Research Article

Received: December 16, 2019; Accepted: May 8, 2020

การเพิ่มจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์กับสารแอนโดรกราโฟไลด์และการพัฒนาสูตรลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจร

Osteoblast Proliferation with Andrographolide and the Development of Debittering Taste of Andrographis Tea Leaf

ณวงศ์ บุนนาค*

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตสงขลา ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

ชุติมา แก้วพิบูลย์

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

สุชาดา จันทร์พรหมมา

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ชลทิต สนธิเมือง

คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

กฤษณ์ สุขนันทร์ธะ

สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Nawong Boonnak*

Department of Basic Science and Mathematics, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla campus, Khoa Roob Chang, Muang, Songkhla 90000

Chutima Kaewpiboon

Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung Campus, Ban Phrao, Pa Payom, Phatthalung 93210

Suchada Chantrapromma

Division of Physical Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Kor-Hong, Hat Yai, Songkhla, 90112

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** nawongb@yahoo.com

Chonlatid Sontimuang

Faculty of Traditional Thai Medicine, Prince of Songkla University,

Kor-Hong, Hat Yai, Songkhla, 90112

Krit Suknuntha

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Prince of Songkla University, Kor-Hong, Hat Yai, Songkhla, 90112

บทคัดย่อ

สารแอนโดรกราโฟไลต์ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบอะซีโตนของใบฟ้าทะลายโจรออกฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ออสติโอบลาสต์ได้มากถึงร้อยละ 152.9±8.6 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าชุดควบคุม (ร้อยละ 100±7.1) นอกจากนี้ยังพบว่าสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่ความเข้มข้นสูง ณ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ออสติโอบลาสต์ (ร้อยละ 110.0±7.2) งานวิจัยนี้ยังมุ่งเน้นพัฒนาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรให้มีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น โดยการเติมสารแต่งรสชาติลงในชาใบฟ้าทะลายโจรได้ชาสูตรปรับปรุงทั้งหมด 7 สูตร พบว่าชาปรับปรุงสูตรที่ 3 ที่มีการเติมน้ำคั่นมะนาวตาฮิติสามารถลดความขมของชาใบฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าชาฟ้าทะลายโจรที่มีการเติมน้ำคั่นมะนาวตาฮิติสามารถพัฒนาเป็นชาป้องกันโรคกระดูกพรุนต่อไป

คำสำคัญ : แอนโดรกราโฟไลต์; เซลล์ออสติโอบลาสต์; ชาฟ้าทะลายโจร; น้ำคั่นมะนาวตาฮิติ; การลดขม

Abstract

Isolated andrographolide from the crude acetone extract of *Andrographis paniculata* leaves promoted osteoblast cell lines proliferation with 152.9±8.6% of cell viability at concentration of 100 µg/mL which was better than that of the control (100±7.1 %). Moreover, at the high concentration of andrographolide (100 µg/mL), it exhibited no cytotoxic against osteoblast cell lines. Therefore, this research aimed to develop a bitter tasted reducing by adding the different types of taste into Andrographis tea to yield 7 tea formulas to improve the taste that was more acceptable from consumers. The tea formula 3 with Tahiti's juice added, significantly showed the best reduction the bitterness of Andrographis tea at 95 % confidence interval. From the results of this research, it reveals that Tahiti's juice-added Andrographis tea can be developed to apply for osteoporosis prevention.

Keywords: andrographolide; osteoblast cell line; Andrographis tea; Tahiti's juice; debittering taste

1. บทนำ

โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) หรือโรคกระดูกบาง จัดเป็นโรคที่ส่งผลกระทบด้านสุขภาพในอันดับต้น ๆ (อันดับที่ 2) รองจากโรคของระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งในผู้ป่วยที่โรคอยู่ในระดับรุนแรงอาจส่งผลถึงขั้นพิการหรือเสียชีวิตได้ โรคกระดูกพรุนมีสาเหตุมาจากเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ทำงานลดลงและเพิ่มขึ้นตามลำดับ [1] และพฤติกรรมการกินนับเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ เช่น การรับประทานอาหารที่มีแคลเซียมต่ำหรืออาหารไขมันสูง เพราะไขมันจะขัดขวางการดูดซึมของแคลเซียมเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้การดื่มเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคาเฟอีนอยู่เป็นประจำมีความเสี่ยงทำให้เกิดโรคกระดูกบางเพิ่มมากขึ้น เพราะคาเฟอีนเป็นสารเร่งการขับน้ำ (มีแคลเซียมละลายอยู่ด้วย) ออกจากร่างกายในรูปของปัสสาวะ และอีกหนึ่งสาเหตุหลัก คือ ภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) [2] ซึ่งฮอร์โมนนี้ทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์ osteoblast และชะลอการทำงานของเซลล์ osteoclast ซึ่งปัญหานี้พบมากในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน เพื่อชะลอความรุนแรงของโรคผู้ป่วยบางรายจำเป็นต้องได้รับฮอร์โมนเสริม เช่น ฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol) เพราะในปี ค.ศ. 1998 พบว่าความหนาแน่นของมวลกระดูก (bone mineral density) ในชายผู้สูงอายุมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฮอร์โมนเอสตราไดออลที่ตรวจพบในร่างกาย [3] ในปี ค.ศ. 2006 จึงได้มีการทดลองใช้ฮอร์โมนเอสตราไดออลในการชะลอการสลายตัวของเนื้อกระดูกในชายสูงอายุในเชิงคลินิก พบว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลสามารถชะลอการสลายตัวของกระดูกได้อย่างมีนัยสำคัญ [4] ซึ่งเอสตราไดออลมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1 ดังนั้นการค้นคว้าสารใหม่ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูก (cell proliferation) ของเซลล์ osteoblast จะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนในอนาคต งานวิจัยทางด้านนี้จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก

