งประเภทนี้มีการแพร่กระจายไปไกลหรือเกิดในตำแหน่งที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดเอาออกมาได้ โดยมักเป็นมะเร็งที่อยู่ในระยะที่ III หรือ IV หรืออาจเป็นมะเร็งระยะแรก แต่สภาพร่างกายของผู้ป่วยไม่แข็งแรงพอที่จะทำการผ่าตัด ซึ่งมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่ไม่สามารถผ่าตัดได้ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ในผู้ป่วยบางคนที่ยังชี้ชัดไม่ได้ว่าสามารถรักษาด้วยการผ่าตัดมะเร็งได้หรือไม่ จะต้องมีการทำรังสีรักษาเพื่อลดขนาดก้อนมะเร็งก่อนที่จะทำการผ่าตัด ซึ่งจะช่วยทำให้สามารถทำการผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกมาได้อย่างสมบูรณ์ในผู้ป่วยบางรายที่แพทย์วินิจฉัยว่ามะเร็งก้อนนั้นสามารถผ่าตัดออกมาได้ แต่เมื่อทำการผ่าตัดแล้วไม่สามารถเอาก้อนมะเร็งออกได้หมด ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการที่มะเร็งมีการแพร่ไปไกลและไม่สามารถมองเห็นได้จากการถ่ายภาพก่อนที่จะทำการผ่าตัด เป็นต้น ในกรณีนี้การผ่าตัดเพื่อเอามะเร็งบางส่วนออกไปและการผ่าตัดอาจทำให้เกิดผลข้างเคียง ดังนั้นอาจจะต้องทำการรักษาด้วยวิธีการทำ bypass ของท่อน้ำดีเพื่อลดการอุดตันของท่อน้ำดี หรือทำการใส่ขดลวดเพื่อขยายท่อน้ำดีระหว่างทำการผ่าตัด ซึ่งอาจเป็นวิธีการรักษาอีกหนึ่งทางเลือกในบางกรณี อาจทำการรักษาด้วยการปลูกถ่ายตับ (ในกรณีที่แพทย์ทำการผ่าตัดเอาตับและท่อน้ำดีออกไปแล้ว) ซึ่งจะมีการให้ยาเคมีบำบัดและรังสีรักษาก่อนเป็นอันดับแรก แต่อย่างไรก็ตามการหาผู้บริจาคตับที่สามารถเข้ากับผู้ป่วยได้ก็ไม่ใช่ว่าเรื่องง่าย มะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มักจะเป็นประเภทที่ไม่สามารถทำการผ่าตัดได้ ดังนั้นในการรักษามะเร็งชนิดนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อที่จะควบคุมไม่ให้มะเร็งเจริญหรือขยายไปมากกว่าเดิมและเพื่อบรรเทาอาการที่เป็นผลจากมะเร็ง

2.4.4 การทำรังสีรักษา และ/หรือการให้ยาเคมีบำบัดอาจช่วยลดขนาดของก้อนมะเร็งหรือชะลอการเจริญของมะเร็งได้ในบางกรณี สำหรับมะเร็งท่อน้ำดีที่เกิดขึ้นภายในตับ การสลายมะเร็ง

โดยการใช้ความร้อนสูงจากคลื่นความถี่หรือการใช้ความเย็นจัดก็สามารถควบคุมขนาดของมะเร็งได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังพบว่ามะเร็งยังสามารถเกิดซ้ำได้อีกหลังการรักษา

2.5 ตำรับยาเบญจกูล

พิกัดเบญจกูลเป็นตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ควบคุมธาตุทั้ง 4 และอากาศธาตุของมนุษย์ให้คงที่อยู่ในสมดุล ถือเป็นตำรับใหญ่แพทย์แผนโบราณให้ความสำคัญและจำเป็นต้องรู้ ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ตำรับเบญจกูลประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด แสดงชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และวงศ์

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์
ผลดีป्ली	<i>Piper chaba</i> Hunt.	PIPERACEAE
	<i>Piper longum</i> Linn.	
	<i>Piper retrofractum</i> Vahl.	
รากช้าพลู	<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	PIPERACEAE
เถาสะค้าน	<i>Piper interruptum</i> Opiz	PIPERACEAE
	<i>Piper</i> sp.	
รากเจตมูลเพลิงแดง	<i>Plumbago indica</i> Linn.	PLUMBAGINACEAE
เหง้าขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	ZINGIBERACEAE

สรรพคุณของสมุนไพรในพิกัดเบญจกูลตามทฤษฎีแพทย์แผนไทย สมุนไพรทั้ง 5 ชนิด ในพิกัดเบญจกูลจะมีสรรพคุณในการบำรุงธาตุต่างกันโดยจะแบ่งเป็นตัวยาประจำธาตุได้ดังนี้

1) ผลดีป्ली เป็นตัวยาประจำธาตุดิน ช่วยระงับธาตุปฏิวินัย ซึ่งมีอยู่ 42 ประการ เช่น อาการผม่ว้ง เจ็บปาก เจ็บฟัน เจ็บอก เจ็บในท้อง เจ็บในสมอง เจ็บในเนื้อ เจ็บหลัง เจ็บเอ็น เจ็บกระดูก ขนลุกชัน ผิวน้ำแตกกระแหง เจ็บตามข้อ ผอมเหลือง รวมไปถึงแสดงอาการวิปริตทางจิต นอนไม่หลับ กระสับประส่าย โกรธ ขุนเขี้ยวง่าย เพ้อคลั่ง

2) รากข้าพลู เป็นตัวยาประจำธาตุน้ำ ช่วยระงับสรรพโทษอันเกิดจากกองธาตุน้ำทั้ง 12 ประการแปรปรวนเช่น มีน้ำตาไหล เลือดกำเดาออกง่าย น้ำลายมาก เหงื่อโทรมตัว ปัสสาวะมากเกินไป ปัสสาวะขัด ท้องแน่นเป็นดาน ส่วนทางจิตใจจะแสดงออกด้วยอาการหวาดผวา สะอื้นได้ง่าย

3) เกาสะก้าน เป็นตัวยาประจำธาตุลม แก้อาการในกองธาตุลมทั้ง 6 เช่น ท้องเต็มไปด้วยลม หาวเรอ ผายลม เบื่ออาหาร มือเท้าเย็น ปากแห้ง คอแห้ง คลื่นเหียน อาเจียน จนถึงขั้นหายใจขัด

4) รากเจตมูลเพลิงแดง เป็นตัวยาประจำธาตุไฟ ช่วยระงับโทษอันเกิดจาก ธาตุไฟทั้ง 4 เช่น ตัวเย็น ไอแห้ง ปวดท้องไม่หาย นัยน์ตามัว มือเท้าเป็นเหน็บชา เบื่ออาหาร ขอบนอนนาน หายใจถี่

5) เหง้าจิง เป็นตัวยาประจำอากาศธาตุ ช่วยคุมกองอากาศธาตุทั้ง 10 ให้เป็นปกติ โทษของอากาศธาตุมีเพียง 2 ประการ คือ หูลั่นดังกรอกแกรกและมองคู่มือตนไม่เห็น (มันทนา สุธธานุรักษ์ 2553)

2.6 ข้อมูลสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับยาเบญจกูล



รูปที่ 2-5 ลักษณะของดีปลี

(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

1) ดีปลี

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper longum* L. (จากอินเดีย), *Piper chaba* Hunter (จากไทย)
Piper retrofractum Vahl. (จากอินโดนีเซีย)

ชื่อวงศ์ PIPERACEAE

ชื่ออื่น ๆ ดีปลี, พริกหาง (ภาคกลาง), ประดงข้อ, ปานน,

ลักษณะของพืช เป็นพรรณไม้เถาเลื้อย มีรากออกตามข้อและเกาะพันสิ่งอื่นได้ ส่วนของลำต้นค่อนข้างกลมและเรียบ มีทั้งต้นตัวผู้และต้นตัวเมีย ใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับ ตัวใบคล้ายรูปไข่แกมขอบขนานหรือรูปไข่เรียว ปลายใบแหลม โคนใบมักมนกลมหรือแหลม เนื้อใบสองข้างไม่เท่ากัน ผิวใบด้านบนมัน ใบมีขนาดกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 6-16 เซนติเมตร เส้นใบที่บริเวณโคนใบมี 3-5 เส้น ดอก ออกเป็นช่อและออกตรงข้ามกับใบ ช่อคล้ายทรงกระบอก ปลายเรียวมน เมื่อเป็นผลมีรูปร่างค่อนข้างกลม ผีเสื้อแน่นอยู่กับแกนช่อรูปทรงกระบอกปลายเรียวมนยาว 2.5 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-8 มิลลิเมตร เมื่ออ่อนมีสีเขียว พอแก่กลายเป็นสีส้มอมน้ำตาล มีรสเผ็ดร้อนและขม

การปลูก นิยมปลูกโดยการชำเถา ชอบดินร่วนและอุดมสมบูรณ์ ทนแล้งได้ดี ฤดูที่เหมาะสมในการปลูกคือ ฤดูฝน เวลาปลูกใช้เถาที่ชำจนรากงอกแล้วปลูก ทำเสาให้เลื้อย ควรดูแลเรื่องน้ำและศัตรูพืชด้วย ดีปลีเป็นสมุนไพรที่ใช้มากในอุตสาหกรรม ยาแผนโบราณ 5,000-7,000 กิโลกรัม/ปี ปลูกได้ดีในภาคกลางของประเทศไทย นับว่าเป็นพืชสมุนไพรตัวหนึ่งที่อยู่ในแผนพัฒนาเป็นสินค้าส่งออก

ส่วนที่ใช้เป็นยา ผลแก่แห้ง

ช่วงเวลาที่เก็บ ช่วงที่ผลแก่จัดแต่ยังไม่สุก ตากแดดให้แห้ง

สรรพคุณ ช่วยบำรุงธาตุ แก้อ่อนเพลีย ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร

และโรคที่เกี่ยวกับทางเดินหายใจ นอกจากนี้ยังใช้แก้โรคลมบ้าหมู ใช้ขับประจำเดือน ขับน้ำดี ช่วยย่อยอาหารและใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ (วิศิษฐ์ เกตุปัญญางค์, 2554)

ตารางที่ 2-2 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของดีปลี

ส่วนที่นำมาใช้	สรรพคุณ
ราก	แก้พิษอัมพฤกษ์ อัมพาต พิษบัตบาด แก้ตัวร้อน แก้พิษคุดทะราดให้ปิดธาตุ แก้ท้องร่วง ขับลม ในลำไส้ แก้คุดทะราด
เถา	แก้พิษงู ขับเสมหะ แก้ปวดฟัน ปวดท้อง จุก เสียด แก้เสมหะพิการ แก้ลมอัมพฤกษ์ แก้ มุตมาต
ใบ	แก้ปวดเมื่อย แก้เส้นเอ็น
ดอก	แก้อาการคลื่นไส้อาเจียน แก้จุกเสียดแน่นท้อง ขับลมในลำไส้ให้ผายและเรอ แก้หืด ไอ แก้ริดสีดวง คุดทะราด แก้ลมวิงเวียน แก้เสมหะ น้ำลายเหนียว แก้ไอ บำรุงธาตุ แก้ท้องเสีย แก้ปถวิธาตุ 20 ประการ แก้อัมพาต และเส้น บัตบาด
ผลแก่จัด	รสเผ็ดร้อน แก้ลม บำรุงธาตุไฟ แก้หืดไอ แก้เสมหะ (หลังเป็นหวัด) แก้หลอดลมอักเสบ ยาขับระดู ยาธาตุ ทาแก้ปวดเมื่อย และอักเสบ ของกล้ามเนื้อ แก้อาการท้องขึ้น ท้องอืดเพื่อ แน่น จุกเสียด ขับลม บำรุงธาตุ ใช้ประกอบ ตำรายาที่ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร ธาตุไม่ปกติ

สารประกอบทางเคมี

สารประกอบกลุ่ม benzenoid ได้แก่ para-methoxy aceto phenone, phenylethanal

สารประกอบกลุ่ม alkaloid ได้แก่ aristolactam A-11, piperolactam A, piperolactam B, piperderdine, peperine, tetrahydropiperine, peperiongingine, piperlongumine, piperlongumine, pipernonaline, dehydropipemonaline, piperundecalidine, peplartine และ dimethoxypiplartine

สารประกอบกลุ่ม monoterpene ได้แก่ dihydrocarveol, para-cymene, terpinolene, alpa-thujene

สารประกอบกลุ่ม sesquiterpene ได้แก่ beta-caryophyllene, zingberine

สารประกอบกลุ่ม isoquinone alkaloid ได้แก่ cepharadione A, cepharadione B, nor-cepharadione B, cephamone B, piperadione

สารประกอบกลุ่ม phenylpropanoid ได้แก่ 3-4-5 trimethoxymethylcinnamate, eicosanyl para-coumaric acid, tridecyl-dihydro-para-coumaric acid, 2-(3'-4'-5'-trimethoxy-phenyl)-propanoic acid, 3-(3'-4'-5'-trimethoxy-phenyl)-propionic acid

สารประกอบกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ D-aspartic acid, L-cystein, dl-serine, L-tyrosine, brachystamide B, pergu midiene, eicosa dienamide, eicosa tele namide, octa deaca dienamide, pipericide, dihydropiperlonguminine, futoamide, guineensine, longamide, pellitorine, retrotractamide A, sylvatine, daucosterol, beta-sitosterol, n-eicosane, n-heneicosane, n-hentriacontane, glycerol-alpha-octadec-cis-12-enoate, hentriacontan-16-one, triacontan-1-ol

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

1. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (Hypoglycemic activity) สารสกัด คีปลี (ทุกส่วน) ในตัวทำละลาย ethanol และน้ำ (1:1) มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อทดลองในหนู (rat) โดยให้สารสกัดทางปาก ในขนาด 250 mg/kg

2. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic activity) สารคีปลี (ทุกส่วน) ใน ethanol 90% มีฤทธิ์ฆ่าเซลล์ lymphocyte ของคนเมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้น 0.1 mg/ml และการทดสอบฤทธิ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงคือ cell-vero, Chinese hamster ovary cells และ lymphoma-dalton's cell ให้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.13, 0.145 และ 0.3 mg/ml ตามลำดับ

3.ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Antiviral activity) สารสกัดด้วย methanol จากผลดีป्ली มีฤทธิ์ต้านไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเริม (Herpes simplex type 1) เมื่อทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยใช้สารสกัดขนาด 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. ฤทธิ์ต้านการแพ้ (Antiallergenic activity) สารสกัดในชั้นน้ำของผลดีป्लीมีฤทธิ์ต้านการแพ้เมื่อทดสอบในหนู (rat) ทั้ง 2 เพศ โดยให้สารสกัดในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเป็นเวลา 3 วัน จากนั้น แยกเอาปอดของสัตว์ทดลองออกมากระตุ้นด้วย Freund's adjuvant และ bovine albumin วัดผลจากค่า rate of flow

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อ Giardia lamblia (Antigiardiasis activity) สารสกัดจากผลดีป्लीในชั้น butanol ขนาด 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และสารสกัดชั้น ethanol (100%) ขนาด 125.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ Giardia lamblia ในหนูทั้งสองเพศ

6. ฤทธิ์ต้านเชื้ออะมีบา (Antiamobid activity) สารสกัดจากผลดีป्लीด้วย ethanol (95%) มีฤทธิ์ต้านเชื้ออะมีบา Entamoeba histolytica ในหนู เมื่อนิยสารสกัดเข้าช่องท้องในขนาด 900 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

7. ฤทธิ์ต้านการเกิดพิษต่อตับ (Antihepatotoxic activity) สารสกัดของผลดีป्ली (ไม่ระบุตัวทำละลาย) มีฤทธิ์ต้านการเกิดพิษต่อตับเมื่อทดสอบในหนู (mouse) โดยให้สารสกัดในขนาด 0.05 กรัม/กิโลกรัม ทางสายยางลงสู่กระเพาะอาหาร (ใช้ Rifampin/INH เหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับ)

8. ฤทธิ์ต้านการเกิด tumor (Antitumor activity) สารสกัดจากผลดีป्लीด้วย ethanol (95%) ในขนาด 50 มิลลิกรัม/สัตว์ทดลอง ให้เป็นเวลา 5 วัน สามารถยับยั้งการโตของก้อนเนื้องอกในหนู (mouse)

การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผลดีป्लीด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ (1:1) พบว่าการป้อนสารสกัดหรือนิยเข้าช่องท้องในขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ไม่พบพิษในหนูถีบจักร

การทดสอบความเป็นพิษต่อตัวอ่อน พบว่าสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% ในขนาดรับประทาน 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมมีผลต่อตัวอ่อน

