

การพัฒนา ยาเม็ด สารสกัดมาตรฐาน สมุนไพร หนุ้าปักกิ่ง

วิภาส ตักดี¹⁾ และ สุนทรา ผลผลา¹⁾

นพมาศ สุนทรเจริญนนท์²⁾ โกวิท พัฒนปัญญาสัตย์³⁾ และ พร้อมจิต ศรีลัมพ์^{*1)}

- 1) ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2) ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล* Email : pypsr@mahidol.ac.th
- 3) ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทำการศึกษาศารสกัดมาตรฐาน ฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และพัฒนาสูตรตำรับยาเม็ด ของน้ำคั้นหนุ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis*) ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าน้ำคั้นหนุ้าปักกิ่งสด ที่ระเหยแห้งโดยวิธี spray dry (L006) และ freeze dry (L001) มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเมื่อนำสารสกัด L001 มาแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยใช้วิธีตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ และการ dialysis จะได้สารสกัดลำดับส่วน L001-L006 ซึ่งพบว่ามีประกอบด้วยสาร polysaccharides ในปริมาณเท่ากับ 0.4-135.2% และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่คือ น้ำตาลกลูโคส สารสกัดลำดับส่วนทั้งหมดมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ยกเว้น L002 โดยที่ L004 มีฤทธิ์ดีที่สุด และการพัฒนาสูตรตำรับยาเม็ด จะใช้ L006 มาทำการศึกษา โดยใช้วิธี wet granulation ซึ่งจะได้ยาเม็ดที่ได้มาตรฐานตามเภสัชตำรับ การศึกษานี้เป็นการพิสูจน์ให้เห็นว่าน้ำคั้นหนุ้าปักกิ่งมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและสารสำคัญคือสารกลุ่ม polysaccharides

key word : ยาเม็ด หนุ้าปักกิ่ง, ฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน, *Murdannia loriformis*, immunostimulating activity, polysaccharides

1. คำนำ

ปัจจุบันผู้ป่วยโรคมะเร็งบางรายที่ได้รับการรักษาโดยวิธีการแพทย์แผนปัจจุบันอยู่แล้ว ก็ยังมีการนำสมุนไพรมาช่วยในการรักษาอีกทางหนึ่งด้วย ตัวอย่างเช่น หนุ้าปักกิ่ง และเห็ดหลินจือ เป็นต้น หนุ้าปักกิ่งเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งกันมาก มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนแถบสิบสองปันนา มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy วงศ์ Commelinaceae เป็นพืชล้มลุก ในตำรายาจีนใช้ในโรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจและรักษาอาการเจ็บคอ ในประเทศไทยผู้ป่วยโรคมะเร็งดื่มน้ำคั้น

จากหนุ้าปักกิ่งทั้งต้น เพื่อรักษาบรรเทาอาการจากโรค มะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งเต้านมและมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ช่วยทำให้อาการโดยทั่วไปของผู้ป่วยดีขึ้น รับประทานอาหารได้ ช่วยลดอาการข้างเคียงจากการฉายแสง (วิภาส จิรจรรย์กุล, 2542; พิมลวรรณ ทัพยุทธพิจารณ์, 2525) ซึ่งในปัจจุบันนี้มีผลิตภัณฑ์ของหนุ้าปักกิ่งขายในท้องตลาดอยู่หลายรูปแบบ ไม่ว่าจะเป็นน้ำคั้นจากหนุ้าปักกิ่งสด แคปซูล หรือชาชงสมุนไพร

จากรายงานการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ในหลอดทดลอง พบว่าหนุ้าปักกิ่งไม่แสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง แต่ก็ยังไม่อาจสรุปได้ว่า หนุ้า

ปักกิ่งไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เพราะคุณสมบัตินี้อาจปรากฏในสัตว์ทดลอง หรือหญ้าปักกิ่งอาจมีคุณสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งคุณสมบัตินี้ช่วยเพิ่มความต้านทานมะเร็งให้แก่ร่างกายได้ (วีณา จิรจรรย์กุล, 2525)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของยาเม็ดที่ได้จากสารสกัดมาตรฐานหญ้าปักกิ่ง

2. วัสดุและวิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างสมุนไพร

หญ้าปักกิ่งสด เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี เดือนมิถุนายน 2546 ทำการตรวจสอบชนิดของพืช โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างซึ่งปลูกที่สวนสมุนไพรสิริรุกชาติ ศาลายา จังหวัดนครปฐม และเปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้ง ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2 การเตรียมสารสกัดในรูปผงแห้งจากหญ้าปักกิ่งสด

นำใบสดที่ล้างสะอาด นำเข้าเครื่องโม่หยาบและเครื่องบดคั้น จะได้น้ำคั้น 67.3% แบ่งส่วนหนึ่งระเหยแห้งโดยวิธี freeze dry จะได้ L001 อีกส่วนนำไประเหยแห้งโดยวิธี spray dry ซึ่งจะใช้สาร carrier ช่วยในการระเหยแห้ง จะได้ L006 โดยในขั้นตอนนี้ได้ทำที่โรงงานบริษัทคั้นน้ำเต้าทองจำกัด (แผนภูมิที่ 1)

2.3 การแยกสารสกัด L001 ให้บริสุทธิ์

การแยกสารสกัด L001 ให้บริสุทธิ์ ทำโดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์และวิธี dialysis จะได้สารสกัดลำดับส่วน L002-006 (แผนภูมิที่ 2)

2.4 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของสารสกัดลำดับส่วน L001-006

2.4.1 การตรวจสอบสารกลุ่ม polysaccharides : ทำปฏิกิริยากับ phenol-sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

2.4.2 การตรวจสอบสารกลุ่ม tannins และ phenolic compounds: ใช้วิธีตกตะกอนกับ gelatin และทำ

ปฏิกิริยากับ ferric chloride test solution (Farnsworth, 1956)

2.4.3 การตรวจสอบสารที่มี steroidal structure : โดยวิธี Lieberman-Burchard test (Farnsworth, 1956)

2.5 การตรวจหาปริมาณ total polysaccharides

การตรวจหาปริมาณ total polysaccharides จะใช้วิธี Phenol-sulfuric acid โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน glucose วัดค่า การดูดกลืนที่ 490 nm (Dubois และคณะ, 1956)

2.6 การตรวจสอบหาองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยใช้วิธี acid hydrolysis / TLC

การทำ acid hydrolysis จะใช้ Trifluoroacetic acid (TFA) ซึ่ง hydrolysate ที่ได้จะนำมาตรวจสอบชนิดของน้ำตาล โดยใช้วิธี TLC โดยมี stationary phase เป็น Cellulose plate และ mobile phase เป็น ethylacetate : pyridine : glacial acetic acid : water ในอัตราส่วน 5 : 5 : 1 : 3 เปรียบเทียบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอ้างอิงแต่ละชนิด ได้แก่ L-Rhamnose, D(+)-Xylose, L(+)-Arabinose, α -D(+)-Glucose, D(+)-Galactose และ D(+)-Galacturonic acid ตัวตรวจสอบคือน้ำยา silver nitrate-sodium hydroxide

2.7 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน คือ CD3 ที่เซลล์ โดยการวัด CD69 expression จากตัวอย่างของเลือดจากผู้ป่วยจำนวน 7 คน หลังจากกระตุ้นด้วยสารสกัดหรือสารสกัดร่วมกับ Staphylococcal enterotoxin B (SEB) ปริมาณ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Maino และคณะ, 1995; Mardiney และคณะ, 1996)

2.8 การพัฒนาตำรับยาเม็ด

ในการพัฒนาตำรับยาเม็ดสารสกัดหญ้าปักกิ่ง มีขั้นตอนดังนี้

2.8.1 ตั้งตำรับและเตรียมยาเม็ดสารสกัดหญ้าปักกิ่งโดยวิธีแกรนูลเปียก

ในการทดลองได้ตั้งสูตรตำรับ 4 ตำรับ โดยตำรับที่ 1 และ 2 จะใช้สาร A เป็นสารช่วยยึดเกาะ แต่เตรียมขึ้นในความเข้มข้นต่างกัน และตำรับที่ 3 และ 4 จะใช้สาร B เป็นสารช่วยยึดเกาะ เตรียมในความเข้มข้นที่เท่ากัน แต่ในตำรับที่ 4 มีการปรับเปลี่ยนของปริมาณสารตัวอื่นร่วมด้วย