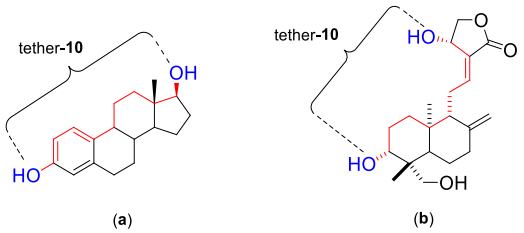

Figure 1 Structures of (a) estradiol and (b) andrographolide

งานวิจัยก่อนหน้ามีการรายงานการค้นพบสารกลุ่ม diterpene lactone ในใบฟ้าทะลายโจร [5] และพบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์ (andrographolide) มีปริมาณมากที่สุดในใบฟ้าทะลายโจร การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสาร andrographolide เปรียบเทียบกับโครงสร้างของ estradiol พบว่าโครงสร้างมีความคล้ายคลึง (isostere) กัน คือ มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group: ¯OH) 2 หมู่ ซึ่งเกาะบนคาร์บอนยาวห่างกันจำนวน 9 คาร์บอน (tether-11) เท่ากันความยาวของ tether บนโครงสร้างของฮอร์โมน estradiol ดังปรากฏในรูปที่ 1 จึงมีความเป็นไปได้ที่สาร andrographolide จะสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก เพราะฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการแยกสาร andrographolide จากใบฟ้าทะลายโจรเพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเซลล์กระดูก (proliferation of osteoblast cell) และพัฒนาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจร โดยการเติมสารที่มีผลต่อการรับรสชาติของตุ่มรับรส (taste bud) บนลิ้นชนิดต่าง ๆ ได้เป็นชาปรับปรุงสูตรต่าง ๆ (formula 1-4 และ formula 2a-3a) ให้มีรสชาติที่ยอมรับได้มากขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการบริโภคในรูปของ

ชา เพราะฟ้าทะลายโจรเป็นพืชที่พบในทุกภาคของประเทศ การบริโภคฟ้าทะลายโจรในรูปชาประชาชนจะไม่มีค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพตนเอง

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเก็บตัวอย่างฟ้าทะลายโจร

เก็บตัวอย่างใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) จากอำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ซึ่งเป็นช่วงฟ้าทะลายโจรเริ่มออกดอกได้ประมาณร้อยละ 50 หลังจากนั้นพิสูจน์อัตลักษณ์พืชตัวอย่างและเก็บตัวอย่างพืชไว้ที่ TSU's herbarium (specimen: NW05)

2.2 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบฟ้าทะลายโจร

นำใบฟ้าทะลายโจรสดมาหั่นแล้วผึ่งลมให้แห้ง แล้วแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตน (commercial grade) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายอะซีโตนออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum evaporator) ได้ส่วนสกัดหยาบอะซีโตนที่มีสีเขียวเข้มน้ำหนัก 6.59 กรัม

2.3 การแยกสารบริสุทธิ์แอนโดรกราโฟไลด์

นำส่วนสกัดหยาบอะซีโตนมาแยกสารบริสุทธิ์โดยอาศัยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ขนาดคอลัมน์สูง 45 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร) ด้วยซิลิกาขนาด 100 (0.063-0.200 มิลลิเมตร) และชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (*n*-hexane) แล้วเพิ่มสภาพขั้วด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (EtOAc) ในอัตราส่วน 5-70 ร้อยละโดยปริมาตร ตามลำดับ

ซึ่งสามารถแยกสารออกเป็นส่วนย่อย (fraction) ทั้งหมด 16 ส่วนย่อย จากนั้นตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC silica gel 60 F_{254}) โดยใช้ตัวชะ (eluent) ระบบ 70 % EtOAc-*n*-hexane แล้วตรวจสอบภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร โดยลักษณะการแยกบนรงควัตถุแผ่นบาง (thin-layer chromatography, TLC) พบว่าแยกสารบริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากได้ 1 สาร คือ fraction 5 [R_f = 0.5 : 70 % of EtOAc-*n*-hexane (1 time)] จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy (รูปที่ 2)

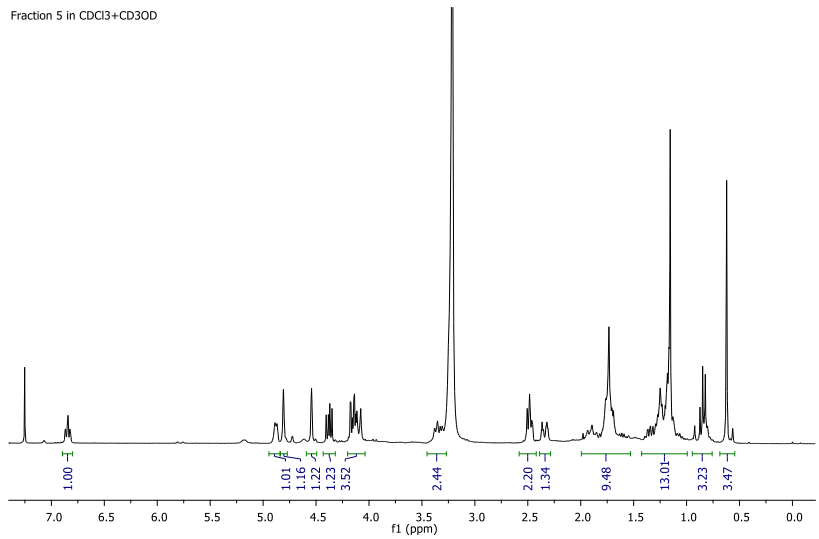

Figure 2 ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD) spectrum of andrographolide (fraction 5)