2) ช้ำพลู



รูปที่ 2-6 ลักษณะของช้ำพลู
(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper sarmentosum* Roxb

ชื่อวงศ์ PIPERACEAE

ชื่ออื่น ๆ ดอกช้ำพลู, ต้นช้ำพลู, ใบช้ำพลู, ผลช้ำพลู, รากช้ำพลู, นมวา, ผักปุนา, ผักพลูนก, พลูลิง, เย่เทีย, ชะพลู

ลักษณะของพืช เป็นพืชไม้ล้มลุก สูง 30-80 เซนติเมตร ดอกช่อ ออกที่ซอกใบ เป็นแท่งสีขาว คล้ายดอกพลู ทั้งต้นมีกลิ่นหอม รูปทรงกระบอก ดอกย่อยแยกเพศ ผลเป็นสีเนื้ออ่อน

การขยายพันธุ์ ขุดแยกดินเดิมไปแยกปลูกในกระถางหรือพื้นที่ที่ปลูกขึ้นง่าย ชอบที่ชื้น หรือ จะเด็ดก้านแก่ ปักชำ สามารถขึ้นได้ (วิศิษฐ์ เกตุปัญญาพงศ์, 2554)

ตารางที่ 2-3 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของข้าวพุลู

ส่วนที่นำมาใช้	สรรพคุณ
ราก	ขับเสมหะให้ออกมาทางระบบขับถ่าย ขับลมในลำไส้ ทำให้เสมหะแห้ง
ใบ	มีรสเผ็ดร้อน ทำให้เจริญอาหาร ขับเสมหะ ใบข้าวพุลูมีสารเบตาแคโรทีนสูงมาก
ดอก	ทำให้เสมหะแห้ง ช่วยขับลมในลำไส้
ต้น	ขับเสมหะในทรวงอก

สารประกอบทางเคมี

สารประกอบกลุ่ม phenylpropanoid ได้แก่ asaricin, gamma-asarone, 1-allyl-2-6-dimethoxy-3-4-methylenedioxybenzene, asaronaldehyde, alpha-asarone hydroxycinnamic acid

สารประกอบกลุ่ม alkaloid ได้แก่ N-(3-phenyl-propanoyl)-pyrrole, sarmentine, samentosine

สารประกอบกลุ่ม steroid ได้แก่ beta-sitosterol

สารประกอบกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ N-2-methyl-butyl-deca-trans-4-denamide, N-iso-butyl-octa-trans2-trans4-dienamide, pellitorine, oxalic acid

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

1. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด (Hypoglycemic activity) เมื่อทดลองใช้สารสกัดด้วยน้ำของต้นข้าวพุลูในขนาด 0.125 และ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แก่หนูขาวปกติ โดยให้รับประทานครั้งเดียว พบว่า มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด แต่สารสกัดในขนาดดังกล่าวไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่เป็นเบาหวาน (streptozotocin-diabetic rat) แต่เมื่อให้สารสกัดดังกล่าวในขนาด 0.125 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการรับประทานติดต่อกันนาน 7 วัน แต่หนูขาวที่เป็นเบาหวานพบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้

2.ฤทธิ์การต้านเนื้องอก (Antitumor-promoting) สารสกัดด้วย methanol จากใบชาพลูความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยง RAJI ของ Epstein barr virus โดยใช้ 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate เป็น antigen activation

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) สาร phenylpropanoid มี 4 ชนิด ที่สกัดแยกได้จากใบชาพลู มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* ที่ 25 ppm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดทั้งต้นของชาพลูด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ 1:1 พบว่า การให้สารสกัด โดยผ่านท่อลงสู่กระเพาะ (gastric intubation) หรือฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ในขนาด 10 กรัมต่อกิโลกรัม ไม่พบพิษในหนูขาว (มันทนา สุทธานุรักษ์, 2553)

ข้อควรระวัง

ใบชาพลูมีสารกลุ่มออกซาเลต (Oxalate) ค่อนข้างสูงซึ่งเป็นสารที่สามารถทำให้เกิดนิ่วในไต ถ้าหากร่างกายได้รับการสะสม จึงควรดื่มน้ำมากๆ เพื่อให้สารดังกล่าวถูกเจือจาง ถูกขับถ่ายมาทางปัสสาวะหรือทานอาหารจำพวกโปรตีนสูงเพื่อป้องกันการเกิดนิ่ว (วิศิษฐ์ เกตุปัญญาพงศ์, 2554)

3) สะค้าน



รูปที่ 2-7 ลักษณะของเถาสะค้าน

(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Piper interruptum*

ชื่อวงศ์ PIPERACEAE

ชื่อท้องถิ่น ตะค้ำน, จะค้ำน, หนามแน่น และสะค้ำนขาว

ลักษณะของพืช เป็นไม้เถาขนาดกลาง เนื้อไม้เป็นเส้นยาวหน้าตัดเป็นรัศมี เปลือกค่อนข้างอ่อน เนื้อสีขาว ใบเดี่ยวรูปหอกกว้างคล้ายใบพริกไทย หรือใบพลู แต่แคบกว่า ปลายแหลม สีเขียวเข้ม เกิดตามป่าดงดิบชื้นทั่วไป และมีอีกชนิดหนึ่ง คือ สะค้ำนแดง มีเนื้อสีแดงส้ม เนื้อละเอียดกว่า เล็กน้อย มีฤทธิ์ร้อนแรงกว่ามาก พบตามป่าแถวชายแดนกาญจนบุรี (มันทนา สุทธานุรักษ์, 2553)

ถิ่นกำเนิด เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และป่าดิบเขตร้อน

ตารางที่ 2-4 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของสะค้ำน

ส่วนที่นำมาใช้	สรรพคุณ
ราก	แก้ไข้ อันประกอบไปด้วย หืด แก้หืด ขับเหงื่อ
เถา	แก้ลมอันเกิดจากกองธาตุพิการ
ใบ	ขับลม แก้จุกเสียด แก้ในกองลม แก้ลมอันเกิดในกองธาตุพิการ แก้ท้องเสีย แก้ปวดท้อง เจริญอาหาร บำรุงธาตุ
ดอก	แก้ลมอันมีพิษ ได้แก่วลมอัมพฤกษ์ ลมปัตตะคาด ลมพรรคิก
ผลแก่จัด	แก้ลมอันแน่นในทรวงทั้งห้า บำรุงธาตุ แก้ท้องเสีย แก้อาการธาตุพิการ แก้ปวดท้องแน่นจุกเสียด และขับลม ไม่ระบุส่วนที่ใช้ขับลม บำรุงธาตุ แก้ลมในกองเสมหะและโลหิต แก้ไข้ แก้หืด แก้ลมแน่นในทรวง

สารประกอบทางเคมี

สารประกอบกลุ่ม alkaloid ได้แก่ piperine

สารประกอบกลุ่ม lignin ได้แก่ eupomatene

สารประกอบกลุ่ม monoterpene ได้แก่ borneol caffeate, borneol paracoumarate

สารประกอบกลุ่ม flavone ได้แก่ 5-7-dimethoxyflavone

สารประกอบกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ ascorbic acid, crotopoxide, pipercollosine, 1-(4'-methoxy-phenyl)-trans-2-(3'-4'-5'-trimethoxy-phenyl)-ethene

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

1. ฤทธิ์ต้านการเกิด tumor (Antitumor activity) สารสกัดด้วย ethanol (90%) มีฤทธิ์ต้านเซลล์ LEUK-P388 ในหนู (mouse) เมื่อนำสารสกัดเข้าช่องท้องในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity) การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเหาะค้ำนในการต้านเชื้อรา *Basidiobolus haptosporus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อโรค subcutaneous phycomycosis ในคนและสัตว์ พบว่า สารสกัดเหาะค้ำนในความเข้มข้นที่ต่ำคือ 1:80 dilution สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Basidiobolus haptosporus* ได้

3. Histaminergic effect สารสกัดจากเหาะค้ำนด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง ethanol กับน้ำ 1:1 มีฤทธิ์เหมือนฮิสตามีน เมื่อทดสอบกับลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภา (guinea pig) โดยใช้สารสกัดในขนาด 0.01 กรัม/ มิลลิลิตร

4. ฤทธิ์กระตุ้นกล้ามเนื้อ (smooth muscle stimulant activity) สารสกัดจากเหาะค้ำนด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง ethanol กับน้ำ 1:1 ในขนาด 0.01 กรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบของลำไส้ส่วน ileum ของหนูตะเภา (guinea pig)

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) สารสกัดชั้น chloroform จากเปลือกต้นของเหาะค้ำน มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เมื่อทดลองโดยวิธี agar plate สารสกัดความเข้มข้น 39.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus pneumonia*

การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดส่วนเหนือดินของสะค้านด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ 1:1 พบว่า การให้สารสกัดโดยผ่านท่อลงสู่กระเพาะอาหาร (gastric incubation) หรือนิดเข้าได้ผิวหนังในขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ไม่พบพิษในหนูขาว (มันทนา สุธานุรักษ์, 2553)

4) เจตมูลเพลิงแดง



รูปที่ 2-8 ลักษณะของรากเจตมูลเพลิงแดง

(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Plumbago indica* Linn. และ *Plumbago rosea* Linn.

ชื่อวงศ์ PIPERACEAE

ชื่ออื่น ๆ ปิดปิวแดง (อีสาน), ไฟใต้ดิน (ใต้) คู้ยวู้ (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี)

ลักษณะของพืช เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กสูงประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นสีเขียวออกแดงเข้ม ใบเดี่ยว โดกกว่าใบมะลิเล็กน้อย สีเขียวอมแดง ดอกช่อสีแดง ผลเป็นฝักรูปกลม จะแตกออกเมื่อแก่ เกิดตามป่าดงดิบ และป่าเบญจพรรณทั่วไป รากสีน้ำตาลดำ เป็นเส้นๆ มีรสมีความร้อนออกรอบๆ ต้น ไม่ควรปลูกไว้ในบ้าน เป็นพืชที่นำปลูกเพื่อทำการค้า ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและปักชำ

ตารางที่ 2-5 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของเจตมูลเพลิงแดง

ส่วนที่นำมาใช้	สรรพคุณ
ราก	รสร้อน บำรุงธาตุ บำรุงโลหิต ขับลมในกระเพาะอาหาร และลำไส้ ขับโลหิตระดู แก่ริดสีดวงทวาร เคลื่อนฝี ให้ความอบอุ่นแก่ร่างกาย กระจายเลือดลม แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย มีฤทธิ์บีบมดลูก ทำให้แท้งได้ ทาแก้โรคผิวหนัง กลากเกลื้อน
ใบ	รสร้อน แก้อ่อนชืดตะสมุฏฐาน (น้ำคั้นออกฝัก) แก้ลมในกองเสมหะ ช่วยย่อยอาหาร ขับผายลม
ดอก	รสร้อน แก่พัทฐปิตตะสมุฏฐาน (น้ำคั้นในฝัก)
ต้น	รสร้อน แก่โลหิตอันเกิดแต่กองกำเดา

สารประกอบทางเคมี

สารประกอบกลุ่ม flavonoid ได้แก่ yaniding-3-0-alpha-L-rhamnoside yaniding-3-rhamnoside, plumbaginol, delphinidin-3-0-alpha-L-rhamnoside, pelargonidin-3-alpha-L-rhamnoside, delphinidin-3-rhamnoside, leucodelphinidin, pelargonidi-3-rhamnoside

สารประกอบกลุ่ม flavonol ได้แก่ ayanin, azaleath, kaempferol-3-0-alpha-L-rhamnoside, kaempferol-3-rhamnoside

สารประกอบกลุ่ม benzenoid ได้แก่ meta-dinitrobenzene, plumbagic acid, digalloyl-glucose, galloyl-glucose

สารประกอบกลุ่ม steroid ได้แก่ campes terol, stigmasterol, betasitosterol

สารประกอบกลุ่ม quinoid ได้แก่ 6-hydroxy-plumbagin, plumbagin, alpha-naphthoquinone, 1-4-naphthoquinone, alpha-hydroxynaphthoquinone, 2-3-epoxy-plumbagin, 3-0-3'-bidroserone

สารประกอบกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ arachidyl alcohol, fructose, glucose, linoleic acid, oleic acid, myricyl palmitic acid, alpha-naphthylamine, plumbagic acid lactone

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

1. ฤทธิ์ลดอุณหภูมิร่างกาย (Hypothermic activity) สารสกัดด้วย ethanol และน้ำ (1:1) ของรากเจตมูลเพลิงแดง มีฤทธิ์ลดอุณหภูมิร่างกายของหนู (mouse) เมื่อนิดสารสกัดเข้าช่องท้อง ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

2. ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Antimutagenicity) สารสกัดจากรากเจตมูลด้วย petroleum ether มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของเชื้อ *salmonella typhimurium* TA100 โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 10.0 ไมโครกรัม/plate เมื่อทดลองด้วยวิธี agar plate

3. ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด (Hypolipidaemic effect) plumbagin (2-methyl-5-hydroxyl 1:4 naphthoquinone) ซึ่งสกัดจากรากเจตมูลเพลิง มีฤทธิ์ลดไขมันในกระต่ายที่มีไขมันในเลือดสูง โดยวัดผลจากการลดลงของโคเลสเตอรอลในซีรัมและการทดลองของ LDL

4. ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก (Antitumor activity) สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงด้วย ethanol (95%) มีฤทธิ์ต้านเนื้องอก *in vivo* เมื่อใช้สารสกัด ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม นิดเข้าช่องท้องหนู (mouse) พบว่า สามารถต้านการเกิด sarcoma ได้ และสารสกัด ในขนาด 75.มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์เนื้องอก CA-Ehrlich-Ascites ในหนู (mouse)

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) จากการทดสอบด้วยวิธี agar plate พบว่า สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงด้วย ethanol (95%) ในขนาด 100.0 มิลลิกรัม/plate มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *salmonella typhi* และ *staphylococcus aureus*

6. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity) จากการทดสอบด้วยวิธี agar plate พบว่า สารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงแดงด้วย ethanol (95%) ในขนาด 100 มิลลิกรัม/disc มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *candida albicans*

5) เหน้งจิง



รูปที่ 2-9 ลักษณะของเหง้าขิงแห้ง
(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber officinale* Roscoe

ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE

ชื่อท้องถิ่น ขิงแกลง, ขิงแดง, ขิงเผือก, สะเอ

ลักษณะพืช พืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดินขึ้นเป็นกอ เหง้าหรือลำต้นแท้มีลักษณะเป็นข้อ ๆ เนื้อในมีสีขาว หรือเหลือง สุกของข้อจะเป็นยอดหรือต้น สูงพุ่มพุ่มดินขึ้นมา 50-100 เซนติเมตร ลำต้นเทียมมีกาบหรือโคนใบหุ้ม ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกันเป็น 2 แถวใบรูปหอกเกลี้ยงๆ หลังใบห่อหุ้ม เป็นรูปร่างน้ำ ปลายใบสอบเรียวแหลม โคนใบแคบและเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม ตรงช่วงต่อระหว่างกาบกับตัวใบจะหักโค้งเป็นข้อศอก ดอกสีขาว ออกเป็นช่อรูปเห็ดหรือกระบองซึ่งแทงขึ้นมาจากเหง้า ทุก ๆ ดอกมีกาบสีเขียวนแดงรูปโค้ง ๆ ห่อหุ้มรับกลีบและกลีบเลี้ยง มีอย่างละ 3 กลีบ โคนกลีบดอกมีวนห่อ ส่วนปลายกลีบผายกว้างออก เกสรตัวผู้มี 6 อัน ผลกลมแข็ง

ตารางที่ 2-6 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยาของเหง้าชิง

ส่วนที่นำมาใช้	สรรพคุณ
ราก	รสหวานเผ็ดร้อนขม แก้แน่น เจริญอาหาร แก้ลม แก้เสมหะ แก้บิด
เหง้า	รสหวานเผ็ดร้อน ขี้บลม แก้ท้องอืด จุกเสียด แน่นเฟ้อ คลื่นไส้อาเจียน แก้หอบไอ ขับเสมหะ แก้บิด เจริญอากาศธาตุ สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจะออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหาร และลำไส้ ใช้เหง้าแก้ทุบหรือบดเป็นผง ชงน้ำดื่ม แก้อาการคลื่นไส้อาเจียน แก้จุกเสียด แน่นเฟ้อ เหง้าสด ตำคั้นเอาน้ำผสมกับน้ำมะนาว เติมเกลือเล็กน้อย จิบแก้ไอ ขับเสมหะ
ใบ	รสเผ็ดร้อน บำรุงกำลัง แก้ฟกช้ำ แก้เนื้อ แก้ขัดปัสสาวะ แก้โรคตา ฆ่าพยาธิ
ดอก	รสเผ็ดร้อน แก้โรคประสาทซึ่งทำให้ใจขุ่นมัว ช่วยย่อยอาหาร แก้ขัดปัสสาวะ
ผล	รสหวานเผ็ดร้อนขม แก้แน่น เจริญอาหาร แก้ลม แก้เสมหะ แก้บิด
ต้น	รสเผ็ดร้อน ขี้บลมให้ผายโร แก่จุกเสียด แก้ท้องร่วง

