บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม
(Literature Review)

2.1 ผักพื้นบ้านที่นำมาศึกษาวิจัย

2.1.1 ผักติ้ว

รูปที่ 1 ผักติ้ว (www.picdb.thaimisc.com/srimuangmai/77-1.jpg)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Cratoxylum formosum* (Jack)
ชื่อวงศ์	Guttiferae
ชื่ออังกฤษ	teaw
ชื่อท้องถิ่น	กวยโชง (กาญจนบุรี) แต้ว (ใต้) ผักเตา(เลย) ติ้วส้ม (นครราชสีมา)
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	**ต้น** ไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงกลาง ผลัดใบและจะผลิใบใหม่พร้อมกับออกดอก ลำต้นมีหนามรอบๆแผ่กิ่งก้านออกเป็นทรงพุ่ม เนื้อไม้ค่อนข้างเหนียว กระพี้สีขาว แก่นสีน้ำตาลปนเหลือง มีน้ำยางเหนียวซึมออกมา ความสูงต้น 8–15 เซนติเมตร

ใบ มีลักษณะเรียวยาว ปลายแหลม เรียงเป็นคู่ตรงข้ามกัน ใบกว้าง 1.5-5 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ มีต่อมอยู่ใต้ใบกระจายไปทั่ว โคนและปลายใบสอบหลังใบเป็นมัน มีสีเข้มกว่าท้องใบ เส้นแขนงใบมี 6-8 คู่ ปลายโค้งจรดกันถึงขอบใบ ใบแก่มีสีแสดหรือแดง

ดอก ดอกมีสีชมพูหรือขาว เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ออกเป็นดอกเดี่ยวๆหรือเป็นกระจุกตามง่าม มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ ดอกลักษณะมน กลีบดอกรูปไข่ มีเกสรตัวผู้จำนวนมาก และรวมกันเป็นกลุ่ม 3-5 กลุ่ม

ผล ผลผิวของผลแข็ง รูปกระสวยสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ มีนวลขาวติดบริเวณผล เมื่อแก่จัดจะแตกตามรอยประสานเป็น 3 แฉก มองเห็นเมล็ดซึ่งมีปีกเป็นรูปโค้งเรียงอัดแน่น ก้านผลยาวประมาณ 1 เซนติเมตร มีขนกระจายอยู่ทั่วไป การขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด

สารสำคัญ	Chlorogenic acid และ leucoanthocyanin
หลักฐานทางวิทยาศาสตร์	สารสกัดมีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ คือ สารสกัดในเอธิลอะซิเตตให้ EC_{50} 7.42 µg/ml และสารสกัดในเมทานอลให้ EC_{50} 9.23 µg/ml TEAC 24.8 mmol/100mg ของน้ำหนักแห้ง
ประโยชน์ทางยา	รากต้มผสมกับหัวแห้วหมูและรากปลาไหลเผือก ใช้ดื่มวันละ 3 ครั้ง แก้ปัสสาวะขัดหรือขับปัสสาวะ ให้วิตามินเอสูง สร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันไม่ให้เด็กเป็นโรคตาไก่ โรคตาบอดกลางคืน

2..1.2 ผักเม็ก

รูปที่ 2 ผักเม็ก (www.ubon.obec.go.th/school/swws/pictures/pak_mek.jpg)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Syzygium gratum* Wight S.N.Mitra var .gratum
ชื่อวงศ์	Scrophulariaceae
ชื่อท้องถิ่น	เม็ก สะเม็ก เม็ดขนุน เหม็ดชุน (ภาคใต้) เสม็ดแดง(ตราด)
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	**ต้น** ไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 5-10 เมตร ลำต้นสีน้ำตาลแดง เปลือกบางซ้อนกันหลายๆชั้น แตกกิ่งก้านมาก **ใบ** ประกอบแบบขนนก เรียงเป็นคู่ตรงกันข้าม ใบย่อยรูปหอกมี 2-4 คู่ ขอบใบเรียบปลายใบแหลม ใบอ่อนมีสีน้ำตาลอมชมพู ใบแก่มีสีเขียวเข้มเป็นมัน **ดอก** ดอกออกเป็นช่อเล็กๆ ที่บริเวณปลายยอด ดอกย่อยออกติดกันเป็นกระจุกสีเหลืองอ่อน เกสรตัวผู้สีขาวจำนวนมาก ลักษณะคล้ายเกสรดอกชมพู่ **ผล** ผลมีลักษณะกลมขนาดเล็ก ก้นผลส่วนใหญ่มีลักษณะนูน ขณะยังอ่อนมีสีเขียวและเมื่อแก่จะมีสีขาว
สารสำคัญ	วิตามินซี
หลักฐานทางวิทยาศาสตร์	มีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ โดย 750 mgBHAeq/g น้ำหนักแห้ง
ประโยชน์ทางยา	ใบใช้แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้จุกเสียด

2.1.3 ผักกระโดนน้ำ

รูปที่ 3 ผักกระโดนน้ำ (www.img362.imageshack.us/img362/1400/ve91ys.gif)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Barringtonia acutangula (L.) Gaertn.*
ชื่อวงศ์	Barringtoniaceae
ชื่ออังกฤษ	Kradone
ชื่อท้องถิ่น	จิกน้ำ จิกนา กระโดนทุ่ง กระโดนน้ำ (หนองคาย) ไม้ตอง (พายัพ) ประคงคา
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	ไม้ยืนขนาดเล็กสูงประมาณ 5 – 13 เมตร ใบใหญ่ยาวเรียวคล้ายชมพู่ ใบโตประมาณ 3 นิ้วมือ ยอดอ่อนมีสีชมพูปนเขียว ดอกออกเป็นช่อห้อยยาว เกสรสีแดงปลายมีสีเหลือง พบตามพื้นที่ราบ ตามสวน ไร่นา
สารสำคัญ	hydrolyzabletannin flavone flavonol และ xanthone
หลักฐานทางวิทยาศาสตร์	สารสกัดในเอธิลอะซิเตตมีสรรพคุณต้านอนุมูลอิสระ ให้ EC_{50} 4.66 μg/ml
ประโยชน์ทางยา	เนื้อไม้เป็นยาขับระดูขาวเมล็ดแก้แน่นท้อง

2.2 รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพและ ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

ปัจจุบันกระแสการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพกำลังได้รับความนิยมอย่างสูง และมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียเงินตราออกนอกประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผักพื้นบ้านของไทยที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ และพบว่ามีผักพื้นบ้านหลายชนิดที่มีสารดังกล่าว อีกทั้งผักพื้นบ้านเป็นสิ่งที่หาง่ายและมีราคาถูก ดังนั้นหากมีการเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆที่มีอยู่ในผักพื้นบ้าน เพื่อส่งเสริมให้ประชาชนหันมาบริโภคผักพื้นบ้านมากขึ้น จะสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล การผลิตยา และลดจำนวนเงินตราที่สูญเสียจากการนำเข้ายาจากต่างประเทศได้อีกทางหนึ่งด้วย ในปัจจุบันประชาชนให้ความสำคัญในการดูแลสุขภาพ และให้ความสนใจในผลิตภัณฑ์สมุนไพรเสริมสุขภาพมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากข้อมูลของศูนย์วิจัยกสิกรไทยในปี 2547 ได้คาดการณ์มูลค่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรในประเทศไทยทั้งยาสมุนไพร อาหารเสริมสุขภาพ เครื่องสำอางสมุนไพร และเครื่องดื่มสมุนไพร มีมูลค่าสูงถึง 40,000 ล้านบาท และมีอัตราการขยายตัว 30% เฉพาะตลาดยาสมุนไพรมีมูลค่าการขายให้กับประชาชนเท่ากับ 2,240 ล้านบาท ดังนั้นหากมีการแปรรูปผักพื้นบ้านให้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเสริมสุขภาพ เพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ ก็จะเป็นการส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรเพิ่มมากขึ้นอีกทางหนึ่งด้วย (อนุช อาภาภิรม, 2004)

ผักพื้นบ้าน หมายถึง พรรณไม้ที่อยู่ในท้องถิ่น อาจเป็นพืชที่เกิดเองตาม สวน ไร่ นา และชาวบ้านในท้องถิ่น นำมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาบริโภคเป็นอาหาร ผักพื้นบ้านจะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น มีการใช้พืชพื้นบ้านไปทำประโยชน์อื่น ๆ เช่น ยาสมุนไพร เครื่องจักรสาน หรือสีย้อมผ้า เป็นต้น (ไชยวัฒน์ และคณะ)

ผักพื้นบ้านของไทยจำนวนมากเป็นสมุนไพรมีสรรพคุณที่น่าสนใจหลายอย่าง เช่น ต้านการอักเสบ มีฤทธิ์สมานแผล ฤทธิ์ฆ่าเชื้อ แก้ท้องร่วง ต้านมะเร็ง บำรุงสุขภาพและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน(ไชยวัฒน์ และคณะ) โดยมีผักพื้นบ้านหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังตัวอย่างเช่น

1. พืชในวงศ์ Rutaceae เช่น มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) เพราะมีสารสำคัญ คือ Bergamottin และ Vitamin C (www. Biodiversity, 2006)
2. พืชในวงศ์ Cucurbitaceae เช่น มะระ (*Momordica charantia*) เพราะมีสารสำคัญ คือ Momordicin (www. Biodiversity, 2006)

3. พืชในวงศ์ Labiatae เช่น โหระพา (*Ocimum basilicum* Linn.) เพราะมีสารสำคัญ คือ Vitamin C (100g มี Vitamin C 19 mg) (www. Biodiversity, 2006)
4. พืชในวงศ์ Solanaceae เช่น มะเขือเปราะ (*Chionathus parkinonii*) เพราะมีสารสำคัญ คือ สารประกอบฟีนอลิก (Chinwangso P, 2006)
5. พืชในวงศ์ Guttiferae เช่น ติ้ว (*Cratoxylum formosum*) เพราะมีสารสำคัญ คือ Chlorogenicacid, leucoanthocyanin (www. Biodiversity, 2006)
6. พืชในวงศ์ Scrophulariaceae เช่น เม็ก (*Limnophila aromatica*) เพราะมีสารสำคัญ คือ Vitamin C (www. Biodiversity, 2006)
7. พืชในวงศ์ Barringtoniaceae เช่น กระโดน (*Barringtonia acutangula*) เพราะมีสารสำคัญ คือ Hydrolyzabletannin flavone flavonol xanthone (www. Biodiversity, 2006)

และจากการค้นคว้าข้อมูลพบว่า ผักติ้ว ผักเม็ก และ ผักกระโดน ซึ่งมีสารสำคัญ คือ สารประกอบฟีโนลิก และมีฤทธิ์ดีในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน(สารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน. 2000)

ชนิดของผักพื้นบ้าน (100 กรัม)	**การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น** (Antioxidant activity)
1. ผัวแพว	+
2. ผักโขมไทย	+
3. ดอกโสน	+
4. ผักเสี้ยน	+
5. ผักกระโดนน้ำ	+++
6. ผักติ้ว	++
7.ผักเม็ก	+++
8. ผักโขมใหญ่	+
9. ผักกระเฉด	++
10. ใบชะพลู	+

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน(สารต้านอนุมูลอิสระในผักพื้นบ้าน. 2000) (ต่อ)

ชนิดของผักพื้นบ้าน (100 กรัม)	**การต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น** (Antioxidant activity)
11. ใบบัวบก	+
12. ใบยอ	+
13. ผักชีฝรั่ง	+
14. ผักชีลาว	+
15. ยอดสะเดา	++
16. ผักกระถิน	+++
17. พริกไทยสด	++
18. ยอดพริก	+
19. ผักชี	+
20. กระชาย	+++

หมายเหตุ : +++ สูง (>20 mg BHA eq./กรัมน้ำหนักแห้ง)

++ ปานกลาง (3.6 - 20 mg BHA eq./กรัมน้ำหนักแห้ง

\+ น้อย (0.75 - 3.6 mg BHA eq./กรัมน้ำหนักแห้ง

มานี และ ธนะเศรษฐ์, 2546 ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากใบของเม็ก โดยใช้วิธี Disc-diffusion assay พบว่า สารสกัดเม็กใน 70% Ethanol มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ MIC เท่ากับ 2.5 mg/ml และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Streptococcus faecalis* ที่ MIC เท่ากับ 2.08 mg/ml นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ MIC เท่ากับ 3.33 mg/ml

Humberto J. Morris และคณะ, 2007 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของ enzymatic protein hydrolysate จาก green microalga *Chlorella vulgaris* (Cv-PH) โดยทำการทดลองในหนู Balb/c mice ซึ่งทำการสกัด Cv-PH โดยใช้ ethanol และ pancreatin ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จำนวนของ Peritoneal exudates cells และ macrophage เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการทดลองจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ immunopotentiating activity ต่อไป

Patricia Hernandez และคณะ, 2007 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ protective effect ต่อ T lymphocytes ของ *Mangifera indica* L. โดยสกัดสารจากเปลือก *Mangifera indica* L. ซึ่งสารสกัดที่ได้ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ polyphenolic compound mangiferin catechin และ epicatechin จากผลการทดลองพบว่าสารจากเปลือก *Mangifera indica* L. สามารถป้องกัน T cells จาก activation-induced cell death ได้

Zhigang Yang และคณะ, 2007 ได้ทำการทดสอบการตอบสนองของ Th1 และ Th2 immune ต่อ ovalbumin (OVA) ในหนู mice สารที่ใช้คือ Ginsennoside RD ซึ่งสกัดได้จากรากของ *panax notoginseng* โดยฉีด subcutaneous เข้าไปในหนูแล้ววัดผลอีกสองสัปดาห์ต่อมา วิธีการที่ใช้ได้แก่

- MTT assay ใช้ในการวัด concanavalin A , lypopolysacchride และ OVA-stimulated splenocyte proliferation
- ELISA test ใช้ในการวัด OVA-specific antibody titers
- microparticle-based flow cytometric immunoassay ใช้ในการวัดจำนวนของ cytokines ในซีรัม

จากผลการทดลองพบว่า Ginsennoside RD มีฤทธิ์ในการเพิ่ม concanavalin A , lypopolysacchride และ OVA-stimulated splenocyte proliferation นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เพิ่ม antibody titers และ cytokines ในซีรัมอย่างมีนัยสำคัญ

Amanda Chaves Pinto และคณะ, 2006 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ immunosuppressive ของสารสกัดที่ได้จาก *Echinodorus macrophyllus* พืชชนิดนี้ใช้ในการรักษา rheumatic diseases โดยทำการทดลองในหนูด้วยการรับประทานสารสกัดจาก *Echinodorus macrophyllus* เป็นเวลา 7 วัน จากผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ *Echinodorus Macrophyllus* จะเกิดการยับยั้งการสร้าง B call antibody และเกิด delayed type hypersensitivity ผ่าน T cells แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ได้จาก *Echinodorus macrophyllus* มีฤทธิ์ immunosuppressive

Beenish Khan และคณะ, 2006 ได้ทำการสกัดสารสำคัญจากรากของ *Withania somnifera* แล้วนำไปทดสอบในหนู Balb/c mice ที่มีภาวะ cronic stress โดยการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 30 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250777

รับประทานในขนาดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 25 , 50 , 100 และ 200 mg/kg p.o. จากผลการทดลองพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของ T lymphocytes และ Th-1 cytokines อย่างมีนัยสำคัญ

Nawong Boonnak และคณะ, 2006 ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ prenylated xanthones และ anthraquinones จาก Cratoxylum formosum ssp. Pruniflorum โดยใช้ส่วนราก และเปลือกลำต้น แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี spectroscopic methods ซึ่งยืนยันผลด้วย X-ray diffraction data พบว่า Cratoxylum formosum ssp. Pruniflorum มี xanthones และ anthraquinones เป็นองค์ประกอบซึ่งจะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

Sompong Boonsri และคณะ, 2006 ทำการทดสอบฤทธิ์ antibacterial และ cytotoxic ของ xanthones ซึ่งได้จากส่วนรากของ Cratoxylum formosum ซึ่งนอกจากจะพบองค์ประกอบใหม่ที่มีชื่อว่า formoxanthone A–C ยังพบ anthraquinones โดยทำการวิเคราะห์ในเบื้องต้นโดยใช้ spectroscopic

LF Yang และคณะ, 2006 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ antiglycation ของ phenolic compounds จากพืชของไทย โดยเลือกพืช 7 ชนิด ได้แก่ Pak Pai (*Limnocharis flava* Buch), Mulberry leave (*Morus alba*), Sa dao (*Azadirachita indica siamensis* Valeton), Pak Tew (*Cratoxylum formosum*) ทั้งสีเขียวและแดง, Pak Khom (*Amaranthus gracilis* Desf) และ Tamarind seed coat (*Tamarindus indica*) ที่สกัดด้วยเอธานอล 50% ซึ่งจะวัดปริมาณ phenolic โดยใช้ Folin-Ciocalteau with Gallic acid ที่ 760 nm. และใช้ Spectrofluorometer ในการดูฤทธิ์ antiglycation พบว่า Pak Tew (*Cratoxylum formosum*) สีแดงมีปริมาณ phenolic มากที่สุด และมีฤทธิ์ antiglycation สูงสุดด้วย

Pitchaon Maisuthikul และคณะ, 2006 ทำการศึกษาการเพิ่ม oxidative stability ของ rice snack ด้วยสารสกัดจากส่วนใบของ *Cratoxylum formosum* โดยเปรียบเทียบกับ tocopherol และ BHT โดยใช้ DPPH และ ABTS method ผลการศึกษาพบว่า *Cratoxylum formosum* ไม่เป็นพิษและเป็นแหล่งอาหารตามธรรมชาติที่มีฤทธิ์ antioxidant