2.8.2 การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด จะทำการหาความเบี่ยงเบนของน้ำหนัก (weight variation) ตามวิธี USP 24 การหาความแข็ง (hardness) ใช้ Manesty Monsanto Tablet Hardness Tester วัดเป็นหน่วย kg การหาความหนา (thickness) ใช้ Rhambold thickness tester วัดเป็นหน่วย mm การหาความกร่อน (friability) ใช้เครื่อง Sartorius® electronic balance และ Roche® friabilator และการหา disintegration time ใช้เครื่อง Disintegration Test Apparatus

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การตรวจสอบคุณภาพทางเคมีของสารสกัดลำดับส่วน L001-006

พบว่า สารสกัดลำดับส่วนทั้งหมด ประกอบด้วยสารกลุ่ม polysaccharides โดยพบว่า L004 และ L006 จะมีปริมาณมากกว่า สารสกัดลำดับส่วนอื่นๆ

3.2 การตรวจสอบหาสารกลุ่ม tannins และ phenolic compounds

พบว่า สารสกัดลำดับส่วนทั้งหมด ไม่มีสารกลุ่ม tannins ยกเว้น L002 พบว่ามี phenolic compounds ที่อาจจะมี phenolic hydroxy group 2 หมู่ เนื่องจากให้ผลบวกกับน้ำยา ferric chloride เป็นสีเขียว

3.3 การตรวจสอบสารที่มี steroidal structure

พบว่า สารประกอบทางเคมีในสารสกัดลำดับส่วนทั้งหมด ไม่มีโครงสร้างเป็น steroidal ยกเว้น L002 ให้ผลบวกกับ Lieberman-Burchard test โดยมีการเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียวอย่างรวดเร็ว

3.4 การตรวจหาปริมาณ total polysaccharides โดยใช้วิธี Phenol-sulfuric acid

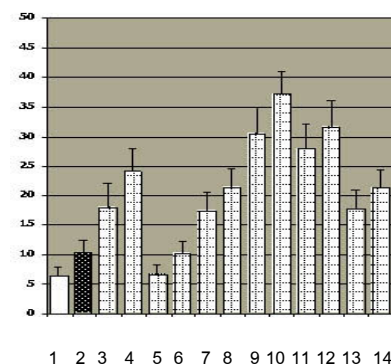
พบว่าสารสกัดลำดับส่วน L001–L006 มี % total polysaccharides (คำนวณเปรียบเทียบกับ glucose) เท่ากับ 22.1, 41.9, 0.4, 100.9, 2.9 และ 135.2 ตามลำดับ โดยจะเห็นว่า สารประกอบใน L004 และ L006 จะเป็นสารกลุ่ม polysaccharides ทั้งหมด แต่เหตุที่ L006 มี % total polysaccharides เท่ากับ 135.2 % นั้น ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการระเหยแห้งโดยวิธี spray dry จะมีการเติมสารช่วยซึ่งเป็นสารกลุ่ม polysaccharides

3.5 การตรวจสอบหาองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยใช้วิธี acid hydrolysis / TLC

พบว่า L001 ประกอบด้วยน้ำตาล glucose เป็นหลัก รองลงมาคือ arabinose และ galactose L002 ประกอบด้วยน้ำตาล glucose เป็นหลัก และ galactose เล็กน้อย L003, L005 และ L006 มีน้ำตาลหลัก คือ glucose ส่วน L004 ประกอบด้วยน้ำตาล arabinose และ galactose ในปริมาณใกล้เคียงกัน

3.6 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

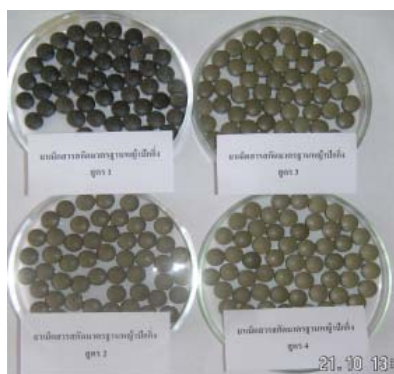
พบว่า สารสกัดลำดับส่วนทั้งหมด มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และมีฤทธิ์เสริมกับสาร SEB โดยที่ L004 มีฤทธิ์ดีที่สุด ยกเว้น L002 ที่ไม่มีฤทธิ์ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงการเปรียบเทียบ ค่า %CD3+/CD69+ หลังการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดลำดับส่วน; track 1 = control; 2 = SEB; 3 = L001; 4 = L001+SEB; 5 = L002; 6 = L002+SEB; 7 = L003; 8 = L003+SEB; 9 = L004; 10 = L004+SEB; 11 = L005; 12 = L005+SEB; 13 = L006; 14 = L006+SEB

