

# ฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณฟีนอลิกรวม และรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย

## Biological activities, total phenolic compound and TLC fingerprint of *Eclipta prostrata* (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski and *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

นิสราตน์ สังคะรัมย์<sup>1</sup>, บรรลือ สังข์ทอง<sup>2</sup>, รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์<sup>2\*</sup>

Nisarath Sangkaram<sup>1</sup>, Bunleo Sangthog<sup>2</sup>, Ruchilak Rattarm<sup>2\*</sup>

Received: 9 June 2021 ; Revised: 2 July 2021 ; Accepted: 11 August 2021

### บทคัดย่อ

กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน อาจเกิดความเข้าใจผิด นำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้องได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดน้ำและ ethanol ของพืชทั้งสาม ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ด้วยวิธี broth dilution method ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีด้วยวิธี TLC ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดของพืชทั้งสามมีฤทธิ์ต้านเชื้อค่อนข้างต่ำ สารสกัด ethanol ยับยั้งการสร้าง nitric oxide ดีกว่าสารสกัดน้ำและยามาตรฐาน diclofenac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า  $IC_{50}$   $33.43 \pm 4.76$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด ethanol กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) มีค่า  $IC_{50}$   $43.48 \pm 1.00$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณฟีนอลิกรวม  $55.46 \pm 7.18$  มิลลิกรัม GAE ต่อสารสกัด 1 กรัม พืชทั้ง 3 ชนิดมีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีความแตกต่างกันทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพและเอกลักษณ์ทางเคมี

**คำสำคัญ:** กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ กระดุมทองเลื้อย ฤทธิ์ทางชีวภาพ ปริมาณฟีนอลิกรวม รอยพิมพ์โครมาโตกราฟี

### Abstract

*Eclipta prostrata* (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski and *S. trilobata* (L.) Pruski are the member of Asteraceae family. Similar characteristics may be misleading and misused. This study aimed to compare biological activities of ethanolic and water extracts of these plants. Antibacterial activity was assessed using broth dilution method for MIC and MBC determination, anti-inflammatory activity using lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells, antioxidant activity using DPPH radical scavenging assay, total phenolic contents using Folin-Ciocalteu reagent and chemical constituents were investigated by TLC their fingerprint. All the tested extracts exhibited low antibacterial effects against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and MRSA. The ethanolic extracts showed significantly stronger inhibition on nitric oxide production than did water extracts and the standard anti-inflammatory medicine, diclofenac. Among them, *S. trilobata* had greatest inhibitory activity with  $IC_{50}$   $33.43 \pm 4.76$   $\mu$ g/ml. The ethanolic extracts of *S. calendulacea* showed the highest antioxidant activity and phenolic content with  $IC_{50}$  of  $43.48 \pm 1.00$   $\mu$ g/ml and  $55.46 \pm 7.18$  mg GAE/g crude extract, respectively. TLC fingerprint of the ethanolic extracts of these three

<sup>1</sup> นิสิตปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

<sup>1</sup> Master degree student, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham Province 44150

<sup>2</sup> Assistant Professor, Pharmaceutical Chemistry and Natural Products Research Unit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham Province 44150

\* Corresponding author: Ruchilak Rattarom, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham Province 44150, rujiluk.r@msu.ac.th

plants were identified. In conclusion, *W. chinensis*, *S. calendulacea* and *S. trilobata* are different as assessed by both their biological activities and their chemical identification by TLC.

**Keywords:** *Eclipta prostrata* (L.) L., *Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski, *S. trilobata* (L.) Pruski, biological activities, total phenolic contents, TLC fingerprint

## บทนำ

กะเม็งเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ทางยา ที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางมี 2 ชนิด คือกะเม็งตัวเมีย (*Eclipta prostrata* (L.) L.) และกะเม็งตัวผู้ (*Sphagneticola calendulacea* (L.) Pruski) ทั้งสองเป็นพืชวงศ์ Asteraceae แยกความแตกต่างของพืชทั้งสองได้ โดยกะเม็งตัวเมียมีกลีบดอกสีขาว ส่วนกะเม็งตัวผู้มีกลีบดอกสีเหลือง อย่างไรก็ตามเมื่อสืบค้นข้อมูลทั้งจากหนังสืออ้างอิง และจากเว็บไซต์ต่างๆ ด้วยชื่อกะเม็งตัวผู้ มักจะพบการแสดงภาพของพืชอีกชนิดคือ กระดุมทองเหลือง (*S. trilobata* (L.) Pruski) วงศ์ Asteraceae เนื่องจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยรูปวิธานจาก Flora of China ระบุความแตกต่างของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ที่รอยหยักขอบใบ คือ กะเม็งตัวผู้มีขอบใบจักกรฟันเลื่อยถี่เล็กน้อย (sparsely serrulate) ส่วนกระดุมทองเหลืองมีขอบใบเว้าเป็น 3 พู (usually 3-lobed) (eFloras, 2008) พืชทั้งสามมีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทย จีน อินเดีย ได้หวัน อินโดนีเซีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ เพื่อรักษาโรคผิวหนัง รักษาแผล รักษาการติดเชื้อ ลดการปวดและอาการบวม (Jahan, *et al.*, 2014 ; Jaisin, 2016 ; Manohar, *et al.*, 2017 ; Shamama, *et al.*, 2017) ในการแพทย์แผนไทย กะเม็งตัวเมียทั้งต้นมีสรรพคุณขับลมให้กระจาย แก้โลหิตอันกระทำให้อ่อน (Prapaspong, *et al.*, 1999) ส่วนกะเม็งตัวผู้มีสรรพคุณแก้ไอ แก้อาเจียนเป็นโลหิต บำรุงโลหิต บำรุงร่างกาย แก้ปวดศีรษะ แก้โรคผิวหนัง แก้ผม่วรง แก้กระเพาะอักเสบ ต้มสมข้าวพอกแก้บวม (Temwiset, *et al.*, 2012) ปัจจุบันในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีการใช้กะเม็งตัวเมียในตำรับยาผสมเพชรสังฆาตสูตรที่ 2 เพื่อบรรเทาอาการริดสีดวงทวารหนัก (National Drug System Development Committee, 2013) และผสมในตำรับยาสมุนไพรครีมกะเม็งเพื่อใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังในโรงพยาบาลคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ แต่ไม่พบการใช้กะเม็งตัวผู้หรือกระดุมทองเหลืองทางยา งานวิจัยก่อนหน้านี้ รายงานผลการสอบถามร้านขายเครื่องยาสมุนไพรทั่วประเทศ จำนวน 25 ร้าน พบว่ามีกะเม็งตัวเมียจำหน่ายทุกร้าน แต่ไม่พบการจำหน่ายกะเม็งตัวผู้ (Sriwisase, *et al.*, 2017) จากชื่อไทยและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเหลือง รวมถึงข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นที่มีแนวโน้มว่าไม่สามารถพบกะเม็งตัวผู้ได้ทั่วไป ประกอบกับการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเหลือง

ในชื่อกะเม็งตัวผู้ อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดโดยนำกระดุมทองเหลืองมาใช้แทนกะเม็งตัวผู้ นำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้อง ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และศึกษา รอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเหลือง ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่สอดคล้องกับการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยน้ำและ ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมยาตามวิธีทางการแพทย์แผนไทยทั้งยาใช้ภายในและภายนอก เช่น ยาต้ม ยาดอง ยาฝน เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลในการพิสูจน์ความแตกต่างระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิด ที่จะนำไปสู่การใช้สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไป

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

### สมุนไพรและสารเคมีที่ใช้

เก็บตัวอย่างส่วนเหนือดินของพืชทั้ง 3 (authentic) กะเม็งตัวเมียเก็บจากหมู่บ้านชิตชล อ.เมือง จ.มหาสารคาม กะเม็งตัวผู้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม และกระดุมทองเหลืองเก็บจากบริเวณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตรวจสอบยืนยันชนิดโดย ผศ.ดร.รุจิลักษณ์ รัตตะระมย์ อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ด้วยการเปรียบเทียบรูปวิธานกับ Flora of China และข้อมูลจากเว็บไซต์อุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลดขนาดด้วยการบดหยาบ ก่อนนำไปสกัด เนื่องจากตัวอย่างกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้สดมีจำนวนน้อย ไม่เพียงพอที่จะทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ได้ จึงนำไปสกัดด้วย ethanol เพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (authentic) ในการเปรียบเทียบรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีเท่านั้น

จัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวเมียจากร้านเวชพงศ์ไอสด แขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร ชื่อเครื่องยากะเม็งตัวผู้ ภายใต้ชื่อภาษาจีนว่า “peng qi ju” (eFloras, 2008) จากร้านขายสมุนไพรเถียนเกิงซำงซีหลิวหลี เมืองเซี่ยเหเหมิน มณฑลฝูเจี้ยน ประเทศจีน นำเครื่องยาสมุนไพร

ทั้ง 2 ชนิดให้นายหอม หะทัยทาระ หมอพื้นบ้านจาก อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ตรวจสอบชนิดของพืชอีกครั้ง จากนั้นนำพืชมาล้างด้วยน้ำสะอาด อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ลดขนาดด้วยการบดหยาบ ก่อนนำไปสกัด

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO) (PanReac Applichem, USA), ceftriaxone (Monotax<sup>®</sup>), dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, USA), lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, USA), griess reagent (Promega, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA), ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Germany), gallic acid (Sigma-Aldrich, USA), Folin-Ciocalteu phenol reagent (Loba chemic, Mumbai), diclofenac (Sigma-Aldrich, Germany), apigenin (Sigma-Aldrich, Germany)

#### การเตรียมสารสกัดพืชสมุนไพร

เตรียมสารสกัดน้ำ โดยการต้ม ชั่งน้ำหนักพืช 50 กรัม เติมน้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มโดยเริ่มจับเวลาเมื่อน้ำเดือดจนครบ 15 นาที กรองและนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Lyophilization เตรียมสารสกัด ethanol โดยการสกัดด้วย soxhlet apparatus ชั่งน้ำหนักพืช 50 กรัม สกัดด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำไปประเหยแห้งต่อบนอ่างน้ำร้อน หาค่าร้อยละปริมาณสารสกัด (% yield) เก็บสารสกัดที่ -20 องศาเซลเซียส ละลายสารสกัดน้ำด้วยน้ำและสารสกัด ethanol ด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกรวม

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ดัดแปลงจาก Uthairung *et al.* (2020)

เชื้อแบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ได้แก่ *S. aureus* สายพันธุ์ DMST 8440 *P. aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853 และ MRSA สายพันธุ์ DMST 20645 เตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 เตรียมสารสกัดน้ำ และ ethanol ของพืชที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 60% DMSO ใน tween 80 เป็นตัวทำละลาย นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นลดลงแบบสองเท่า ลำดับส่วน โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เติมน้ำที่เตรียมไว้ลงในทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดย positive control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับเชื้อ