E.Schwarz และคณะ, 2005 ได้ทำการสกัดน้ำจาก *Echinacea purpurea* เพื่อทดสอบผลต่อ B และ T lymphocytes ในอาสาสมัครเพศชาย สุขภาพดี มีอายุระหว่าง 20-40 ปี โดยใช้การทดลองแบบ doble-blind placebo-controlled cross-over design ซึ่งให้อาสาสมัครโดยการรับประทานเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับประทานน้ำที่สกัดจาก *Echinacea purpurea* มีจำนวนของ CD8+-T lymphocyte เพิ่มขึ้นเล็กน้อย

P.Morazzoni และคณะ, 2005 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัดจากรากของ *Echinacea angustifolia* (Polinacea™) ซึ่งสารสกัดที่ได้ประกอบด้วย echinacoside (> 4 %) , high molecular weight polysaccharide IDN 5405 (< 5 %) และ isobutylamide fraction (< 0.1 %) ซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้

- in vitro พบว่าสารสกัดจากรากของ *Echinacea angustifolia* (Polinacea™) มีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบอัตราการเพิ่มจำนวน T lymphocyte และการสร้าง γ-interferon ในหนู
- in vivo พบว่าสารสกัดจากรากของ *Echinacea angustifolia* (Polinacea™) มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยลดจำนวนเชื้อ *Candida albican* ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการตายได้

Pitchaon Maisuthisakul และคณะ, 2005 ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ antioxidant ของสารสกัดจากติ้ว (Cratoxylum formosum Dyer) โดยใช้ส่วนใบของติ้วที่สกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธี high-performance liquid chromatography และ electrospray ionization mass spectrometry พบว่าส่วนประกอบหลักในติ้วที่แสดงฤทธิ์ antioxidant คือ chlorogenic acid จากนั้นจึงนำมาเปรียบเทียบกับ tocopherol และ BHT โดยใช้ DPPH และ ABTS assays ได้ผลดังนี้ คือ สารสกัดติ้วมี free radical มากกว่า tocopherol และ BHT และการทดสอบการเกิดพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ในหนู mice พบการเกิดพิษเมื่อ LD50 ของสารสกัดติ้วมากกว่า 32 กรัมต่อกิโลกรัม

Nunthawun Uawonggul และคณะ, 2005 ได้ทำการคัดเลือกพืชเบื้องต้นที่มีฤทธิ์ต้าน *Heterometrus laoticus* ซึ่งเป็นพิษของแมลงป่องที่ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ fibroblast โดยคัดเลือกพืช 64 สายพันธุ์ แล้วนำพิษของแมลงป่องมาบ่มร่วมกับสารสกัดของพืชและเซลล์ fibroblast เป็นเวลา 30 นาที พบว่าพืชมากกว่า 40 % มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพืชที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae), *Barringtonia acutangula* (L.) Gaertn. (Lecythidaceae),*Calamus* sp. (Palmae), *Clinacanthus nutans* Lindau (Acanthaceae), *Euphorbia neriifolia* L. (Euphorbiaceae), *Ipomoea aquatica* Forssk (Convolvulaceae),*Mesua ferrea* L. (Guttiferae), *Passiflora laurifolia* L. (Passifloraceae), *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Labiatae), *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae), *Rumex* sp. (Polygonaceae) และ *Sapindus rarak* DC. (Sapindaceae) โดยจะนำไปพัฒนาเป็นยาต้านพิษแมลงป่องต่อไป แต่มีเพียง *Andrographis paniculata* และ *Barringtonia acutangula* ที่มีประสิทธิภาพในการต้านพิษต่ำ

Wimolnut Auttachoat และคณะ, 2004 ได้ทำการสกัดสารจาก *Aeginetia indica* Roxbert (Dok Din Daeng , DDD) โดยใช้น้ำและเอทานอล จากน้ำนำไปให้ในหนู B6C3F1 mice เพศเมีย ซึ่งสารที่สกัดด้วยน้ำจะให้โดยวิธีรับประทานผ่านทางสายยาง ส่วนสารที่สกัดด้วยเอทานอลจะให้ทาง intraperitoneal เป็นเวลา 28 วัน เมื่อนำมาทดสอบด้วย MLT และ CTL assay พบว่าสารสกัดจาก *Aeginetia indica* Roxbert (Dok Din Daeng , DDD) มีฤทธิ์กระตุ้น T lymphocyte อย่างมีนัยสำคัญ

Jinyou Duan และคณะ, 2003 ได้ทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของ *Diospyros kaki* ด้วยวิธี high-performance gel-permeation chromatography และลักษณะโครงสร้างด้วยวิธี combination of methylation analysis periodate oxidation partial acid hydrolysis ^{1}H และ ^{13}C NMR spectroscopy และ ESI mass spectrometer จากข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการทดลองเบื้องต้น แสดงให้เห็นว่า *Diospyros kaki* มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ B lymphocyte แต่ไม่พบการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte

S.Mehrotra และคณะ, 2002 ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ antilymphoproliferative จากรากของ *Boerhaavia diffusa* โดยทดสอบในเซลล์ชนิดต่างๆ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ยับยั้ง T cell mitogen phytohemagglutinin และ concanavalin A โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในหนูและมนุษย์

2.3 การศึกษาและทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้ทุกแห่งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ร่างกาย สัญลักษณ์ทั่วไปของอนุมูลอิสระ คือ $R^{\cdot}$ ซึ่งอาจหมายรวมถึงอะตอมหรือโมเลกุล การเขียนสัญลักษณ์อนุมูลอิสระจะตามท้ายด้วยจุด ($^{\cdot}$) เสมอ ซึ่งเป็นเครื่องหมายแทนอิเล็กตรอนเดี่ยว ในบางกรณีอาจเติมเครื่องหมายลบ (-) ติดอยู่ข้างบนสัญลักษณ์ด้วย เช่น $O_2^{-\cdot\cdot}$ หรือ O_2^{-} ซึ่งอนุมูลอิสระเกิดได้จากปฏิกิริยาทางเคมีดังนี้

1. เกิดจากการรวมตัวของอิเล็กตรอนเดี่ยวกับสารประกอบที่อยู่เสถียร (R) ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นมากที่สุดในเซลล์ คือ เกิดจากสารชีวโมเลกุลซึ่งได้รับรังสี เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา เป็นต้น
2. เกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในสภาวะ excited state ซึ่งปฏิกิริยานี้พบได้บ่อยในการเผาไหม้วัสดุอินทรีย์ ควันบุหรี่ ขี้เถ้าบุหรี่ เป็นต้น

3. เกิดจากการดึงอะตอมของไฮโดรเจนออกจากโมเลกุลของสารที่มีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบ ปฏิกิริยานี้พบมากในการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งสารไฮโดรคาร์บอนก็คือ ลิปิด และสารเริ่มต้น ได้แก่ ออกซิเจน สารพวกเปอร์ออกไซด์ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) พอร์ไฟริน (porphyrin) บิลิรูบิน (bilirubin) เรตินอล (retinol) เป็นต้น โดยอะตอมของไฮโดรเจนจะถูกดึงออกจากโมเลกุลของกรดไขมันได้อนุมูล lipid ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ lipid ชนิดอื่นๆ อีกต่อไป
4. เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นได้ทั่วไปในเซลล์หลายชนิด และจะถูกเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่ายเมื่อทำปฏิกิริยากับอิเล็กตรอนของเหล็ก[3] ดังแสดงในสมการ (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

5. เกิดจากปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ เช่น paraquat หรือ gramoxone ที่ใช้เป็นสารฆ่าหญ้า โดยจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาต่อกันเป็นลูกโซ่ (ไชยวัฒน์ ไชยสุต และคณะ)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (ไชยวัฒน์ ไชยสุตและคณะ)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain reaction) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ ขั้นอินนิทิเอชัน (initiation step) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ขั้นพรอพาเกชัน (propagation step) เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลตัวอื่น และขั้นตอนสุดท้ายเรียกว่าเทอร์มิเนชัน(termination step) เป็นขั้นตอนที่มีการรวมกันของอนุมูลอิสระ 2 อนุมูล ได้เป็นสารที่มีความเสถียร

1. **ขั้นตอนอินนิทิเอชัน** (Initiation step)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (hydrolysis) ด้วยแสง (photolysis) ด้วยรังสี (radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) นอกจากนี้ก็ยังมีเอนไซม์อื่นๆอีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์ รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ Singlet oxygen (${}^1O_2$) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสภาวะที่ถูกกระตุ้น (exited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

2. **ขั้นตอนพรอพาเกชัน** (Propagation step)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชัน จะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนของพรอพาเกชัน ซึ่งเกิดปฏิกิริยาขึ้นได้ 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ขึ้นมา

3. **ขั้นตอนเทอร์มิเนชัน** (Termination step)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันได้เป็นสารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) สามารถทำลายกรดอะมิโนที่อยู่ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เช่น histidine praline tryptophan cysteine tyrpsine เป็นต้น ซึ่งผลที่เกิดขึ้นทำให้กรดอะมิโนเหล่านี้เกิดการแตกหัก (fragment) การเกิด cross link และ การรวมตัว (aggregate) นอกจากนี้ hydroxyl radical ยังสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของโคดอน แต่เมื่อเกิดการย้ายส่วนของโครโมโซม (translocation) ของชิ้นส่วนของยีนที่เฉพาะเจาะจง (specific gene segment) ทำให้ดีเอ็นเอ เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) และมีการแบ่งเซลล์ผิดปกติไป

เซลล์และเนื้อเยื่อของร่างกายมนุษย์ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด เพื่อทำหน้าที่แตกต่างกัน เซลล์แบคทีเรียก็มีองค์ประกอบของเคมีคล้ายกับในเซลล์ร่างกาย ตัวอย่างสารประกอบที่พบในเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่

- ดีเอ็นเอ (DNA) ทำหน้าที่เก็บข้อความทางพันธุกรรม
- อาร์เอ็นเอ (RNA) ถ่ายทอดข้อความทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอมาเป็นโปรตีน
- โปรตีนทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ ตัวเร่ง และตัวควบคุมปฏิกิริยา
- คาร์โบไฮเดรตเป็นโครงสร้างในเซลล์และเนื้อเยื่อและมีหน้าที่สะสมพลังงาน
- ไขมันมีบทบาทเป็นโครงสร้างที่สำคัญในเซลล์และเป็นแหล่งสะสมพลังงานที่สำคัญของร่างกาย

เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะเครียด (oxidative stress) ซึ่งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมและป้องกันปริมาณของอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับปกติที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ร่างกายจะมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระที่เรียกว่า Antioxidant defense system ซึ่งได้แก่สารในกลุ่มเอนไซม์ โปรตีน และสารอาหารต่างๆ เช่น วิตามินซี และวิตามินอี สารต้านอนุมูลอิสระในระบบดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และซ่อมแซมเซลล์ที่ได้รับความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระกับกระบวนการเกิดโรค (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดกระบวนการเผาผลาญในร่างกายจะถูกปลดปล่อยออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ก่อให้เกิดความเสียหายและมีผลกระทบต่อกระบวนการนำไปสู่การแสดงออกทางคลินิก โดยปกติแล้วร่างกายจะมีการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยของเหลวภายในร่างกายที่มีส่วนประกอบเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีโลหะจับอยู่ ได้แก่ เอนไซม์และโปรตีน

การมีปริมาณอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล จะก่อให้เกิดสภาวะเครียดในร่างกาย (oxidative stress) ซึ่งมีบทบาทในการเกิดโรคต่างๆ มากกว่า 100 โรค เช่น ภาวะผนังเส้นเลือดแดงหนา และมีความยืดหยุ่นน้อยลง เนื่องจากการสะสมไขมันที่ผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดตีบตัน เกิดภาวะสมองและหัวใจขาดเลือดชั่วขณะ โรคซึ่งเกี่ยวกับการเสื่อมของประสาท โรคภูมิแพ้ และโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังสัมพันธ์กับลักษณะโรคหรือความผิดปกติอื่นๆ ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบ อันเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ โรคเนื้องอกเรื้อรัง ดาวน์ซินโดรม โรคตับอักเสบ โรคข้ออักเสบ การติดเชื้อเอชไอวี โรคแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากโรคเบาหวาน โรคต้อกระจก แผลเปื่อย อีกทั้งยังมีส่วนที่เกี่ยวกับโรคปอดหลายโรค เช่น โรคปอดที่เกิดจากการสูดใยหิน ไนโตรเจนไดออกไซด์ โอโซน ยากำจัดวัชพืช หรือยารักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังรวมถึงการมีออกซิเจนมากเกินไปในระบบร่างกาย เซลล์ที่มีหน้าที่คุ้มกันและกำจัดเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม มีความเกี่ยวข้องในการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น ในกระบวนการอักเสบและในภาวะที่ร่างกายถูกออกซิไดซ์ หรือมีอนุมูลอิสระมากเกินสมดุล จะทำให้โอกาสเกิดโรคหลายโรคสูงขึ้น เช่น โรคปอดติดเชื้อไวรัส และไข้หวัดใหญ่ เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (ไชยวัฒน์ ไชยสุตและคณะ)

สารต้านอนุมูลอิสระหรือแอนติออกซิแดนท์ (antioxidants) คือ สารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้ยังรวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระนี้มีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ และที่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น butylated hydroxyanisole (BHA) butylated hydroxytoluene (BHT) และ tert-butylhydroquinone (TBHQ)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) ในธรรมชาติอาจแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ

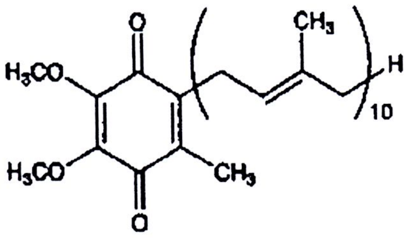
1. **Intracellular antioxidants** ได้แก่ พวกเอนไซม์ catalase superoxide dismutase (SOD) glutathione transferase (GST) glutathione peroxidase (GPx) glutathione reductase (GSR) thiol proteins และ histones เป็นต้น

2. **Extracellular antioxidants** จะมีโมเลกุลขนาดเล็กเมื่อเทียบกับ Intracellular antioxidants ได้แก่ วิตามินซี (ascorbic acid) วิตามินอี (alpha-tocopherol) uric acid bilirubin และ carotenoids เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีสารต้านออกซิเดชันที่พบในผนังเซลล์ ได้แก่ tocopherals beta-carotene ubiquinine (coenzyme Q) และสารต้านออกซิเดชันในระบบหมุนเวียนเลือดที่ได้จากอาหาร ได้แก่ ascorbate ion polyphenols flavonoids glucosinolates procyanidines tocopherols carotenes ส่วนสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันน้อย (weak antioxidants) ได้แก่ albumin tranferin และ lactoferrin

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

1. Coenzyme Q (CoQ)

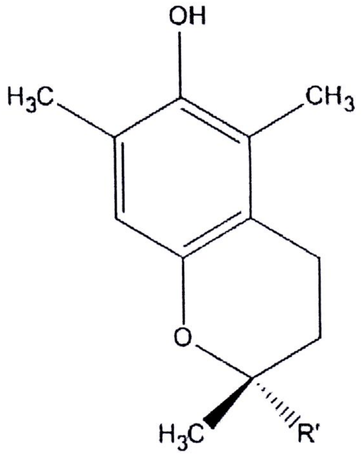


รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของ CoEnzyme Q_{10} (Santosh S และคณะ, 2006)

Coenzyme Q ประกอบด้วย ubiquinone และ ubiquinol ซึ่งทำหน้าที่สำคัญเป็น reducing agent ในไมโตคอนเดรีย ubiquinol มีบทบาทสำคัญในการป้องกันปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (โอภา วัชระคุปต์,2549) ของ LDL-cholesterol ที่ผนังเซลล์ของไมโตคอนเดรีย ซึ่งเชื่อว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันของของ LDL-cholesterol มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด (atherosclerosis) ubiquinol ทำงานร่วมกับวิตามินอีในการต้านอนุมูลอิสระ (Santosh S และคณะ, 2006) เนื่องจาก ubiquinol สามารถเปลี่ยน tocopherol radical กลับเป็นวิตามินอีได้ (ณัฏฐา รัชตะนาวิน, 2547)

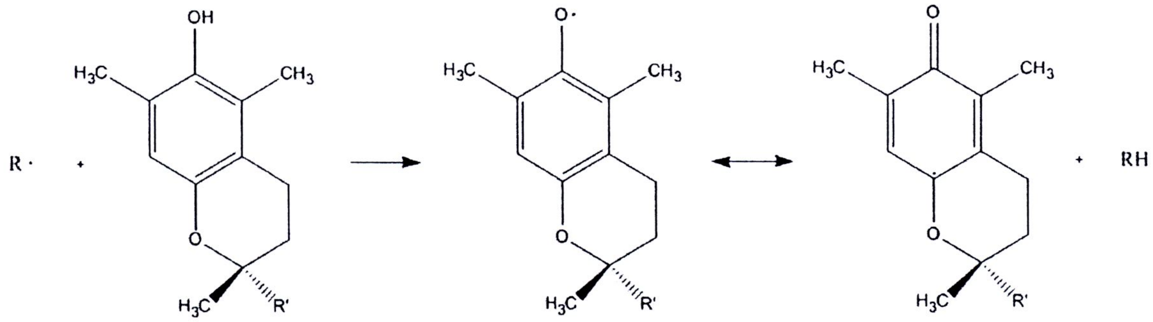
พบว่า ร้อยละ 70 ของ CoQ เป็น ubiquinone โดยในหนูเป็น ubiquinone-9 แต่ในมนุษย์เป็น ubiquinone-10 (10 isoprenoid unit) ปริมาณของ CoQ ที่ผิวหนังสูงใกล้เคียงกับวิตามินอี และจะมีปริมาณสูงขึ้นในผิวหนังที่ถูกแสงแดดเสมอ (ณัฏฐา รัชตะนาวิน, 2547)