สารประกอบทางเคมี

เหง้ามีสารประกอบกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

สารประกอบกลุ่ม monoterpene ได้แก่ (+)-angelicoidenodenol-2-O-beta-D-glucopyranoside, borneal, borneol acetate, camphor, para-cymen-8-ol, para-cymene, perillene, rosefuran, tricyclene, borneol methyl ether, camphene hydrate, 1-8-cineol, 3-7-dimethyl-octa-3-cis-6-dien-1-al, 3-7-dimethyl-octa-3-trans-6-dien-1-al, pin-2-en-5-ol, terpinen-4-ol, geraniol-beta-D-glucopyranoside, linalool-beta-D-glucopyranoside, menthan-3-ol, nerol-beta-D-glucopyranoside, 3-7-dimethyl-8-hydroxy-octa-trans-2-cis-6-dien-1-ol-beta-D-glucopyranoside, camphene, car-3-ene, geraniol acetate, alpha-terpinene, alpha-terpineol, 1-8 (2-hydroxy)-cineol, cis-geranic acid, trans-geranic acid, linalool oxide, para-mentha-1-5-diene-7-ol, para-mentha-2-8dien-1-ol, paramenth-1-5-diene-8-ol, para-mentha-1-8-dien-7-ol, nerol oxide, 2-6-dimethyl-octa-2-6-diene-1-8-diol, 2-6-dimethyl-octa-3-7-diene-1-6-diol, 1-8 terpene hydrate, 4-terpineol, citral, citronellal, neral, citronellol, linalool propionate, citronellol acetate, geranial, limonene, geraniol, linalool, geraniam, trans-linalool oxide, menthol, beta-myrcene, perillen, gamma-terpinene, terpinolene, beta-thujone, myrcene, beta-pinene, perilla aldehyde, beta-phellandrene, alpha-phellandrene, alpha-pinene, (+)-beta-phellandrene, dabinene

สารประกอบกลุ่ม Diterpene ได้แก่ galanoactone, glannolactone, 8-beta-(17)-epoxy-labd-trans-12-ene-15-16-dial, 8-beta-labd-trans-12-ene-15-16-dial, 8-beta-17-epoxylabda-trans-8-(17)-12-diene-15-16-dial

สารประกอบกลุ่ม Sesquiterpene ได้แก่ cedrol, guaiol, aromadendrene, calamenene, beta-himachalene, beta-ionone, juniper camphor, alpha-muurolene, 9-oxosessquiterpene hydrocarbon, trans-trans-beta-bisabolene, alpha-farnesene, gamma-bisabolene, beta-caryophyllene, beta-elemene, gamma-eudesmol, farnesal, trans-beta-farnesene, gammamurolene, selina-3-7(11)-diene, xanthorrhizol, caryophyllene, (+)-alpha-curcumene, farnesene, zingerberone, alpha-cedrol, farnesol, nerolidol, alpha-copaene, alpha-curcumene, elemol, beta-eudesmol, cis-nerolidol, trans-nerolidol, beta-santalol, alpha-farnesene, beta-farnesene,

furanogermenone, humulene epoxide 1, humulene epoxide 2, zerumbodienone, cis-selinene-4-ol, alpha-ylangene, beta-sesquiphellandrol, cis-sesquisabinene hydrate, sesquithuene, zingiberenol, zingiberene, alpha-zingiberene, zingiberine, zingiberol, zingiberone

สารประกอบกลุ่ม flavonoid ได้แก่ cysanthemin

สารประกอบกลุ่มอื่น ๆ ได้แก่ caffeic acid, para-coumaric acid, caprylic acid, chavicol, methylheptenone, nonyl aldehyde, capsaicin, curcumin, cyclobutane, cyclohexene, nonan-1-al, nonan-2-one, oct-trans-2-en-al, octan-1-ol acetate, 1-(4-O-beta-D-glucopyranosyl-3-methoxy-phenyl)-3-5-dihydroxydecane, cis-rose oxide, trans-rose oxide, 5-O-beta-D-glucopyranosyl-3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decane, 3(R)-5(S)-diacetoxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decane, 3(R)-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decane, 5(S)-acetoxy-3(R)-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-decane, ethyl myristate, 6-methyl-Hept-5-en-2-one, 2-2-4 trimethyl-heptane, cis-hexan-3-ol, methyl-nonyl-ketone, trans-octen-2-al, eugenol, undecan-2-one, fluoride, furfural, heptan-2-one, hexan-1-al, lauric acid, octan-1-al, undecan-2-ol, 6-gingeracetate, 4-gingeresulfonic acid, shogasesulfonic acid A, shogasesulfonic acid B, shogasesulfonic acid C, shogasesulfonic acid D, 10-gingerdiol, 6-gingerdiol, 6-gingerdiol diacetate, 6-gingerdiol diacetate methyl ether, 6-gingerdiol methyl, 8-gingerdiol, gingerol methyl ether, 4-gingerdiol, paradol, 12-gingerdiol, 12-methylgingerdiol, 6-methylshogaol, 4-gingerdiacetate, 6-gingerdiacetate, 8-gingerdione, 8-dehydrogingerdione, 6-gingerone, 6-gingerdiol, 10-dihydrogin, 1-dehydrogingerdione

ฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity)

1. ฤทธิ์ antitumor สารสกัด จากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ antitumor ในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัด ฉีดเข้าช่องท้อง ในขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
2. ฤทธิ์ขับปัสสาวะ สารสกัด จากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ขับปัสสาวะในหนูขาวใหญ่ เมื่อได้รับสารสกัด ขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง

3. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด สารสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด เมื่อทดลองในหนูขาวใหญ่ให้สารสกัดขนาด 45.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางสายยางลงสู่กระเพาะ

4. ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะ สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารของกระต่าย เมื่อให้สารสกัดในขนาด 169.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบด้วยวิธี agar plate โดยใช้สารสกัด ความเข้มข้น 500.0 ไมโครกรัม/disc พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (strain 7075, BB), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Samonella typhi* (Strain H), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*

6. ฤทธิ์ต้านอักเสบ สารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทานอล 80% มีฤทธิ์ลดไข้ในหนูที่ได้รับสารสกัดในขนาด 100.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยฉีดเข้ากระเพาะ

7. ฤทธิ์ลดไข้ สารสกัดจากเหง้าที่สกัดด้วยเอทานอล 80% มีฤทธิ์ลดไข้ในหนูที่ได้รับสารสกัดในขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยฉีดเข้ากระเพาะอาหาร

8. ฤทธิ์ลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยใช้อาสาสมัครกินขิงในรูปแบบผงในขนาด 5.0 กรัมต่อคน (ADP-induced aggregation)

9. ฤทธิ์ฆ่าพยาธิไส้เดือน สารสกัด จากเหง้า ที่สกัดด้วยเมทานอล ในขนาด 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ฆ่าพยาธิไส้เดือน

10. ฤทธิ์ต้านคลื่นไส้อาเจียน ทดลองในผู้ป่วยหญิงโรค hyperemesis gravidarum 27 คน ผู้ป่วยได้รับผงขิงหรือยาหลอก (placebo) ขนาด 250 มิลลิกรัม วันละ 4 ครั้งเป็นเวลา 4 วัน ผู้ป่วยที่ได้รับผงขิงมีอาการดีขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

11. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) สารสกัด จากเหง้าด้วยเมทานอลในขนาด 0.16 กรัมต่อกิโลกรัม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหนูถีบจักร (ใช้เอทานอล กระตุ้นให้เกิด lipid peroxidation ที่ตับของหนู)

การทดสอบความเป็นพิษ

สารสกัดจากส่วนเหนือดินที่สกัดด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอล และน้ำ (1:1) ถัดเข้าช่องท้องหนูถีบจักรได้ค่า LD₅₀ เท่ากับ 178.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สารสกัดจากเหง้าด้วยเอทานอล 80% ขนาด 3.00 กรัมต่อกิโลกรัมพบว่าความเป็นพิษในหนูถีบจักรเมื่อนิดสารสกัดเข้ากระเพาะสารสกัดจากเหง้า สกัดด้วยเอทานอล 95% ให้ intra veins infusion ขนาด 5.0 มิลลิกรัมต่อตัวทำให้เกิดพิษต่อสุนัขแต่เหง้าจึงให้ทางสายยางสู่กระเพาะในขนาด 20 กรัมต่อตัว ไม่พบความเป็นพิษต่อสุนัขและกระต่ายในขนาด 1-118 กรัมต่อตัว ไม่พบความเป็นพิษ

2.7 การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายในการเตรียมสารสกัดขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายองค์ประกอบสำคัญที่ต้องการและองค์ประกอบอื่นๆ ที่ไม่ต้องการและขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัดที่ต้องการ เตรียมขึ้น สารละลายอาจเป็นตัวทำละลายเดี่ยวหรือเป็นของผสมของตัวทำละลายต่าง ๆ โดยทั่วไป สารละลายมีคุณสมบัติ ดังนี้

- 1) มีความสามารถในการละลายองค์ประกอบสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่น ๆ ได้น้อย
- 2) หาง่ายราคาถูก
- 3) ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย
- 4) มีความคงตัวดี
- 5) ไม่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพร
- 6) ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไปและไม่ติดไฟง่าย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมการสกัดพืชสมุนไพรมีหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติแตกต่างกันดังนี้

1. น้ำ เป็นตัวทำละลายที่ดีหาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายมีข้อเสียหลายประการคือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มากพอๆ กับองค์ประกอบที่สำคัญที่ต้องการ สารเหนียวที่ละลายออกมากับน้ำ เช่นน้ำตาล แป้ง ซึ่งเป็นอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดถ้าไม่ได้ใส่สารกันบูด อีกประการหนึ่งน้ำมีจุดเดือดสูง ดังนั้นถ้าต้องการให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นขึ้นจะต้องใช้ความร้อนสูงในการระเหยน้ำออกไป ซึ่ง

อาจจะเกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบที่สำคัญได้ ดังนั้น ไม่ค่อยใช้น้ำเดี่ยวๆ เป็นตัวทำละลายแต่จะใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆ โดยเฉพาะแอลกอฮอล์น้ำที่เติมกรดลงไปเล็กน้อย (acidified water) ใช้สกัดองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรที่มีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารประกอบพวกอัลคาลอยด์ ส่วนน้ำที่เติมด่างลงไปเล็กน้อย (alkalinized water) ก็จะใช้สกัดพืชสมุนไพรบางชนิด

2. แอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายที่ดีมากมีความไวในการละลายมากกว่าน้ำและยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้แอลกอฮอล์สามารถระเหยได้ง่ายกว่าน้ำ หากต้องการทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้น แต่แอลกอฮอล์ราคาสูงกว่าน้ำ ดังนั้นในการสกัดองค์ประกอบในพืชสมุนไพรจึงควรพิจารณาถึงราคาของตัวทำละลาย

3. กลีเซอริน เป็นตัวทำละลายที่ดีของสารประกอบหลายชนิดในพืชสมุนไพร เช่น แทนนินและ oxidation products ของแทนนิน นอกจากนี้แทนนินยังมีคุณสมบัติเป็นสารกันเสียได้อีกด้วย เนื่องจากกลีเซอริน ระเหยที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจะยังคงอยู่ในสารสกัดขั้นสุดท้าย จึงไม่ควรใช้กลีเซอรินในการเตรียมสารสกัดที่ไม่ต้องการให้มีกลีเซอรินเหลืออยู่ กลีเซอรินมักใช้เป็นตัวทำละลายร่วมกับน้ำหรือแอลกอฮอล์ในการใช้เป็นตัวทำละลาย

4. น้ำผสมแอลกอฮอล์เป็นสารละลายที่ใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางที่สุดมีคุณสมบัติในการละลายองค์ประกอบสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์แต่ราคาถูกกว่าและยังสามารถป้องกันการเสียสภาพของสารสกัดได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำผสมแอลกอฮอล์ยังช่วยป้องกันการแยกตัวขององค์ประกอบในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ซึ่งมักจะเกิดในกรณีที่ใช้ตัวอย่างเดียวในการสกัด

5. เฮกเซน เหมาะสำหรับสารสกัดที่ไม่มีขี้ผึ้งใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับกำจัดไขมันจากสมุนไพร ข้อดีคือราคาไม่แพง

6. คลอโรฟอร์ม เป็นตัวทำละลายที่ดีแต่มีความไว้น้อย เกิดอิมัลชันได้ง่าย ถ้าใช้สกัดสารซึ่งเป็นด่าง แก่อาจจะสลายให้กรดเกลือ

7. อีเทอร์มีฤทธิ์ในการละลายน้อยกว่าคลอโรฟอร์มแต่มีความไวดีกว่า ข้อเสียก็คือระเหยและระเหิดง่าย เกิดออกซิไดซ์ได้ง่ายและดูดซับน้ำได้มาก

8. เมทานอล เป็นตัวทำละลายที่มีอำนาจในการละลายกว้าง ส่วนมากใช้ในการสกัด

องค์ประกอบสำคัญที่มีขี้และยังใช้ทำละลายเอโนไซม์ในพืชด้วย เช่นเดียวกับเอทานอล แต่นิยมใช้เอทานอลมากกว่าเพราะราคาถูกกว่าและเป็นพิษน้อยกว่า

2.8 หลักการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญนั้นมีหลายวิธี เช่น วิธีการหมัก (marceration) วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (percolation) การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ความร้อน (soxhlet extraction) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) การสกัดน้ำมันหอมระเหย (extraction of volatile oil) เป็นต้น ในการเลือกจะใช้วิธีการใดในการสกัดสารสำคัญ พิจารณาจากจุดประสงค์ของงานวิจัยว่าต้องการให้ได้สารสกัดที่สมบูรณ์หรือเกือบสมบูรณ์ เช่น หากต้องการสารสกัดเจือจางอาจใช้วิธีการหมักก็เพียงพอ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาจากคุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด ตลอดจนความพร้อมของอุปกรณ์และเครื่องมือที่มี เพราะแต่ละวิธีการสกัดนั้นมีข้อดี ข้อเสียรวมถึงวิธีการที่แตกต่างกันซึ่งจำเป็นต้องศึกษาการสกัดของแต่ละวิธีและเลือกใช้ให้เหมาะสม (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547)

1. มาเซเรชัน (maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญโดยวิธีการหมักกับน้ำยาสกัด โดยน้ำยาสกัดสามารถแทรกเข้าไปละลายองค์ประกอบออกมาได้การหมักควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท การหมักในน้ำยาสกัดที่เหมาะสมจะใช้เวลา 7 วันหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างการหมักควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วในการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากน้ำยาสกัด วิธีการสกัดนี้ใช้น้ำยาในการสกัดน้อยจึงประหยัด เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนความร้อน (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547) ซึ่งจะทำให้การสกัดสารที่อุณหภูมิห้อง แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด

ตารางที่ 2-7 คุณสมบัติของตัวทำละลายบางชนิดที่ใช้ในการสกัดสารจากพืชสมุนไพร

ตัวทำละลาย	คุณสมบัติ
Ether	เป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ได้จำกัดชนิด ไม่ละลายสารพื้นฐานชนิดอื่น ๆ ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อสมุนไพร ซึ่งเกิดการ Oxidize ได้ง่าย
Hexane	เหมาะสำหรับสารไม่มีขั้วราคาถูก
Acetone	เป็นตัวทำละลายที่กำจัดไขมันได้ดีแต่สามารถละลายสารพื้นฐานในพืชได้บ้างข้อเสียคือมีกลิ่นฉุนกำจัดออกได้ยาก
Chloroform	เป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายได้สารเกือบทุกชนิดแต่ไม่นิยมใช้เนื่องจากไอรระเหยของสารอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ และเป็นสารก่อมะเร็ง
Ester	ตัวทำละลายในการสกัดสมุนไพรทำให้ด้วยสำคัญเข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย
Methylene chloride	เกิดอิมัลชันแต่ทำให้แห้งหรือระเหยได้ยาก
Alcohol	นิยมใช้เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำมี 2 ชนิดคือเมทานอลและเอทานอล มีอำนาจในการละลายสารกว้างมากและยังใช้ทำละลายเอนไซม์ในพืชได้ ลดปฏิกิริยาการสลายตัวของน้ำจืดออกได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูง
Water	เป็นตัวทำละลายที่สำคัญไม่ไวไฟ ไม่เป็นพิษ หาง่ายราคาถูกและสกัดสารได้มากชนิดแต่ไม่มีความคงตัว อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ง่าย ก่อนนำมาใช้ต้องผ่านกระบวนการกำจัดเชื้อก่อน

2. การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) เป็นวิธีการสกัดที่ใช้ความร้อนเข้าช่วย ซึ่งวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้ จะสกัดสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งโดยใช้สารละลาย นิยมใช้อุปกรณ์สกัดที่เรียกว่า ซอกซ์เลตเอ็กซ์แทรกเตอร์ (soxhlet extractor) ซึ่งการทำงานนั้นจะเป็นระบบปิด โดยใช้ตัวทำละลาย ที่มีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจากฮีทติงแมนเทิล (heating mantle) หรือ

หม้ออังไอน้ำ น้ำยาสกัดในภาชนะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบอร์ (thimble) ซึ่งบรรจุตัวอย่างไว้ น้ำยาสกัดวนผ่านลงตัวอย่างหลายครั้ง จนกระทั่งองค์ประกอบในตัวอย่างถูกสกัดออกมา เมื่อน้ำยาสกัดในเอกซ์แทรกติงแชมเบอร์ (extracting chamber) สูงจนถึงระดับเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลลงภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนการสกัดสมบูรณ์ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องเหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสียคือไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนความร้อน และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสมเพราะจะเกิดการแยกตัวของตัวทำละลายแต่ละชนิด เนื่องจากจุดเดือดต่างกันจะทำให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างกันไปจากเดิมและผลการสกัดไม่ดีเท่าที่ควร (รัตน อินทรานุปกรณ, 2547)

3. การสกัดแบบใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟ (microwave assisted extraction, MAE) วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้คลื่นรังสีไมโครเวฟในการให้ความร้อนแก่ตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะแพร่ความร้อนไปสู่ตัวอย่างทำให้เกิดการแยกขององค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างไปสู่ตัวทำละลาย วิธีการสกัดแบบนี้เหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลืองใช้เวลาในการสกัดน้อยมาก

4. การสกัดแบบใช้เครื่องความถี่สูง (ultrasound sonicator extraction, UE) วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้คลื่นเสียงในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างแล้วทำให้องค์ประกอบเคมีของตัวอย่างแพร่สู่ตัวทำละลาย วิธีการสกัดแบบนี้ใช้เวลาในการสกัดน้อยเหมาะกับการสกัดองค์ประกอบที่ไม่ทนความร้อนและใช้น้ำยาในการสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง (Trusheva et al., 2007)

2.9 การทำให้สารสกัดจากตัวอย่างให้เข้มข้น (preconcentration)

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจางทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สมบูรณ์และไม่มีประสิทธิภาพจึงต้องนำมาทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยวิธีดังนี้

1. การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (water bath) วิธีนี้อาจทำให้สารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงและหากใช้สารละลายอินทรีย์ในการสกัด การระเหยโดยใช้ความร้อนโดยตรงบนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญเมื่อใช้ความร้อน

2. การกลั่นในสุญญากาศ จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำพร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโปเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหนาแน่นที่จะกลั่น ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย และภาชนะรองรับสารละลายหลังจากการกลั่นโดยการสกัดอย่างหนาแน่นซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออ่างไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุนตลอดเวลาที่ทำงานเพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารอย่างหนาแน่นนี้จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่นซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่อตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับโดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุควบแน่นที่คอนเดนเซอร์และหยดลงมาภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น ซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

2.10 เครื่อง Flow cytometry

Flow cytometry เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ โดยอาศัยหลักการกระเจิงของแสงเลเซอร์เมื่อตกกระทบเซลล์หรือโมเลกุลของสารเรืองแสงที่ติดกับสารภายในเซลล์ ทำให้สามารถวัดขนาดของเซลล์ ทราบถึงความซับซ้อนขององค์ประกอบภายในเซลล์ ทราบถึงชนิดของเซลล์ ทราบปริมาณสารภายในเซลล์ เทคนิคนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น การนับจำนวนเซลล์ การแยกชนิดของเซลล์ ทำได้โดยการย้อมติดสีด้วยสารสีเรืองแสงแล้วจึงนำนิวเคลียสนั้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer นำค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่วัดจากการเรืองแสงของสารสีเรืองแสงของตัวอย่างซึ่งเป็นค่าที่สะท้อนถึงปริมาณดีเอ็นเอภายในเซลล์ไปเปรียบเทียบกับค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์มาตรฐานและเซลล์อ้างอิงที่ทราบถึงขนาดของจีโนมและทราบจำนวนชุดของโครโมโซมที่แน่นอนแล้ว จะทำให้เราทราบขนาดของจีโนมหรือจำนวนชุดของโครโมโซมของพืชที่ศึกษาได้

Flow cytometry เป็นเทคโนโลยีที่ใช้วัดและวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของเซลล์ เช่น ขนาดของเซลล์ ความซับซ้อนขององค์ประกอบภายในเซลล์ ตรวจสอบโปรตีนหรือสารต่างๆ ที่อยู่ในเซลล์หรือบนผิวเซลล์ โดยอาศัยหลักการกระเจิงของแสงเลเซอร์และการเปล่งแสงของโมเลกุลที่เกิดจากการกระตุ้นของแสงเลเซอร์หลังจากกระทบกับเซลล์หรืออนุภาคหนึ่งๆ ที่

แขวนลอยอยู่ในระบบของเหลว ในระบบ flow cytometry เซลล์จะถูกเตรียมและทำให้แขวนลอยในของเหลวและไหลผ่านลำแสงเลเซอร์ที่ละเซลล์ เมื่อแสงเลเซอร์กระทบกับเซลล์จะทำให้เกิดลำแสงหลายรูปแบบ ลำแสงเหล่านี้จะถูกแยกออกจากกันหลังจากผ่านตัวกรองแสง (filters) ชนิดต่างๆ หลังจากนั้นลำแสงจะถูกรวบรวมและตรวจสอบโดย detector ซึ่งจะเปลี่ยนสัญญาณแสงเป็นสัญญาณไฟฟ้าที่เก็บข้อมูลและวิเคราะห์ได้ด้วยระบบคอมพิวเตอร์

ระบบ flow cytometry ถูกประยุกต์ใช้ในงานหลายๆ ด้าน เช่น

- ใช้ในการวัดปริมาณ ขนาดหรือแยกชนิดของเซลล์ต่างๆ ที่สนใจ โดยอาศัยการติดตามโปรตีนที่จำเพาะต่อเซลล์ชนิดที่ศึกษานั้นๆ เช่น ในทางการแพทย์ใช้นับจำนวนเซลล์มะเร็ง เซลล์ที่ติดเชื้อ HIV

- ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติของเซลล์ หรือสารภายในเซลล์ เช่น การตรวจปริมาณ chlorophylls, fatty acids ภายในเซลล์ของสาหร่ายเซลล์เดียว เพื่อตรวจสอบคุณภาพของเซลล์สาหร่ายที่ใช้ในการผลิตน้ำมัน

- ใช้ในการตรวจสอบการแตกหักของโครโมโซมหรือดีเอ็นเอ โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเบสอะดีนีนที่แตกหักจากสายดีเอ็นเอ เป็นต้น

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคมะเร็งเป็นโรคที่เกิดจากการที่เซลล์ปกติเกิดการกลายพันธุ์ระดับยีนและแปรสภาพกลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยมีลักษณะที่สำคัญคือเซลล์มีการแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้ ลูกหลานไปยังเนื้อเยื่ออื่นอยู่รอบข้างและแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย ซึ่งจากลักษณะต่าง ๆ นี้ทำให้ นักวิจัยส่วนใหญ่พยายามศึกษาหาแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งอย่างต่อเนื่องแม้ว่าสารเคมีบำบัดส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันจะมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในขั้นตอนต่าง ๆ ได้แต่ก็ยังไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งให้หมดไปได้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดผลข้างเคียง เช่น การกดไขกระดูก เป็นต้น ดังนั้นการแสวงหาสารชนิดใหม่จากแหล่งต่างๆ เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งจึงมีความจำเป็นอย่างมาก พืชสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะเข้ามามีบทบาทในการรักษาโรคมะเร็งได้

ได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายงานวิจัยซึ่งสามารถสรุปได้ดังในตาราง

ตารางที่ 2-8 รายชื่อนุพันธ์ของพืชที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
1	Vindesine and Vinorelbine	<i>Catharanthus</i> <i>roseus</i> (แพงพวยฝรั่ง)	มะเร็งเม็ด เลือดขาว มะเร็งต่อม น้ำเหลือง มะเร็งอวัยวะ ชั้นสูง มะเร็ง เต้านม มะเร็ง ปอด และ มะเร็งเยื่อ โพรงมดลูก เจริญผิดปกติ	Mitotic block	Cragg and Newman, 2005
2	Vinflunine	<i>Catharanthus</i> <i>roseus</i> (แพงพวยฝรั่ง)	ลดความเป็น พิษในการ ทดสอบใน สัตว์	Mitotic block	Okouneva et al., 2003; Simeons et al., 2008
3	Etoposide and Teniposide	<i>Podophyllum</i> <i>peltatum</i> and <i>Podophyllum</i> <i>emodi</i> (mayapple)	มะเร็งต่อม น้ำเหลือง มะเร็ง หลอดลม และอวัยวะ	-	Shoeb, 2006
4	Taxol Taxotere	<i>Taxus</i> <i>brevifolia</i> Nutt, (สนฮิว)	การ แพร่กระจาย มะเร็งเต้านม รังไข่ ปอด มะเร็งต่อม	Mitotic block	Kingston, 2007

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
			ดูหมาก และมะเร็ง ต่อม น้ำเหลือง		
5	Topotecan	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt, <i>Taxus baccata</i> (สนยิว)	ใช้ในผู้ป่วยที่ คือต่อยา Paclitaxel	Mitotic block	Hait et al., 2007
6	Irinotecan	<i>Camptotheca acuminate</i>	มะเร็งเยื่อ ผิวรังไข่และ มะเร็งปอด	การยับยั้ง DNA topoisomerase I	Creemers et al., 1996
7	Irinotecan	<i>Camptotheca acuminate</i>	มะเร็งระยะ ลุกลามและ มะเร็งลำไส้ ใหญ่	การยับยั้ง DNA topoisomerase I	Fuchs et al., 2006
8	Exatecan	<i>Camptotheca acuminate</i>	ฤทธิ์ต้านเนื้อ งอกที่อาจ เกิดขึ้นทั้งใน หลอด ทดลองและ ในร่างกาย	การยับยั้ง DNA topoisomerase I	Mineko et al., 2000
9	LE-SN-38	<i>Camptotheca acuminate</i>	เซลล์มะเร็ง ต่างๆ	การยับยั้ง DNA topoisomerase I	Zhang et al., 2004

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
10	Berberamine	<i>Berberis amarensis</i> (Amur barberry)	มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิดไมอี ลอยด์เรื้อรัง	Caspase-3-dependent apoptosis	Xie et al., 2009; Xu et al., 2006
11	Berberine	<i>Hydrastis Canadensis</i> L., <i>Berberineeris</i> sp& <i>Arcungelisia</i> flaw	มะเร็งกระดุก ปอด ตับ ต่อม ลูกหมาก และมะเร็ง เต้านม	ยังไม่ทราบแน่ชัด	Wang et al., 2011; Patil et al., 2010
12	Beta- lapachone	<i>Tabebuia avellanedae</i>	มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อม ลูกหมาก มะเร็งปอด มะเร็งตับ อ่อน และ มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิด promyelocytic	การยับยั้ง topoisomerase I และ II	Li et al., 2000; De Almeida, 2009
13	Betulinic acid	<i>Betula alba</i> (ซิลเวอร์เบิร์ช)	ยับยั้งฤทธิ์ ต้านมะเร็งใน มนุษย์	กระตุ้นการตายของ เซลล์ในวิถีไมโทคอน เดรียของ	Fulda, 2008
14	Colchicine	<i>Colchicum autumnale</i> and	มะเร็งเม็ด เลือดขาวและ	Anti-mitotic	Dubey et al., 2008

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
		<i>Gloriosa superba</i> L. (พืชในวงศ์ ดองดึง)	เนื้องอกชนิด solid tumors		
15	Combretastatin A-4	<i>Combretum caffrum</i> Kuntze	การทดลอง ทางคลินิก ระยะที่ 2	หยุดการสร้าง Tubulin	Thomson et al., 2006; Ley et al., 2007
16	Cucurbitacin	Cucurbitaceae species	เซลล์มะเร็ง ต่างๆ	ยับยั้งตัวสร้าง สัญญาณ/ยับยั้ง JAK 2 และยับยั้งการทำงาน STAT3	Molavi et al., 2008; Bernard and Llayinka et al., 2010
17	Curcumin	<i>Curcuma longa</i> (ขมิ้นชัน)	มะเร็งลำไส้ ใหญ่ multiple myeloma และมะเร็ง ตับอ่อน	กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่แน่ชัด	Sa et al., 2010; Goel et al., 2008
18	Daphnoretin	<i>Wikstroemia indica</i>	a) Ehrlich ทำให้เกิดมะเร็งในช่องท้อง และ b) เซลล์ Hep3B ตับของมนุษย์	a) กดการสร้างโปรตีนและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ b) ยับยั้งการแสดงออกของแอนติเจนที่ผิวตัวอีกเสบปี	Lu et al., 2011; Diogo et al., 2009

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
19	Diadzein and Genistein	<i>Lupinus</i> species, <i>Vicia</i> <i>faba</i> , <i>Glycine</i> <i>max</i> , <i>Psoralea</i> <i>corylifolia</i>) (โกฐนยนิ์)	Genistein ยับยั้งมะเร็ง รังไข่และ มะเร็งเต้านม และมะเร็งที่ เกิดจาก สารเคมีใน กระเพาะ อาหาร กระเพาะ ปัสสาวะ ปอด ต่อม ลูกหมาก ลำไส้ใหญ่ และเลือด	ยับยั้งการเผาผลาญ 3A 4- และปฏิกิริยา ออกซิเดชัน	Kaufman et al., 1997; Moon et al., 2006, Dixon and Ferreira et al., 2002
20	Ellipticine	<i>Ochrosia</i> <i>borbonica</i> , <i>Excavatia</i> <i>coccinea</i> , <i>Ochrosia</i> <i>elliptica</i>	เซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ	การแทรกสอดของ สาย DNA และการ ยับยั้ง topoisomerase II	Kao et al., 2006
21	Emodin	Rhizome of rhubarb	มะเร็งปอด ตับ รังไข่ และเม็ดเลือด	กระตุ้นการตายของ เซลล์มะเร็งได้หลาย ช่องทาง	Huang et al., 2009

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
22	Flavopiridol	<i>Amoora rohituka</i> and <i>Dysoxylum binectariferum</i>	มะเร็งลำไส้ ใหญ่และไส้ ตรง มะเร็ง ปอด มะเร็ง เซลล์ไต มะเร็งต่อม น้ำเหลือง มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิดлимโฟ ซิติกรเรื้อรัง และเนื้องอก ที่เป็นก้อน	ยับยั้งการลุกลาม ของวัฏจักรเซลล์ที่ ระยะ G1 หรือ G2	Mans et al., 2000
23	Harringtoni ne and Homoharrin gtonine	<i>Cephalotaxus harrintania</i> , <i>C. hainanensis</i> and <i>C. qinensis</i>	มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิด เนื้องอก แบบมัยอิ ลอยด์และ มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิดเรื้อรัง แบบไมอิ ลอยด์	การยับยั้งการ สังเคราะห์โปรตีนและ การสร้างสาย DNA	Cragg and Newman, 2005; Efferth et al., 2007