แบคทีเรีย negative control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไซยาปฏิวินะ ceftriaxone ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียหรือไม่มี ความขุ่น บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC นำหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไป spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ คือไม่มี โคโลนีของเชือบนจานเพาะเลี้ยง บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MBC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้วิธียับยั้งการสร้าง nitric oxide (NO) ดัดแปลงจาก (Makchuchit, *et al.* 2017)

เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96-well plate จำนวน  $2 \times 10^5$  cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin และ 1% streptomycin บ่มในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติมน้ำ LPS ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดลอง ส่วนหลุมควบคุม เติมน้ำ DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเหลือง ที่ความเข้มข้น 2-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดลองและหลุมควบคุม โดยมี 2% DMSO ใน DMEM เป็น solvent control และยา diclofenac เป็น positive control บ่มในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวเหนือตะกอนแต่ละหลุม 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ใหม่ เติมน้ำ Griess reagent (Promega<sup>®</sup>) โดยเติมน้ำ sulfanilamide solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที จากนั้นเติมน้ำ NED solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยเติมน้ำละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน phosphate buffer saline ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใน 96-well plate เติมน้ำที่ มีเซลล์ RAW 264.7 อยู่ บ่มในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดของเหลวเหนือตะกอนออก เติมน้ำ 0.04 M HCl ใน isopropanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก MTT-formazan จากเซลล์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร หากเซลล์รอดชีวิตน้อยกว่าร้อยละ 70 เมื่อเทียบกับ solvent control แสดงว่าสารสกัดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งการสร้าง NO (%)



inhibition) และค่า  $IC_{50}$  โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 9.0

#### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ตัดแปลงจาก Uthairung *et al.* (2020)

เตรียมสารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลี้ยงใน DMSO และสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 1-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plates เติม 0.15 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ใน ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดลอง ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%inhibition) และค่า  $IC_{50}$  โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 9.0 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

#### การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ตัดแปลงจาก Zhang *et al.* (2006)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ethanol สารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลี้ยง ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติมสารละลาย  $Na_2CO_3$  ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติม Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่ม 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid แสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัม gallic acid สมมูลกับน้ำหนักสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g crude extract) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

#### การศึกษารอยพิมพ์โครมาโตกราฟีด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

นำสารสกัดชั้น ethanol ของพืชทั้ง 3 ชนิด และสารมาตรฐาน apigenin ละลายด้วย methanol ให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โหลดสารแต่ละชนิดปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่น TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> ขนาด 6x10 เซนติเมตร โดยใช้เครื่อง Linomat 5 นำแผ่น TLC ใส่ในแทงค์ที่บรรจุตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ระบบ ได้แก่ chloroform: hexane: 95% ethanol (6: 3: 1), petroleum ether: chloroform: methanol (2: 7.5: 0.5) และ chloroform: benzene: 95% ethanol: methanol (5: 3: 1.5: 0.5) ปริมาตร 50 มิลลิตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้ UV cabinet ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกภาพนำไปสเปรย์ด้วย anisaldehyde/ $H_2SO_4$  บันทึกภาพ รายงานผลเป็นค่า  $R_f$

#### สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติพื้นฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล one-way analysis of variance (ANOVA) และถ้าหากข้อมูลมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จะใช้ Scheffe post-hoc test เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

#### ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างพืชในงานวิจัยครั้งนี้ ได้ตัวอย่างกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่เป็น authentic ปริมาณน้อยไม่เพียงพอสำหรับการสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ต่างๆ จึงสกัด authentic ด้วย ethanol เพื่อใช้เปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค TLC เท่านั้น ส่วนสารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต่างๆ ใช้สมุนไพรที่จัดซื้อจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรในการเตรียมสารสกัด กระดุมทองเลี้ยงใช้พืช authentic ในการสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่างๆ รวมถึงการเปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค TLC ผลการสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลี้ยงได้ปริมาณสารสกัดน้ำคิดเป็นร้อยละ 7.21, 6.49 และ 8.38 ตามลำดับ สารสกัด ethanol คิดเป็นร้อยละ 1.44, 2.01 และ 0.77 ตามลำดับ ภาพสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด แสดงใน Figure 1



Figure 1 Whole plant and flowers of *E. prostrata*, *S. calendulacea* and *S. trilobata*

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ MRSA พบว่าทั้งสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้งสาม มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียค่อนข้างต่ำ โดยสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านเชื้อ

*S. aureus* และ *P. aeruginosa* ดีที่สุด ค่า MIC 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ฤทธิ์ต่อเชื้อ MRSA พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA แต่มีเพียงสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อดังกล่าว (Table 1)

**Table 1** Minimum inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of purchased *E. prostrata*, purchased *S. calendulacea* and authentic *S. trilobata* extracts against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and MRSA (mg/mL) (n = 3)

| Samples     | Plant                  | <i>S. aureus</i> |     | <i>P. aeruginosa</i> |      | MRSA |      |
|-------------|------------------------|------------------|-----|----------------------|------|------|------|
|             |                        | MIC              | MBC | MIC                  | MBC  | MIC  | MBC  |
| Water       | <i>E. prostrata</i>    | 12.5             | 25  | 50                   | >100 | 50   | >100 |
|             | <i>S. calendulacea</i> | 12.5             | 25  | 50                   | >100 | 50   | >100 |
|             | <i>S. trilobata</i>    | 50               | 50  | 100                  | 100  | >100 | >100 |
| 95% ethanol | <i>E. prostrata</i>    | 25               | 25  | 50                   | >100 | 100  | 100  |
|             | <i>S. calendulacea</i> | 25               | 25  | 50                   | >100 | 100  | >100 |
|             | <i>S. trilobata</i>    | 25               | 50  | 50                   | 100  | 50   | >100 |
|             | Ceftriaxone            | -                | 10  | -                    | 10   | -    | 10   |