andrographolide; white solid; mp = 218-222 ºC; IR[b] (*v*): 3400, 3299, 1727, 1673, 908 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$+CD_3OD) data: δ 6.84 (1H, *td*, *J* = 6.9, 1.5 Hz, H-12), 4.88 (1H, *d*, *J* = 5.7 Hz, H-14), 4.81 (1H, *brs*, H-17a), 4.53 (1H, *brs*, H-17b), 4.38 (1H, *dd*, *J* = 10.2, 6.0 Hz, H-15a), 4.16 (1H, *dd*, *J* = 10.2, 2.1 Hz, H-15b), 4.10 (1H, *d*, *J* = 11.0 Hz, H-19a), 3.35 (1H, *brt*, *J* = 8.1 Hz, H-3), 3.31 (1H, *m*, H-19b)*, 2.48 (1H, *brd*, *J* = 12.9 Hz, H-11a), 2.34 (1H, *dt*, *J* = 13.2, 3.6 Hz, H-11b) , 1.55 (3H, *s*, CH_3-18), 0.82-1.89 (11H, m, -CH_2-1, -CH_2-2, -CH_2-6, -CH_2-7 and H-5) and 0.62 (3H, *s*, CH_3-20)

2.4 การเลี้ยงเซลล์และการทดสอบการเพิ่มจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์

เซลล์ออสติโอบลาสต์ (osteoblast cell) ของหนูถีบจักรชนิด MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593) เพาะเลี้ยงขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด alpha-modified minimum essential medium (α-MEM; Gibco Grand Island, NY, USA) ซึ่งประกอบด้วย 10 % ของ fetal bovine serum (FBS; Gibco Grand Island, NY, USA) 2 มิลลิโมลาร์ glutamine 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร penicillin G และ 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะบรรยากาศ 5 % ของก๊าซ CO_2 [6] ทดสอบการเพิ่มจำนวนและความเป็นพิษต่อเซลล์ MC3T3-E1 กับสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่แยกได้แล้วตรวจวัดด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazoleyl)-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay โดยการนำเซลล์ออสติโอบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน 96-well plate (จนได้ความหนาแน่นประมาณ 5,000 เซลล์/หลุม) มาเลี้ยงให้เจริญประมาณร้อยละ 90 แล้วเติมสารแอนโดรกราโฟไลต์ลงไปในแต่ละหลุมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในช่วงท้ายของการบ่มจะเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุมแล้วบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดผลึกฟอร์มาแซน (crystal formazan) มีการเติม acid isopropanol ปริมาตร 40 µL พร้อมเขย่าเบา ๆ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของฟอร์มาแซนที่ความยาวคลื่น λ_{max} = 510 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader แล้วคำนวณร้อยละของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ MC3T3-E1 ด้วยสมการที่ (1) ดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = OD_T \div OD_C \quad (1)$$

เมื่อ OD_T คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบกับสารแอนโดรกราโฟไลต์; OD_C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ MC3T3-E1

รายงานผลการทดลองในรูปของ mean± S.D. โดยการคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS และวิเคราะห์ค่าความแตกต่าง (significance) อย่างมีนัยสำคัญของผลการทดลองด้วยค่า p-value ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม ANOVA โดยวิธีของ Duncan's new multiple range test (DMRT)

2.5 การเตรียมชาใบฟ้าทะลายโจร

อบใบฟ้าทะลายโจรที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จนใบฟ้าทะลายโจรแห้งสนิท จากนั้นนำใบฟ้าทะลายโจรอบแห้งไปใช้เตรียมชาใบฟ้าทะลายโจรสูตรต่าง ๆ ดังนี้

2.5.1 ชุดควบคุม (control) ชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิม ซึ่งเตรียมโดยการชั่งใบฟ้าทะลายโจรแห้งบดละเอียดน้ำหนัก 500.0 มิลลิกรัม ละลายในน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5.2 ชุดปรับปรุง (modify) ประกอบด้วยชาปรับปรุงสูตรต่าง ๆ (formula 1-4 และ formula

2a และ 3a) ดังนี้

2.5.3 Formula 1 (สูตร 1) เติมสารให้ความหวาน คือ sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาณต่างกัน ได้ชาใบฟ้าทะลายโจรเติมสารให้ความหวานทั้งหมด 6 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นชั่ง sucrose ในปริมาณดังนี้ 1 = 31.2 มิลลิกรัม 2 = 62.5 มิลลิกรัม 3 = 125.0 มิลลิกรัม 4 = 250.0 มิลลิกรัม 5 = 500.0 มิลลิกรัม และ 6 = 1,000.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5.4 Formula 2 (สูตร 2) เติมสารให้ความเค็ม คือ purified sodium chloride (NaCl) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาณต่างกัน ได้ชาใบฟ้าทะลายโจรที่เติมสารให้ความเค็มทั้งหมด 6 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นชั่ง NaCl ในปริมาณ ดังนี้ 1 = 31.2 มิลลิกรัม 2= 62.5 มิลลิกรัม 3 = 125.0 มิลลิกรัม 4 = 250.0 มิลลิกรัม 5 = 500.0 มิลลิกรัม และ 6 = 1,000.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5.5 Formula 2a (สูตร 2a) เติมสารให้ความเค็ม คือ sodium gluconate ($NaC_6H_{11}O_7$) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาณต่างกัน ได้ชาใบฟ้าทะลายโจรที่เติมสารให้ความเค็มทั้งหมด 6 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นชั่ง sodium gluconate ในปริมาณ ดังนี้ 1 = 31.2 มิลลิกรัม 2 = 62.5 มิลลิกรัม 3= 125.0 มิลลิกรัม 4 = 250.0 มิลลิกรัม 5 = 500.0 มิลลิกรัม และ 6 = 1,000.0 มิลลิกรัม ตามลำดับ ละลายในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5.6 Formula 3 (สูตร 3) เติมสารให้ความเปรี้ยว คือ Tahiti's juice (มะนาวตาฮิติ, *Citrus aurantifolia*) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาณต่างกัน ได้ชาใบฟ้าทะลายโจรที่เติมสารให้ความเปรี้ยวทั้งหมด 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมในหน่วยร้อยละโดยปริมาตรดังนี้ 1 = 1 มิลลิลิตร 2 = 2 มิลลิลิตร 3 = 3 มิลลิลิตร 4 = 4 มิลลิลิตร และ 5 = 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ละลายในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5.7 Formula 3a (สูตร 3a) เติมสารให้ความเปรี้ยว คือ Lemon's juice (เลม่อน, *Citrus lemon*) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาณต่างกัน ได้ชาใบฟ้าทะลายโจรที่เติมสารให้ความเปรี้ยวทั้งหมด 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมในหน่วยร้อยละโดยปริมาตรดังนี้ 1 = 1 มิลลิลิตร 2 = 2 มิลลิลิตร 3 = 3 มิลลิลิตร 4 = 4 มิลลิลิตร และ 5= 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ละลายในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