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
24	Indirubin	Chinese herb, Danggui Longhui Wan	มะเร็งเม็ด เลือดขาว ชนิดไมอี ลอยด์เรื้อรัง	ยับยั้งไคเนสที่ขึ้นกับ cyclin9	Nam et al., 2005
25	Ingenol 3-o- angelate	<i>Euphorbia peplus</i> L.	Actinic keratosis และมะเร็ง เซลล์ต้น กำเนิด	ทำให้เกิดเนื้อร้ายของ เนื้องอกโดยการ กระตุ้นของPKC	Hampson et al., 2005
26	4- Ipomeanol	<i>Ipomoea batatas</i>	มะเร็งปอด ใน สัตว์ทดลอง	Cytochrome P-450 เป็นสื่อกลางในการ แปลงเป็นสารที่จับกับ ดีเอ็นเอ	Ancuceanu and Istudor, 2004
27	Irisquinone	<i>Iridanthea elatea pullasii</i> and <i>Iris kumaoensis</i>	การศึกษาเนื้อ งอกในหนูที่ สามารถปลูก ถ่ายได้	ทำหน้าที่เป็นตัวทำ ปฏิกิริยาเคมี	Hazra et al., 2004
28	Phenoxodio l	Plant isoflavone, genistein	มะเร็งรังไข่ ต่อม ลูกหมาก และมะเร็ง ปากมดลูก	ยับยั้งการขนส่งเยื่อหุ้ม เซลล์พลาสมาและการ เพิ่มจำนวนเซลล์	Herst et al., 2009
29	Pandimex	Saponins of ginseng	มะเร็งเต้านม ลำไส้ใหญ่- ทวารหนัก ปอด ตับอ่อน	หยุดวงจรเซลล์และทำ หน้าที่เป็นตัวบล็อก P- glycoprotein	Pan et al., 2010

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
			และก้อนเนื้อ งอก		
30	Perillyl alcohol	พืชหลายชนิด เช่น มินต์ เซอร์ รี ลาเวนเดอร์ และอื่น ๆ	มะเร็งปอด มะเร็งต่อม ลูกหมาก มะเร็งลำไส้ และมะเร็ง เต้านม	กลไกที่แน่นอนยังไม่ สามารถระบุได้	Pan et al., 2010; Bardona et al., 2002; Yeru va et al., 2007
31	Pervilleines	<i>Erythroxylum pervillei</i>	ยังไม่เสร็จ	สารยับยั้ง P- glycoprotein	Mi et al., 2001; Mi et al., 2002; Mi et al., 2003
32	Salvicine	<i>Salvia prionitis Hance</i>	มะเร็ง	การยับยั้ง topoisomerase II	Deng et al., 2011
33	Schischkinn in	<i>Centaurea schischkinii</i>	เซลล์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่ใน หลอด ทดลอง	ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด	Shoeb et al., 2005
34	Montamine	<i>Centaurea Montana</i>	เซลล์มะเร็ง ลำไส้ใหญ่ CaCo2 ใน หลอด ทดลอง	ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด	Shoeb et al., 2006

ลำดับ ที่	สารอนุพันธ์ พืช	ชื่อ Genus และ Species	การทดลอง เกี่ยวกับ เซลล์มะเร็ง ต่าง ๆ	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
35	Silvestrol	<i>Aglaia foveolata</i> Panell	มะเร็งต่อม ลูกหมาก มะเร็งเต้านม และปอด	วิธีการตายของเซลล์ มะเร็ง	Kinghom et al., 2009; Kim et al., 2007
36	PG490-88	<i>Tripterygium wifordii</i> Hook F	มะเร็งต่อม ลูกหมาก	เสริมฤทธิ์ต้านเนื้องอก ของสารที่เป็นพืชต่อ เซลล์และเคมีบำบัด ซึ่งทำให้เกิดการตาย ของเซลล์	Liu, 2011

จากตารางแสดงให้เห็นว่า มีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการศึกษาสารที่สกัดได้จากพืชในการยับยั้งและป้องกันการเกิดมะเร็งทั้งในหลอดทดลอง สัตว์ทดลองและในมนุษย์ และมีการทดลองในมะเร็งหลากหลายชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด เป็นต้น ซึ่งจากการรวบรวมงานวิจัยพบว่ายังไม่มีการศึกษาในมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งมะเร็งชนิดนี้พบสูงสุดที่ประเทศไทยในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรในพิกัดยาเบญจกูล ซึ่งพิกัดเบญจกูลนี้มีการนำสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ดิปลิ รากข้าวปลู เกาสะค่าน รากเจตมูลเพลิงแดง และจิง โดยใช้ในอัตราส่วนที่เท่ากัน เพื่อปรับธาตุในร่างกายให้เกิดความสมดุลตามหลักการรักษาของแพทย์แผนไทย ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 1. ตู้อบลมร้อน | 9. Inverse Light Microscopy |
| 2. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง | 10. Liquid Nitrogen Tank |
| 3. เครื่องบดละเอียด | 11. Centrifuge |
| 4. Rotary evaporator | 12. Spectrophotometer |
| 5. Freeze dryer | 13. ชุด Electrophoresis |
| 6. Vacuum pump | 14. เครื่อง Image Quant Imager |
| 7. CO ₂ incubator | 15. เครื่อง Flow cytometry |
| 8. Laminar flow | |

อุปกรณ์

- | | |
|--|--------------------------------|
| 1. กระดาษกรอง Whatman No.1 | 6. ถาดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 6 หลุม |
| 2. ผ้าก๊อช | 7. ถาดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 24 หลุม |
| 3. กรวยกรอง | 8. ถาดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 96 หลุม |
| 4. ขวด Duran สีขาว ขนาด 1000 มิลลิลิตร | 9. Auto pipette |
| 5. ปีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร | 10. Tip |
| | 11. เข็มฉีดยา+ Syringe |

สารเคมี

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| 1. 95% เอทานอล | 6. 5-fluorouracil |
| 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ HAM's F12 | 7. Bradford |
| 3. Bovine serum albumin (BSA) | 8. PVDF membrane |
| 4. Trichloroacetic acid | 9. 10% SDS-polyacrylaide |
| 5. Acetic acid | 10. Skim milk |

11. TTBS

14. PBS

12. TBS

15. Annexin-V

13. HRP conjugated secondary antibody

16. Propidium iodide staining

3.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาเบญจกูล

3.1.1 การอบสมุนไพร

การเตรียมสารสกัดตำรับยาเบญจกูล สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือตำรับยาเบญจกูลซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ผลดีปลี รากข้าพลุเถาสะถ้าน รากเจตมูลเพลิงแดง และเหง้าจิง เมื่อได้สมุนไพรสด นำมาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำเข้าตู้อบโดยใช้อุณหภูมิในการอบ 60 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง เพื่อให้สมุนไพรแห้ง (รูปที่ 3-1)



a)



b)



c)



d)

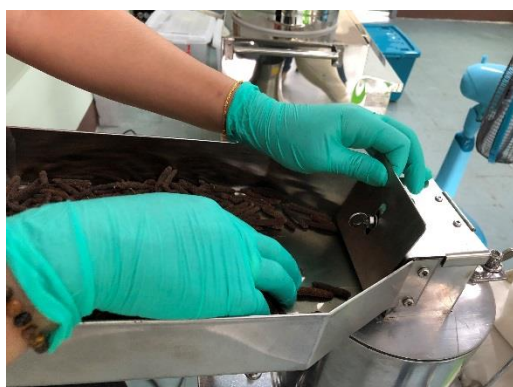


e)

รูปที่ 3-1 สมุนไพรในตำรับยาเบญจกูล หลังจากอบแห้ง ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ a) ผลดีปลี b) รากข้าวพุด c) เถาสะค้าน d) รากเจตมูลเพลิงแดง และ e) เหง้าขิงแห้ง (ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

3.1.2 การบดและหมักสมุนไพร

เมื่อได้สมุนไพรแห้งจากการอบแล้ว จากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องบดแบบละเอียด (รูปที่ 3-2) จากนั้นนำสมุนไพรแต่ละชนิดชั่งน้ำหนัก ปริมาณ 200 กรัม เพื่อนำมาหมักด้วย 95% เอทานอล เป็นเวลา 3 วัน แยกเป็นสมุนไพรชนิดเดียว ส่วนตำรับยาเบญจกูลนั้น ชั่งสมุนไพรแต่ละชนิด ปริมาณ 40 กรัม จากนั้นนำมาผสมให้เข้ากันจะได้สมุนไพรในตำรับยาเบญจกูล ปริมาณ 200 กรัม จากนั้นหมักด้วย 95% เอทานอลปริมาณ 500 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 3-2 การบดสมุนไพรโดยใช้เครื่องบดสมุนไพรแบบละเอียด (ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

3.1.3.การกรองสารละลายสมุนไพร

หลังจากหมักสมุนไพร และหมั่นคนให้เข้ากันครบ 3 วันแล้วจากนั้นนำสมุนไพรแต่ละชนิด กรองผ่านผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 01 โดยกรองใส่ขวด Duran สีชา กากที่เหลือจากการกรอง จะนำมาเติม 95% เอทานอล ปริมาณ 500 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 01 หมักและกรองซ้ำ โดยจะทำทั้งหมด 3 รอบเพื่อให้ได้สารสำคัญจากสกัดจากสมุนไพรครบถ้วน

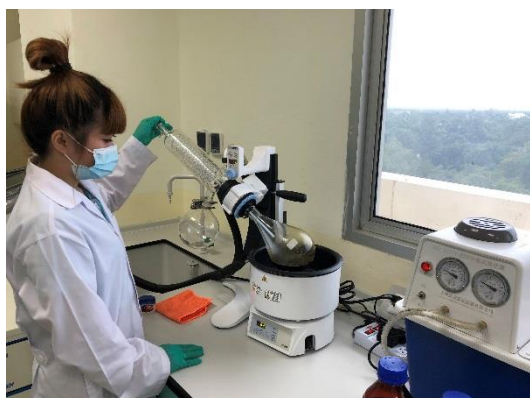




รูปที่ 3-3 การกรองสารสกัดสมุนไพร โดยกรองผ่านผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman No.1
(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

3.2 การระเหยตัวทำละลาย

เมื่อได้สารละลายสมุนไพรแต่ละชนิดแล้ว นำมาระเหยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ออก โดยนำสารละลายสมุนไพรแต่ละชนิดเทลงในขวดก้นกลม และนำไปเข้าเครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Rotary evaporator) (รูปที่ 3-4) จนเริ่มแห้ง จากนั้นทำซ้ำจนตัวทำละลายระเหยหมด โดยสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการสกัด 3-4 ชั่วโมง เมื่อได้สารสกัดที่มีลักษณะหนืดข้น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 เซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่



รูปที่ 3-4 การระเหยตัวทำละลายโดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายสุญญากาศ (Rotary evaporator)
(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

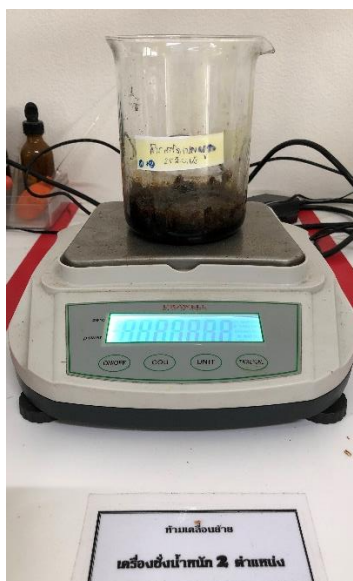
3.3 การระเหยแห้ง (Freeze dry)

นำสารสกัดที่ได้ นำไประเหยแห้งอีกครั้ง จากนั้นทำให้แห้ง โดยการ freeze dry (รูปที่ 3-5) โดยการลดอุณหภูมิลงถึง -96 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาการระเหยแห้ง 24-48 ชั่วโมง จนกระทั่ง สารสกัดเป็นผง



รูปที่ 3-5 การระเหยแห้งสารสกัดโดยใช้เครื่องระเหยแห้ง (Freeze dryer)
(ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

จากนั้นทำการเก็บสารสกัดไว้ทำการทดสอบโดยชั่งน้ำหนักสารที่ได้แต่ละชนิดเพื่อคำนวณ ปริมาณสารสกัดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของผงยาที่ชั่งเมื่อเริ่มต้น (รูปที่ 3-6)



รูปที่ 3-6 ชั่งน้ำหนักสารที่ได้แต่ละชนิดเพื่อคำนวณปริมาณสารสกัดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของผงยาที่ชั่งเมื่อเริ่มต้น (ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2021)

3.4 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

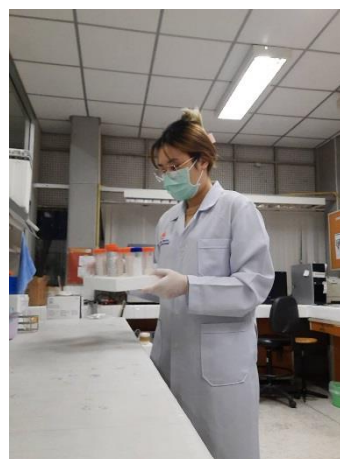
3.4.1 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKKU-M213 และ KKKU-M214 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ (MMNK-1) โดยเติมเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวลงในถาดเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุมให้มีเซลล์ประมาณ 2,000 เซลล์ ปริมาตร 100 μL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HAM F'12 ที่มี 10% bovine serum albumin (BSA) จากนั้นเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง คูลสารละลายทั้งหมดออกจากหลุม แล้วเติมสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นต่าง ๆ เติมนลงในหลุมทดสอบ ปริมาตร 100 μL แล้วเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) โดยใช้วิธี sulforhodamine B assay คูลอาหารเลี้ยงเชื้อออก จากนั้นใส่สาร trichloroacetic acid ความเข้มข้น 10% ในแต่ละหลุมปริมาตร 100 μL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 ครั้ง หลังจากที้นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาทีแล้วจึงเติม 4% SRB ปริมาตร 50 μL ทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นล้างด้วย 0.1% acetic acid จำนวน 3 ครั้ง นำไปอบให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที และละลายสีออกจากเซลล์ด้วย 10 mM tris-base ปริมาตร 200 μL พร้อมทั้งเขย่าจนเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm (Tecan, Switzerland) โดยมีตัวควบคุมชนิดบวกคือ 5-fluorouracil และรายงานค่าเป็นความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่ สามารถยับยั้งเซลล์ได้ (half maximal inhibitory concentration; IC₅₀) (รูปที่ 3-7)



รูปที่ 3-7 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2022)

3.5 การทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค Flow cytometry

Flow cytometry เทคนิคนี้เป็นการทดสอบว่าเซลล์เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis โดยจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีในถาดขนาด 6 หลุม จำนวนเซลล์ 60,000 เซลล์ต่อหลุม ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ในตู้ incubator อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส , 5% CO₂ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมสารสกัดความเข้มข้น IC₅₀ ที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษของตำรับยาเบญจกูลต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการ trypsinized นำเซลล์ที่ได้ล้างด้วย PBS เย็น ก่อนทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 RCF(g) นาน 5 นาที ต่อมาทำการย้อมสี annexin-V และ propidium iodide staining ซึ่งจะ re-suspend เซลล์ด้วย annexin-V และ propidium iodide (50:1) ใน incubation buffer ที่เตรียมไว้ลงในแต่ละหลุม 100 μ L แล้วนำไป incubate ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometry ซึ่งข้อมูลที่ได้จะถูกแปลผลเพื่อใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการรายงานผลต่อไป (รูปที่ 3-8)



รูปที่ 3-8 ทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis
โดยใช้เทคนิค Flow cytometry (ที่มา:คณะผู้วิจัย, 2022)

3.6 ศึกษาผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 24 well plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ HAM's F12, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin นำไป incubate ที่ 37°C, 5% CO₂ เมื่อได้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 90% แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วใช้ปลาย microtip ขีดจากขอบ well ด้านหนึ่ง ไปยังด้านตรงข้าม โดยให้อยู่ระหว่างกลางของ well จากนั้นล้าง เซลล์ที่หลุดออก ด้วย PBS buffer แล้วตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ และถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่เวลา 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยการวัดการ

เคลื่อนที่ของเซลล์ จากนั้นติดตามผลการเคลื่อนที่ของเซลล์อย่างต่อเนื่องพร้อมกับถ่ายภาพเซลล์เพื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาที่เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด

บทที่ 4

ผลการวิจัย

คณะผู้วิจัยได้สกัดสารสำคัญจากตำรับยาเบญจกูลโดยใช้วิธีทางเคมี (Ethanollic Extract) ในการสกัดสารสำคัญซึ่ง ตำรับยาเบญจกูล ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ผลดิบปลี รากข้าวพุลู เถา สะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าชิง และนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดย 1) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2) ทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และ 3) ศึกษาผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลเทียบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยมีผลการวิจัย ดังนี้