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง NO พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัดน้ำและยา diclofenac ซึ่งเป็น positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกระดุมทองเหลืองมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $33.43 \pm 4.76$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีกว่ากะเม็งตัวผู้และกะเม็งตัวเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดชั้นน้ำของพืชทั้ง 3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้น้อยกว่าร้อยละ 50 และการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ RAW 264.7 ด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดน้ำและสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีเซลล์รอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 90 (Table 2)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า สารสกัด ethanol ของกะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ค่า  $IC_{50}$

เท่ากับ  $43.48 \pm 1.00$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีกว่าสารสกัดน้ำที่มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $91.55 \pm 1.07$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังไม่ดีเท่ากับ ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $3.68 \pm 0.21$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (20.89 มิลลิโมล) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเหลืองที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าร้อยละ 50 (Table 2)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัดทั้งสองของกะเม็งตัวผู้ มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดของพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัด ethanol มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า  $55.46 \pm 7.18$  และ  $39.58 \pm 3.74$  มิลลิกรัม GAE ต่อสารสกัด 1 กรัม ตามลำดับ (Table 2)

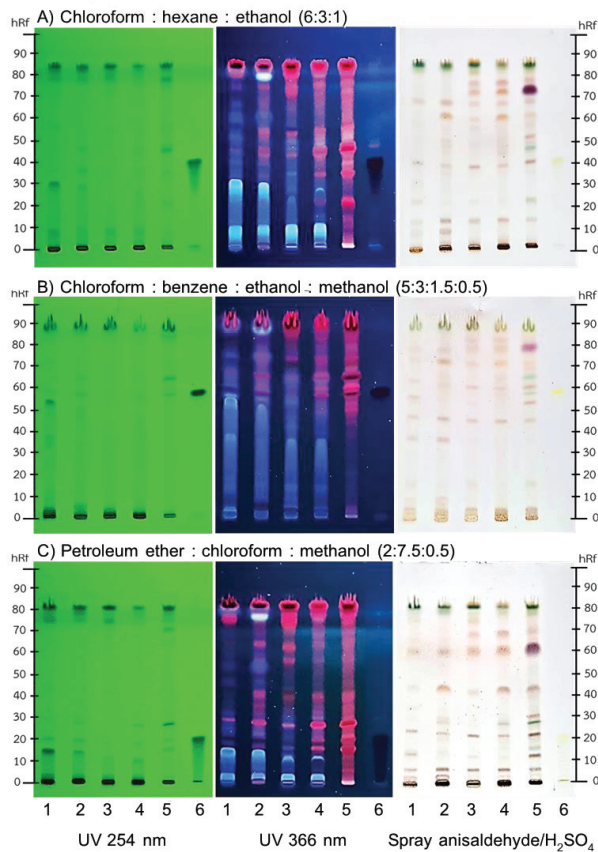
**Table 2** Inhibition of LPS-induced NO production from RAW 264.7 cells and % cell viability in MTT assay, Inhibition of DPPH radical scavenging and total phenolic contents of purchased *E. prostrata*, purchased *S. calendulacea* and authentic *S. trilobata* extracts (n = 3)

| Samples       | Plants                 | Inhibition of NO production |   | MTT assay                    | Inhibition of DPPH radical scavenging |                                      | Total phenolic contents  |
|---------------|------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|               |                        | % inhibition (100 µg/mL)    | IC <sub>50</sub> (µg/mL) [mM]           | % cell viability (100 µg/mL) | % inhibition (100 µg/mL)              | IC <sub>50</sub> (µg/mL) [mM]        | (mg GAE/g crude extract) |
| Water         | <i>E. prostrata</i>    | 9.76±0.45                   | >100                                    | 97.99±1.74                   | 27.41±1.50                            | >100                                 | 22.22±0.72 <sup>d</sup>  |
|               | <i>S. calendulacea</i> | <b>39.95±1.47</b>           | <b>&gt;100</b>                          | <b>96.11±0.30</b>            | <b>51.97±0.53</b>                     | <b>91.55±1.07<sup>c</sup></b>        | 39.58±3.74 <sup>b</sup>  |
|               | <i>S. trilobata</i>    | 5.44±0.80                   | >100                                    | 98.25±4.55                   | 20.45±1.46                            | >100                                 | 12.88±2.58 <sup>d</sup>  |
| 95% ethanol   | <i>E. prostrata</i>    | 75.66±2.66                  | 62.21±2.04 <sup>c</sup>                 | 96.41±1.56                   | 36.31±1.74                            | >100                                 | 25.63±2.34 <sup>c</sup>  |
|               | <i>S. calendulacea</i> | <b>79.83±0.65</b>           | <b>56.64±1.82<sup>c</sup></b>           | <b>99.71±1.07</b>            | <b>86.14±0.29</b>                     | <b>43.48±1.0<sup>b</sup></b>         | 55.46±7.18 <sup>a</sup>  |
|               | <i>S. trilobata</i>    | 98.23±1.45                  | 33.43±4.76 <sup>b</sup>                 | 97.16±1.18                   | 17.07±0.84                            | >100                                 | 15.62±2.51 <sup>d</sup>  |
| Diclofenac    |                        | 66.79±0.97                  | 70.82 ±2.26 <sup>a</sup><br>[239.14 mM] | 103.03±2.91                  | -                                     | -                                    | -                        |
| Ascorbic acid |                        | -                           | -                                       | -                            | -                                     | 3.68±0.21 <sup>a</sup><br>[20.89 mM] | -                        |