2. วิตามินอี



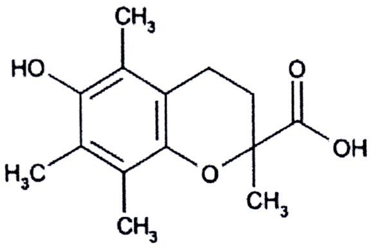
รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างของวิตามินอี (www.ch.ic.ac.uk, 2006)

วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดละลายในน้ำมันที่สำคัญ วิตามินอีในพืชมี 8 isoform โดยมี 2 isoform ที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากคือ tocopherols และ tocotrienols (high potency E หรือ HPE) (Santosh S และคณะ, 2006) โดยวิตามินอีมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันไขมันในผนังเซลล์จากการเกิดออกซิเดชัน พบว่าช่วยปกป้องผิวหนังจากแสงแดดและป้องกันมะเร็งผิวหนัง รวมทั้งช่วยซ่อมแซมผิวและให้ภูมิคุ้มกันผิวหนังอีกด้วย บทบาทในการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี คือ ให้อะตอมไฮโดรเจน ซึ่งจะไปจับกับอนุมูลไลปิดเปอร์ออกซิล และอนุมูลอัลคอกซิล เป็นการหยุดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน ดังรูปที่ 6 แต่เนื่องจากวิตามินอีละลายน้ำไม่ดีและมีฤทธิ์ไม่สูงมาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยดัดแปลงโครงสร้างให้มีฤทธิ์ดีขึ้น เช่น *dl* – tocopheryl nicotinate trolox และอนุพันธ์ต่างๆ (ณัฏฐา รัชตะนาวิน, 2547)



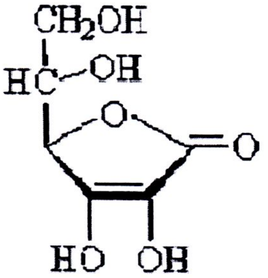
รูปที่ 6 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินอี (www.ch.ic.ac.uk, 2006)

Trolox เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอี ที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี พบว่าวิตามินอีต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน แต่ Trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในหลายโมเดล ดังนั้นในงานวิจัยจึงนิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน (ณัฏฐา รัชตะนาวิน, 2547)



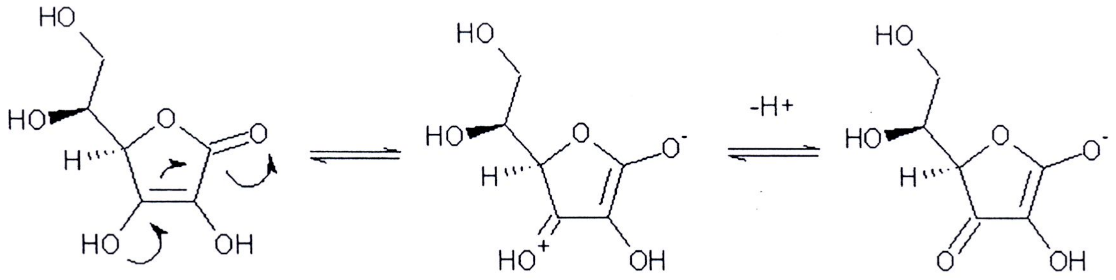
รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างของ 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylcroman-2-carboxylsyre (trolox) (www.axxora.com, 2006)

3. **วิตามินซี**



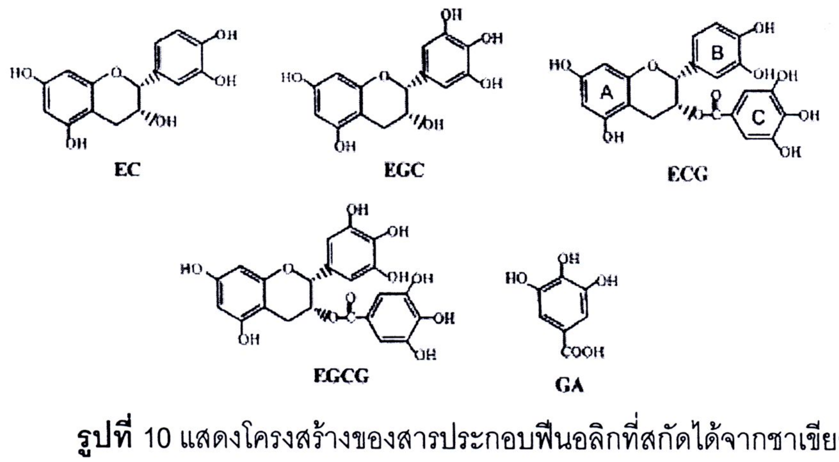
รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างของวิตามินซี (Wikipedia. Ascorbic acid. 2007)

L-ascorbic ซึ่งเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ของวิตามินซี วิตามินซีมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ที่สามารถละลายน้ำได้ดีมาก คงตัวในอากาศเมื่ออยู่ในสภาวะบริสุทธิ์และแห้ง แต่สลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อโดนความชื้นและแสง วิตามินซี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีปริมาณมากในกลุ่ม non enzymatic antioxidant ทำหน้าที่ป้องกันอนุมูลอิสระ การศึกษาประสิทธิภาพของวิตามินซี ในการป้องกันแสงแดดและลดอันตรายของแสงต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ส่วนมากเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ปัจจุบันมีการนำวิตามินซี มาใช้รักษาผิวหนังชราจากแสงแดด โดยเชื่อวิตามินซี นอกจากจะช่วยป้องกันแสงแดดแล้วยังจะช่วยสร้างคอลลาเจนใหม่ได้ ซึ่งกลไกการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะมีการสูญเสียไฮโดรเจนไป 1 อะตอม (Wikipedia. Ascorbic acid. 2007) ดังกลไกในรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี (Wikipedia. Ascorbic acid. 2007)

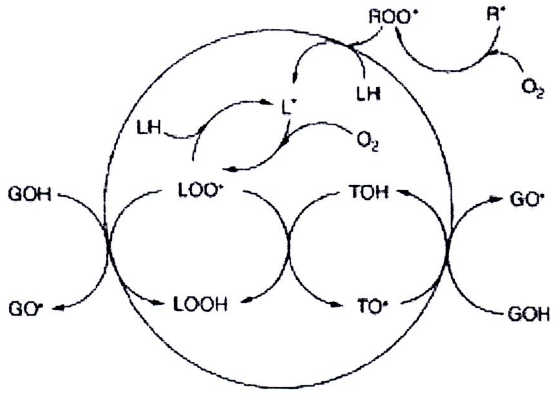
4. **ชาเขียว** (Green tea)



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากชาเขียว

(Zhou B และคณะ, 2006)

ในปัจจุบันเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่กำลังได้รับความสนใจ โดยมี polyphenol เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากรายงานการศึกษาในชาเขียว พบว่าสารสกัดจากใบชาเขียวส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบโพลีฟีนอลิก catechin และอนุพันธ์ เช่น (-)-epicatechin (EC) (-)-epigallocatechin (EGC) (-)-epicatechin gallate (ECG) (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) และ gallic acid (GA) สารเหล่านี้จะมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ดี โดยฉพาะ EGCG ซึ่งฤทธิ์ในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้น เกิดจากการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันใน phospholipidbilayer ใน low density lipoprotein (Zhou B และคณะ, 2006 และ Liu ZQ และคณะ, 2006) ใน epidermal microsomes (Zhou B และคณะ, 2006) ใน synaptosomes (Zhou B และคณะ, 2006 และ Guo Q และคณะ, 2006) และยับยั้งการเกิด tumourigenesis โดยกลไกดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับ initiating radicals (ROO$^{\cdot}$) propagating peroxyl radical (LOO$^{\cdot}$)(Zhou B และคณะ, 2006) (ดังแสดงในรูปที่ 11) และเกี่ยวข้องกับการสร้าง α-tocopheral โดยรีดิวซ์อนุมูลของ α-tocopheroxyl (TO$^{\cdot}$)(Zhou B และคณะ, 2006 และ Liu ZQ และคณะ, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยยืนยันว่าสารประกอบฟีนอลิกในชาเขียวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ (ปรีชา บุญจูง, 2549) และยังมีบทบาทในการเป็น neuroprotective ในโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's diseases) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's diseases) (Weinreb O และคณะ, 2004)

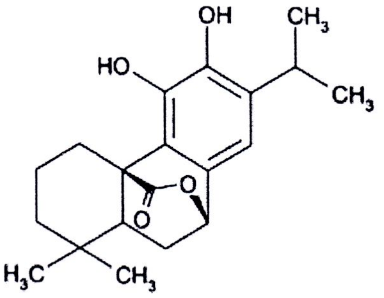


รูปที่ 11 แสดงกลไกการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกในชาเขียว

(Zhou B และคณะ, 2006)

5. สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอกและพบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น ในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8000 ชนิดในธรรมชาติ พบทั้งในโมเลกุลขนาดเล็กเช่น กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และ ฟลาโวนอยด์ และในโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และ แทนนิน เป็นต้น ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน มีรายงานถึงปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนควรได้รับต่อวัน จะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 20 มิลลิกรัม – 1 กรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณวิตามินอีที่ควรได้รับต่อวัน สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมไปถึงการเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และ สามารถลดความดันโลหิตจาก ฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้ มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูล (ปรีชา บุญจูง, 2549)



คุณสมบัติทางกายภาพของสารประกอบฟีนอลิก คือ มีความคงสภาพในสารละลายอินทรีย์ สารละลายทั้งที่มีขั้ว หรือไม่มีขั้ว เช่น carbon tetrachloride และ trichloroethane และยังคงสภาพได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 200 °C นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อแรงตอกอัดได้อีกด้วย (www.axxora.com, 2006) มีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความคงสภาพของสารประกอบฟีนอลิก โดยพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ อุณหภูมิ (Van der sluis AA และคณะ, 2007 และ Talcott ST และคณะ, 2007) ออกซิเจนในอากาศ (Palma M และคณะ, 2006 และ Liazid A และคณะ, 2006) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบ ฟีนอลิกลดลง ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง ทั้งนี้ได้มีการทดลองเก็บสารประกอบฟีนอลิกไว้ที่อุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า สารประกอบฟีนอลิก ณ อุณหภูมิทั้ง 2 มีปริมาณลดลง โดย ณ อุณหภูมิ 35

องศาเซลเซียส มีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกลดลงมากกว่า (Talcott ST และคณะ, 2007) ในด้านปัจจัยเกี่ยวกับออกซิเจนในอากาศ ได้มีการทดลองเก็บสารประกอบฟีนอลิกไว้ในที่ที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่างกัน คือ ร้อยละ 0 20 และ 100 พบว่าที่ความเข้มข้นของออกซิเจนร้อยละ 100 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเหลือน้อยที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้นของออกซิเจนร้อยละ 20 และ 0 จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากขึ้นตามลำดับ ดังนั้น ยิ่งมีความเข้มข้นของออกซิเจนในอากาศมาก ยิ่งทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกลดลง (Van der sluis AA และคณะ, 2007)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) มีความสัมพันธ์กับความจุของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมนิยมหาด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method(Pintukanon C และคณะ, 2006 / Mongkolsilp S และคณะ, 2006 /Chen YT และ Lin KW, 2006/ Stevanato R และคณะ,2006) ซึ่งเป็นการศึกษาการเกิดสีโดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ pH 10 โดยสาร Folin-Ciocalteu จะถูกรีดิวซ์เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ดังสมการ

$$\text{สารประกอบฟีนอลิก} + Na_2CO_3 + \text{FC reagent} \longrightarrow \text{สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน}$$

จากนั้นนำสารละลายที่เป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินไปวิเคราะห์โดยเครื่อง UV – Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร(หมอชาวบ้าน,2545) ซึ่งข้อดีของวิธี Folin-Ciocalteu method คือ เป็นวิธีที่มีความเฉพาะเจาะจง *(specific)* รวดเร็ว และ ไม่มีสารเคมีอื่น เช่น ascorbate citrate หรือ sulfate รบกวนการเกิดปฏิกิริยา (Stevanato R และคณะ,2006)

ระบบการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (ไชยวัฒน์ ไชยสุตและคณะ) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. Primary antioxidants

ทำหน้าที่โดยการป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่จะเกิดขึ้น โดยการเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้กลายเป็นโมเลกุลที่ไม่มีอันตราย ก่อนที่อนุมูลอิสระนั้นจะไปทำลายหรือทำปฏิกิริยากับสารอื่น สำหรับสารในกลุ่มนี้ เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตต (SOD) เอนไซม์คาตาเลส (CAT) และ เอนไซม์กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPx)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2. Secondary antioxidants

ทำหน้าที่ในการจับกับอนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ อันเป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องถ่ายทอดกันหรือกระทบกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นอย่างไม่สิ้นสุดและต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ สำหรับสารในกลุ่มนี้ เช่น วิตามินอี (alpha-tocopherol) beta-carotene วิตามินซี (ascorbic acid) uric acid bilirubin และ albumin เป็นต้น

3. Tertiary antioxidants

ทำหน้าที่ในการซ่อมแซมสารชีวโมเลกุลที่ถูกทำให้เสียหาย (damage) โดยอนุมูลอิสระ สำหรับสารในกลุ่มนี้ เช่น DNA-repaired enzymes, methionine sulphoxide reductase เป็นต้น

ดัชนีชีวภาพ (Biomarker) **สำหรับชี้วัดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล** (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

ดัชนีชีวภาพ (Biomarker) สำหรับชี้วัดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล มีแนวทางในการวัดได้ 2 แนวทางคือ การวัดอนุมูลอิสระโดยตรง และ การวัดระดับความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่เป็นผลิตผลของอนุมูลอิสระมีความไวสูง การวัดอนุมูลอิสระโดยตรงทำได้ยาก เพราะ อนุมูลอิสระมีระยะครึ่งชีวิตสั้นมาก คือ อยู่ในระดับวินาที จึงทำการวัดได้ยาก

<u>วิธีการวัดดัชนีชีวภาพที่ใช้บ่งชี้ภาวะถูกออกซิไดซ์มากเกินสมดุล</u> สามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. วัดปริมาณอนุมูลอิสระและสารเกี่ยวข้องที่มีความไวสูงโดยตรง ซึ่งการวัดอนุมูลอิสระโดยตรงมีข้อจำกัดในเรื่อง เครื่องมือ และ วิธีการ
2. วัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารต้านออกซิเดชัน ที่อยู่ในร่างกายตามธรรมชาติ เช่น วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เป็นต้น
3. วัดปริมาณเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และ สารที่เกี่ยวข้องหรือทำหน้าที่ขจัดอนุมูลหรือต้านออกซิเดชัน เช่น เอนไซม์เอสโอดี เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
4. วัดปริมาณความเสียหายที่เกิดกับชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย กล่าวคือ การวัดสารที่เป็นผลิตผลจากการที่ไลปิด โปรตีน และดีเอนเอ ถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ หรือผลิตผลจากอนุมูลอิสระ
5. วัดประสิทธิภาพหรือความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลหรือต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity หรือ TAC) โดยนำเลือด พลาสมา หรือสารต้านออกซิเดชันมาหาความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลต่างๆ

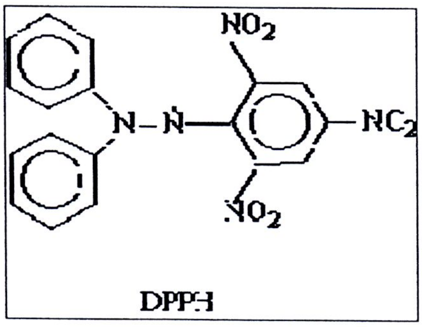
ดัชนีชี้วัดจากความสามารถรวมในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC) (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

จากการที่ร่างกายและเซลล์มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้หลายชนิด จึงมีระบบควบคุมป้องกันไม่ให้มีอนุมูลอิสระเกินสมดุล คือ สารขจัดอนุมูลอิสระ เช่น อัลบูมิน เฟอริติน วิตามินซี เป็นต้น และ เอนไซม์ขจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด การใช้ดัชนีจากการหาปริมาณสารต้านออกซิเดชันเดี่ยวๆ หรือ การวัดปริมาณการเกิดชีวโมเลกุล ที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เสียหาย เป็นดัชนีวัดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล ว่ามีระดับมากน้อยเพียงใดนั้น อาจไม่เป็นค่าที่สะท้อนถึงภาพรวมของภาวะออกซิเดชันของร่างกายหรือสารตัวอย่าง ดังนั้นจึงมีการหาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งเป็นการรวมองค์ประกอบทั้งหมดของภาวะรีดอกซ์ โดยมีวิธีการวัดดังนี้คือ วิธี TRAP ORAC FRAP TEAC และ DPPH ซึ่งวิธี DPPH มีข้อดีคือ ทำง่าย ใช้เครื่องมือทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ โดยมีหลักการดังนี้

วิธี DPPH Radical Scavenging Assay (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

อนุมูล DPPH˙ มีสูตรโครงสร้างตามรูปที่ 12 ซึ่งเป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว และมีสีม่วง โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับอนุมูล ABTS การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ โดยใช้เครื่องมือ Electron Paramagnatic Resonance (EPR) หรือใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์วัดการลดลงของสี หลังจากเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร การเกิดปฏิกิริยา แสดงดังสมการ

2,2-diphenyl-picryl hydrazyl (DPPH) + antioxidant ⟶ Diphenyl picryl hydrazine
(สีม่วง) (สีเหลือง)



รูปที่ 12 แสดงโครงสร้าง 2,2-diphenyl-picryl hydrazyl (DPPH)

ต่อมามีการพัฒนาใช้ DPPH ในการหาความสามารถในการต้านอนุมูล เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) โดยคำนวณจากสมการ

$AE = 1/ EC_{50} T_{EC50}$

เมื่อ

EC_{50} = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH˙ เริ่มต้นลงได้ 50%