3.7 การพัฒนาตำรับยาเม็ด

ผลการทดลองพบว่า เม็ดยาจากทุกสูตรตำรับให้ลักษณะของเม็ดยาที่ดี กล่าวคือสามารถตอกเป็นเม็ดยาที่สวยงามได้ เม็ดยามีสีเขียวอมเทา แต่พบว่าเม็ดยาในสูตรตำรับที่ 1 จะมีสีเข้มกว่าสูตรตำรับอื่น ๆ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ลักษณะภายนอกของยาเม็ดในสูตรตำรับต่างๆ (ตำรับที่ 1-4)

นอกจากนี้ได้ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของยาเม็ด พบว่ายามีทั้ง 4 สูตรมีค่าความเบี่ยงเบนของน้ำหนักไม่เกิน 5 % (มีค่าอยู่ระหว่าง 2.50-3.81%) ความแข็งมีค่า 5.48-7.17 kg ค่าความหนา อยู่ระหว่าง 4.41-4.65 mm. มีค่าความกร่อน 0.12-1.0 % ซึ่งค่าดังกล่าวเป็นไปตามข้อกำหนดของเภสัชตำรับ USP 24 แต่ยาเม็ดสูตรที่ 1 และ 2 มีค่า disintegration time มากกว่า 30 นาที ซึ่งถือว่าไม่เข้ามาตรฐานเภสัชตำรับแต่ยาเม็ดสูตรที่ 3 และ 4 มีค่า disintegration time ประมาณ 28 นาที ที่เข้ามาตรฐานเภสัชตำรับ แต่ก็ยังเป็นเวลาการแตกตัวที่นาน ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาสูตรยาเม็ดต่อไป

4. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ยาเม็ดจากสารสกัดมาตรฐานหญ้าปักกิ่ง ที่มีการพิสูจน์ฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและควบคุมคุณภาพและปริมาณสารสำคัญ ซึ่งความรู้ที่ได้ครั้งนี้ได้มีการถ่ายทอดให้กับบริษัทค้านักน้ำเต้าทอง ซึ่งเป็นบริษัทที่ได้เข้าร่วมในโครงการ และนักศึกษาได้มีโอกาสเรียนรู้วิธีการศึกษาวิจัย

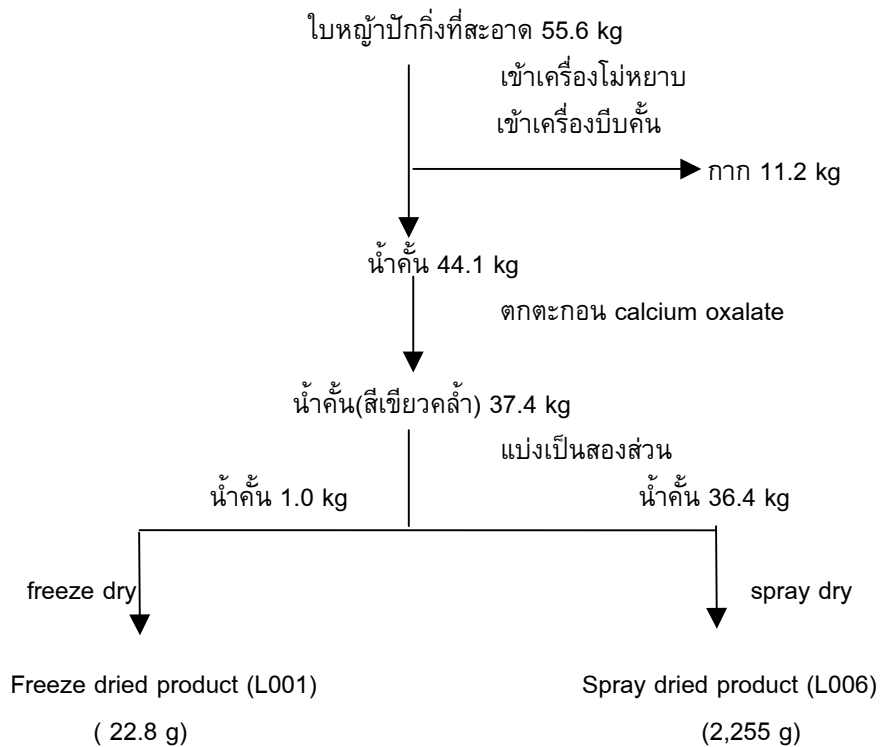
และพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการสร้างรายได้ให้กับตนเองและประเทศชาติ