Values are expressed as mean ± SD (n = 3), IC<sub>50</sub> of Inhibition of NO production, inhibition of DPPH radical scavenging and total phenolic contents analysis were performed with One-way ANOVA follow by Scheffe Post Hoc multiple comparison test, the different alphabets (<sup>a,b,c,d</sup>) indicate statistical significant ( $p < 0.05$ ), when IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL not included.

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี TLC วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 254 nm, 366 nm และ spray anisaldehyde/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน (Figure 2) โดยกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรมีลักษณะแถบสาร

รอยพิมพ์โครมาโตกราฟีตรงกับสมุนไพร authentic แตกต่างกันเพียงความเข้มของแถบสาร ที่แสดงถึงปริมาณสารที่แตกต่างกัน ระบบตัวทำละลายที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ชัดเจนที่สุดคือ chloroform: hexane: ethanol (6:3:1) โดยมีแถบสารที่แตกต่างกันอย่างน้อย 1 จุด



**Figure 2** TLC fingerprint analysis in three different solvent systems A) chloroform: hexane: ethanol (6:3:1), B) chloroform: benzene: ethanol: methanol (5:3:1.5:0.5) and C) petroleum ether: chloroform: methanol (2:7.5:0.5) and identify by UV 254 nm, UV 366 nm and spray anisaldehyde/ $H_2SO_4$ . The samples are the following: 1 = purchased *E. prostrata*, 2 = authentic *E. prostrata*, 3 = purchased *S. calendulacea*, 4 = authentic *S. calendulacea*, 5 = authentic *S. trilobata*, 6 = apigenin.

## สรุปและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีความแตกต่างกันทั้งเอกลักษณ์ทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง (Karthikumar *et al.*, 2007 ; Nithin *et al.*, 2018 ; Balekar, *et al.*, 2012) และยังเป็นรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA ของกะเม็งตัวเมียเป็นครั้งแรก มีรายงานการแยกและทดสอบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากกะเม็งตัวเมีย ได้แก่ eclalbasaponin เป็นสารกลุ่ม terpenoid glycosides ที่ออกฤทธิ์โดยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดี (Ray *et al.*, 2013) และสาร wedelolactone เป็นสาร

กลุ่ม coumestans มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* (Dalal & Kataria, 2010). ซึ่ง wedelolactone พบได้ในพืชทั้ง 3 ชนิด (Le, *et al.*, 2021 ; Sureshkumar, *et al.*, 2011) จึงอาจเป็นสารบ่งชี้ (marker) ชนิดหนึ่งที่ทำให้พืชทั้ง 3 แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้รายงานการศึกษาของ Rahman & Rashid (2018) ที่แยกส่วนสารสกัด methanol ของกะเม็งตัวเมียนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า fraction ที่มีขั้วสูงจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ได้ดีกว่า fraction ที่มีขั้วน้อยกว่า ซึ่งกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้พบสารกลุ่ม coumestans ที่เป็นสารมีขั้วอีกหลายชนิด จึงอาจช่วยเสริมฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในพืชทั้ง 2 ได้ ผลการศึกษาสอดคล้องกับการใช้พืชทั้ง 3 ชนิดในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาบาดแผลและโรคผิวหนัง รวมถึงประเทศไทยที่มีการนำกะเม็งตัวเมียมาพัฒนาเป็นตำรับยาสมุนไพรครีมกะเม็งเพื่อใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังในโรงพยาบาลในจังหวัดบุรีรัมย์ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกะเม็งตัวเมียในการพัฒนาเป็นยาสมุนไพรที่ใช้รักษาแผลที่มีการติดเชื้อ โดยเฉพาะในผู้ป่วยเบาหวานที่มักเกิดแผลที่เท้าและเสี่ยงต่อการติดเชื้อได้ง่าย โดยมีรายงานว่า การติดเชื้อที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวานในทุกๆ ระดับความรุนแรง มักพบการติดเชื้อ *S. aureus* ร่วมด้วยบ่อยที่สุด และมีแนวโน้มที่จะมี MRSA มากขึ้นเรื่อยๆ (Stapanavatr & Karnjanabatr, 2010) แม้ว่าค่า MBC ในการศึกษาครั้งนี้จะค่อนข้างสูง แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดกะเม็งตัวเมียได้โดยการพัฒนาวิธีการสกัด การพัฒนาระบบนำส่งยาทางผิวหนัง หรือการใช้สมุนไพรกะเม็งตัวเมียร่วมกับสมุนไพรอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA เช่น น้ำมันอบเชย (Caichompoo *et al.*, 2020) ขมิ้นชัน (Supannapan, *et al.*, 2010)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการใช้พืชทั้งสามในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาแผลและลดอาการบวม (Jaisin, 2016 ; Manohar *et al.*, 2017 ; Balekar *et al.*, 2014) และสอดคล้องกับงานวิจัยฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง (Arunachalam *et al.*, 2009 ; Sureshkumar *et al.*, 2010 ; Govindappa *et al.*, 2011) สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของกะเม็งตัวเมีย เช่น orobol, wedelolactone, apigenin, luteolin, hesperetin-7-O- $\beta$ -D-glucoside, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside, (Le *et al.*, 2021), Echinocystic acid (Ryu *et al.*, 2013) เป็นต้น ส่วนกะเม็งตัวผู้พบว่ามีเพียง wedelolactone ที่มีรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Yuan *et al.*, 2013) กระดุมทองเลื้อยมีรายงานสารออกฤทธิ์ ได้แก่ 5,7,4'-trihydroxyflavone, 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl (1-4)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl] oleanolic acid 28-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (Thao *et al.*, 2019) และ (3 $\alpha$ )-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19-oic acid (Xu *et al.*, 2021) จากรายงานจะเห็นว่า มีสาร