2.5.8 Formula 4 (สูตร 4) เติมสารให้ความเค็มและความเปรี้ยวผสมกัน คือ NaCl และ Tahiti's juice ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิม โดยการชั่ง NaCl ในปริมาณ 31.2 มิลลิกรัม ผสมกับ Tahiti's juice ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

หลังจากนั้นนำชาใบฟ้าทะลายโจรที่เตรียมได้ทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองมาศึกษาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรกับอาสาสมัครสุขภาพดีทั้งเพศชายและหญิง อายุ 17-21 ปี จำนวน 62 คน

2.6 การลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรในอาสาสมัครสุขภาพดี

2.6.1 เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัคร

อาสาสมัครเข้ารับการทดสอบต้องเป็นผู้มีสุขภาพดีและมีสติสัมปชัญญะสมบูรณ์ โดยมีอายุ 17-21 ปี โดยเปิดรับสมัครผู้อาสาเข้าร่วมโครงการ 62 คน โดยที่อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการจะต้องผ่านการทดสอบการชิมรสชาติของสิ่งที่คุ้นเคยขณะหลับตาแล้วตอบรสชาติของสิ่งที่ชิมว่ามีรสชาติอย่างไร หากอาสาสมัครตอบรสชาติได้ตรงกับรสชาติของสิ่งที่ชิม ถือว่าผ่านเกณฑ์คัดเลือกเข้าเป็นอาสาสมัครชิมชาฟ้าทำลายโจรได้

2.6.2 จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

การศึกษาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรกับอาสาสมัครสุขภาพดีได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งอนุมัติให้ดำเนินศึกษาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรกับอาสาสมัครสุขภาพดีได้โดยต้องปฏิบัติตามหลักจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์อย่างเคร่งครัด ซึ่งมีหนังสือรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เลขที่ EC.57/B 06-002

2.6.3 การทดสอบการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรกับอาสาสมัครสุขภาพดี

อาสาสมัครจะได้รับการชิมชาทั้ง 7 สูตร ได้แก่ ชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิม (ชุดควบคุม) และชาใบฟ้าทะลายโจรที่ได้รับการปรับปรุงรสชาติ (ชุดทดลองประกอบด้วย formula 1-4 และ formula 2a และ 3a) โดยใส่ชาแยกในภาชนะบรรจุชาที่ปิดสนิท (blind) ผู้วิจัยจะให้อาสาสมัครชิมรสชาติโดยการอมกลั้วไว้ในปาก แล้วบ้วนทิ้ง แล้วอาสาสมัครจะต้องให้คะแนนการลดขม (debittering score) [5] ของชา 2 ด้าน คือ รสชาติ (debittering taste) และกลิ่น (debittering smell) จากนั้นอีก 5 นาที (ไม่เหลือรสชาติของชาก่อนหน้า) จะให้อาสาสมัครชิมครั้งต่อไป โดยเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

(1) คะแนนด้านรสชาติ ได้แก่ 0 = ไม่มีความขม (พึงพอใจมากที่สุด) 1-2 = มีความขมน้อยมาก (พึงพอใจมาก) 3-4 = มีความขมน้อย (พึงพอใจ) 5 = มีความขมปานกลาง (พึงพอใจปานกลาง) 6-7 = มีความขมพอประมาณ (พึงพอใจพอประมาณ) 8-9 = มีความขมมาก (พึงพอใจน้อย) และ 10 = มีความขมมากที่สุด (ไม่พึงพอใจ)

(2) คะแนนด้านกลิ่น ได้แก่ 0 = ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว (พึงพอใจมากที่สุด) 1-2 = มีกลิ่นเหม็นเขียวน้อยมาก (พึงพอใจมาก) 3-4 = มีกลิ่นเหม็นเขียวน้อย (พึงพอใจ) 5 = มีกลิ่นเหม็นเขียวปานกลาง (พึงพอใจปานกลาง) 6-7 = มีกลิ่นเหม็นพอประมาณ (พึงพอใจพอประมาณ) 8-9 = มีกลิ่นเหม็นเขียวมาก (พึงพอใจน้อย) และ 10 = มีกลิ่นเหม็นเขียวมากที่สุด (ไม่พึงพอใจ)