5. กิตติกรรมประกาศ

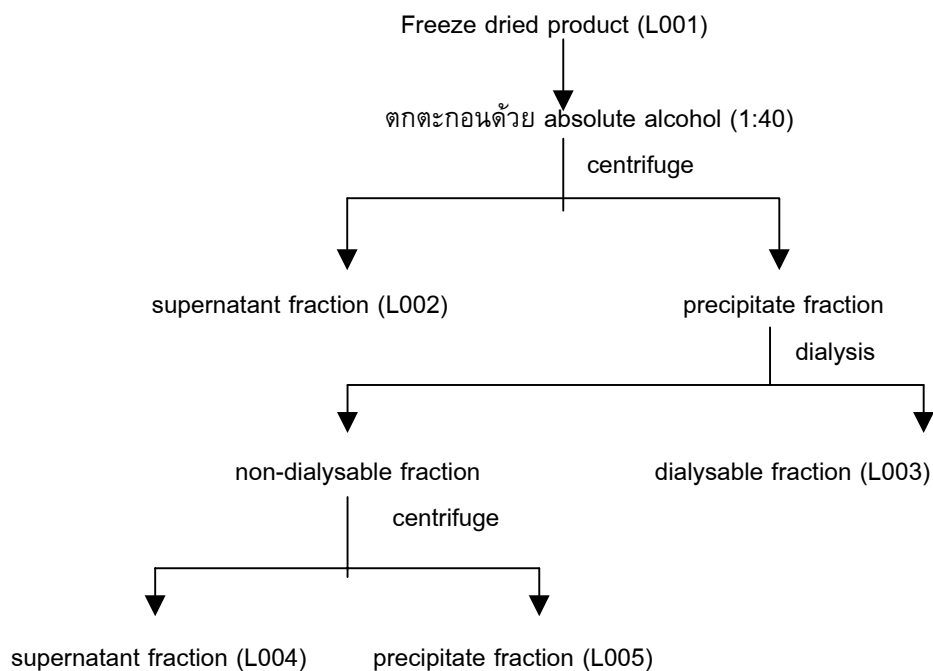
ขอขอบคุณสำนักงานโครงการ IRPUS ภายใต้การสนับสนุนของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้สนับสนุนเงินทุนวิจัย จำนวน 100,000 บาท

6. เอกสารอ้างอิง

- พิมลวรรณ ทัญทุพพิจารณ์. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของหญ้าปักกิ่งในหนูขาว. หนังสือรวบรวมงานวิจัย โครงการพัฒนาการใช้สมุนไพรและยาไทยทางคลินิก 2525 – 36; 197 – 203.
- วีณา จิรจรรย์กุล. การศึกษากลไกประกอบเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองของหญ้าปักกิ่ง. หนังสือรวบรวมงานวิจัย โครงการพัฒนาการใช้สมุนไพรและยาไทยทางคลินิก 2525 – 36; 205 – 25.
- วีณา จิรจรรย์กุล. สารต้านมะเร็งจากหญ้าปักกิ่ง. จุลสารข้อมูลสมุนไพร 2542; 16(3):10 – 3.
- Dubois M, Gilles KA, Kamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 1956; 28: 350-6.
- Farnsworth NR. Biological and phytochemistry screening of plants. J Pharm Sci 1966; 55(3): 260.
- Maino VC, Suni MA, Ruitenber JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. Cytometry 1995; 20: 127-33.
- Mardiney M, Brown MR, Fleisher TA. Measurement of T-cell CD69 expression : a rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. Cytometry 1996; 26: 305-10.
- The United States Pharmacopeia 24 and the National Formulary 19. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, INC, 2000.



แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดในรูปผงแห้งจากกล้วยปากกิ่งสด



แผนภูมิที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดลำดับส่วนจาก L001