T_{EC50} = เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลให้ได้ EC_{50}

ข้อด้อยของวิธีนี้ คือ อนุมูล DPPH˙ มีความคงตัว ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะ จัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH˙ ที่แสดงจะเห็นว่า อิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงและหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยา ขจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งๆที่สารต้านอนุมูลนั้น มีฤทธิ์ดีในการขจัดอนุมูลเปอร์ออกซี นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระ สามารถทำให้สี DPPH˙ จางลงได้อีกด้วย (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

2.4 การศึกษาและทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Immune system) (รัชนี เมฆมณี และคณะ , 2540)

เราสามารถแบ่งชนิดของภูมิคุ้มกันตามกลไกการป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกายได้ดังนี้

1. **ภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ** (Non-specific immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันโดยทั่วไปของร่างกายไม่จำเพาะเจาะจงต่อแอนติเจนชนิดใด ได้แก่

1.1 Physical barrier

เครื่องกีดขวางทางกายภาพ เช่น ผิวหนัง เซลล์เยื่อบุผิว ทำหน้าที่ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ เข้าสู่ร่างกายได้ง่าย

1.2 Phagocytosis

การจับกินโดยเซลล์ของร่างกายของร่างกาย (phagocytic cell) เช่น neutrophil monocyte macrophage ทำหน้าที่จับกินจุลินทรีย์และสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่ผ่าน physical barrier เข้าไปในร่างกาย

2. **ภูมิคุมกันชนิดจำเพาะ** (Specific immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันของร่างกายที่สร้างขึ้นหลังจากเคยได้รับการกระตุ้นมาก่อน มีปฏิกิริยาที่

จำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นตัวกระตุ้นหรือแอนติเจนที่คล้ายคลึงกันเท่านั้น ภูมิคุ้มกันชนิดนี้แบ่งเป็น

2.1 Humoral immunity

เป็นภูมิคุ้มกันที่อาศัยแอนติบอดีเป็นปัจจัยหลักในการทำลายแอนติเจน เซลล์ที่มีหน้าที่หลักในกลไกนี้ คือ B-Lymphocyte

2.2 Cellular immunity

เป็นภูมิคุ้มกันที่อาศัย lymphocyte เป็นปัจจัยหลักในการทำลายแอนติเจนนั้นๆ เซลล์ที่มีหน้าที่หลักในกลไกนี้ คือ T-Lymphocyte

ร่างกายของมนุษย์จำเป็นต้องอาศัยภูมิคุ้มกันทุกชนิดข้างต้นที่กล่าวมา ทำงานร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพและสมดุลเพื่อให้ดำรงชีวิตได้อย่างปกติสุข หากภูมิคุ้มกันผิดปกติมากหรือน้อยเกินไป จะทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา ซึ่งการรักษาภาวะภูมิคุ้มกันปกติอีกวิธีหนึ่งคือ การปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation)

การปรับภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation)

การปรับภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) หมายถึง การปรับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธีต่างๆ เพื่อให้ได้ผลเพิ่มหรือลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตามที่ต้องการ ในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยปกตินั้น ส่วนประกอบต่างๆ ทั้งที่เป็นเซลล์และสารน้ำต่างทำงานประสานกันอย่างต่อเนื่อง เพื่อตอบสนองต่อแอนติเจนที่มากระตุ้น เซลล์หลักที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อเซลล์ต่างๆ คือ T-Lymphocyte B-Lymphocyte และ macrophage รวมทั้งสารที่ผลิตและหลั่งจากเซลล์ทั้งสามชนิดนี้

การปรับสภาวะของภูมิคุ้มกันถ้าแบ่งตามผลของการตอบสนองที่ได้รับสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. **การเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกัน** (Immunopotentiation)

1.1 **การสร้างเสริมภูมิคุ้มกัน** (Immunization) หมายถึง การทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรคต่างๆ ขึ้น ทำได้ 2 วิธี

1.1.1 Active immunization หรือ Vaccination

คือ การทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันโรคด้วยตนเอง โดยการให้แอนติเจนหรือวัคซีน สารดังกล่าวจะกระตุ้นให้ร่างกายค่อยๆ สร้างภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะต่อโรคนั้นๆ ขึ้นมา ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจะมีทั้งภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) และภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity)

1.1.2 Passive immunization

คือ การทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันโรคเกิดขึ้นทันที โดยการให้สารที่มีคุณสมบัติป้องกันโรคได้อยู่แล้ว เช่น แอนติบอดีหรือแกมมาโกลบูลินที่มีความจำเพาะต่อโรคเข้าไปในร่างกาย ถ้าเป็น lymphocyte ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการเข้าไป เรียก Adoptive immunization หรือ Passive cellular immunization

1.2 สารเพิ่มภูมิคุ้มกัน (Immunopotentiator) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์เพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ยกตัวอย่างเช่น

1.2.1 Adjuvant

การที่ร่างกายสามารถสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้อย่างเพียงพอภายหลังการได้รับวัคซีนนั้น สาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ มีการเติมสารที่มีฤทธิ์ตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน คือ adjuvant ลงไปในวัคซีน ตัวอย่างของ adjuvant ได้แก่ Freund 's adjuvant Alum (potassium alum sulfate) และ MDP (muramyl dipeptide)

1.2.2 Cytokines

เป็นกลุ่มของสารน้ำที่หลั่งจากเซลล์หลายชนิดในร่างกาย โดยเฉพาะเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นแบบจำเพาะ (specific immune respond) Cytokines จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเป็นผลให้เกิดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นมากขึ้น ตัวอย่าง Cytokines ที่มีการนำมาใช้แล้ว ได้แก่

Interferon (INF) มีฤทธิ์เพิ่มการทำลายเซลล์มะเร็งและไวรัส แต่จะมีอาการไม่พึงประสงค์ ได้แก่ ไข้ หนาวสั่น ปวดเมื่อยตามตัว คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ใจสั่น ความดันลด เกล็ดเลือดต่ำ และอาจเกิดพยาธิสภาพของปลายประสาทได้

Interleukin-2 (IL-2) ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง โดยเพิ่มความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งของ NK cell และเพิ่มความสามารถของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ในการทำลายเซลล์มะเร็ง

Tumor Necrosis Factor (TNF) ใช้ในการรักษามะเร็งในระบบทางเดินอาหารและกระเพาะปัสสาวะ แต่มีอาการไม่พึงประสงค์ คือ ไข้ หนาวสั่น ความดันเลือดต่ำ ปวดศีรษะ และถ้าให้ในขนาดสูงเกินไปจะมีผลทำให้เกิดอาการผอมแห้งและช็อกได้

Isoprinosine (Inosiplex®) เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เพิ่มการผลิตแอนติบอดี เพิ่มการทำงานของ T-cell , macrophage และ NK cell แต่มีผลทำให้กรดยูริกในเลือดสูง

Levamisole เป็นยาถ่ายพยาธิ แต่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ใช้ร่วมกับ 5-FU ภายหลังการผ่าตัดมะเร็งลำไส้ใหญ่ระยะที่ 3 แต่มีผลข้างเคียง คือ คลื่นไส้ อาเจียน ออกผื่น และ agranulocytosis (รัชนี เมฆมณี และคณะ , 2540)

2. **การลดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน** (Immunosuppression)

Immunosuppressive therapy หมายถึง การรักษาด้วยวิธีการยับยั้งการทำงานหรือกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยการให้สารที่มีฤทธิ์กดการทำงานดังกล่าว (Immunosuppressant) ซึ่งได้แก่

- Corticosteroid ใช้เพื่อลดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และลดการอักเสบในหลายๆ โรค เช่น acute rheumatic fever , rheumatoid arthritis และใช้ป้องกันการสลัดกราฟท์จากการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นต้น แต่มีอาการไม่พึงประสงค์ซึ่งเกิดจากการได้รับยาเป็นระยะเวลานานๆ คือ กระดูกผุ บวม กดการเจริญเติบโตในเด็ก กดการทำงานของต่อมหมวกไต ความดันเลือดสูง เกร็ดเลือดต่ำ และติดเชื้อได้ง่าย
- Cyclophosphamide ใช้รักษา rheumatoid arthritis autoimmune Hemolytic anemia systemic lupus erythematosus ผลข้างเคียงของยา คือ การกดไขกระดูก ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ผมร่วง
- Methotrexate ใช้รักษา rheumatoid arthritis psoriasis แต่ผลข้างเคียงของยา คือ มีพิษต่อไตสูงมาก
- Monoclonal antibody specific with subset of T – cell (OKT3) ใช่รักษาและป้องกันการสลัดกราฟท์ แต่มีพิษต่อระบบประสาท ทำให้ชัก สมองบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ

การทดสอบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

การทดสอบที่เกี่ยวกับเซลล์ต่างๆทางวิทยาคุ้มกัน สามารถทำได้หลายวิธี ทั้งการทดสอบด้านเซลล์และด้านสารน้ำ ซึ่งมีการทดสอบในสัตว์ทดลอง (in vivo test) และในหลอดทดลอง (in vitro test) และในส่วนนี้จะกล่าวเฉพาะการทดสอบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในหลอดทดลอง โดยทั่วๆ ไปหลักการทดสอบในหลอดทดลอง ได้แก่ การตรวจนับเซลล์ชนิดต่างๆ ของภูมิคุ้มกัน โดยอาศัย เครื่องมือจำเพาะ (marker) หรือที่รับจำเพาะ (receptor) ซึ่งมีอยู่บนผิวเซลล์แต่ละชนิด และการทดสอบการทำงาน (function) ของเซลล์แต่ละชนิดของระบบภูมิคุ้มกัน

ในปัจจุบันการตรวจนับเซลล์ชนิดต่างๆ ทำได้ง่ายและมีความแม่นยำมากขึ้น โดยอาศัยการตรวจเครื่องหมายจำเพาะบนผิวเซลล์ (surface marker) ของเซลล์แต่ละชนิด โดยใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อ surface marker นั้นๆ ด้วยการติดฉลากเรืองแสง และตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง หรือเครื่องมือ Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) โดยสามารถวิเคราะห์ขนาด การสะท้อนแสง และการเรืองแสงของเซลล์นั้นๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเซลล์ที่มีคุณสมบัติที่ต้องการจากเซลล์อื่นได้

การทดสอบการทำงานของ lymphocyte ส่วนใหญ่มักใช้เซลล์ที่ได้จากกระแสเลือดที่ผ่านการแยกเอาเม็ดเลือดแดงและ polymorphonuclear cells ออกไปก่อน ซึ่งทำได้โดยการปั่นผ่าน density gradient ที่ประกอบด้วยสาร Ficoll-Hypaqua ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงกว่า 1.077 ซึ่งได้แก่เม็ดเลือดแดงและ polymorphonuclear leukocyte จะตกลงไปที่ก้นหลอดทดลอง ส่วน mononuclear cells ซึ่งได้แก่ lymphocyte และ monocyte จะลอยอยู่ตรงกลางระหว่างชั้นพลาสมาและ Ficoll-Hypaqua

วิธีการทดสอบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์

I.**การตรวจ** Natural killer cells

1.**การตรวจนับ** Natural killer cells

ทำโดยอาศัย antibody ต่อ CD56 และ CD16 ของ NK-cells ตรวจด้วยวิธี Immunofluorescence

2.**การตรวจการทำหน้าที่ของ** Natural killer cells

2.1 Natural killer cells activity

คือ การทดสอบความสามารถของ NK-cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายที่มีความไวต่อการทดสอบนี้ เช่น erythroleukemia cell line K562 หลักการทดสอบ คือ ติดฉลากเซลล์เป้าหมายของสารกัมมันตรังสี เช่น ^{51}Cr แล้วนำไปผสมกับ lymphocytes เซลล์เป้าหมายถูกเซลล์ทำลายจะปล่อยสารกัมมันตรังสีออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ปั่นแยกเอาส่วนที่เป็นเซลล์ออก แล้ววัดรังสีในส่วนที่เป็นน้ำ

2.2 Antibody dependent cell-mediate cytotoxicity (ADCC)

เป็นปฏิกิริยาการทดสอบ NK cells ทำลายเซลล์เป้าหมาย โดยอาศัยแอนติบอดีจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายซึ่งจับกับที่รับสำหรับส่วน Fc ของ Ig G บนผิวของ NK cells วิธีการคือใช้เม็ดเลือดแดงไก่เป็นเซลล์เป้าหมาย มาติดฉลากด้วย ^{51}Cr แล้วเคลือบแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงไก่ที่เตรียมขึ้นในกระต่าย จากนั้นนำมาผสมกับ lymphocytes NK

cells ที่มีที่รับสำหรับส่วน Fc ของ Ig G จะจับกับเม็ดเลือดแดงที่มี Ig G เคลือบอยู่บนผิว ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลายและปล่อยสารกัมมันตรังสีออกมา วัดรังสีดังกล่าว ทดสอบแบบเดียวกันโดยใช้เม็ดเลือดแดงที่ไม่มี Ig G เคลือบบนผิว

II.การตรวจ neutrophils **และ** Monocytes

1.**การตรวจนับ** neutrophils **และ** Monocytes

neutrophils มีนิวเครียสที่แตกต่างจาก mononuclear cell และมีแกรนูลอยู่ใน cytoplasm ทำให้สามารถตรวจนับได้โดยการย้อมเม็ดเลือดขาวธรรมดา ส่วน monocytes สามารถตรวจนับได้โดยการย้อมเม็ดเลือดขาวเช่นเดียวกันหรือโดยให้ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ CD14ซึ่งเป็นแอนติบอดีจำเพาะบนผิวของโมโนไซท์และนำไปตรวจด้วยวิธี Immunofluorescence

2.**การตรวจความสามารถในการทำหน้าที่ของ** neutrophils **และ**Monocytes

2.1 **การเคลื่อนที่** (motility)

ทำได้โดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ neutrophil ภายใต้แผ่น agarose ใน petridish โดยใช้สาร chemotactic

2.2 **การกลืนกิน** (ingestion)

การทดสอบความสามารถในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเข้าไปไว้ในเซลล์ ทำได้โดยผสม neutrophils กับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ที่เคลือบด้วย opsonin ซึ่งอาจเป็นคอมพลีเมนต์หรือแอนติบอดี ซึ่งทำให้ neutrophils กลืนกินสิ่งแปลกปลอมได้ดีขึ้น แล้วนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสม แล้วย้อมสีและนับจำนวน neutrophils ที่มีสิ่งแปลกปลอมอยู่ภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.3 Intracellular killing **โดยวิธี** nitroblue tetrazolium (NBT) dye reaction

เป็นการทดสอบขั้นตอน respiratory burst โดย superoxide anion ที่ PMN สร้างขึ้น จะไป reduce NBT dye ซึ่งเป็นสารน้ำใสสีเหลืองให้เปลี่ยนเป็น formazan สีน้ำเงินเข้ม ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer หรืออีกวิธีหนึ่ง คือ chemiluminescence หลักการคือ reactive oxygen compound ต่างๆ ได้แก่ H_2O_2 superoxide radical และ singlet oxygen จะทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียและสารอื่นๆ ใน phagosome เกิดสารที่มี unstable carboxyl groups ที่มีพลังงานสูง สารนี้จะปล่อยพลังงานออกมาเพื่อเปลี่ยนตัวเองเป็น stable compound ที่มีพลังงานต่ำลง พลังงานที่ปล่อยออกมานี้สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง liquid scintillation count

III.การตรวจนับ B-Lymphocytes มีหลายวิธีดังนี้

1.การตรวจนับ B-Lymphocytes

1.1 **การตรวจ** surface immunoglobulin (sIg) B-lymphocytes **ที่เจริญเต็มที่แล้ว**

คุณสมบัติเฉพาะตัว คือ มีอิมมูโนโกลบูลินอยู่ที่ผิวเซลล์ ส่วนใหญ่เป็น Ig M และ IgD อยู่บนเซลล์เดียวกัน การตรวจ sIg ใช้วิธี Immunofluorescence โดยใช้แอนติบอดีต่อ light chain ก็ได้

1.2 **การตรวจ** Fc receptor **การหา** B-lymphocytes

โดยใช้ที่รับส่วน Fc ของ IgG ที่อยู่บนผิวเซลล์เป็นเครื่องหมาย ทำปฏิกิริยากับ IgG แล้วตรวจด้วยวิธี direct immunofluorescence หรือ indirect immunofluorescence โดยใช้ IgG และแอนติบอดีต่อ IgG ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

1.3 **การตรวจแอนติเจน** CD19 **และ** CD20

เป็นแอนติเจนที่พบบนผิวของ B-Lymphocytes ที่เจริญเต็มที่แล้วในกระแสเลือด ทำโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน CD19 และ CD20 ในการตรวจนับปริมาณ B-Lymphocytes

2.การตรวจการสร้างและหลั่งอิมมูโนโกลบูลินโดย B-Lymphocytes

B-Lymphocytes มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ lymphocyte อื่นๆ และเม็ดเลือดอื่นๆ ไม่มี คือ สามารถสร้างและหลั่งอิมมูโนโกลบูลินได้ การนำ monoclonal cell มาตรวจดูความสามารถในการสร้างและหลั่งอิมมูโนโกลบูลิน จึงเป็นการตรวจการทำงานของ B-Lymphocytes การตรวจที่เรียกว่า reverse hemolytic plaque assay มีหลักการคือ เคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วย antihuman Ig antibody โดยใช้สาร chromic chloride ช่วยผสมเม็ดเลือดแดงที่เคลือบแล้วเข้ากับ Lymphocytes นำไปผสมกับวุ้น agarose เทลง petridish ปล่อยให้วุ้นแข็งตัว หลังจากนั้นจึงราด antihuman Ig antibody และคอมพลีเมนต์ทับลงไปบนวุ้น อิมมูโนโกลบูลินที่หลั่งออกมาจาก B-Lymphocytes จะทำปฏิกิริยากับ antihuman Ig antibody เป็น immune complex แล้ว กระตุ้นคอมพลีเมนต์ จึงเกิดการแตกสลายของเม็ดเลือดแดงแกะที่มี immune complex จับอยู่เป็นวงๆ hemolysis อยู่รอบๆ B-Lymhocytes ที่หลั่งอิมมูโนโกลบูลิน นับจำนวนวง hemolysis ก็จะทราบจำนวน B-Lymhocytes ที่มีความสามารถในการสร้างและหลั่งอิมมูโนโกลบูลิน