4.1 สารสกัดหยาบจากสมุนไพรตำรับยาเบญจกูล

เมื่อนำสมุนไพรที่ตากแห้ง มาบดด้วยเครื่องบดละเอียด จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก ปริมาณ 200 กรัม จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ด้วยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน (ทำการแช่หมักซ้ำ 3 ครั้ง) หลังจากนั้นทำการกรองสารละลายโดยใช้ผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman No.1 ผ่านกรวยแก้ว จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบที่มีตัวทำละลายเป็น 95% เอทานอล ตามตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักสารสกัดหยาบ ร้อยละผลผลิต และลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร 5 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาเบญจกูล

สมุนไพร	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	ร้อยละผลผลิต	ลักษณะทางกายภาพ
เบญจกูล	200	9.6	ของเหลวหนืดสีดำ-น้ำตาล
ดีป्ली	200	11.4	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล-แดง
รากข้าวพุลู	200	5.6	ของเหลวหนืดสีดำ
เถาสะค้าน	200	6.2	ของเหลวหนืดสีดำ-น้ำตาล
รากเจตมูลเพลิงแดง	200	15.9	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม-ดำ
เหง้าชิงแห้ง	200	7.4	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล-แดง

จากการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด และตำรับยาเบญจกูล พบว่าเมื่อทำการสกัดโดยแช่หมักด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอลจะได้ร้อยละของสารสกัดหยาบเรียงลำดับจากน้อยไปหามากได้ดังนี้ รากข้าวพุลู (5.6%), เถาสะค้าน (6.2%), เหง้าชิงแห้ง (7.4%), ตำรับเบญจกูล (9.6%), ดีป्ली (11.4%) และรากเจตมูลเพลิงแดงมากที่สุด (15.9%)

4.2 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

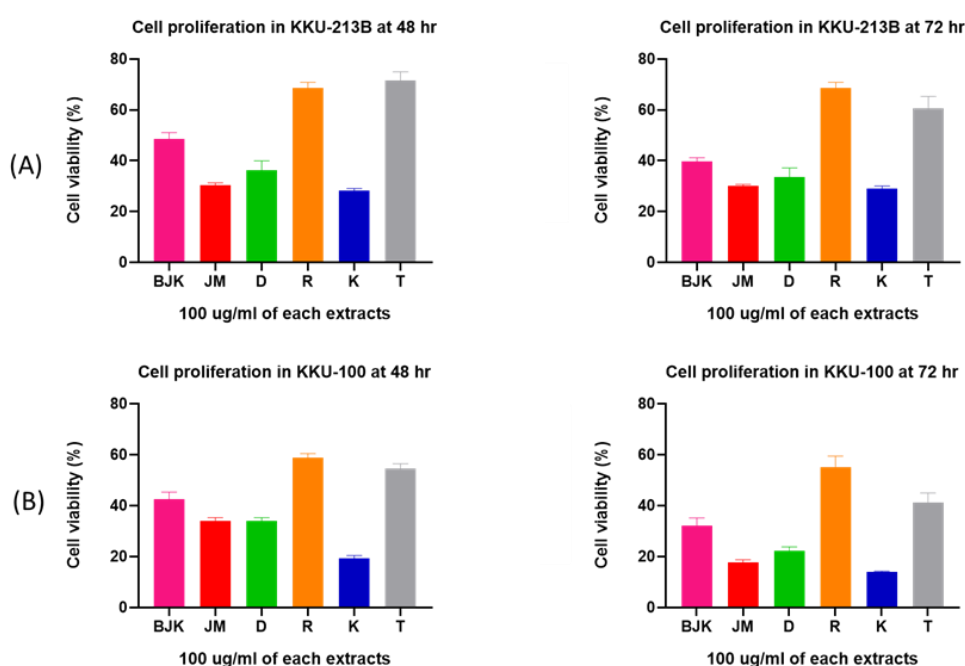
Methyl tetrazolium 3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นเทคนิคการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ วิธีการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโคลน KKU-M213 และ KKU-M100 โดยเลี้ยงเซลล์ แต่ละชนิดในถาดเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม เติมสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิดและสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 100 µg/mL เติมลงในหลุมทดสอบปริมาตร 100 µL แล้วเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability)

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับดังนี้ จิง (K) ร้อยละ 28.07 รากเจตมูลเพลิงแดง (JM) ร้อยละ 30.21 ผลดีป्ली (D) ร้อยละ 36.22 ตำรับยาเบญจกูล (BJK) ร้อยละ 48.47 รากข้าวพุลู (R) ร้อยละ 68.49 และเถาสะค้าน (T) ร้อยละ 71.47 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ 72 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับดังนี้ จิง ร้อยละ 28.89 รากเจตมูลเพลิงแดง ร้อยละ 29.94 ผลติป्ली ร้อยละ 33.65 ตำรับยาเบญจกูล ร้อยละ 39.60 รากข้าวพุล ร้อยละ 55.31 และเถาสะก้าน ร้อยละ 60.68 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี KKU-M100 ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับดังนี้ จิง ร้อยละ 19.33 รากเจตมูลเพลิงแดง ร้อยละ 33.89 ผลติป्ली ร้อยละ 33.93 ตำรับยาเบญจกูล ร้อยละ 42.58 เถาสะก้าน ร้อยละ 54.55 และรากข้าวพุล ร้อยละ 58.71 ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี KKU-M100 ที่ 72 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับดังนี้ จิง ร้อยละ 13.82 รากเจตมูลเพลิงแดง ร้อยละ 17.54 ผลติป्ली ร้อยละ 22.20 ตำรับยาเบญจกูล ร้อยละ 32.17 เถาสะก้าน ร้อยละ 41.27 และรากข้าวพุล ร้อยละ 55.18 ตามลำดับ (รูปที่ 4-1)

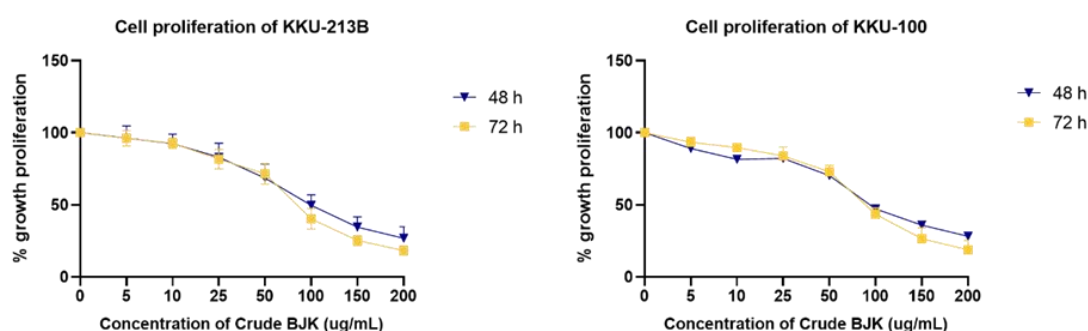


รูปที่ 4-1 เทคนิค MTT assay ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง : (A) KKU-213B (B) KKU-100

จากนั้นทำการทดสอบสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลเพื่อทดสอบว่าความเข้มข้นในปริมาณใดจะทำให้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีลดลงได้ครึ่งหนึ่ง (IC50) วิธีการทดสอบโดยทำการ

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีโคลน KKU-M213 และ KKU-M100 โดยเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิดในถาดเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม เติมสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ เติมลงในหลุมทดสอบปริมาตร 100 μL แล้วเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) รายงานค่าเป็นความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ (half maximal inhibitory concentration; IC_{50})

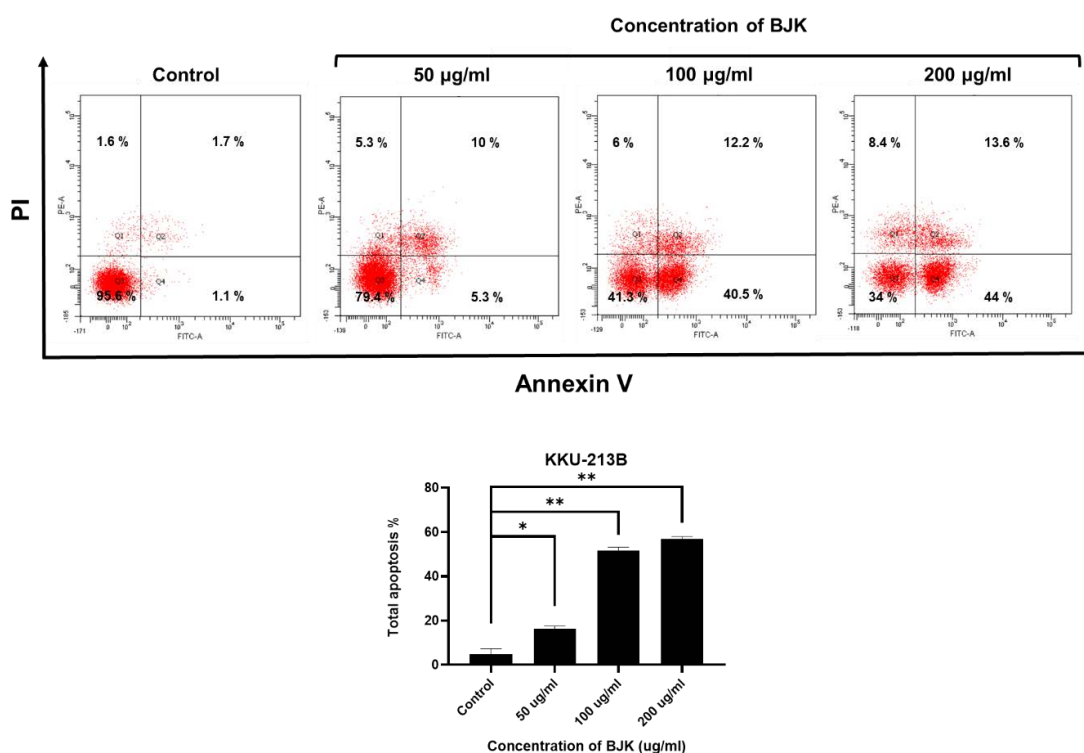
นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีแต่ละชนิดในถาดเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม เติมสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ เติมลงในหลุมทดสอบปริมาตร 100 μL แล้วเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) รายงานค่าเป็นความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) พบว่าเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีโคลน KKU-213B ที่ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลที่เวลา 48 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี ที่ 93.61 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีได้ร้อยละ 50 และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี ที่ 76.13 $\mu\text{g/mL}$ และ เซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีโคลน KKU-100 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลที่เวลา 48 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี ที่ 89.94 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีได้ร้อยละ 50 และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดี ที่ 80.16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 4-2)



รูปที่ 4-2 ความสามารถของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีโคลน KKU-213B และ KKU-100 ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง

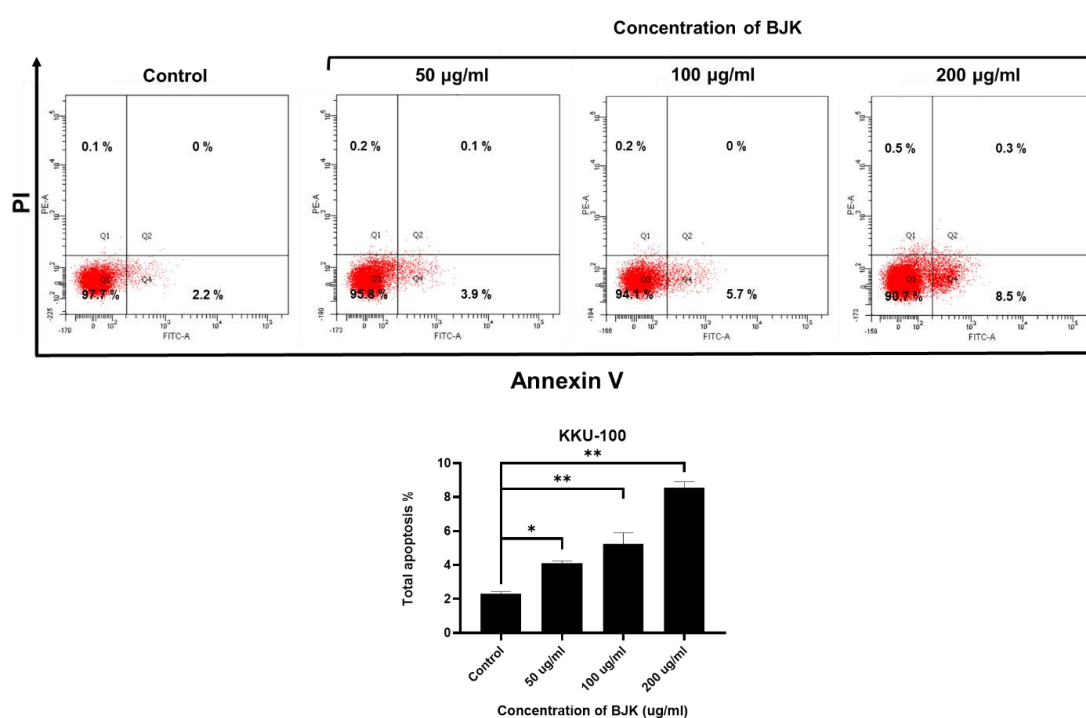
4.3 การทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค Flow cytometry

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลในการกระตุ้นการตายของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะถูกวัดด้วย the Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog no. V13241) โดยจากผลการศึกษพบว่าสารสกัดเบญจกูล สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านกระบวนการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยจากรูปที่ 4-3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B ภายใน 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ โดยมีอัตราการตายร้อยละ 16.2 ± 1.273 , 51.7 ± 1.414 และ 56.7 ± 1.273 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.2% ที่ใช้เป็นตัวแทนละลายสารสกัดเบญจกูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4-3 ฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B ภายใน 48 ชั่วโมง (*p < 0.05, **p < 0.001)

นอกจากนี้ การทดสอบเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีชนิด KKU-213B แตกต่างจากเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีชนิด KKU-100 โดยจากรูปที่ 4-4 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยมีอัตราการตายร้อยละ 4.1 ± 0.141 , 5.25 ± 0.636 และ 8.55 ± 0.354 ที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม

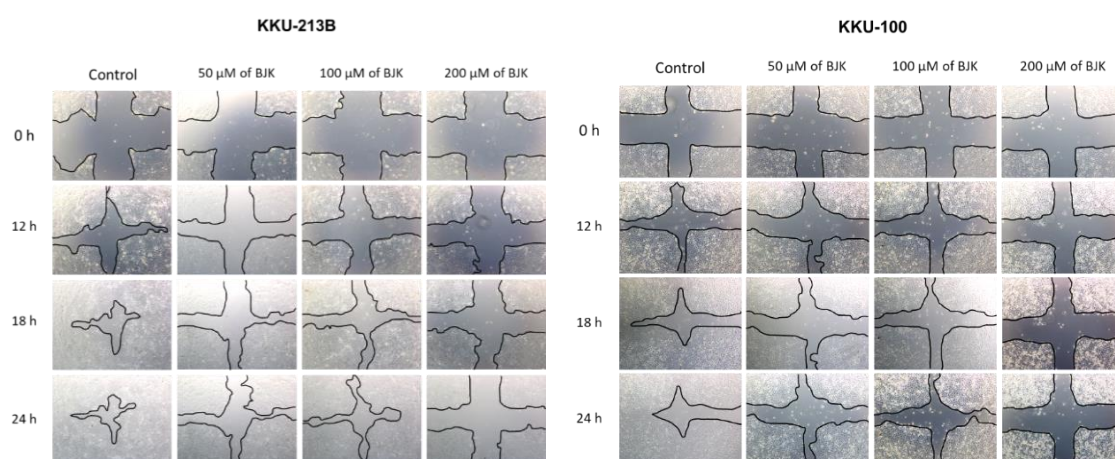


รูปที่ 4-4ฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีชนิด KKU-100 ภายใน 48 ชั่วโมง (*p < 0.05, **p < 0.001)

4.4 ผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งรังท่อน้ำดีใน 24 well plate เมื่อได้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 90% แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 μM , 100 μM และ 200 μM แล้วใช้ปลาย micropipet จัดจากขอบ well ด้านหนึ่ง ไปยังด้านตรงข้าม โดยให้อยู่ระหว่างกลางของ well จากนั้นล้างเซลล์ที่หลุดออก ด้วย PBS buffer แล้วตรวจสอบความสามารถในการ

เคลื่อนที่ของเซลล์ และถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่เวลา 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยการวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ จากนั้นติดตามผลการเคลื่อนที่ของเซลล์อย่างต่อเนื่องพร้อมกับถ่ายรูปเซลล์เพื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาที่เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดตำรับยาเบญจกูล โดยผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B และ KKU-100 ด้วยเทคนิค Wound healing จากผลการศึกษพบว่าสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B และ KKU-100 ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 4-5