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงด้วยค่า mean±S.D. (n = 3) ใช้โปรแกรม SPSS โดยสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลได้แก่ ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างผลการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.8 การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารกลุ่มแลคโตนด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

aliquot ชาใบฟ้าทะลายโจรรสชาติดั้งเดิมในปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในคิวเวตต์ แล้วเติมสารละลาย 3,5-dinitro benzoic acid ความเข้มข้นร้อยละ 2 และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 อย่างละ 30 ไมโครลิตร เขย่าต่อเนื่องเป็นเวลา 3 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 544 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณสารกลุ่มแลคโตนรวมจากสมการเส้นตรง (linear regression) ของกราฟมาตรฐาน พบว่าในชาใบฟ้าทะลายโจร

รสชาติดั้งเดิมมีสารกลุ่มแลคโตนรวมในปริมาณร้อยละ 7.38 โดยน้ำหนัก

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การสกัดสารสกัดหยาบและแยกสารแอนโดรกราโฟไลต์จากใบฟ้าทะลายโจร

ใบฟ้าทะลายโจรสดหั่นตากแห้งแล้วแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอะซีโตน แล้วระเหยตัวทำละลายออก ได้ส่วนสกัดหยาบอะซีโตนที่มีสีเขียวเข้ม จากนั้นแยกสารแอนโดรกราโฟไลต์จากส่วนสกัดหยาบอะซีโตนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยอาศัยตัวชะระหว่าง EtOAc กับ *n*-hexane ในอัตราส่วนต่าง ๆ ซึ่งแยกสารออกเป็นส่วนย่อย (fraction) ได้ทั้งหมด 16 ส่วนย่อย กับสารบริสุทธิ์อีก 1 สาร ที่ R_f = 0.5 [70 % of EtOAc-*n*-hexane (1 time)] หลังจากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H NMR spectroscopy ซึ่งพบการปรากฏลักษณะสัญญาณของ ^{1}H NMR spectrum (รูปที่ 2) เหมือนกับสาร andrographolide [5] จึงสรุปว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือ andrographolide โดยมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 1

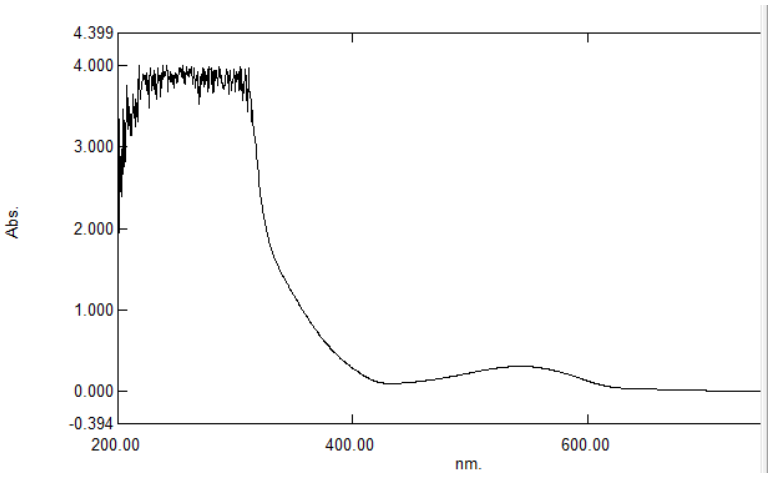

Figure 3 UV-vis spectrum of original andrographis tea after treatment with Kedde's reagent

3.2 ผลการเพิ่มจำนวนเซลล์ออสติโอบลาสต์ด้วยสารแอนโดรกราโฟไลต์

นำสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบอะซีโตนมาศึกษาการออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกของหนูถีบจักรด้วยวิธี MTT assay โดยพิจารณาจากร้อยละ cell viability ของเซลล์ออสติโอบลาสต์หลังการเติมสารแอนโดรกราโฟไลต์ พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ออสติโอบลาสต์เพิ่มจำนวนได้มากขึ้นถึงร้อยละ 152.9±8.6 (รูปที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 100±7.1) นอกจากนั้นผลการทดลองในรูปที่ 4 ยังแสดงให้เห็นว่าสารแอนโดรกราโฟไลต์ที่เจือจางความเข้มข้นลง 100 เท่า (เทียบกับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) คือ ณ ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ออสติโอบลาสต์ได้ถึงร้อยละ 128.8±5.5 ขณะที่สารแอนโดรกราโฟไลต์ที่เจือจางความเข้มข้นลงอีก 1,000 เท่า (ความเข้มข้น 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ออสติโอ

บลาสต์มีการเพิ่มจำนวนได้มากถึงร้อยละ 116.2±5.4 และที่น่าแปลกใจ คือ สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่ความเข้มข้นสูง ณ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงความเป็นพิษ (non-cytotoxic) ต่อเซลล์ออสติโอบลาสต์ เพราะไม่มีการลดลงของจำนวนของเซลล์ออสติโอบลาสต์ (ร้อยละ 110.0±7.2) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาผลของเอนโดรกราโฟไลด์สามารถกระตุ้นเซลล์ออสติโอบลาสต์และการสร้างกระดูกทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* [4] ดังนั้นผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารแอนโดรกราฟไลด์มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูกได้ดี ถึงแม้ใช้ความเข้มข้นในระดับต่ำมากก็ตาม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังต้องการพัฒนาการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรให้มีรสชาติที่ยอมรับได้มากขึ้น เพื่อให้ง่ายต่อการบริโภคในรูปของชา

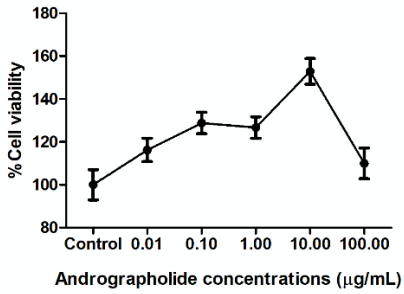

Figure 4 The effect of andrographolide on cell viability of osteoblast cell lines

3.2 การลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรในอาสาสมัครสุขภาพดี

การศึกษานี้เป็นการวิจัยกึ่งทดลอง (quasi-experimental research) ซึ่งศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครเดียวแบบอิสระต่อกัน (independent sample) จำนวน 62 คน โดยให้อาสาสมัครชิมชา แล้วให้คะแนนการลดขมตามเกณฑ์ที่กำหนด [7] การทดลองชิมชาฟ้าทะลายโจรสูตรดั้งเดิมของอาสาสมัคร 62 คน พบว่ามีระดับคะแนนความขมด้านรสชาติ 8.77±1.27 (ดังแสดงในตารางที่ 1) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าชาใบฟ้าทะลายโจรมีรสชาติขมมาก ยากต่อการบริโภคในรูปแบบของชา ผู้วิจัยจึงพัฒนาชาใบฟ้าทะลายโจรให้มีรสชาติที่ยอมรับได้มากขึ้น โดยการเติมสารที่มีผลต่อการรับรสชาติของตุ่มรับรส (taste bud) ขมบนลิ้นชนิดต่าง ๆ [8] ได้แก่ สารให้ความหวาน (sucrose) [8,9] สารให้ความเค็ม (purified sodium chloride) [8-10] และสารให้ความเปรี้ยว (Tahiti's juice) [8] ลงในชาใบฟ้าทะลายโจร ได้เป็นชาปรับปรุงสูตร formula 1-3 ตามลำดับ พบว่าชาปรับปรุงสูตร formula 1 ณ ความเข้มข้นที่ 6 (200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีคะแนนความขมด้านรสชาติ 8.21±1.27 (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า sucrose สามารถลดความขมของชาใบฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญ ชาปรับปรุงสูตร formula 2 ณ ทุกความเข้มข้น 1-6 พบว่าคะแนนความขมด้านรสชาติ (ตารางที่ 1) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารให้ความเค็ม NaCl ไม่มีประสิทธิภาพในการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจร แต่ขณะที่ชาปรับปรุงสูตร formula 3 ที่มีการเติม Tahiti's juice ณ ความเข้มข้นที่ 1 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นความเข้มที่น้อยที่สุด ยังสามารถลดระดับความขมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (7.21±2.05) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Tahiti's juice มีประสิทธิภาพสูงมากในการลดความขมของชาใบฟ้าทะลายโจรสูตรดั้งเดิม โดยระดับความขมหลังเติม Tahiti's juice ลดลงอยู่ในระดับขมพอประมาณ (7.21±2.05 ถึง 6.05±1.89) ถึงขมปานกลาง (5.39±2.10) เมื่อเปรียบเทียบกับชาฟ้าทะลายโจรสูตรดั้งเดิม ซึ่งมีรสชาติความขมอยู่ในระดับขมมาก (8.77±1.27) โดยสามารถกล่าวว่าการเติม Tahiti's juice ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรนั้นทำให้บริโภคได้ง่ายขึ้นมาก

ผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าการเติม NaCl (ซึ่งมีรสชาติเค็ม) ลงในชาใบฟ้าทะลายโจรมีผล

ต่อการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรน้อยมาก ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนเป็นการเติมเกลือ sodium gluconate (มีรสชาติเค็มเล็กน้อย) แทน NaCl เพราะมีงานวิจัยระบุการใช้ sodium gluconate ในการลดขมของยาที่ใช้กับเด็ก [10,11] หลังการชิมชาปรับปรุงสูตร formula 2a (ตารางที่ 2) ของอาสาสมัคร ณ ทุกความเข้มข้น 1-6 พบว่าการเติมเกลือ sodium gluconate ทำให้ชาใบฟ้าทะลายโจรมีรสชาติขมขึ้น เพราะฉะนั้นการเติมเกลือทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถลดความขมของชาใบฟ้าทะลายโจร

Table 1 Debittering taste scores of Andrographis teas (formula 1-3) with different tastes

Concentrations**	Debittering taste scores*		
	Formula 1 (sucrose added)	Formula 2 (NaCl added)	Formula 3 (Tahiti's juice added)
[1]	9.48±0.95^{de}	8.69±1.51^{a}	7.21±2.05^{d}
[2]	9.34±1.12^{cde}	8.39±1.65^{a}	7.02±1.86^{cd}
[3]	9.58±0.82^{e}	8.29±1.75^{a}	6.61±2.08^{bcd}
[4]	9.20±1.16^{cde}	8.37±1.71^{a}	6.05±1.89^{abc}
[5]	8.68±1.48^{bc}	7.82±1.81^{a}	5.39±2.10^{ab}
[6]	8.21±1.67^{ab}	8.00±2.01^{a}	-
Control	8.77±1.27^{bcd}	8.77±1.27^{a}	8.77±1.27^{e}

*Different letters within a column indicate differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance, **[1] = 6.2 mg/mL, [2] = 12.5 mg/mL, [3] = 25.0 mg/mL, [4] = 50.0 mg/mL, [5] = 100 mg/mL and [6] = 200 mg/mL

Table 2 Debittering taste score of Andrographis teas (formula 2 and 2a) with different types of salts

Concentrations**	Debittering taste scores*	
	Formula 2 (NaCl added)	Formula 2a (sodium gluconate added)
[1]	8.69±1.51^{a}	9.00±1.53^{b}
[2]	8.39±1.65^{a}	9.23±1.11^{b}
[3]	8.29±1.75^{a}	8.82±1.34^{ab}
[4]	8.37±1.71^{a}	9.13±1.32^{b}
[5]	7.82±1.81^{a}	9.03±1.23^{b}
[6]	8.00±2.01^{a}	8.66±1.32^{ab}
Control	8.77±1.27^{a}	8.77±1.27^{ab}