ออกฤทธิ์ที่พบเหมือนกันในพืชทั้งสามชนิด ได้แก่ luteolin, apigenin และ wedelolactone ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของพืชทั้งสาม จึงน่าจะมาจากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารหลายชนิด โดยเฉพาะกระดุมทองเลื้อยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ที่โดดเด่นกว่าพืชอีก 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าน่าจะยังมีสารสำคัญอื่นๆ ที่ร่วมออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติม การที่พืชทั้ง 3 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีกว่ายา diclofenac ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) อาจเนื่องมาจากการหลั่ง NO เป็นเพียงกลไกหนึ่งในกระบวนการอักเสบ ยังมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ อาทิเช่น การหลั่งสาร cytokine ต่างๆ ดังนั้นการสรุปว่าสารสกัดพืชใดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีหรือไม่ จำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบที่หลากหลายเพื่อยืนยันผลต่อไป เช่น ฤทธิ์ยับยั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) และ interleukin (IL-1 $\beta$ , IL-6 และ IL-10) เป็นต้น รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการพัฒนาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไปใช้เพื่อรักษาหรือบรรเทาอาการที่มีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่าการสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อย (Karthikumar *et al.*, 2007 ; Govindappa *et al.*, 2011) ในขณะที่กะเม็งตัวผู้ที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ดี (Bari *et al.*, 2021) แม้จะยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ethanol และน้ำในพืชทั้งสามมาก่อน แต่ผลการศึกษาค้นนี้ก็สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายออร์แกนิกในการสกัดน่าจะให้ได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยในพืชอื่นๆ ที่รายงานว่าการสกัด ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าการสกัดน้ำ (Dhanani *et al.*, 2017 ; Sepahpour *et al.*, 2018) เนื่องจากสารกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยกว่าน้ำ ได้ดีกว่าในน้ำ (Sepahpour *et al.*, 2018) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมในการศึกษานี้ ที่พบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ระบุว่าสารสกัดที่มี total polyphenolic สูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกันโดยมีความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง (Aryal *et al.*, 2019)

เทคนิค TLC ให้รอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่สามารถแยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ โดยแถบสารของสารสกัด authentic กะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ แตกต่างจากเครื่อง

ยาที่ซื้อจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรเล็กน้อย อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารบางชนิดที่เกิดจากการเก็บรักษาเครื่องยาไว้ หรือเกิดจากความแตกต่างของแหล่งที่มาของวัตถุดิบพืชทั้ง 2 ที่ทำให้มีองค์ประกอบของสารบางชนิดแตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของพืชทั้ง 3 ชนิด ปรากฏแถบสารที่มีสีและค่า R<sub>F</sub> ตรงกันหลายจุด ซึ่งอาจหมายถึงการมีสารชนิดเดียวกันเนื่องจากพืชทั้ง 3 อยู่ในวงศ์ Asteraceae เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะกะเม็งตัวผู้และกระดุมทองเลื้อย ที่แถบสารหลัง spray anisaldehyde/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> มีสีและค่า R<sub>F</sub> ตรงกันเกือบทุกจุด เนื่องจากพืชทั้ง 2 อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ สกุล *Sphagneticola* และมีความใกล้ชิดทางอนุกรมวิธานมาก จึงเป็นไปได้ว่านอกจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่มีความใกล้เคียงกันมากแล้ว องค์ประกอบสารเคมีในพืชทั้ง 2 ก็น่าจะใกล้เคียงกันมาก โดยสารที่พบมากในพืชทั้ง 3 ชนิดเป็นสารกลุ่ม terpenoids และ flavonoids (Han *et al.*, 2015 ; Sureshkumar *et al.*, 2011) การใช้ spray anisaldehyde/ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> สามารถตรวจสอบสารกลุ่ม terpenes และ steroids โดย monoterpenes ให้สีฟ้า triterpenes ให้สีม่วง และ steroids ให้สีเทา (Gerlach *et al.*, 2018) ดังนั้นแถบสารสีชมพู-ม่วงที่มีความโดดเด่นในพืชทั้ง 3 โดยเฉพาะในกระดุมทองเลื้อย จึงน่าจะเป็นสารกลุ่ม triterpenes ซึ่งควรมีการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์ทราบชนิดต่อไป การศึกษาค้นนี้ใช้ apigenin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม flavonoids เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ เนื่องจากพบได้ในพืชทั้ง 3 ชนิด (Balekar *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2015 ; Lin *et al.*, 2007) แต่ผลจาก TLC ไม่สามารถระบุแถบสารที่ตรงกับสารมาตรฐาน apigenin อาจเนื่องมาจากมีสารปริมาณน้อยจนไม่ปรากฏเป็นแถบสารที่ชัดเจน หรืออาจเกิดจากมีสารอื่นที่มีค่า R<sub>F</sub> ใกล้เคียงกัน และบดบังแถบสาร apigenin หากต้องการระบุสารบ่งชี้ (marker) apigenin อาจใช้ spray reagent ที่มีความจำเพาะต่อสารกลุ่ม flavonoids เช่น aluminium chloride, antimony (III) chloride เป็นต้น (Ghosh *et al.*, 1987) หรือใช้เทคนิคที่มีความจำเพาะต่อการแยกสารมากขึ้น เช่น เทคนิค HPLC เพื่อ peak สารจะถูกแยกด้วยความละเอียดที่สูงขึ้น และพื้นที่ใต้ peak สามารถบอกถึงปริมาณของสารได้ นอกจากนี้ อาจมีการใช้สารมาตรฐาน apigenin, luteolin หรือ wedelolactone ซึ่งพบในพืชทั้ง 3 ชนิดในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ผลการศึกษาเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด สรุปได้ว่า กะเม็งตัวเมียมีความโดดเด่นเรื่องการต้านเชื้อโดยเฉพาะ MRSA และต้านการอักเสบ เหมาะสมต่อการใช้ในปัจจุบันที่ผสมในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับโรคผิวหนัง กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูง



มีงานวิจัยที่แสดงฤทธิ์ที่หลากหลายสามารถพัฒนาต่อยอด เป็นเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ที่สำคัญคือการขยายพันธุ์เนื่องจาก ไม่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและไม่มีจำหน่ายในร้านขายสมุนไพรในประเทศไทย เช่นเดียวกับกระดุมทองเลื้อย ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่โดดเด่น และมีรายงานฤทธิ์อื่นๆ หลายรายงาน จึงเหมาะจะศึกษาและต่อยอดการพัฒนาเป็น ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นพืชที่พบได้ทั่วไป ปลูกและขยายพันธุ์ ได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากะเม็งตัว ผู้และกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้น หากเกิดความเข้าใจผิดจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันและการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยใน สื่อโซเชียลมีเดียในสื่อต่างๆ อย่างไม่ถูกต้อง และเกิดการนำพืช มาใช้ไม่ถูกต้อง ก็อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพร ทั้ง 2 ต้นได้

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ สำหรับนิสิตบัณฑิตยศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาของคณะเภสัชศาสตร์ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

### เอกสารอ้างอิง

- Arunachalam, G., Subramanian, N., Pazhani, G.P. and Ravichadran, V. (2009). Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3 (3), 97-100.
- Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R. and Koirala, N. (2019). Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants (Basel)*, 8 (4), 96.
- Balekar, N., Nakpheng, T., Katkam, N.G. and Srichana, T. (2012). Wound healing activity of entkaura-9 (11), 16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine*, 19 (13), 1178-1184.
- Balekar, N., Nakpheng, T., Katkam, N.G. and Srichana, T. (2014). *Wedelia trilobata* L.: A phytochemical and pharmacological review. *Chiang Mai Journal of Science*, 41 (3), 590-605.
- Caichompoo, W., Uamnuch, P., Sangsawee, K. and Lertsatitthanakorn, P. (2020). Development of beads containing anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* essential oils. *Journal of Science and Technology*, 1 (1), 24-34.
- Dalal, S. & Kataria, S.A. (2010). Phytochemical screening of ethanolic extract and antibacterial activity of *Eclipta prostrata*. *Asian Journal of Chemistry*, 22 (9), 7336-7342.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N.A. and Kumar, S. (2017). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (1), S1193-S1199.
- eFloras. (2008). *Flora of China*. [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=2&taxon\\_id=130944](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=130944)
- Gerlach, A.L., Gadea, A., Silveira, R.M., Clerc, P. and Devehat, F.L. (2018). *The Use of anisaldehyde sulfuric acid as an alternative spray reagent in TLC analysis reveals three classes of compounds in the genus Usnea Adans. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota)*. doi: 10.20944/preprints201802.0151.v1
- Ghosh, P., Sil, P. and Thakur, S. (1987). Spray reagent for the detection of coumarins and flavonoids on thin-layer plates. *Journal of Chromatography A*, 403, 285-287.
- Govindappa, M., Naga, S.S., Poojashri, M.N., Sadananda, T.S. and Chandrappa, C.P. (2011). Antimicrobial, antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3, 43-51.
- Han, L., Liu, E., Kojo A., Zhao, J., Li, W., Zhang, Y., Wang, T., and Gao, X. (2015). Qualitative and quantitative analysis of *Eclipta prostrata* L. by LC/MS. *The Scientific World Journal*. doi.org/10.1155/2015/980890
- Jahan, R., Al-Nahain, A., Majumder, S. and Rahmatullah, M. (2014). Ethnopharmacological significance of *Eclipta alba* (L.) Hassk. (Asteraceae), *International Scholarly Research Notices*. Doi: 10.1155/2014/385969
- Jaisin, Y. (2016). Ka-meng– A Review. *Thai Journal of Pharmacology*, 38 (2), 30-47. (In Thai)
- Karthikumar, S., Vigneswari, K. and Jegatheesan, K. (2007). Screening of antibacterial and antioxidant activities of leaves of *Eclipta prostrata* (L.). *Scientific Research and Essays*. 2 (4), 101-104.