IV.การตรวจนับ T-Lymphocyte มีวิธีการตรวจหลายวิธีดังนี้

1.การตรวจนับ T-Lymphocyte

1.1 การตรวจที่รับเม็ดเลือดแดงแกะ

T-Lymphocyte มีลักษณะพิเศษที่ต่างจากเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ คือ บนผิวเซลล์มีที่รับสำหรับจับกับเม็ดเลือดแดงแกะ เมื่อนำเซลล์ทั้งสองมารวมกัน เม็ดเลือดแดงแกะจะเกาะติดอยู่กับที่รับดังกล่าวบน T-Lymphocyte เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นเป็นรูปคล้ายดอกกุหลาบเรียกว่า E-rosette หรือ spontaneous sheep erythrocyte rosette ด้วยวิธีนี้สามารถตรวจนับลิมโฟซัยท์ได้

1.2 การตรวจ T-Lymphocyte subpopulation

จะเป็นการตรวจหาแอนติเจน CD3 CD4 CD8 ที่พบอยู่บนผิวของ T-Lymphocyte โดย CD3 อยู่บน T-Lymphocyte ทุกเซลล์ CD4 ส่วนใหญ่พบบน helper T-Lymphocyte และ CD8 ส่วนใหญ่พบอยู่บน suppressor T-Lymphocyte และ/หรือ cytotoxic T-Lymphocyte การตรวจแอนติเจนเหล่านี้จะใช้ monoclonal antibody-anti CD3 anti CD4 หรือ anti CD8 นำมาย้อมเซลล์ด้วยวิธี direct immunofluorescence

2.การตรวจการทำหน้าที่ของ T-Lymphocyte

2.1การตรวจความสามารถในการเปลี่ยนรูปของลิมโฟซัยท์ (lymphocyte transformation)

เป็นการวัดความสามารถในการตอบสนองของลิมโฟซัยท์ เมื่อกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจนทั้ง T-Lymphocyte และ B-Lymphocyte จะเปลี่ยนรูปเป็นลิมโฟบลาสท์ซึ่งตรวจได้โดยดูการสร้าง deoxyribonucleic acid (DNA) โดยอาศัยหลักการที่ว่า การเปลี่ยนแปลงจากลิมโฟซัยท์เป็นลิมโฟบลาสท์นั้น เซลล์จะต้องเพิ่มการสร้าง DNA เนื่องจาก T-Lymphocyte เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักในปฏิกิริยา จึงใช้ในการตรวจสอบการทำงานของ T-Lymphocyte ได้

2.1.1 **การกระตุ้นด้วยไมโตเจน** (mitogen)

ไมโตเจนคือสารที่สามารถกระตุ้นลิมโฟซัยท์ให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยไม่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนใดๆ ส่วนใหญ่สารนี้จะเป็น glycoprotein จากพืชที่รวมเรียกว่า lectin ไมโตเจนที่ใช้กันบ่อยๆ คือ Phytohemagglutinin (PHA) และ Concanavalin A (Con A) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้น T-Lymphocyte เป็นส่วนใหญ่ ส่วน Pokeweed mitogen (PWM) มีฤทธิ์กระตุ้นทั้ง T-Lymphocyte และ B-Lymphocyte ไมโตเจนอื่นๆ ได้แก่ protein A ซึ่งได้จากเชื้อ

แบคทีเรีย *Staphylococus aureous* สายพันธุ์ Cowan I ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นเฉพาะ B-Lymphocyte เท่านั้น

การกระตุ้นลิมโฟซัยท์ด้วยไมโตเจนทำได้โดยการเลี้ยงลิมโฟซัยท์ร่วมกับไมโตเจนในหลอดทดลองและใส่สารที่เป็นต้นกำเนิด (Precursor) ของ DNA ลงไปเพื่อให้ลิมโฟซัยท์ที่เปลี่ยนเป็นลิมโฟบลาสท์นำไปใช้ สารดังกล่าวคือ thymidine ซึ่งติดฉลากไว้ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ส่วนใหญ่ใช้ tritium-labeled thymidine หรือเรียกว่า tritiated thymidine (^{3}H-thymidine) แล้วแยกแต่ส่วนที่เป็นเซลล์ออกมาวัดปริมาณรังสีเบต้า (β radiation) ด้วย scintillation counter ก็จะทราบปริมาณการแบ่งตัวใหม่จากปริมาณสารรังสี ^{3}H-thymidine ที่มีอยู่ภายในเซลล์เหล่านั้น

2.1.2 **การกระตุ้นด้วยแอนติเจน**

เป็นการวัดความสามารถของลิมโฟซัยท์ในการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ต้องการตรวจ โดยวัดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ หลักการและวิธีการของการทดสอบนี้คล้ายกันกับการทดสอบกระตุ้นด้วยไมโตเจน แต่ใช้แอนติเจนในการกระตุ้นแทน และใช้เวลาในการทดสอบยาวนานขึ้น เนื่องจากปริมาณลิมโฟซัยท์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดหนึ่ง มีน้อยมากกว่า 0.01 % ของจำนวนลิมโฟซัยท์ทั้งหมด แอนติเจนที่ใช้กันบ่อยๆ ได้แก่ purified protein derivative (PPD) ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* , Streptokinase-Streptodornase (SK-SD) จากเชื้อ *Streptococcus* เป็นต้น

2.2 **การตรวจวัดปริมาณซัยโตไคน์** (Cytokine) **และ** Soluble cell products

ซัยโตไคน์เป็นสารน้ำที่หลั่งจากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อเซลล์เหล่านี้ถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจน ซัยโตไคน์ที่นิยมใช้วัดการทำงานของ T-Lymphocyte ได้แก่ IL-2 Interferon gamma

2.2.1 **การตรวจ** IL-2 **และ** receptor (IL-2R)

การทดสอบนี้ใช้ทดสอบการทำงานของ T-Lymphocyte ในหลอดทดลอง มีหลักการคือ เมื่อ T-Lymphocyte ถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจนที่มีลักษณะจำเพาะก็จะหลั่ง IL-2 ออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ขณะเดียวกัน T-lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นก็จะมีปริมาณ IL-2R บนผิวเซลล์มากขึ้นและหลุดออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ ทำให้เราสามารถนำเอาน้ำเลี้ยงเซลล์มาวัดปริมาณ IL-2 และ IL-2R ทำโดยวิธี ELISA โดยอาศัยโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ IL-2 และ IL-2R มีประโยชน์ในการวินิจฉัยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องชนิดต่างๆ

2.2.2 การตรวจอินเตอร์เฟียรอน (IFN)

อินเตอร์เฟียรอน (IFN) เป็น cytokine ที่มีคุณสมบัติเป็น immunoregulatory protein ที่มีผลต่อเซลล์ต่างๆ หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน IFN-γ เป็นอินเตอร์เฟียรอนที่ผลิตโดย T-Lymphocyte ทั้งชนิดที่มี $CD4^+$ และ $CD8^+$ T-Lymphocyte ซึ่งจะหลั่ง IFN-γ ได้หลังจากถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจำเพาะหรือสิ่งกระตุ้นที่ไม่จำเพาะ เช่น anti-lymphocyte antibody IL-2 ไมโตเจน เป็นต้น

การตรวจอินเตอร์เฟียรอนทำได้ 2 วิธี คือ bioassay และ immunoassay การตรวจด้วยวิธี bioassay อาศัยคุณสมบัติของอินเตอร์เฟียรอนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ซึ่งมีคุณสมบัติของ IFN-γ , IFN-α , IFN-β การทดสอบมีหลักการดังนี้ คือ ให้สิ่งส่งตรวจที่มีอินเตอร์เฟียรอนทำปฏิกิริยากับเซลล์ที่ใช้เลี้ยงไวรัส อินเตอร์เฟียรอนที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจนั้นจะไปทำให้เซลล์มีความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัส หลังจากนั้นล้างเอาอินเตอร์เฟียรอนออกจากเซลล์ แล้ววัดเปรียบเทียบปริมาณไวรัส จากเซลล์ที่ได้รับอินเตอร์เฟียรอนกับไวรัสที่ไม่ได้รับอินเตอร์เฟียรอน ไวรัสที่นิยมใช้ในการทดสอบนี้ คือ vascular stomatitis virus ซึ่งมีความไวต่อฤทธิ์ของอินเตอร์เฟียรอน

2.2.3 การตรวจ soluble CD8

เป็นแอนติเจนที่อยู่บน mature lymphocytes ที่ทำหน้าที่เป็น cytotoxic หรือ suppressor cell โดยที่จะหลั่งออกมาทั้งในภาวะที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นโดยจะพบ soluble CD8 เพิ่มในภาวะที่มีการกระตุ้นและการเพิ่มจำนวน CD8 T-lymphocyte การเพิ่มขึ้นของ CD8 จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายของการเพิ่มการทำงานของ CD8 T-lymphocyte ได้ การตรวจวัด soluble CD8 ทำโดยวิธี ELISA ซึ่งอาศัยโมโนโคลนัลแอนติบอดีจำเพาะ และเปรียบเทียบกับ CD8 มาตรฐานที่ทราบแล้ว

2.2.4 การตรวจการทำลายเซลล์โดย cytotoxic T-Lymphocytes

Cytotoxic T-Lymphocyte ทำหน้าที่ทำลายเซลล์แปลกปลอม เช่น เซลล์ของร่างกายที่ติดเชื้อไวรัส เซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในร่างกาย และกลไกการสลัดกราฟท์ ทั้งนี้ Cytotoxic T-Lymphocyte ที่ทำหน้าที่นี้จะต้องเป็นเซลล์ที่มีที่รับจำเพาะสำหรับแอนติเจนบนเซลล์แปลกปลอม

จากการทดสอบ cytotoxic T-Lymphocytes ที่จำเพาะสำหรับแอนติเจน (antigen specific cytotoxic T cell assay) ใช้ตรวจวัดปริมาณ cytotoxic T-Lymphocytes ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแปลกปลอมที่อยู่บนผิวเซลล์ ทำโดยการใช้เซลล์เป้าหมายติดฉลาก

สารรังสี ^{51}Cr เมื่อลิมโฟซัยท์ทำปฏิกิริยากับเซลล์เป้าหมาย ^{51}Cr จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ถูกทำลาย และสามารถตรวจวัดปริมาณรังสีที่ปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ เป็นการตรวจสอบความจำเพาะของ cytotoxic T-Lymphocytes

สำหรับการทดสอบการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการทดสอบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ โดยวัดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาวชนิด T-Lymphocytes (Lymphocytes proliferation assay) ด้วย MTT assay

Lymphocytes proliferation assay

เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟซัยท์ หลักการคือ เมื่อ Lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วย mitogen ซึ่งเป็นสารพวก glycoprotein ได้แก่ phytohemaggutinin (PHA) ซึ่งกระตุ้น T-Lymphocyte pokeweed mitogen (PWM) ซึ่งกระตุ้น B-Lymphocytes ไมโตเจนดังกล่าวจะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ Lymphocytes โดยวิธีที่นิยมตรวจวัดคือการใช้สารกัมมันตภาพรังสีติดฉลากกับ precursor ของ DNA ส่วนใหญ่ใช้ tritium-labeled thymidine หรือเรียกว่า tritiated thymidine (^{3}H-thymidine) แล้วแยกส่วนที่เป็นเซลล์ออกมาวัดปริมาณรังสีเบต้าด้วย scintillation counter ก็จะทราบปริมาณการแบ่งตัวใหม่จากปริมาณสารรังสี ^{3}H-thymidine ที่มีอยู่ภายในเซลล์เหล่านั้น

สำหรับในงานวิจัยชิ้นนี้ได้ใช้วิธีการทดสอบโดยการวัดการเกิดสี ด้วยวิธี colorimetric assay โดยใช้ MTT เป็นสารที่ทำให้เกิดสี หลักการคือ เมื่อ lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนและมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นด้วย โดย mitochondria ซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ก็เพิ่มจำนวนขึ้นด้วย ซึ่ง mitochondria จะสร้างเอนไซม์ dehydrogenase มา reduce MTT tetrazolium salt ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง ไปเป็น formazan compound ซึ่งเป็นผลึกสีน้ำเงิน สามารถนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณ mitochondria enzyme และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จึงเป็นการวัดการแบ่งเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้

$$\text{MTT (Yellow tetrazolium salt)} \xrightarrow{\text{Mitochondria dehydrogenase enzyme}} \text{formazan Compound (Blue crystal)}$$

การตรวจวัด Lymphocytes proliferation เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งกระตุ้นจากภายนอก ในการทดสอบฤทธิ์ของสารปรับภูมิคุ้มกัน สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulant) จะทำให้อัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ Lymphocytes เพิ่มขึ้น ส่วนสารที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) จะทำให้อัตราการแบ่งตัวของ Lymphocytes ลดลง

สมุนไพรที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (New immunomodulator from plants)

ในปัจจุบันนี้ ได้มีการนำพืชสมุนไพรหรือ สารสกัดจากพืชสมุนไพรมาใช้ในการศึกษาโรคต่างๆ มากมาย มีการใช้สมุนไพรบางชนิดอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน รวมถึงการใช้สมุนไพรในการแพทย์พื้นบ้านเพราะเป็นแหล่งความรู้หนึ่ง ซึ่งทางการแพทย์หรือเภสัชกรรมแผนใหม่ใช้เป็นจุดเริ่มต้นในการค้นหายาใหม่จากธรรมชาติ เพราะเหตุผลที่ว่าการใช้ประโยชน์ทางยาจากพืชในการแพทย์พื้นบ้านได้ผ่านประสบการณ์ที่สะสมต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลานาน เสมือนกับเป็นการวิจัยเบื้องต้น การนำพืชสมุนไพรที่มีการใช้ประโยชน์ในการแพทย์พื้นบ้านไปวิจัยจึงมีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่าพืชทั่วๆ ไป ซึ่งในปัจจุบันนี้สมุนไพรได้กลายเป็นที่สนใจอย่างมากของนักวิจัยเพื่อการพัฒนาสมุนไพรให้เป็นรูปแบบยาเตรียมชนิดต่างๆ

ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ฤทธิ์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาพบว่าสาระสำคัญที่มีผลต่อภูมิคุ้มกันโรค แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย เช่น alkaloid terpenes saponin phenols quinone lipid flavonoid ตัวอย่างเช่น

- Alkaloids พบในพืช *Aristolochai clematitis* มีผู้พบสารสกัดจาก *A.clematitis* มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันโดยไปเพิ่มความสามารถในการจับกินและย่อยทำลายจุลชีพของ lymphocytes และ peritoneal macrophage เป็นต้น
- Terpenes Helanalin เป็นเทอร์ปีนที่แยกได้จากพืชสกุล *Arnica* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของไขข้อ โดยออกฤทธิ์ผ่านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและกระตุ้นให้มีการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน

2.สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก เช่น lectin polysaccharides peptides และ protein เป็นต้น ตัวอย่างเช่น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

- Lectin คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันคือ สามารถทำปฏิกิริยารวมกลุ่มกับ Lymphocytes และกระตุ้นการแบ่งตัว สารประเภท Lectin เช่น concanavalin A จาก *Canavalia ensiformis*
- Polysaccharides ยับยั้งมะเร็งโดยกระตุ้น T-Lymphocyte Macrophage ให้จับกินหรือย่อยจุลชีพดีขึ้น พบจากผลกาฝากชื่อ viscic acid สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลองได้ โพลีแซคคาไรด์ยังมีฤทธิ์เป็น adjuvant ในระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ คือ ลดจำนวนแอนติบอดี IgM เล็กน้อย แต่ทำให้ IgG เพิ่มอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีผู้พบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Echinacea purpurea Eupatorium perfoliatum Chamomilla recutia* ดอกคำฝอย *Carthamus tinctoriu Althaea officinalis Astragalus mongholices Acanthopanax senticosus* เป็นต้น
- Peptide และ Protein สารในกลุ่มนี้ที่มีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันมีน้อย มีผู้แยกโปรตีนจาก *Artemisia princes* น้ำหนักโมเลกุล 500,000-1,000,000 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด interferon เมื่อให้ทางรับประทานหรือทาง parenteral ซึ่ง interferon นี้ จะมีความสามารถในการทำลายไวรัสในการติดเชื้อครั้งแรกและกระตุ้นให้ macrophage NK-cell และ Cytotoxic T-cell ให้ทำลายไวรัสดีขึ้น

2.5 การศึกษาและทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ข้อมูลของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาศึกษา

1 *Staphylococcus aureus* (มาลิน จุลศิริ และคณะ, 2538 และ นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

อยู่ใน Family Micrococcaceae เป็นเชื้อแกรมบวกรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-1.2 µm ติดสีแกรมบวก เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่อุณหภูมิ 37 °C pH 7.4 ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ทำให้เกิดโรคได้ทั้งตัวเชื้อเองและสารพิษ ทำให้เกิดโรคในอวัยวะและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย เช่น การติดเชื้อที่ผิวหนัง กุ้งยิง หูอักเสบ ปอดบวม เยื่อบุในหัวใจอักเสบ อาหารเป็นพิษ ลำไส้อักเสบ และไขกระดูกอักเสบ นอกจากนี้เชื้อยังเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดแผลในช่องปาก

2 *Streptococcus faecalis* (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544 และ Duerden BI และคณะ , 1993)

เป็น Group D Streptococci กลุ่ม Enterococci มักเจริญเป็นคู่หรือสายสั้นๆ เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้คน สามารถเจริญได้ใน NaCl 6.5% หรือน้ำดี 40% ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ด้วย Penicillin ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะหรือระบบหัวใจและหลอดเลือดหรือทำให้

เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และจากรายงานการศึกษา พบว่า เชื้อ *S. faecalis* ทำให้เกิดฟันผุคล้ายกับ *Streptococcus mutans* โดย *S. mutans* จะทำให้เกิดฟันผุและรอยแยกที่ผิวฟัน จากนั้น *S. faecalis* และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นจะมาอาศัยอยู่บริเวณรอยแยก แล้วทำให้เกิดฟันผุเพิ่มมากขึ้น โดยที่เชื้อ *S. faecalis* สามารถหลั่งกรดและดำรงชีวิตอยู่ใน pH ต่ำๆ ได้

3 ***Bacillus subtilis*** (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ, 2544)

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนขนาดค่อนข้างใหญ่ พบเชื้อนี้ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จึงเป็นตัวปนเปื้อนตามวัตถุดิบต่างๆ หรือที่จะใช้ประกอบอาหาร นม ไข่ จะพบเชื้อนี้ปนเปื้อนที่เปลือก นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารที่ปรุงสำเร็จ เช่น ข้าวผัด เชื้อนี้ทำให้เกิดโรค เช่น ปอดบวม หรือเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียในคนที่อ่อนแอ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง เกิดเยื่อหุ้มสมองและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ แต่ที่พบบ่อยที่สุดคืออาการของอาหารเป็นพิษ

2.6 การศึกษาเกี่ยวกับการการพัฒนาและตั้งตำรับ

2.6.1 ตำรับยาเม็ดสมุนไพรต้านออกซิเดชันและตำรับลูกอมกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

การเตรียมตำรับยาเม็ด(ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา, 2525)

ยาเม็ด คือ solid pharmaceutical dosage form ที่มีหรือไม่มีสารช่วย ทำได้โดยใช้แรงอัด หรือmolding ก็ได้ ยาเม็ดมีข้อดีเหนือยาประเภทอื่นอยู่หลายประการ ได้แก่ มีความแน่นอนในด้านการให้ยา เมื่อเก็บไว้มีคุณสมบัติทางกายภาพดี มีความคงตัวทางเคมีและมี physiological activity ดี สะดวกในการรับประทาน ขนาดยาที่รับประทานในแต่ละครั้งแน่นอน การผลิตในอุตสาหกรรมไม่ยุ่งยาก ต้นทุนการผลิตค่อนข้างต่ำ การบรรจุขนส่งและจ่ายยาทำได้ง่าย ข้อเสีย คือ ต้องมีการพัฒนาตำรับ ซึ่งต้องใช้เวลาและความละเอียดอ่อนในการเตรียมตำรับ

ขบวนการผลิตยาเม็ดสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1. Dry methods เป็นวิธีการที่ไม่มีน้ำหรือของเหลวมาเกี่ยวข้อง แบ่งออกเป็น
   - Direct compression
   - Granulation by compression (dry granulation, slugging)
2. Wet methods เป็นวิธีที่มีน้ำหรือของเหลวช่วย คือ Wet granulation methods

1. Dry methods (ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา, 2525)

1.1 Direct compression

การผลิตโดยวิธีตอกตรง คือ การนำส่วนผสมของตัวยาสำคัญ และสารอื่นๆ มาตอกเป็นเม็ดโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทำแกรนูล โดยสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ส่วนผสมต้องมีความสามารถในการไหล (flowability) ที่ดี เมื่อตอกอัดเป็นเม็ดให้ความแข็งที่เหมาะสม และตำรับที่เตรียมต้องมี content uniformity

ข้อดีในการผลิตยาเม็ดโดยวิธีการตอกตรง

1. ประหยัด เนื่องจากใช้ เครื่องมือ แรงงาน พื้นที่ เวลา และวัตถุดิบน้อย
2. หลีกเลี่ยงขั้นตอนในการเตรียมแกรนูล ได้แก่ ความร้อน ความชื้นและแรงอัด
3. หลีกเลี่ยงตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อยาในวิธีแกรนูลเปียก เช่น อุณหภูมิ ความหนืด และความชื้นของสารละลายยึดเกาะ
4. แตกตัวได้อนุภาคเริ่มต้น
5. มีความสม่ำเสมอของอนุภาคดี
6. ความคงตัวของยาเม็ดดี

ข้อจำกัดในการผลิตยาเม็ดโดยวิธีการตอกตรง

1. ราคาของสารเพิ่มปริมาณค่อนข้างแพง
2. การขาดวัตถุดิบ
3. การขาดความเข้าใจและข้อมูลวัตถุดิบ
4. ข้อจำกัดทางกายภาพของตัวยาสำคัญ เช่น compressibility flowability
5. ในการตอกต้องคำนึงถึงคุณสมบัติทางกายภาพของวัตถุดิบ เช่น ขนาดอนุภาค ความชื้น คุณสมบัติของผิวและรูปร่าง การไหล และความหนาแน่น
6. การแปรเปลี่ยนระหว่างรุ่น (lot to lot variability)
7. ความสม่ำเสมอของอนุภาคของส่วนประกอบในตำรับ
8. ปัญหาด้านฝุ่นผง
9. นิยมใช้สี lake ในการแต่งสี
10. การอ่อนตัวของเม็ดยา

1.2 Dry granulation **หรือ** slugging methods

เป็นการทำแกรนูลโดยไม่ใช้น้ำหรือความชื้น เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับตัวยาที่สลายตัวได้เร็ว เมื่อสัมผัสความชื้น ความร้อน หรือทั้ง 2 ปัจจัยร่วมกัน รวมทั้งที่มีปริทาณตัวยาสูงเกินกว่าจะผลิตแบบตอกอัดโดยตรง ซึ่งการทำแกรนูลแบบแห้งมีขั้นตอน คือ หลังจาก

ผสมยาและสารช่วยอื่นๆ แล้วนำไปตอกอัดโดยเครื่องตอกที่มีขนาดใหญ่ หรืออัดโดยใช้ compactor แล้วจึงนำแกรูลที่อัดแล้วมาย่อยผ่านแร่ง ได้เป็นแกรนูลเล็กๆ ก่อนตอก

ข้อดีในการผลิตยาเม็ดโดยการทำแกรนูลแห้ง

1. มีขั้นตอนน้อย
2. เหมาะกับตัวยาสำคัญที่ไวต่อความชื้น หรือความร้อน

ข้อจำกัดในการผลิตยาเม็ดโดยการทำแกรนูลแห้ง

ตัวยาสำคัญและสารช่วยในตำรับต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและต้องทนต่อการตอกอัดซ้ำๆได้

2. Wet granulation methods (ยุพิน รุ่งเวชวุฒิวิทยา, 2525)

การทำเป็นแกรนูลเปียก มีขั้นตอนคือ การผสมแห้ง (dry blending) การนวดผสมเปียก (wet massing) การแร่งเปียก (wet sieving) การอบแห้ง (drying) การย่อยแกรนูลแห้ง (dry milling) กระบวนการผลิตยาเม็ดนั้น เริ่มต้นจากการผสมตัวยาสำคัญกับสารช่วยอื่นๆ ในตำรับ จากนั้นเติมสารยึดเกาะ แล้วผสมต่อจนเป็น damp mass แล้วจึงทำการแร่งเปียก อบแห้ง แร่งแห้ง แล้วจึงทำการตอกอัด โดยการทำ wet granulation นั้น เป็นการทำให้อนุภาคเกิดการ agglomeration เป็นแกรนูลซึ่งโดยมากปัญหามักเกิดในขั้นตอนการเติมสารยึดเกาะ จนได้เป็น damp mass

ข้อดีในการผลิตยาเม็ดโดยการทำแกรนูลเปียก

1. ไม่เกิดการแยกตัว แม้จะเกิดการสั่นสะเทือน ในระหว่างกระบวนการผลิต
2. การไหลดีขึ้น
3. ความหนาแน่นของผงยาใกล้เคียงกัน
4. ลดปัญหาการกักอากาศในเม็ดยา
5. ปริมาณฝุ่นน้อย
6. สามารถเปลี่ยนผงยาที่ไม่ชอบน้ำให้ชอบน้ำได้ ในกรณีที่ยามีปริมาณน้อย
7. กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ
8. เป็นวิธีที่มีมานานและมีความเที่ยงตรงสูง

ข้อจำกัดในการผลิตยาเม็ดโดยการทำแกรนูลเปียก

1. มีกระบวนการหลายขั้นตอน
2. ใช้เวลาในการผลิตนาน จึงต้องทำการ validation ทุกขั้นตอน
3. ใช้พื้นที่ค่อนข้างมาก
4. เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง

5. เกิด cross contaminate ในระหว่างการเคลื่อนย้าย

ส่วนประกอบในตำรับ (มนต์ชุลี นิติพน, 2525)

ในยาเม็ดนอกจากจะมีตัวยาสำคัญแล้ว ส่วนมากมักมีสารอื่นผสมกับตัวยานั้น เพื่อทำให้ตอกเป็นเม็ดได้ สารที่ผสมกับตัวยาเป็นสารที่เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยา เรียกว่า สารช่วย (exipient) แบ่งเป็น 6 ประเภท คือ

1. สารเพิ่มปริมาณ (diluent)

ยาเม็ดที่ประกอบด้วยยาที่มีจำนวนน้อย จำเป็นต้องใช้สารเพิ่มปริมาณในการช่วยเพิ่มปริมาณยาให้มากเพียงพอที่จะตอกเป็นยาเม็ดได้ สารเพิ่มปริมาณที่นิยมใช้ เช่น micro crystalline cellulose (Avicel®) มี 4 เกรด คือ Avicel® PH 101 PH102 PH103 และ PH105 ซึ่งแตกต่างกันที่ขนาดของสาร คือ Avicel® PH 101 มีการกระจายของขนาดสารดี Avicel® PH 102 มีขนาดใหญ่กว่า Avicel® PH 101 ส่วน Avicel® PH 103 มีการกระจายขนาดสารคล้าย PH 101 แต่มีความชื้นน้อยกว่า ส่วน Avicel® PH 105 มีขนาดสารเล็กกว่า PH 101 Avicel® มีความชื้นประมาณร้อยละ 5 ดูดความชื้นได้ หลังจากดูดความชื้น ทำให้ความแข็งของเม็ดยาลดลง กระจายตัวได้ในน้ำ ละลายในด่างอ่อน และพองตัว ไม่ละลายในกรด หรือ organic solvent มีคุณสมบัติเด่น 2 ประการ คือ เมื่อตอกเป็นยาเม็ดจะได้ยาเม็ดที่แข็งมาก เนื่องจากเป็นสารเพิ่มปริมาณที่มี pressure hardness profile สูงสุด แต่สามารถแตกตัวได้เร็วมาก เนื่องจากการพองตัวของจุลผลึก ทำให้แรงดึงดูดของอนุภาคเสียไป ทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะแม้ขณะเป็นผงแห้ง ทำให้สารอื่นรวมตัวกันเป็นยาเม็ดได้ง่าย คือ มี compressibility สูง สามารถใช้ Avicel® เพียงร้อยละ 5 – 10 ในตำรับ ซึ่งอาจใช้ร่วมกับสารอื่น ทำให้การรวมตัวกับตัวยาดีกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ยังมีสารเพิ่มปริมาณตัวอื่น ๆ เช่น lactose sucrose แป้ง calcium carbonate Emcompress® manitol และ sorbital เป็นต้น

2. สารยึดเกาะ (binder)

คือสารที่ทำให้เกิดการเกาะกันระหว่างสารที่เป็นผง และคงสภาพเกาะกันระหว่างการผลิตหลังการตอก อีกทั้งเพิ่มคุณสมบัติด้านการไหล ทำให้แกรนูลที่ได้มีขนาดและความแข็งตามต้องการ มีความสม่ำเสมอกันตลอดทั้งยาเม็ด เกิดเป็น hydrophobic surface hydrophilic เพิ่ม bioavailability เพิ่ม homogeneity ของตำรับยาที่มีตัวยาน้อย ทำให้ไม่เกิดไฟฟ้าสถิตในระหว่างการผสม ต้องระมัดระวังในการเลือกสารยึดเกาะ เนื่องจากยาเม็ดต้องเกาะกัน จนกระทั่งรับประทานเข้าไปแล้วต้องแตกตัว และละลายเพื่อปลดปล่อยตัวยาออกมา

เกิดการดูดซึมของตัวยา ตัวอย่างสารยึดเกาะเช่น polyvinyl pyrrolidone (PVP) นอกจากนี้ยังมีสารยึดเกาะตัวอื่น ๆ เช่น แป้ง acacia tragacanth gelatin methyl cellulose ethyl cellulose และ carboxy methyl cellulose เป็นต้น

3. สารช่วยลื่น (lubricant)

ทำหน้าที่ลดแรงเสียดสี คือ เป็นสารที่อยู่ระหว่างผิวหน้าในขณะเกิดแรงเสียดสี ป้องกันการเสียดสี และสึกหรอ ดังนั้นสารช่วยลื่นจึงต้องทำหน้าที่ทันที หลังจากการตอกยาเม็ด เพื่อลดแรงเสียดสี ระหว่างผนังด้านในของแม่พิมพ์และขอบยาเม็ด ในระหว่างการส่งยาเม็ดขึ้นมาจากแม่พิมพ์ เนื่องจากยาเม็ดหลังการตอกมีแนวโน้มขยายตัวออกเล็กน้อย และเกิดการติดกับผนังแม่พิมพ์ สารช่วยลื่นจึงช่วยทำให้ยาเม็ดที่ได้มีลักษณะที่สวยงามมากขึ้น และลดความร้อนที่เม็ดยา ตัวอย่างเช่น magnesium stearate นอกจากนี้ยังมีสารช่วยลื่นตัวอื่น ๆ เช่น glyceryl monostearate และ Precilol® เป็นต้น

4. สารช่วยไหล (glidant)

เป็นสารที่ทำให้การไหลของแกรนูลดีขึ้น จึงทำให้แกรนูลมีลักษณะกลม ลดแรงเสียดสีระหว่างสารกันเอง ลดปัญหาการไหลของสารจากส่วนที่ใหญ่ไปยังส่วนที่เล็กกว่า สารช่วยไหลในจำนวนพอเหมาะทำให้การไหลของสารลงแม่พิมพ์สม่ำเสมอ ทำให้ยาเม็ดที่ได้มีน้ำหนักสม่ำเสมอตลอดการตอกนั้น ๆ ตัวอย่างสารช่วยไหลเช่น Aerosil® มีลักษณะเป็นผงละเอียดมาก มี specific surface สูงมาก สามารถใช้ในจำนวนน้อย เพื่อทำให้เกิดเป็นฟิล์มช่วยในการไหล นอกจากนี้ยังมีสารช่วยไหลอื่น เช่น Syloid และ Cab-O-Sil® เป็นต้น

5. สารกันติด (anti-adherent)

เป็นสารที่ป้องกันสารติดหน้าสากและแม่พิมพ์ ตัวอย่างเช่น talcum นิยมใช้ในตำรับยาเม็ดที่มีตัวยา หรือสารช่วยที่ไวต่อด่าง ต้องทดสอบความเป็นด่างของสารกันติด และเมื่อนำ talcum มาละลายน้ำ ต้องมี pH ต่ำกว่า 7 เพื่อทำให้ตัวยามีความคงทนดี นอกจากนี้สารช่วยลื่นอื่นๆ เช่น magnesium trisilicate และ calcium stearate เป็นต้น

6. สารช่วยแตกตัว (disintegrant)

มีคุณสมบัติต่อต้านประสิทธิภาพของตัวยึดเกาะ และแรงจับทางกายภาพที่เกิดขึ้นภายใต้แรงอัด ช่วยให้ยาเม็ดเกิดการแตกตัวเมื่อโดนกับน้ำ ตัวอย่างของสารช่วยแตกตัว เช่น sodium starch glycolate (Explotab®) สารนี้มี bulk density สูง ไม่ขัดขวางการไหลของแกรนูล เมื่อใช้แรงอัดทำให้ช่วยการรวมตัวของสารกันเป็นเม็ด มีประสิทธิภาพของการเป็นสาร

ช่วยแตกตัวได้ดี นอกจากนั้นยังไม่ดูดความชื้น และยังมีสารช่วยแตกตัวอื่นที่นิยมใช้ คือ แป้ง microcrystalline cellulose alginate และ gums เป็นต้น

การประเมินและควบคุมคุณภาพยาเม็ด (ทัดทรง ทั่วทิพย์, 2525)

1. **ลักษณะของเม็ดยา**

ได้แก่ขนาด รูปร่าง รอยพิมพ์บนเม็ดยา ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้ผู้ผลิตจะเป็นผู้กำหนดขึ้น

2. **น้ำหนักยาเม็ด**

2.1 **การทดสอบความแปรปรวนของน้ำหนักยาเม็ด** (Weight variation test)

เป็นการประเมินผลจากน้ำหนักของยาเม็ด ใช้กับยาเม็ดไม่เคลือบและมีตัวยาสำคัญมากกว่า 50 มก. แต่ถ้าเป็นยาเม็ดเคลือบ หรือมีตัวยาสำคัญ $\leq$ 50 มก. ต้องผ่านการประเมินความสม่ำเสมอของตัวยาสำคัญในยาเม็ดด้วย ซึ่งความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยา จะขึ้นกับการเตรียมตำรับยาและกระบวนการผลิต

2.2 **การทดสอบความสม่ำเสมอของตัวยาสำคัญในยาเม็ด** (Content uniformity test)

เป็นการหาปริมาณตัวยาสำคัญในยาเม็ด เพื่อให้แน่ใจว่าในยาแต่ละเม็ดมีตัวยาสำคัญสูงถึงระดับการรักษา (Therapeutic level) ใช้กับยาเม็ดเคลือบทุกชนิดหรือไม่เคลือบที่มีตัวยาสำคัญน้อยกว่า 50% โดยน้ำหนักของยาเม็ดนั้น

3. **การทดสอบการแตกตัวของยาเม็ด** (Disintegration Test)