รูปที่ 4-5 ฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการทดสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B และ KKU-100 ภายใน 24 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4-5 แสดงผลของฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลด้วยเทคนิค Wound healing พบว่า หากเติมสารสกัดตำรับยาเบญจกูลลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์มะเร็ง จากนั้นใช้ปลาย microtip จัดเป็นเส้นเพื่อดูการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งที่ 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นทั้ง 50 μ M, 100 μ M และ 200 μ M สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ทั้ง KKU-213B และ KKU-100 ได้ดี เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดตำรับยาเบญจกูล

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนี้ คณะผู้วิจัยได้สกัดสารสำคัญจากตำรับยาเบญจกูลโดยใช้วิธีทางเคมี (Ethanolic Extract) ในการสกัดสารสำคัญซึ่ง ตำรับยาเบญจกูล ประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ผลดิบปลี รากข้าวพุด เถาสะค้าน รากเจตมูลเพลิงแดง เหง้าขิง และนำมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดย 1) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2) ทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี และ 3) ศึกษาผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลเทียบกับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยมีผลการวิจัยจากข้อมูลการสกัดสารสำคัญพบว่า สมุนไพรที่มีร้อยละของปริมาณผลผลิตมากที่สุดได้แก่ รากเจตมูลเพลิงแดง (15.9%) รองลงมาได้แก่ ผลดิบปลี (11.4%) ตำรับยาเบญจกูล (9.6%) และขิงแห้ง (7.4%) ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเข้มเนื่องจากการสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล ซึ่งมีคุณสมบัติในการละลายสารได้กว้างทั้งสารที่มีขี้และไม่ขี้ทำให้การเลือกใช้อเอทานอลสามารถละลายสารสำคัญที่มีอยู่ในสมุนไพรได้มากกว่า ทำให้สารสกัดที่ได้มีความหนืด

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ วิธีการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโคลน KKU-M213 และ KKU-M100 โดยเลี้ยงเซลล์ แต่ละชนิดในถาดเลี้ยงเชื้อขนาด 96 หลุม เติมสารสกัดจากสมุนไพร 5 ชนิดและสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ เติมลงในหลุมทดสอบปริมาตร 100 μL แล้วเพาะเลี้ยงที่ 37°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability)

ผลการทดลองพบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี KKU-M213 ที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี จากน้อยไปมากเรียงลำดับดังนี้ ขิง (K) ร้อยละ 28.07 รากเจตมูลเพลิงแดง (JM) ร้อยละ 30.21 ผลดิบปลี (D) ร้อยละ 36.22 ตำรับยาเบญจกูล (BJK) ร้อยละ 48.47 รากข้าวพุด (R) ร้อยละ 68.49 และเถาสะค้าน (T) ร้อยละ 71.47 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ตำรับยาเบญจกูลทำให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีมีชีวิตอยู่ร้อยละ 48.07 ซึ่งอยู่ในช่วงกลาง แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ในระดับกลาง ไม่ทำให้เซลล์ตายในปริมาณมาก ซึ่งแสดงให้เห็น

เห็นว่าการใช้ตำรับยาเบญจกูลจะทำให้เซลล์มีการปรับสมดุล เช่นเดียวกับการศึกษาของหมอฟันบ้านที่จะใช้ตำรับยาในการปรับสมดุลร่างกายของผู้ป่วยมะเร็งก่อนที่จะทำการรักษา (อ้างอิง)

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแต่ละชนิด เติมสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลที่ถูกละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น ตั้งแต่ 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ ที่ 37°C นาน 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) พบว่าเซลล์มะเร็งโคลอน KKU-213B ที่ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลที่เวลา 48 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 93.61 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ร้อยละ 50 และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 76.13 $\mu\text{g/mL}$ และเซลล์มะเร็งโคลอน KKU-100 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดตำรับยาเบญจกูลที่เวลา 48 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 89.94 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ร้อยละ 50 และที่ 72 ชั่วโมง ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ที่ 80.16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นค่อนข้างน้อยกว่า เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ใช้สมุนไพรชนิดอื่นที่ใช้ยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (อ้างอิง) ซึ่งในการศึกษาต่อไปหากนำตำรับยาเบญจกูลนี้ไปใช้ในการรักษาผู้ป่วย ปริมาณการใช้ยาในการรักษาจะน้อยทำให้สะดวกต่อการได้รับการรักษาจากตำรับยาชนิดนี้

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลในการกระตุ้นการตายของเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะถูกวัดด้วย the Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Catalog no. V13241) โดยจากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดเบญจกูล สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีผ่านกระบวนการกระตุ้นการตายแบบ apoptosis โดยจากรูปที่ 4-3 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเบญจกูลสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B ภายใน 48 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยมีอัตราการตายร้อยละ 16.2 ± 1.273 , 51.7 ± 1.414 และ 56.7 ± 1.273 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ทดสอบด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 0.2% ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดเบญจกูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลเข้าไป จะกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ซึ่งเป็นการตายของเซลล์มะเร็งซึ่งเกิดจากการกระตุ้นจากสารที่เติมเข้าไปในระบบ ซึ่งไม่ได้เกิดจากปัจจัยแวดล้อมอื่น ทำให้เป็นการยืนยันได้ว่า สารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลเมื่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้รับสารสกัดนี้เข้าไปในเซลล์แล้วจะกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis

ผลการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีเมื่อได้รับสารสกัด (Wound healing assay) เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีใน 24 well plate เมื่อได้ความหนาแน่นของเซลล์ ประมาณ 90% แล้วจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วใช้ปลาย microtip ขีดจากขอบ well ด้านหนึ่ง ไปยังด้านตรงข้าม โดยให้อยู่ระหว่างกลางของ well จากนั้นล้าง เซลล์ที่หลุดออก ด้วย PBS buffer แล้วตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเซลล์ และถ่ายรูปด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่เวลา 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยการวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์ จากนั้นติดตามผลการเคลื่อนที่ของเซลล์อย่างต่อเนื่องพร้อมกับถ่ายรูปเซลล์เพื่อเปรียบเทียบตามระยะเวลาที่เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารสกัด ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเบญจกูลในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด KKU-213B และ KKU-100 ด้วยเทคนิค Wound healing จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด KKU-213B และ KKU-100 ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นได้ว่า สารสกัดจากตำรับยาเบญจกูลสามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้

ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับตำรับยาเบญจกูลในการรักษาหลายงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาด้านการต้านการอักเสบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ซึ่งผลพบว่ายาเบญจกูลสามารถลดการอักเสบของเซลล์ได้ ในปี 2017 Rachawat, P. ได้ศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิกและความปลอดภัยของสารสกัดเบญจกูลในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมเบื้องต้นเมื่อเปรียบเทียบกับยาไดโคลฟีแนล นอกจากนี้ ในปี 2012 Ruangnoo, S. et al. ได้ทำการศึกษาตำรับยาเบญจกูลเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก รวมถึงมะเร็งตับ

ตำรับยาเบญจกูลมีการนำไปใช้ประโยชน์มากมายในการรักษาโรคต่าง ๆ ซึ่งเป็นแนวทางการแพทย์แผนโบราณที่ใช้อยู่ในการทำให้อวัยวะประกอบหลักทั้งห้าอยู่ในสภาวะสมดุล และควบคุมการทำงานทางสรีรวิทยาภายในร่างกายมนุษย์ เพื่อคืนความสมดุล การแพทย์แผนไทยถือว่าโรคบางชนิดเป็นอาการของความไม่สมดุลที่แฝงอยู่ ดังนั้นการอยู่อย่างสมดุลจึงเป็นกุญแจสำคัญในการมีชีวิตที่ยืนยาวปราศจากโรคภัยไข้เจ็บ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การนำตำรับยานี้มาพัฒนาต่อยอดเพื่อแก้ปัญหาการะโรคที่เป็นปัญหา 1 ใน 3 ของประเทศ คือโรคมะเร็ง และสามารถนำงานวิจัยนี้ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไปในอนาคต ซึ่งการศึกษานี้เป็นแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรจากธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถเชื่อมโยงกับนักวิจัยผู้เชี่ยวชาญ

ในสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย ด้านเภสัชกรรม ด้านการแพทย์ ตลอดจนโรงพยาบาลและศูนย์วิจัย มะเร็ง ดังนั้นการผลิตยาตำรับไทยที่ได้จากสมุนไพรธรรมชาติ นอกจากลดความเสี่ยงหรืออันตรายที่จะเกิดขึ้นจากสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อผลิตยารักษาแล้ว ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยมะเร็งได้อย่างมาก เนื่องจากสมุนไพรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตตำรับยาเบญจกูลมีราคาไม่แพง เมื่อเทียบกับยาที่ผลิตขึ้นเพื่อรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน นอกจากนี้ประโยชน์ด้านการรักษาผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแล้ว ยังสามารถส่งเสริมเกษตรกรที่ปลูกสมุนไพรให้มีรายได้เพิ่มขึ้นและเป็นการประกอบอาชีพที่ยั่งยืน จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้สามารถต่อยอดได้หลายด้าน เช่น ด้านสาธารณสุข เภสัชกรรม เกษตรกรรม รวมถึงด้านอุตสาหกรรมการผลิตอีกด้วย และสามารถสร้างความร่วมมือกับผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ เพื่อวิเคราะห์สารสำคัญในเชิงลึก ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของยาสู่เป้าหมายเซลล์มะเร็งอย่างตรงจุด ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้เป็นการหาแนวทางการรักษาโดยใช้สมุนไพรธรรมชาติเพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ถือเป็นวิธีการรักษาที่มีคุณค่าและมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคมะเร็ง

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

- 1) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านการตรวจสอบหาสารต้านอนุมูลอิสระของตำรับยาเบญจกูลเพื่อเป็นข้อมูลในด้านการต้านอนุมูลอิสระเพื่อเทียบกับการทดสอบในเซลล์มะเร็งที่จะทำการศึกษาวิจัยต่อไป
- 2) ควรมีการศึกษาในมะเร็งชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น มะเร็งตับ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมน้ำเหลือง เพื่อให้มีข้อมูลในแนวทาง ด้านการยับยั้งมะเร็งชนิดต่าง ๆ
- 3) นำตำรับยานี้ไปทดลองใช้ในสัตว์ทดลอง เพื่อทำการทดสอบถึงฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ในสัตว์ทดลอง รวมถึง พัฒนาสารสกัดนี้เพื่อทดลองใช้ในผู้ป่วยจริง

บรรณานุกรม

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2556. Herbal Extracts: Preparation and Isolation of Active Constituents by using Chromatographic Techniques. 306

วิศิษฐ์ เกตุปัญญางศ์. 2554. ผลของสารสมุนไพรเบญจกูล ต่อคุณภาพไข่ไก่ ค่าโลหิตวิทยาและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโรคในไก่ไข่ลูกผสมโรดไอส์แลนด์เรซกับบาร์พลัมทรีอค. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ; พระนครศรีอยุธยา.

Ancuceanu, R.V., Istudor, V., (2004). Pharmacologically active natural compounds for lung cancer. **Altern Med Rev.**, 9:402-419.

Bardona, S., Foussard, V., Fournel, S., Louban, A., (2002). Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. **Cancer Lett.**, 181:187-194.

Banales, J.M. et al. 2016 Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat.Rev.Gastroenterol. Hepatol.* Doi:10.1038/nrgastro.2016.51

Cragg, G.M., Newman, D.J., (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. **J Ethnopharmacol.**, 100: 72-79

Creemers, G.J., Bolis, G., Gore, M., Scarfone, G., Lacave, A.J., Guastalla, J.P., Despax, R., Favalli, G., Kreingerg, R., VanBelle, S., et al, (1996). Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer: results of a large European phaseII study, **J Clin Oncol.**,14:3056-61.

Deng, F., Lu, J.J., Liu, H.Y., Lin, L.P., Ding, J., Zhang, J.S., (2011). Synthesis and antitumor activity of novel salvicine analogues. **Chin Chem Lett.**, 22:25-28.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Dixon, R.A., Ferreira, D., (2002). Molecules of interest: genistein. **Phytochemistry.**, 60:205-211.
- Dubey, K.K., Ray, A.R., Behera, B.K., (2008). Production of demethylated colchicine through microbial transformation and scale-up process development. **Process Biochem.**,43:251-257
- Efferth, T., Li, P.C.H., Konkimalla, V.S.B., Kaina, B., (2007). From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends Mol Med.**, 13:353-61.
- Fuchs, C., Mitchell, E.p., Hoff, P.M., (2006). Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. **Cancer treat rev.**, 32:491-503
- Fulda, S., (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. **Int J Mol Sci.**, 9:1096-1107
- Hait, W.N., Rubin, E., Alli, E., Goodin, S., (2007). Tubulin targeting agents. **Update on cancer therapeutics.**,2:1-18.
- Hampson, P., Wang, K., Lord, J.M., (2005). Treatment of actinic keratosis, acute myeloid leukemia therapy, Treatment of basal cell carcinoma, Protein kinase C activator. **Drugs Fun.**, 30:1003.
- Hazra, B., Sarma, M.D., Sanyal, U., (2004). Separation methods of quinonoid constituents of plants used in oriental traditional medicines. **J Chromatogr B.**, 812:259-275.
- Herst, P.M., Davis, J.E., Neeson, P., Berridge, M.V., Ritchie, D.S., (2009). The anti-cancer drug, phenoxidiol, kills primary myeloid and lymphoid leukemic blasts and rapidly proliferating T cells. **Haematological.**, 94:928-934.
- Huang, Z., Chen, G., Shi, P., (2009). Effects of emodin on the gene expression profiling of human breast carcinoma cells. **Cancer Detec Prev.**,286-291.
- Itharat, A., Sakpakdeejaroen, I., 2010. Determination of cytotoxic compounds of Thai traditional medicine called Benjakul using HPLC. **J Med Assoc Thai** 93 Suppl 7, S198-203.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kao, YC., Kuo, PL., Hsu, YL., Cho, CY., Lin, CC., (2006). Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Life Sciences.**, 2550-2557.
- Kaufman, P.B., Duke, J.A., Briellmann, H., Boik, J., Hoyt, J.E., (1997). A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. **J Altern Complement Med Sprint.**, 3:7-12.
- Kim, S., Hwang, B.Y., Su, BN., Chai, H., Mi, Q., Kinghorn, A.D., Wild, R., Swanson, S.M., (2007). Silvestrol, a potential anticancer rocaglate derivative from *Aglaiia foveolata*, induce apoptosis in LNCaP cells through the mitochondrial/apoptosome pathway without activation of executioner caspase-3 or -7. **Anticancer Res.**, 27:2175-2183.
- Khuntikeo N, Chamadol N, Yongvanit P, Loilome W, Namwat N, Sithithaworn P. et al. Cohort profile: cholangiocarcinoma screening and care program (CASCAP). **BMC Cancer**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459438/>
- Kinghorn, D., de Blanco, E.J.C., Chai, H.B., Orjala, J., Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., Oberlies, N.H., Wani, M.C., Kroll, D.J., Pearce, C.J., et al. (2009). Discovery of anticancer agents of diverse natural origin. **Pure Appl Chem.**, 81:1051-1063.
- Kingston, D.G.I., (2007). The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. *Phytochemistry.*, 68(14): 1844-1854
- Kuropakornpong, P., Itharat, A., Panthong, S., Sireeratawong, S., Ooraikul, B., 2020. In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Activities of Benjakul: A Potential Medicinal Product from Thai Traditional Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020, 9760948.
- Li, Y., Li, C.J., Yu, D., Pardee, A.B., (2000). Potent induction of apoptosis by β -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Mol Med.**, 6:1008-1015

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Liu,Q., (2011). Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. **Int Immunopharmacol.**,11:377-383.
- Lu, CL., Li, YM., Fu, GA., Yang, L., Jiang, JG., Zhu, L., Lin, FL., Chen, J., Lin, QS., (2011). Extraction optimization of daphnoretin from root bark of Wikstroemia indica (L.) C.A. and its anti-tumour activity tests. **Food Chem.**, 124:1500-1506.
- Mans, D.R.A., Da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist.**, 5:185-198.
- Mi, Q., Cui, B., Lantvit, D., Reyes-Lim, E., Chai, H., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Swanson, S.M., (2003). Pervilleine F, a new tropane alkaloid aromatic ester that reverses multidrug resistance. **Anticancer Res.**, 23:3607-15.
- Mi, Q., Cui, B., Silva, G.L., Lantivit, D., Lim, E., Chai, H., Hollingshead, M.G., Mayo, J.G., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., et al. (2002). Pervilleines B and C, new tropane alkaloid aromatic esters that reverse the multidrug-resistance in the hollow fiber assay. **Cancer Lett.** 184:13-20.
- Mi, Q., Cui, B., Silva, G.L., Lantivit, D., Lim, E., Chai, H., You, M., Hollingshead, M.G., Mayo, J.G., Kinghorn, A.D., et al. (2001). Pervilleine A, a novel tropane alkaloid that reverses the multidrug-resistance phenotype. **Cancer Res.**, 61:4030-7.
- Mineko, I., Michio, I., Ikuo, M., Megumi, M., Setsuko, I., Akiko, T., Akio, E., (2000). Growth inhibitory effect of a new camptothecin analog, DX-8951f, on various drug-resistant sublines including BCRP-mediated camptothecin derivative-resistant variants derived from the human lung cancer cell line PC-6. **Anti-Cancer Drugs.** 11:353-362
- Molavi, O., Z., Mahmud, A., Alshamsan, A., (2008). Polymeric micelles for the solubilization and delivery of STAT3 inhibitor cucurbitacins in solid tumors. **Int J Phamr.**, 347:118-127

บรรณานุกรม (ต่อ)

Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E., (2006). Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol In Vitro.**,20:187-210.