- Le, D.D., Nguyen, D.H., Ma, E.S., Lee, J.H., Min, B.S., Choi, J.S. and Woo, M.H. (2021). PTP1B inhibitory and anti-inflammatory properties of constituents from *Eclipta prostrata* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 44 (3), 298-304.
- Lin, F.M., Chen, L.R., Lin, E.H., Ke, F.C., Chen, H.Y., Tsai, M.J. and Hsiao, P.W. (2007). Compounds from *Wedelia chinensis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 28 (12), 2521-2529.
- Makchuchit, S., Rattarom, R. and Itharat, A. (2017). The anti-allergic and anti-inflammatory effects of Benjakul extract (a Thai traditional medicine), its constituent plants and its some pure constituents using in vitro experiments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 1018–1026.
- Manohar, R.N, Padmaja, V., Kumar, P.S.S., Selvin, C.D.S. and Ancy, P. (2017). Comparing the pharmacological activities of *Sphagneticola calendulaceae* and *Sphagneticola trilobata* an over view. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (11), 457-467.
- National Drug System Development Committee. (2013). *National list of essential medicines (List of herbal medicine products)*. [https://data.go.th/dataset/0b502303-cf3e-4f0d-94d8-be84d741043b/resource/370aa664-3e9f-4015-8061-ff9f7080e95b/download/herbal\\_book\\_56.pdf](https://data.go.th/dataset/0b502303-cf3e-4f0d-94d8-be84d741043b/resource/370aa664-3e9f-4015-8061-ff9f7080e95b/download/herbal_book_56.pdf)
- Nithin, R., Padmaja, V., Shaji, S., Shiji, S. and Ancy, P. (2018). Comparative study on antimicrobial activity of *Wedelia chinensis* and *Wedelia calendulaceae*. *International Research Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, 1 (3), 49-51.
- Prapaspong, B., Suwannapokin, S. and Chaiyaklang, U., editors (1999). *Phathayasastra sangkhraha: Thai traditional Medicine*. Bangkok: Kurusapa Business Organization. (in Thai)
- Rahman, M.S. & Rashid, M. (2008). Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Eclipta prostrata*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 8, 47-52.
- Ray, A., Bharali, P. and Konwar, B.K. (2013). Mode of antibacterial activity of eclalbasaponin isolated from *Eclipta alba*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 2003–2019.
- Ryu, S., Shin, J.S., Jung, J.Y., Cho, Y.W., Kim, S.J., Jang, D. and Lee, K. (2013). Echinocystic acid isolated from *Eclipta prostrata* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, TNF-alpha, and IL-6 expressions via NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Planta Medica*, 79 (12), 1031-1037.
- Sepahpour, S., Selamat, J., Abdul Manap, M.Y., Khatib, A. and Abdull Razis, A.F. (2018) Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules*, 23 (2), 402. doi.org/10.3390/molecules23020402
- Shamama, B., Avijit, M. and Saumya, D. (2017). *Wedelia chinensis* (Asteraceae)-An overview of a potent medicinal herb. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (6), 488-496.
- Sriwisase, W., Tesarin, E. and Pharueang, W. (2017). Plant identification, antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Eclipta prostrata* (L.) L., *Wedelia chinensis* Merr. and *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc [Independent study]. Maha Sarakham University. (in Thai)
- Stapanavatr, W. and Karnjanabatr, B. (2010). Bacteriology and antibiotics usage in patients with diabetic foot infection. *Vajira Medical Journal*, 54 (2), 199-208.
- Supannapan, P., Vuthiphandchai V. and Nimrat, S. (2010). Efficiency of some commercial herb extracts and fresh herb extracts on inhibition of *Staphylococcus aureus* growth. *Thai Journal of Toxicology*, 25 (1), 15-28.
- Sureshkumar, S., Sivakumar, T., Chandrasekar, M. and Suresh, B. (2010). Investigating the anti-inflammatory and analgesic activity of leaves of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr. in standard experimental animal models. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (2), 123-129.
- Sureshkumar, S., Senthilkumar, K.M., Rajesh, V. and Thenmozhi, S. (2011). Estimation of Wedelolactone content in *Wedelia* species by HPTLC technique. *Journal of Pharmacy Research*, 4 (1), 193-194.
- Temwiset, P., Thanasilangkul, B. and Chimpae, T. (2012). *Thai medicinal plant properties*, Vol.1. Nontha Buri: Department of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. (in Thai).

- Thao, N.P., Binh, P.T., Luyen, N.T., Cong, N.D., Dang, N.H. and Dat, N.T. (2019). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of constituents from *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Vietnam Journal of Chemistry*, 57 (1), 121-127.
- Uthairung, A., Rattarom, R. and Mekjaruskul, K. (2020). Cosmeceutical applications of essential oils of *Amomum biflorum* Jack from whole plant and rhizome. *Thai Journal of Science and Technology*, 9 (5), 680-692.
- Xu, J., Wang, Z., Sun, L., Wang Y., Wang, Yi. and He, X. (2021). (3 $\alpha$ )-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from *Wedelia trilobata* L., exerts an anti-inflammatory effect via the modulation of NF- $\kappa$ B, MAPK and mTOR pathway and autophagy in LPS-stimulated macrophages. *Toxicology in Vitro*, 73. doi: 10.1016/j.tiv.2021.105139
- Yuan, F., Chen, J., Sun, P-p., Guan, S. and Xu, J. (2013). Wedelolactone inhibits LPS-induced pro-inflammation via NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Biomedical Science*, 20 (1), 84. doi: 10.1186/1423-0127-20-84
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A. Dennis, D.A. and Barrow, C.J. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18 (3), 445-450.