การทดสอบการแตกตัวของยาเม็ด เป็นการยืนยันว่าการผลิตในแต่ละครั้ง มีความสม่ำเสมอ ซึ่งการแตกตัวของยาเม็ดจะขึ้นกับขนาดและรูปร่างของยา ขนาดแกรนูล ชนิดและปริมาณของตัวยาและสารยึดเกาะ และแรงอัดหรือความเร็วในการตอก โดยการทดสอบนี้จะใช้ทดสอบได้ทั้งยาเม็ดหรือแคปซูล แต่ยาเม็ดที่ใช้อม เคี้ยว หรือที่ออกแบบให้ปล่อยตัวยาช้าๆ อาจจะเป็นช่วง หรือช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่ต้องทดสอบการแตกตัว

4. **การทดสอบการละลายของยาเม็ด** (Dissolution Test)

เป็นการทดสอบการละลายตัวของยา โดยตัวยาที่ละลายน้ำได้ดีจะถูกดูดซึมได้เร็วกว่าตัวยาที่ละลายน้ำได้น้อย การละลายจะขึ้นกับขนาดอนุภาค ชนิดและปริมาณของสารช่วยต่างๆ ในยาเม็ด ซึ่งการทดสอบจะทำในยาเม็ดเคลือบ ยาเม็ดไม่เคลือบ หรือ แคปซูล โดยเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบมีหลายแบบแต่ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 แบบ คือ Apparatus1 เป็นแบบ basket และ Apparatus 2 เป็นแบบ paddle ซึ่งการเลือกใช้ จะระบุไว้ใน monograph

5. **การวัดความหนา** (Thickness)

ขนาดของแม่พิมพ์ที่ใช้และที่สำคัญคือแรงที่ใช้ตอก โดยการวัดความหนาจะใช้เครื่องมือ Micrometer caliper

6. **การวัดความแข็ง** (Hardness)

ความแข็งจะสัมพันธ์กับการแตกตัว ค่าการละลาย และความกร่อนของยาเม็ด ซึ่งขั้นตอนในการทดสอบความแข็งจะทำการสุ่มยาเม็ด 20 เม็ด มาวัดความแข็งด้วยเครื่อง Monsanto Hardness Tester (manual) หรือ Erweka Hardness Tester (Automatic) แล้วอ่านค่าความแข็งของเม็ดยา หน่วยเป็นกิโลกรัม โดยทั่วไปค่ามาตรฐานความแข็งที่นิยมใช้คือ

Oral tablet : 4-8 หรือ 10 kg

Core tablet : $\geq$10 kg

ยาเม็ดเคี้ยว : ~ 3 kg

SR tablet : ~ 10-20 kg

7. **การทดสอบความกร่อน** (Friability test)

ความกร่อนเกิดจากการเสียดสีและการกระทบกระเทือน ถ้าเม็ดยามีความแข็งน้อยก็จะทำให้กร่อนมากขึ้น ทำให้เม็ดยาเกิดการแตกหักในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งได้ ซึ่งความกร่อนของเม็ดยา นอกจากจะขึ้นกับความแข็งของเม็ดยาแล้ว ยังอาจมีสาเหตุมาจากสารยึดเกาะมีปริมาณน้อยเกินไป ความชื้นในแกรนูลน้อยเกินไป มีผงละเอียดมากเกินไป หรือแรงตอกน้อยเกินไป เป็นต้น

8. **การหาปริมาณสารฟีนอลิกในยาเม็ด** (L Wenhong และคณะ 2006)

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในยาเม็ด โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วย ultrasonic extraction ซึ่งจะวัดสารประกอบฟีนอลิกที่อยู่ในยาเม็ด โดยสกัดด้วยสารละลายเมธานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 60:40 แล้วนำไป sonicate ในเวลาไม่เกิน 30 นาที จากนั้นนำไปกรอง แล้วนำสารละลายที่กรองแล้วไปทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu methods ซึ่งใช้หลักการของการเกิดสีจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ pH 10 ซึ่งสาร Folin-Ciocalteu จะถูกรีดิวซ์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน

2.6.2 ตำรับแผ่นฟิล์มสมุนไพรเพื่ออนามัยในช่องปาก

1. ข้อมูลของพอลิเมอร์ที่นำมาศึกษา

Carrageenan (มัทธนี อนันนตพงษ์, 2544)

เป็น Anionic polysaccharide จากสาหร่ายทะเลสีแดง มีโครงสร้างเป็น Linear sulfated polysaccharide คาราจีแนนสามารถคงรูปเป็นเจลได้ที่อุณหภูมิห้อง เจลที่ได้มีลักษณะเป็นตั้งแต่ฟิล์มไปจนถึงอีลาสติก โดยจุดหลอมเหลวมีค่าตั้งแต่สูงถึงต่ำ มี pH 6-10 ไม่คงตัวในสภาวะ Strongly alkaline นิยมใช้เป็น Stabilizer ในผลิตภัณฑ์นม

คาราจีแนน แบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ Lamda – carrageenan, Iota-carrageenan และ kappa-carrageenan โดยคาราจีแนนทั้ง 3 ชนิด จะแตกต่างกันที่จำนวน Ester sulfate ซึ่งเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพ สามารถละลายน้ำได้ หากมีการใช้ความร้อนจะมีการละลายเพิ่มมากขึ้น อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไป คือ 50-80 °C ความหนืดขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อุณหภูมิ ชนิดของสาหร่ายที่นำมาสกัด น้ำหนักโมเลกุล และอนุมูลอิสระ

<u>ช่วงความเข้มข้นที่ใช้</u>

Carrageenan สามารถใช้ในตำรับต่างๆ ดังนี้ ใน Skin creams และ Lotion ใช้ความเข้มข้นสูงได้ถึง 1% ใน Aqueous gel products ใช้ความเข้มข้นสูงได้ถึง 0.8% ในยาสีฟันใช้ความเข้มข้นสูงได้ถึง 1.2%

<u>กลไกการเพิ่มความหนืด</u>

ในกรณีที่ตำรับมี Carrageenan และ Gelatin เป็นส่วนผสมต้องกำหนดให้ pH ของตำรับสูงกว่า Isoelectric point นอกจากนี้ การละลายของ Carrageenan นี้ เมื่อละลายในน้ำจะจับตัวเป็นก้อน ดังนั้นกลไกการเพิ่มความหนืด จะขึ้นกับ ค่า pH และอุณหภูมิ คาราจีแนนสามารถทำให้เกิดความหนืดได้สูง จึงสามารถพยุงให้สารลอยตัวและเกิดความคงตัว เมื่อมีการเขย่าหรือใช้แรงเพื่อทำลายโครงสร้างเจล ความหนืดจะลดลงอย่างรวดเร็วแต่สามารถคืนตัวและพยุงให้สารกลับลอยตัวในเวลารวดเร็วหลังตั้งทิ้งไว้

<u>ขั้นตอนการสกัด</u>

ในขั้นแรกล้างสาหร่ายก่อน จากนั้นจึงทำการสกัดด้วยน้ำร้อนแล้วทำให้อยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง นำสารสกัดที่ได้ไปกรองด้วย Diatomaceous earth filter ภายใต้ความดัน จะได้สารละลายใสจากนั้นจึงตกตะกอน Carrageenan ด้วย Ethanol นำไปทำให้แห้งโดยใช้ Vacuum และบดให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ

ลักษณะโครงสร้างทางเคมี

โครงสร้างของ Carrageenan เกิดจาก Galactose หลายยูนิตมาต่อกันได้เป็น Sulphated polysaccharide สายหลัก คือ D-galactose เชื่อมกับ α- (1-3) และ β- (1-4) โดยแต่ละ Fraction จะแตกต่างกันทั้งจำนวนและ Sulphate group

Kappa และ Iota carrageenan เป็น gelling agent ที่มี β-D-galactose 4-sulphate เชื่อมที่ตำแหน่งที่ 1 และ 4 แต่ Iota carrageenan จะต่างกับ Kappa carrageenan ตรงที่ Iota carrageenan จะมี Sulphate group เพิ่มขึ้นที่ 3, 6 Anhydrogalactose ทั้ง Kappa และ Iota ไม่ได้อยู่ในรูปบริสุทธิ์ โดยสารตั้งต้นของทั้งคู่คือ Mu และ Nu carrageenan เนื่องจากเอนไซม์ในสาหร่ายทะเลซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี จะตัด 6-Sulphate group ออก ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในขั้นตอนการสกัด Carrageenan ในสภาวะที่เป็นด่าง

Gelatin (มัทธนี อนันนตพงษ์, 2544)

Gelatin USP, BP ใช้มากในทางเภสัชกรรม เช่น Suspending agent, Emulsifying agent, Gelling agent, Hard gelatin capsule, Soft gelatin capsule ซึ่ง Gelatin สามารถพองตัวในน้ำเย็น ละลายในน้ำร้อน แต่ไม่ละลายใน Ethanol, Chloroform, Ether, Fixed และ Volatile oil ผลิตโดยวิธี Hydrolyze collagen ซึ่งเป็น Connective tissue ของสัตว์ แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิด A ผลิตโดยวิธี Hydrolysis ด้วยกรด และชนิด B ผลิตโดยวิธี Hydrolysis ด้วยด่าง

คุณสมบัติที่สำคัญของโปรตีน เช่น Gelatin คือ Isoelectric point (pI) ซึ่งโปรตีนจะตกตะกอนง่ายที่จุดนี้ Gelatin ชนิด A มี pI เท่ากับ 6.3-9.5 และเนื่องจากว่า Gelatin ไม่คงตัวในกรด ดังนั้นถ้าจำเป็นต้องเติมกรดลงในสารละลาย Gelatin ให้เติมเป็นอันดับสุดท้าย ปัจจัยที่มีผลต่อการคงตัวของสารละลาย Gelatin ได้แก่ pH ซึ่ง pH ที่ทำให้ Gelatin คงตัวมากที่สุดคือ 5.5-8.0 ปริมาณเกลือที่มากกว่าร้อยละ 3.5 จะช่วยเพิ่มการทำละลาย

การเตรียมสารละลาย Gelatin

1. โปรย Gelatin ในน้ำเย็น เพื่อให้ Gelatin ดูดน้ำ
2. นำมาละลายที่อุณหภูมิ 60-70 °C คนอย่างสม่ำเสมอประมาณ 10 นาที

ข้อควรระวัง : การคนสารละลาย Gelatin แรงๆ จะทำให้เกิดฟองอากาศได้ แก้ไขได้โดยนำไปไล่ฟองอากาศด้วยเครื่อง Sonicator นอกจากนี้ Gelatin ยังถูกทำลายได้ด้วยความร้อนและกรด ดังนั้นจึงควรหลักเลี่ยงอุณหภูมิที่สูงกว่า 80 °C และถ้าจำเป็นต้องเติม Gelatin และ กรด ลง

ในส่วนผสมที่ใช้ความร้อนสูง ควรทำให้ส่วนผสมนั้นเย็นลงเสียก่อน แล้วจึงเติม Gelatin และกรดลงไป

<u>ประโยชน์</u>

จุดประสงค์คือ เป็น Gelling agent และ Whipping agent โดยคุณสมบัติสำคัญของการเป็น Gelling agent คือ มีลักษณะเป็น Gel นิ่มสามารถหลอมเหลวได้ที่อุณหภูมิของร่างกาย (24-33 °C) Gel จะเกิดการหลอมเหลวและแข็งตัว โดยอาศัยความร้อนและความเย็นตามลำดับ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ทำให้ Gel แข็งตัวขึ้นกับความเข้มข้นของ Gel ทั้งนี้ Gelatin สามารถใช้ร่วมกับ Gelling agent หรือ Gum ชนิดอื่นๆ ได้ เช่น Pectin, Agar, Starch หรือ Acacia ซึ่งการใช้ร่วมกันนี้มีข้อควรระวัง คือ อาจเกิดการจับกันเป็นก้อนของสารผสม อันเนื่องมาจากสภาวะไม่เหมาะสม

HEC (Hydroxyethylcellulose)(Raymond CR และคณะ, 2003)

เป็น Nonionic ether derivative of cellulose มีลักษณะเป็นสารที่มีสี Light tan หรือครีม-ขาว ไม่มีรสและกลิ่น เป็น Hygroscopic powder ละลายน้ำในช่วงอุณหภูมิที่กว้างได้เป็นสารละลายใส และไม่ Form gel ไม่ละลายใน Acetone, Ethanol, Ether, Toluene และ Organic solvents แต่ใน Polar organic solvent บางชนิด เช่น Glycol จะสามารถพองตัวและละลายได้บ้างเล็กน้อย

นิยมใช้ HEC กันอย่างแพร่หลายใน Pharmaceutical formulation ใช้เป็น Thickening agent ใน Ophthalmic และ Topical formulation หรือใช้เป็น Binder และ Coating agent ในการเตรียมยาเม็ด นอกจากนี้ยังเป็น Lubricant preparation สำหรับผู้ที่ตาแห้ง ปากแห้ง และใส่คอนแทคเลนส์

HPMC (Hydroxypropylmethylcellulose) (Raymond CR และคณะ, 2003)

HPMC เป็น Nonionic cellulose ether มีลักษณะเป็นสารสีขาวหรือครีม ไม่มีกลิ่นและรส เป็น Fibrous หรือ Granular powder เมื่อถูกน้ำจะพองตัวได้เป็นคอลลอยด์ที่หนืดและไม่แตกตัวเป็นประจุ สามารถละลายได้ในน้ำเย็น แต่ไม่ละลายใน Ethanol, Ether และ Chloroform สามารถนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย Autoclave โดยที่ไม่เสียสภาพความหนืด นอกจากนี้ยังนิยมใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว

HPMC ใช้กันอย่างแพร่หลายใน Oral และ Topical pharmaceutical preparation ในการเตรียมยาสำหรับรับประทาน จะใช้ HPMC เป็น Tablet binder, Coating agent, Film former, Extended-release tablet matrix, Stabilizing agent, Suspending agent และสารเพิ่มความหนืด ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 2-5% w/w บางครั้งจะใช้เป็น Binder สำหรับ Dry granulation

สำหรับ HPMC ที่เป็น High-viscosity grade จะใช้ในการเตรียม Matrix เพื่อควบคุมการปลดปล่อยยาโดยใช้ที่ความเข้มข้น 10-80% w/w ในการเตรียมยาเม็ดและแคปซูล

ความเข้มข้นที่ใช้ในการเพิ่มความหนืดจะอยู่ในช่วง 2-20% w/w ซึ่งถ้าเป็น Low-viscosity grade จะใช้ในการเตรียม Film coating solution ที่ละลายในน้ำ ส่วนพวกที่เป็น High-viscosity grade จะเป็น Organic solvents

ในการเตรียม Aqueous solution จะต้องกระจายตัวในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80-90 °C ก่อนจึงละลายในน้ำเย็น ส่วนการเตรียมใน Organic solvent จะต้องกระจาย HPMC ใน Organic solvent ในอัตราส่วน HPMC 5-8 ส่วน ต่อ Organic solvent 1 ส่วนและเติมน้ำเย็นตามสารละลายจะมีความคงตัวที่ pH 3-11 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจะทำให้ความหนืดลดลง

Pectin (มัทธนี อนันนตพงษ์, 2544)

เป็นสารกลุ่ม Carbohydrate ซึ่งได้มาจาก Dilute acid extract ของผลไม้ตระกูลส้ม (Citrus fruits) ประกอบด้วย Methoxylated polygalacturonic acids นิยมใช้ความเข้มข้น 0.1% ของ Finished product

Pectin อาจใช้เป็น Suspending agent, Emulsifying agent เดี่ยวๆ ก็ได้หรือใช้ร่วมกับ Acacia เพื่อเพิ่มความหนืด ประโยชน์ในการรักษาเป็น Demulcent เช่น ใน Kaolin Mixture with Pectin NF

<u>คุณสมบัติ</u>

Pectin มี 2 ชนิดขึ้นกับ Degree of methylatation (DM) คือ ถ้า DM มากกว่าร้อยละ 50 จะเรียกว่า High methoxy pectin ส่วนถ้า DM น้อยกว่าร้อยละ 50 จะเรียกว่า Low methoxy pectin และ DM ยังสัมพันธ์กับความเร็วของการแข็งตัว ซึ่งแบ่งได้ดังนี้ คือ Pectin ซึ่งมี DM ระหว่างร้อยละ 68-72 เรียกว่า Pectin ชนิดแข็งตัวเร็ว และถ้า DM อยู่ระหว่างร้อยละ 66-70 จะเรียกว่า Pectin ชนิดแข็งตัวช้า Pectin ละลายในน้ำแต่ไม่ละลายในสารละลาย (Aqueous solution) และเกลือ Monovalent cation (Alkaline metal) ของ Pectinic acid และ Pectin acid ละลายน้ำได้การละลายและความหนืดของสารละลาย Pectin จะมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล, ความเข้มข้น, pH, และประจุในสารละลายเดิม เช่น การ Form gel ช่วง pH 5-6 สารละลาย Pectin จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง ข้อควรระวัง คือ ที่ pH ต่ำกว่า 45 High methoxy pectin ชนิดแข็งตัวช้าจะเสียคุณสมบัติของ Gel strength และที่ pH ต่ำกว่า 3.2 จะเกิด Pre-gel ในทางปฏิบัติจึงควรใช้ Buffer เช่น Citric acid และ Potassium citrate แต่ที่ใช้ในทางการค้าจะเป็น Premixed ระหว่าง Pectin กับ Buffer salt

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

<u>ประโยชน์</u>

HMP ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มี pH ต่ำ เช่น เจลลี่ผลไม้ และใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ไม่จำกัด ในขณะที่ LMP จะใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มี pH เป็นกลาง และต้องจำกัดปริมาณตาม ADI ด้วย Pectin สามารถใช้ร่วมกับ Starch และ Gelling agent ชนิดอื่นได้ เช่น Gelatin โดยใช้ Gelatin ร้อยละ 25 แทนที่ Pectin ได้ แต่ถ้าปริมาณ Gelatin ที่ใช้แทนที่ Pectin สูง จะทำให้ได้ลักษณะ gel ที่นิ่มเกินไป และใช้แรงเคี้ยวไม่มาก ซึ่งข้อควรระวังในการใช้ Pectin ร่วมกับ Gelling agent ตัวอื่นๆ คือ pH ที่เปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้เกิดความไม่เข้ากันได้