Nam, S., Buettner, R., Turkson, J., Kim, D., Cheng, J.Q., Muehlbeyer, S., Hippe, F., Vatter, S., Merz, K.H., Eisenbrand, G., et al. (2005). Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. **PNAS.**, 102:5998-6003.

National Cancer Institute. Cancer incidence in Thailand 2016 : **Cancer in Thailand** 2016. Bangkok: National Cancer Institute; (15; 2018).

Okouneva, T., Hill, B.T., Wilson, L., Jordan, M.A., (2003). The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. **Mol Cancer Ther.**, 2:427-436

Pan, L., Chai, H., Kinghom, A.D., (2010). The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochem Lett.**, 3:1-8.

Rachawat, P., Pinsornsak, P., Kanokkangsadal, P., Itharat, A., 2017. Clinical Efficacy and Safety of Benjakul Remedy Extract for Treating Primary Osteoarthritis of Knee Compared with Diclofenac: Double Blind, Randomized Controlled Trial. Evid Based Complement **Alternat Med** 2017, 9593580.

Ruangnoo, S., Itharat, A., Sakpakdeejaroen, I., Rattarom, R., Tappayutpijam, P., Pawa, K.K., 2012. In vitro cytotoxic activity of Benjakul herbal preparation and its active compounds against human lung, cervical and liver cancer cells. **J Med Assoc Thai** 95 Suppl 1, S127-134.

Sa, G., Das, T., Banerjee, S., Chakraborty, J., (2010). Curcumin: from exotic spice to modern anticancer drug. **Al Ameen J Med Sci.**, 3:21-37.

Sakpakdeejaroen I and Itharat A, 2009. Cytotoxic compounds against breast adenocarcinoma cells (MCF-7) from Pikutbenjakul. **J Health Res** 2009, 23(2): 71-76

บรรณานุกรม (ต่อ)

Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasmy, Y., MacManus, S., Nahar, L., Kong, T.L.P., Sarker, S.D., (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. **Tetrahedron.**, 61:9001-06.

Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Trevidadu, J., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K., Sarker, S.D., (2006). Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in-vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. **Tetrahedron.**, 62:11172-77

Sunila E.S. and Kuttan G. 2004 Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J Ethnopharmacol* 90(2-3):339-46.

The national Institute of cancer 2013

Thomson, P., Naylor, M.A., Everett, S.A., Stratford, M.R.L., Lewis, G., Hill, S., Patel, K.B., Wardman, P., Davis, P.D., (2006). Synthesis and biological properties of bioreductively targeted A-4. **Mol Cancer Ther.**,5:2886-2894

Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., 2007. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chem Cent J** 1, 13.

Xie, J., Ma, T., Gu, Y., Zhang, X., Qiu, X., Zhang, L., Xu, R., Yu, Y., (2009). Berbamine derivatives: a novel class of compounds for anti-leukemia activity. **Eur J Med Che.**, 44:3293-3298

Yeruva, L., Pierre, K.J., Elegbede, A., Wang, R.C., Carper, S.W., (2007). Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. **Cancer Lett.** 257:216-226.

Zhang, J.A., Xuan, T., Parmar, M., Ma, L., Ugwa, S., Ali, S., Ahmad, I., (2004). Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38. **Int J Pharm.**,:270:93-107

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

รูปภาพประกอบการดำเนินงานวิจัย

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย



นำสมุนไพรที่อบแห้งแล้วออกจากตู้อบ



ตีปตี

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



รากชำพุด



เถาสะค้าน

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)

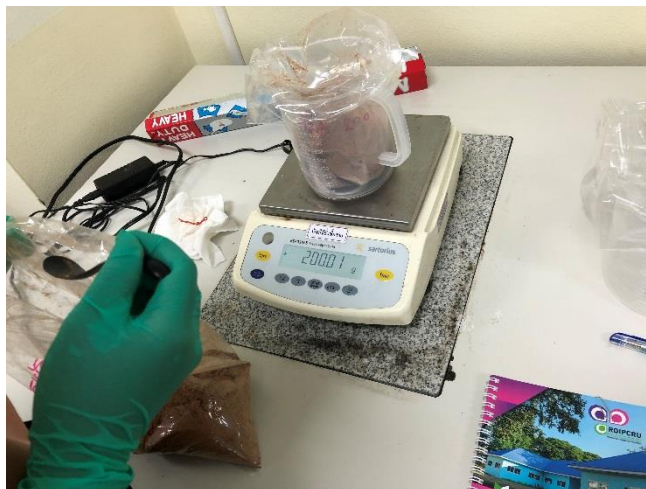


รากเจตมูลเพลิงแดง



เหง้าขิงแห้ง

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



ซังสมุนไพรที่อบแห้ง และบดด้วยเครื่องบดละเอียดเพื่อนำไปหมักด้วย 95% เอทานอล



หมักด้วย 95% เอทานอล หมั่นคนเพื่อสกัดสารสำคัญออกมา ใช้ระยะเวลาในการหมัก 3 วัน

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



กรองผ่านผ้าก๊อชและกระดาษกรอง Whatman No.1



แยกตัวทำละลาย (95% เอทานอล) ออกจากสารสกัดโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ Rotary evaporator

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



สารสกัดดีปรีที่ได้หลังจากแยกตัวทำละลายออกแล้ว

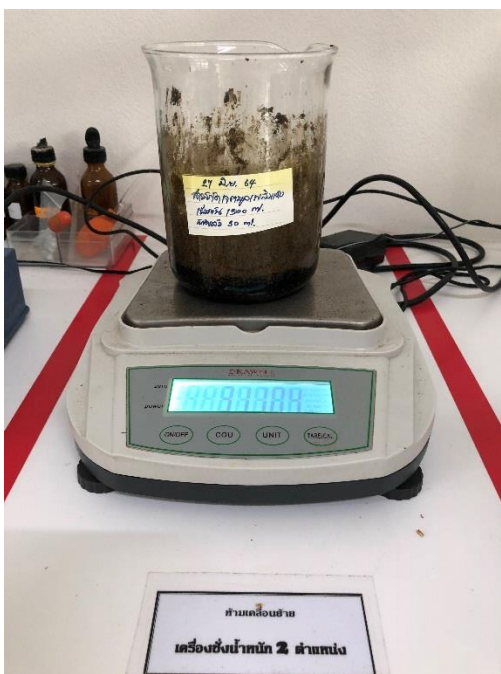


นำมาอบเพื่อไล่ตัวทำละลายในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



นำเข้าเครื่อง Freeze dryer เพื่อนำน้ำออก ทำให้สารสัດแห้ง



ชั่งน้ำหนักสารที่ได้หลังจากผ่านเครื่อง freeze dryer แล้ว

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



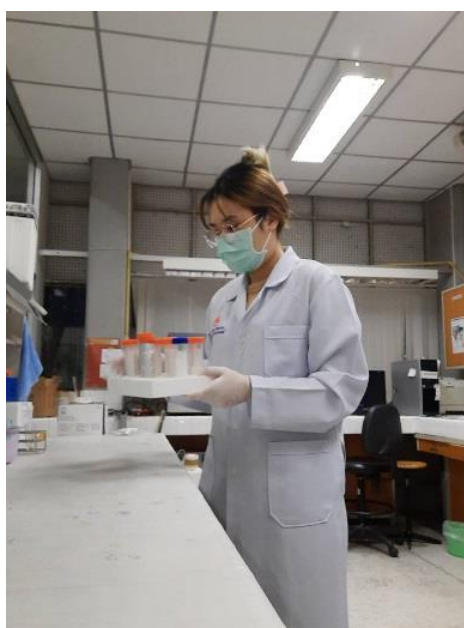
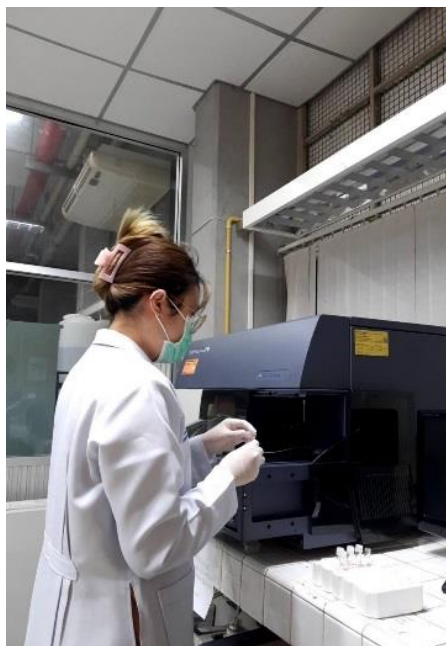
นำสารสกัดที่ได้บรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และนำส่งมหาวิทยาลัยขอนแก่นเพื่อตรวจวิเคราะห์

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

รูปภาพประกอบการดำเนินการวิจัย (ต่อ)



ทดสอบกระบวนการตายของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแบบ apoptosis โดยใช้เทคนิค Flow cytometry

ภาคผนวก ข

หลักฐานการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์



แบบฟอร์มรับรองการนำผลงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้ประโยชน์

๑. ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ของตำรับยาเบญจกูลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี
Evaluation of active compound and cytotoxicity of Benjakul on
cholangiocarcinoma cancer cell lines.
๒. ชื่อนักวิจัย/นักประดิษฐ์ ดร. กัญญารัตน์ เตือนหงาย, ผศ.ดร. อัญชลี เตชะเสน,
ผศ.สุภาพร วิสูงเร, นางสาวศุมาลีน ดีจันทร์, นางสาวนวิรัตน์ มีชัย,
นางสาวผกามาศ ประระทั้ง, นางลักษณ์คณา กิจจรัส
๓. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
๔. ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท ทุนอุดหนุนการวิจัย ด้านวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (ววน.)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565
๕. ปีที่งานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ดำเนินการเสร็จ ...2565.....
๖. ปีที่นำไปใช้ประโยชน์2565.....
๗. การนำไปใช้ประโยชน์
 - ๗.๑ ชื่อหน่วยงาน วิสาหกิจชุมชนสมุนไพรเพื่อสุขภาพบ้านเขา.....
 - ๗.๒ ที่อยู่หน่วยงาน ...เลขที่ 146 หมู่ที่ 17 ตำบลบ้านโคก อำเภอเมืองเพชรบูรณ์ จังหวัดเพชรบูรณ์.....

ขอรับรองว่าได้นำผลงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ ดังนี้

- ☐ ๑. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และพัฒนาชุมชนในเชิงสาธารณะ (โปรดระบุรายละเอียด)

.....
.....
.....

- ☐ ๒. การนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาชุมชนในเชิงนโยบาย (โปรดระบุรายละเอียด)

๒

☒ ๓. การนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาชุมชนในเชิงพาณิชย์ (โปรดระบุรายละเอียด)

.....สามารถนำงานวิจัยนี้มาผลิตสมุนไพรและให้กลุ่มวิสาหกิจชุมชนเพิ่มพื้นที่การปลูกสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด เพื่อนำมาทำเป็นวัตถุดิบในการปรุงพิกัดยาเบญจกูล ซึ่งจะสามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรในชุมชนและกลุ่มวิสาหกิจชุมชนสมุนไพรเพื่อสุขภาพบ้านเขาได้

☐ ๔. การนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาชุมชนอื่นๆ (โปรดระบุรายละเอียด)

ผลลัพธ์/ผลกระทบการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์และพัฒนาเป็นอย่างไร

งานวิจัยนี้สามารถกระตุ้นให้เกษตรกรที่ปลูกสมุนไพร ได้ปลูกสมุนไพร 5 ชนิดเพิ่มขึ้น ได้แก่ ตีปลี ข้าวพลู เถา สะค้าน เเจตมูลเพลิงแดง และชิง เพื่อนำไปผลิตเป็นสมุนไพรใช้ในการปรับสมดุลของร่างกายต่อไป



(นายประเทือง แก้วหล่อ)

ผู้นำไปใช้ประโยชน์

ตำแหน่ง ประธานกลุ่มวิสาหกิจชุมชน

สมุนไพรเพื่อสุขภาพบ้านเขา

วันที่ให้ข้อมูล9 ธันวาคม 2565.....

หมายเหตุ

การใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะ เช่น ผลงานวิจัยที่นำไปใช้ให้เกิดประโยชน์แก่สาธารณะในเรื่องต่างๆ ที่ทำให้คุณภาพชีวิตและเศรษฐกิจของประชาชนดีขึ้น ได้แก่ การใช้ประโยชน์ด้านสาธารณสุข ด้านการบริหารจัดการ สำหรับวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม (SME) ด้านการส่งเสริมประชาธิปไตย ภาคประชาชน ด้านศิลปะและวัฒนธรรม ด้านวิถีตามหลักปรัชญาของเศรษฐกิจพอเพียง เป็นต้น

การใช้ประโยชน์เชิงนโยบาย เช่น ใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัยเชิงนโยบายในการนำไปประกอบเป็นข้อมูลการประกาศใช้กฎหมาย หรือกำหนดมาตรการกฎเกณฑ์ต่างๆ โดยองค์กร หรือหน่วยงานภาครัฐและเอกชน เป็นต้น

การใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ เช่น งานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ที่นำไปสู่การพัฒนาสิ่งประดิษฐ์ หรือผลิตภัณฑ์ซึ่งก่อให้เกิดรายได้ หรือนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เป็นต้น

ประวัติคณะผู้วิจัย

- [illegible]

ประวัติคณะผู้วิจัย (ต่อ)

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวนวรรณ์ มีชัย
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1-2199-00478-xx-x
3. ตำแหน่งปัจจุบัน -
4. ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

หลักสูตรสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง
จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ 056-717122, 090-696-3147

E-mail nawarat.mee@pcru.ac.th
6. ประวัติการศึกษา พท.บ. (การแพทย์แผนไทย)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

พท.ม. (การแพทย์แผนไทย)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

วิทยาศาสตร์สุขภาพด้านการแพทย์แผนไทย
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

ทำงานวิจัยและได้รับการตีพิมพ์วารสารระดับชาติจำนวน 2 ฉบับ

ประวัติคณะผู้วิจัย (ต่อ)

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวผกามาศ ประระทั้ง
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1-4410-00072-xx-x
3. ตำแหน่งปัจจุบัน -
4. ตำแหน่งทางวิชาการ อาจารย์
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

หลักสูตรสาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ อำเภอเมือง
จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000

โทรศัพท์ 056-717122, 081-069-0462

E-mail phakamas.p@pcru.ac.th
6. ประวัติการศึกษา พท.บ. (การแพทย์แผนไทย)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

พท.ม. (การแพทย์แผนไทย)

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย
7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

วิทยาศาสตร์สุขภาพด้านการแพทย์แผนไทย
8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

ทำงานวิจัยและได้รับการตีพิมพ์วารสารนานาชาติจำนวน 2 ฉบับ

ประวัติคณะผู้วิจัย (ต่อ)

1. ชื่อ-นามสกุล นางลักษณัณณา กิจจรัส
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 1-6799-00047-XX-X
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการศึกษา
4. ตำแหน่งทางวิชาการ -
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
 อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ 67000
 โทรศัพท์ 056-717122 E-mail Pong-su@hotmail.com
1. ประวัติการศึกษา วท.บ. (สาธารณสุขชุมชน)
 มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
 วิทยาศาสตร์สุขภาพ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย
 -