*Different letters within a column indicate differences determined by DMRT at the 95 percent level of significance, **[1] = 6.2 mg/mL, [2] = 12.5 mg/mL, [3] = 25.0 mg/mL, [4] = 50.0 mg/mL, [5] = 100 mg/mL and [6] = 200 mg/mL

ผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าการเติม Tahiti's juice มีประสิทธิภาพสูงมากในการลดขม แต่มีงานวิจัยระบุว่าเปลือกของมะนาวตาฮิติมีสารขม คือ ลิโมนิน (limonin) [12] ผสมอยู่ในเปลือกในปริมาณมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อรสขมของชาฟ้าทะลายโจรได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดขมให้ดีมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือกเติมสารให้ความเปรี้ยวที่ได้จากพืชในตระกูล Citrus ที่ไม่มีสาร limonin ผสมอยู่ในเปลือก นั่นคือ *Citrus lemon* (เลม่อน) โดยการเติม Lemon's juice ลงในชาฟ้าทะลายโจร ได้เป็นชาปรับปรุงสูตร formula 3a (ตารางที่ 3) พบว่าการเติม Lemon's juice สามารถลดขมได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเติม Tahiti's juice ณ ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า Tahiti's juice มีประสิทธิภาพในการลดขมได้ดีกว่า Lemon's juice ซึ่งอาจเป็นเพราะ Tahiti's juice มีความเปรี้ยวมากกว่า Lemon's juice ในปริมาตรเท่ากัน จึงทำให้ประสิทธิภาพการลดขมต่างกัน จากนั้นลองผสมรสชาติระหว่าง Tahiti's juice กับ NaCl ซึ่งผลการทดลอง (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าการเติมรสชาติเปรี้ยวและเค็มไม่สามารถลดขมได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชาสูตรดั้งเดิมและชาปรับปรุงสูตร formula 3 ที่มีการเติม Tahiti's juice เพียงอย่างเดียว

Table 3 Debittering taste scores of Andrographis teas (formula 3 and 3a) with different types of juices

Concentrations**	Debittering taste scores*	
	Formula 3 (Tahiti's juice added)	Formula 3a (lemon's juice added)
[1]	7.21 ± 2.05^{d}	8.16 ± 1.46^{cd}
[2]	7.02 ± 1.86^{cd}	7.82 ± 1.61^{c}
[3]	6.61 ± 2.08^{bcd}	7.56 ± 1.62^{bc}
[4]	6.05 ± 1.89^{abc}	6.95 ± 1.65^{ab}
[5]	5.39 ± 2.11^{a}	6.58 ± 2.02^{a}
Control	8.77 ± 1.27^{e}	8.77 ± 1.27^{d}

*Different letters within a column indicate differences determined by DMRT at the 95 percent level of significance, **[1] = 16.7 v/v [2] = 28.6 v/v, [3] = 37.5 v/v, [4] = 44.4 v/v and [5] = 50.0 v/v

Table 4 Debittering taste scores of Andrographis tea with mixed taste

Tea formula	Formula 2 (NaCl added)	Formula 3 (Tahiti's juice added)	Formula 4 (NaCl and Tahiti's juice added)	Control
Debittering taste scores*	8.69 ± 1.51^{a}	7.02 ± 1.86^{b}	8.11 ± 1.54^{a}	8.77 ± 1.27^{a}

*Different letters within a column indicate differences determined by DMRT at the 95 percent level of significance

Table 5 Debittering smell scores of Andrographis teas (formula 1 and 3) with different types of taste

Concentrations**	Debittering smell scores*	
	Formula 1 (sucrose added)	Formula 3 (Tahiti's juice added)
[1]	4.47±2.49[a]	3.10±2.30[ab]
[2]	4.42±2.43[a]	2.82±2.25[a]
[3]	4.73±2.52[a]	3.00±2.17[a]
[4]	4.42±2.50[a]	3.21±2.45[ab]
[5]	4.23±2.57[a]	2.77±2.41[a]
[6]	4.02±2.69[a]	2.66±2.22[a]
Control	4.53±2.68[a]	4.53±2.68[a]

*Different letters within a column indicate differences determined by DMRT at the 95 percent level of significance ** formula 1: [1] = 6.2 mg/mL, [2] = 12.5 mg/mL, [3] = 25.0 mg/mL, [4] = 50.0 mg/mL, [5] = 100 mg/mL and [6] = 200 mg/mL; formula 3: [1] = 16.7 v/v [2] = 28.6 v/v, [3] = 37.5 v/v, [4] = 44.4 v/v and [5] = 50.0 v/v

หลังจากนั้นนำชาปรับปรุงสูตร formula 1 และ 3 ที่มีประสิทธิภาพในการลดขมได้อย่างมีนัยสำคัญมาศึกษาการลดความขมด้านกลิ่น พบว่าชาปรับปรุงทั้งสูตร formula 1 และ 3 (ตารางที่ 5) ไม่สามารถลดกลิ่นขมของฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีข้อสังเกตว่าชาปรับปรุงสูตร formula 3 ณ ความเข้มข้นที่ 5 และ 6 ระดับกลิ่นความขมลดลง 1 ระดับ (2.77±2.41) ซึ่งอยู่ในระดับมีกลิ่นเหม็นเขียวน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับชาฟ้าทะลายโจรสูตรดั้งเดิม (4.53±2.68) ซึ่งมีระดับความเหม็นเขียวในระดับเหม็นเขียวปานกลาง