Pullulan (www.ncpri.ro/pollulan/en/index.htm., 2006)

เป็น Neutral glucan (คล้ายคลึงกับ Amylase, Dextran, Cellulose) โครงสร้างส่วนใหญ่เป็นคาร์บอน ได้จากเชื้อจุลินทรีย์ *Aureobasidium pullulans* ภายใน Fermentation conditions โครงสร้าง 10% จะเป็น Maltotetrose และมี a-1,3 Branch linkages เมื่อผ่านกระบวนการ Biosynthesis และ Purification แล้ว Pullulan product จะประกอบด้วย Heteropolysaccharide หรือ Acid polysaccharides ลักษณะเป็นผงสีครีมหรือสีขาว ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 25 °C ไม่ละลายใน Organic solvent สารละลาย Pullulan จะมีความคงตัวและความหนืดต่ำ (5.1 mPa) เมื่อเทียบกับ Polysaccharide ตัวอื่นๆ

สารละลาย 1% Pullulan มี pH 5-7 ไม่มีพิษ ใช้เป็น Film former ในการเตรียมยาเม็ดแคปซูล Microcapsules Desagregating และ Local administration agent นอกจากนี้ยังใช้กันอย่างแพร่หลายในการเตรียมเครื่องสำอาง โดยจะใช้มากในการเตรียม Hydrating cream และ Gel

Pullulan semisynthic derivatives ได้แก่ Carboxymethyl pullulan, Sulfopropyl pullulan, Pullulan acetate

PVP90 (Polyvinylpyrrolidone) (Raymond CR และคณะ, 2003)

มีหลายเกรดแบ่งตามค่า K-value ได้แก่ 12, 15, 17, 25, 30, 60, 90 และ 120 ใช้เป็น Disintegrant, Dissolution aid, Suspending agent และ Tablet binder ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการเตรียม Pharmaceutical formulation โดยเฉพาะการเตรียม Solid dosage form ในการเตรียมยาเม็ดนั้น สารละลาย PVP ใช้เป็น Binder ใน Wet granulation process หรือ อาจเติม PVP ใน Powder blends ของการเตรียม Dry granulation in situ ด้วยการเติม น้ำ Ethanol

หรือ Hydroalcoholic solution นอกจากนี้ PVP ยังใช้เป็น Solubilizer ใน Oral และ Parenteral preparation โดยจะช่วยการละลายของยาที่ละลายได้น้อยในการเตรียมเป็น Solid dosage form และ สารละลาย PVP ยังใช้เป็น Coating agent ได้ด้วย

PVP ใช้เป็น Suspending, Stabilizing หรือ สารเพิ่มความหนืดใน Topical และ Oral suspension และ Solution

PVP ละลายได้ดีในกรด Chloroform, Ethanol, Ketones, Methanol และ น้ำ แต่ไม่ละลายใน Ether, Hydrocarbons และ Mineral oil

Tacca flour (มัทธนี อนันนตพงษ์, 2544)

Tacca flour เป็นสารประกอบส่วนใหญ่ของพอลิแซคคาไรด์ ได้จากแป้งข้าวโพด และแป้งสาลี ปกติแป้งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นผลึกที่ประกอบขึ้นด้วย Mannose 27% และ Amylopectin 73% ซึ่งจะไม่ละลายในน้ำเย็น แต่ละลายในน้ำต้มเดือด ซึ่งเมื่อทำให้เย็นลงจะได้เป็นเจลสีขาวขุ่นที่เรียกว่า แป้งเปียก นิยมใช้เป็นสารยึดเกาะในการผลิตยาเม็ด สารช่วยแตกตัวในยาเม็ด หรือเป็นสารก่อฟิล์ม

Xanthan gum (Raymond CR และคณะ, 2003)

Xanthan gum เป็น High molecular weight polysaccharide gum ซึ่งประกอบด้วย D-glucose และ D-mannose เป็น Hexose unit และมี D-glucoronic acid โดยนิยมใช้ Xanthan gum กันอย่างแพร่หลายในการเตรียม Oral และ Topical formulations เครื่องสำอาง และอาหาร โดยใช้เป็น Suspending agent และ Stabilizing agent หรือใช้เป็น Thickening agent และ Emulsifying agent ซึ่ง Xanthan gum นั้นเป็นสารที่ไม่มีพิษและเข้าได้กับ Ingredient ได้มากมายหลายชนิด มีความคงตัวดี มีความหนืดในช่วง pH และอุณหภูมิที่กว้าง โดยสารละลายของ Xanthan ในน้ำจะคงตัวได้ในช่วง pH 3-12 ที่อุณหภูมิ 10-60 °C

เมื่อผสม Xanthan gum กับ Inorganic suspending agent เช่น Magnesium aluminum silicate หรือ Organic gum จะทำให้เกิด Synergistic rheological effect สามารถเข้าได้กับสารส่วนใหญ่ที่เป็น Synergistic และ Natural viscosity- increasing agent ถ้าผสมรวมกับ Cellulose derivative xanthan gum จะช่วยป้องกันการเกิด Depolymerization ของ Cellulose derivative ได้

Xanthan gum เป็นสารกลุ่ม Anionic จะไม่ใช้ร่วมกับสารกลุ่ม Cationic surfactant, พอลิเมอร์ หรือ Preservative ไม่เข้ากับสารที่เป็น Oxidizing agent, Tablet film-coating บาง

ชนิด, Carboxymethylcellulose sodium, Dried aluminum hydroxide gel และสารสำคัญบางอย่าง เช่น Amitryptyline, Tamoxifen และ Verapamil

2. ข้อมูลของสารอื่นในตำรับ

Equal® (http://www.2.fda.moph.go.th, 2006 และ http://www.mypharmacy.com.sg, 2006)

Equal® เป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล

รูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผงบรรจุซอง ซองละ 1000 mg. ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (mg)	คุณสมบัติ	พลังงาน (Kcal)
Lactose	961 mg	สารเพิ่มปริมาณ	3.844 Kcal
Aspartame	36 mg	สารให้ความหวาน	0.144 Kcal
Silicon dioxide	3 mg	สารดูดซับ	-
รวม	1000 mg	-	3.988 Kcal

Equal® 1 ซอง ให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี มีความหวานเท่ากับน้ำตาล 2 ช้อนชา ซึ่งให้พลังงาน 32 กิโลแคลอรี

Glycerin (Raymond CR และคณะ, 2003)

เป็น Antimicrobial preservative, Emollient, Humectant, Plasticizer, Solvent, Sweetening agent, Tonicity agent ซึ่งใช้ในยารับประทาน ยาตา ยาใช้เฉพาะที่ และยาที่ให้ทางหลอดเลือดดำ

Glycerin จะใช้เป็น Plasticizer ของ Gelatin เมื่อใช้ในการเตรียม Soft gelatin capsule และ Gelatin suppository

3.ข้อมูลของผลิตภัณฑ์เพื่ออนามัยในช่องปาก

น้ำยาบ้วนปาก(ฉวีวรรณ ภักดีธนากุล, 2001)

การบ้วนปากด้วยน้ำสะอาดจะช่วยขจัดเศษอาหารหลังจากรับประทานอาหารได้ดี บางคนก็นิยมใช้น้ำยาบ้วนปาก เพื่อระงับกลิ่น ทำให้เกิดความมั่นใจในการพูดคุย กับผู้อื่นมากขึ้น ปัจจุบันมีน้ำยาบ้วนปากขายอยู่หลายชนิด จึงจำเป็นต้องเลือกให้ถูกต้องและเหมาะสม โดยต้องคำนึงถึงความปลอดภัย ไม่เกินอันตรายต่อช่องปากและฟัน น้ำยาควรจะมีกลิ่น สี และรสดี ราคาพอประมาณและถูกกับวัตถุประสงค์ของผู้ใช้เพื่อให้ได้ประโยชน์ตามที่ต้องการ

น้ำยาบ้วนปาก ช่วยทำให้ลมปากสดชื่น

น้ำยาบ้วนปากมีส่วนผสมสำคัญ คือ ยาฆ่าเชื้อโรคและสารที่ทำให้มีกลิ่นหอม ช่วยให้ลมปากหอม สะอาด รู้สึกสดชื่น แต่ผลจะคงอยู่ระยะสั้นและชั่วคราวเท่านั้น เนื่องจากในช่องปากมีเชื้ออยู่มากมายหลายชนิด และยาฆ่าเชื้อที่ใส่ลงไปมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้ออย่างอ่อนๆ เท่านั้น หากเราใช้น้ำยาบ้วนปากที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ที่เข้มข้นเกินไป อาจจะทำให้สมดุลของเชื้อในช่องปากเสียไป เชื้อราจะเจริญขึ้น เกิดเชื้อราบนลิ้น เพดานปาก หรือกระพุ้งแก้ม

นอกจากนี้น้ำยาบ้วนปากส่วนใหญ่จะมีส่วนผสมของแอลกอฮอล์อยู่ด้วย ซึ่งพบว่าการใช้น้ำยาที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงติดต่อกัน เป็นระยะเวลานาน 10-20 ปี ขึ้นไป อาจทำให้มีโอกาสเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อ ในช่องปากได้ ดังนั้น จึงควรใช้ตามความจำเป็น ไม่ควรใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานๆ

น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารฟลูออไรด์ ช่วยป้องกันการเกิดฟันผุ

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่า ฟลูออไรด์มีส่วนช่วยในการป้องกันฟันผุ จึงมีการนำมาใช้ในหลายรูปแบบ เช่น ผสมในยาสีฟัน เป็นยาเม็ดสำหรับรับประทาน ทำน้ำยาใช้สำหรับเคลือบฟันหรือขัดฟัน และผสมในน้ำยาบ้วนปาก โดยปกติร่างกายจะได้รับสารฟลูออไรด์จากอาหาร ผักผลไม้บางชนิดและในน้ำดื่ม ตามธรรมชาติหรือน้ำประปา ในน้ำธรรมชาติของบางจังหวัดจะมีปริมาณฟลูออไรด์มากกว่าที่อื่น เช่น จังหวัดเชียงใหม่ ชัยภูมิ และยังพบสารฟลูออไรด์ได้ในผักเขียวบางชนิด เช่น ใบชา ใบเมี่ยง ดังนั้น การใช้ฟลูออไรด์จะต้องคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ด้วย เพราะหากได้รับฟลูออไรด์มากเกินไป อาจเกิดอันตรายได้ เช่น ถ้าเกิดอย่างเฉียบพลันจะทำให้เกิดการคลื่นไส้อาเจียน ปวดหัว หรือเป็นพิษถึงแก่ชีวิตได้ แต่ถ้าได้รับมากเกินไป จากการค่อยๆ สะสมเป็นระยะเวลานาน จะทำให้ฟันตกกระ หรือมีความผิดปกติในการสร้างกระดูกได้ การใช้จึงควรปรึกษาทันตแพทย์ โดยเฉพาะการรับประทานฟลูออไรด์ในรูปยาเม็ด ส่วนการใช้ฟลูออไรด์ทาเฉพาะที่ต้องทำเป็นประจำ เพื่อให้ฟลูออไรด์เข้าไปพอกที่ผิวฟันได้ และมักจะได้ผลดีในฟันที่งอกขึ้นมาในช่องปากใหม่ๆ ที่สารเคลือบฟันยังไม่แข็งแรง และการใช้น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารฟลูออไรด์ หลังการแปรงฟันทุกวัน โดยอมกลั้วปากนาน 2-3 นาที มีรายงานว่า สามารถลดการเกิดฟันผุได้ การใช้ฟลูออไรด์ที่ได้ผลดี ปลอดภัย และมีประสิทธิภาพที่สุด จะเป็นการใช้ในรูปแบบยาสีฟัน เนื่องจากมีการใช้ติดต่อกันเป็นประจำทุกวัน

น้ำยาบ้วนปาก ช่วยลดเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก

ผู้ป่วยที่มีเหงือกอักเสบลุกลาม หรือผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโรคเหงือก โดยวิธีการผ่าตัด ซึ่งเรียกว่า การทำศัลยปริทันต์ (Periodontal surgery) ทันตแพทย์จะแนะนำให้ใช้น้ำยาบ้วนปากที่มี

ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้แผลผ่าตัดหรือเหงือกอักเสบหายเร็วขึ้น เช่น นำเอาผงยา Tetracycline ที่มีอยู่ในแคปซูลมาผสมน้ำสะอาดประมาณ 5 ml หรือประมาณ 1 ช้อนชา ผสมให้เข้ากันดีแล้วใช้อมกลั้วปากและคอ นานสัก 2-3 นาที แล้วจึงบ้วนออก หรือกลืนเข้าไปเลย แต่รสยาจะขมมาก การใช้ยาปฏิชีวนะในการฆ่าเชื้อโรคในช่องปาก ควรใช้เมื่อทันตแพทย์แนะนำเท่านั้น

<u>น้ำยาบ้วนปากผสมคลอเฮกซีดีน ช่วยลดการอักเสบของเหงือก</u>

คลอเฮกซีดีนเป็นสารที่นำมาผสมเป็นน้ำยาบ้วนปาก มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ช่วยลดการเกิดแผลในช่องปาก และช่วยลดการเกิดฟันผุได้ มีรายงานทางทันตกรรมมากมายที่สนับสนุนการใช้คลอเฮกซีดีนในผู้เป็นโรคเหงือกอักเสบลุกลาม ซึ่งมีอาการเหงือกบวมอักเสบ เป็นหนอง ฟันโยก และมีกลิ่นปากรุนแรง นอกจากนี้ยังใช้อมบ้วนปาก กลั้วคอเพื่อบรรเทาอาการเจ็บคอได้ด้วย แต่น้ำยาคลอเฮกซีดีน ข้อเสียคือ น้ำยาจะมีรสขมมาก การใช้ติดต่อกันนานๆ มักจะทำให้เกิดคราบสีเหลืองปนน้ำตาลบนตัวฟัน และอาจทำให้การรับรสอาหารเสียไปด้วย

<u>น้ำยาบ้วนปากที่ผสมสารสกัดจากพืชหรือสมุนไพร ช่วยระงับกลิ่นปาก</u>

สารสกัดจากพืชหรือสมุนไพรที่ผสมอยู่ในน้ำยาบ้วนปาก มีจุดประสงค์เพื่อให้น้ำยาบ้วนปากมีกลิ่นหอม และรสชาติดีขึ้น เมื่ออมบ้วนปากทำให้รู้สึกสะอาด สดชื่น ช่วยระงับกลิ่นปาก หรือกลิ่นอาหารที่รับประทานได้ สารสกัดเหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากใบฝรั่ง หรือสารสกัดจากเปลือกมังคุดจะมีฤทธิ์ฝาดสมาน ช่วยลดการอักเสบในช่องปากได้ และสารสกัดจากใบฝรั่งยังมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ซึ่งจะช่วยลดการเกิดคราบจุลินทรีย์ได้

<u>การใช้น้ำยาบ้วนปากก่อนการแปรงฟัน</u>

การใช้น้ำยาบ้วนปากชนิดนี้ มีจุดประสงค์เพื่อให้คราบจุลินทรีย์อ่อนตัวและหลุดออกง่าย โดยใช้อมก่อนการแปรงฟัน ซึ่งจะช่วยให้การแปรงฟันมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานในวารสารทันตกรรมว่า การใช้ในกลุ่มทดลองไม่มีผลแตกต่างจากผู้ที่ไม่ได้ใช้ แสดงว่า การแปรงฟันให้สะอาดโดยวิธีปกติก็เพียงพอในการกำจัดคราบอาหารและคราบจุลินทรีย์ ดังนั้น การใช้น้ำยาบ้วนปากก่อนการแปรงฟัน จึงไม่จำเป็นและไม่เหมาะสำหรับเด็ก โดยเฉพาะเด็กที่ยังบ้วนปากได้ไม่ดี

Listerine® PocketPaks (www.pfizer.com.au, 2007)

<u>ลักษณะทางกายภาพ</u> : แผ่นฟิล์มมีลักษณะบาง กรอบเล็กน้อย เมื่อพับแล้วไม่แตกหัก มีสีค่อนข้างขุ่น และมีรสเผ็ดเย็น ในหนึ่งกล่องประกอบด้วยแผ่นฟิล์มขนาด 2 x 3 cm ความหนา 29.4 ± 0.55 μm จำนวน 24 แผ่น น้ำหนักสุทธิ 0.792 กรัม (24 แผ่น)

<u>ส่วนประกอบ</u> : CoolMint: Pullulan, Flavours, Menthol, Aspartame, Acesulfame Potassium, Copper Gluconate, Polysorbate 80, Carrageenan, Cineole (Eucalyptol), Methyl Salicylate, Glyceryl Oleate, Thymol, Locust Bean Gum, Propylene Glycol, Xanthan Gum, Fast Green FCF.

<u>วิธีใช้</u> : ดึงแผ่นอม Listerine® PocketPaks ออกจากตลับจากนั้นวางแผ่นฟิล์มลงบนลิ้นและปล่อยให้ละลาย สามารถใช้แผ่นฟิล์มมากกว่าหนึ่งแผ่นติดต่อกันได้ทันที เพื่อให้เกิดความรู้สึกสดชื่นยิ่งขึ้น

<u>คำเตือน</u> : ไม่เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย (Phenylketonuria)

<u>การเก็บรักษา</u> : เก็บในที่แห้ง อุณหภูมิ 15 – 25 °C และหลีกเหลี่ยงการเก็บในที่ชื้นหรือร้อนจัด

<u>ผลิตโดย</u> : LTS Lohmann Therapy Systems Corp., New Jersey 0706, USA under theauthority of Pfizer Inc. New York, N.Y. USA.