4. สรุป

สารแอนโดรกราโฟไลด์ที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบอะซีโตนสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ osteoblast ของหนูถีบจักรด้วยวิธี MTT assay พบว่าสาร andrographolide ณ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ออสติโอบลาสต์เพิ่มจำนวนได้มากที่สุดถึงร้อยละ 152.9±8.6 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ร้อยละ 100±7.1) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ณ ความเข้มข้นต่ำ ๆ (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารแอนโดรกราโฟไลด์ยังมีประสิทธิภาพของในการกระตุ้นให้เซลล์ osteoblast มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ถึงร้อยละ 128.8±5.5 นอกจากนี้ ณ ความเข้มข้นสูง (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารแอนโดรกราโฟไลด์ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ osteoblast (ร้อยละ 110.0±7.2) และเพื่อพัฒนารูปแบบการรับประทานฟ้าทะลายโจรในรูปของชา โดยการศึกษาการปรับปรุงชาใบฟ้าทะลายโจรพบว่าชาปรับปรุงสูตร formula 1 ที่มีการเติมสารให้ความหวาน คือ sucrose สามารถลดขมแต่ต้องเติม sucrose ในปริมาณสูง ขณะที่ชาปรับปรุงสูตร formula 2 และ 2a ที่มีการเติมสารให้ความเค็ม คือ NaCl และ sodium gluconate ไม่สามารถลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจร นอกจากนี้พบว่าชาปรับปรุงสูตร formula 3 ที่มีการเติมสารให้ความเปรี้ยว คือ

Tahiti's juice มีประสิทธิภาพสูงในการลดความขมของชาใบฟ้าทะลายโจรอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าจะมีการเติมสารให้ความเปรี้ยวอีกชนิด คือ Lemon's juice ลงในชาปรับปรุงสูตร formula 3a ก็ยังสามารถลดขมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมีประสิทธิภาพด้อยกว่าการเติม Tahiti's juice นอกจากนี้ชาปรับปรุงสูตร formula 3 ณ ความเข้มข้นที่ 5 และ 6 ส่งผลให้กลิ่นความขมลดลง 1 ระดับ (2.77±2.41) อยู่ที่ระดับมีกลิ่นเหม็นเขียวน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับชาฟ้าทะลายโจรสูตรดั้งเดิม (4.53±2.68) ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเขียวในระดับปานกลาง หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานแล้วเกิดอาการชาหรืออ่อนแรงตามแขน หรือขาให้หยุดการใช้ทันที และไม่ควรใช้สมุนไพรฟ้าทะลายโจรร่วมกับยาลดความดันเลือด สารกันเลือดเป็นลิ่ม และยาต้านการจับตัวของเกล็ดเลือด

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันฮาลาล มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (SCI12H58) ขอขอบคุณ นางสาวเพ็ญศิริ กรดหนู นางสาวสิรินันท์ จันทร์เกื้อ และนางสาวสุนิสา ดามะลี ที่เสียสละกำลังกายและใจในการทำงานวิจัยนี้อย่างเต็มความสามารถและตั้งใจ ขอขอบคุณ คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนพื้นที่ในการวิจัยและคำแนะนำจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์เกี่ยวกับการลดขมของชาใบฟ้าทะลายโจรกับอาสาสมัครสุขภาพดี

6. References

[1] Zhai, Z.J., Li, H.W., Liu, G.W. Qu, X.H., Tian, B., Yan, W., Lin, Z., Tang, T.T., Qin, A. and Dai, K.R., 2014, Andrographolide suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro* and prevents inflammatory bone loss *in vivo*, Br. J. Pharmacol. 171: 663-675.

[2] Weitzmann, M.N. and Pacifici, R., 2006, Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale, J. Clin. Invest. 116: 1186-1194.

[3] Khosla, S., Melton, L.J., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Klee, G.G. and Riggs, B.L., 1998, Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: A key role for bioavailable estrogen, J. Clin. Endocrinol. Metab. 83: 2266-2274.

[4] Fink, H.A., Ewing, S.K., Ensrud, K.E., Barrett-Connor, E., Taylor, B.C., Cauley, J.A. and Orwoll, E.S., 2006, Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men, J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 3908-3915.

[5] Kulyal, P., Tiwari, U.K., Shukla, A. and Gaur, A.K., 2010, Chemical constituents isolated from *Andrographis paniculate*, Indian J. Chem. 49B: 356-359.

[6] Yongyun, C., Jingwei, Z., Zhiqing, L., Wenxiang, C. and Huiwu, L., 2019, Andrographolide stimulates osteoblasto genesis and bone formation by inhibiting nuclear factor kappa-B signaling both *in vivo* and *in vitro*, J. Orthop. Transl. 19: 47-57.

[7] Birhade, S.T., Bankar, V.H., Gaikwad, P.D., and Pawar, S.P., 2010, Preparation and

evaluation of cyclodextrin based binary systems for taste masking, Int. J. Pharm. Sci. Drug Res. 2: 199-203.

[8] Pandey, S., Kumar, S., Prajapati, S.K. and Madhav, N.V.S., 2010, An overview on taste physiology and masking of bitter drug, Int. J. Pharm. Bio. Sci. 1: 1-11.

[9] Rashima, R.S., Maizura, M., Kang, W.M., Fazilah, A., and Tan, L.X., 2017, Influence of sodium chloride treatment and poly saccharides as debittering agent on the physicochemical properties, antioxidant capacity and sensory characteristics of bitter gourd (*Momordica charantia*) juice, J. Food Sci. Technol. 54: 228-235.

[10] Keast, R.S.J. and Breslin, P.A.S., 2002, Modifying the bitterness of selected oral pharmaceuticals with cation and anion series of salts, Pharm. Res. 19: 1019-1026.

[11] Mennella, J.A., Pepino, M.Y. and Beauchamp, G.K., 2003, Modification of bitter taste in children, Dev. Psychobiol. 43: 120-127.

[12] Breksa, A.P., Zukas, A.A. and Manners, G.D., 2005, Determination of limonoate and nomilinoate A-ring lactones in citrus juices by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1064: 187-191.