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

นิศารัตน์ สังคะรัมย์[1], บรรลือ สังข์ทอง[2], รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์[2*]
Nisarat Sangkaram[1], Bunleo Sangthog[2], Ruchilak Rattarm[2*]

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

บทคัดย่อ

กะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน อาจเกิดความเข้าใจผิด นำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้นได้ 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±4.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัด ethanol กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) มีค่า IC_{50} 43.48±1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณฟีนอลิกรวม 55.46±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±4.76 µg/ml. The ethanolic extracts of *S. calendulacea* showed the highest antioxidant activity and phenolic content with IC_{50} of 43.48±1.00 µg/ml and 55.46±7.18 mg GAE/g crude extract, respectively. TLC fingerprint of the ethanolic extracts of these three

[1] นิสิตปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์, หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

[1] Master degree student, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Maha Sarakham Province 44150
[2] 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 อย่างไรก็ตาม เมื่อสืบค้นข้อมูลทั้งจากหนังสืออ้างอิง และจากเว็บไซต์ต่างๆ ด้วยชื่อกะเม็งตัวผู้ มักจะพบการแสดงภาพของพืชอีกชนิด คือ กระดุมทองเลื้อย (*S. trilobata (*L.) Pruski) วงศ์ Asteraceae เนื่องจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันมาก โดยรูปวิธานจาก Flora of China ระบุความแตกต่างของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ที่รอยหยักขอบใบ คือ กะเม็งตัวผู้มีขอบใบจักรฟันเลื่อยถี่เล็กน้อย (sparsely serrulate) ส่วนกระดุมทองเลื้อยมีขอบใบเว้าเป็น 3 พู (usually 3-lobed) (eFloras, 2008) พืชทั้งสามมีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทย จีน อินเดีย ไต้หวัน อินโดนีเซีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ เพื่อรักษาโรคผิวหนัง รักษาแผล รักษาการติดเชื้อ ลดการปวดและอาการบวม (Jahan, *et al.,* 2014 ; Jaisin, 2016 ; Manohar, *et al.,* 2017 ; Shamama, *et al.,* 2017) ในการแพทย์แผนไทย กะเม็งตัวเมียทั้งต้นมีสรรพคุณขับลมให้กระจาย แก้โลหิตอันกระทำให้ร้อน (Prapaspong, *et al.,* 1999) ส่วนกะเม็งตัวผู้มีสรรพคุณแก้ไอ แก้อาเจียนเป็นโลหิต บำรุงโลหิต บำรุงร่างกาย แก้ปวดศีรษะ แก้โรคผิวหนัง แก้ผมร่วง แก้กระเพาะอักเสบ ตำผสมข้าวพอกแก้บวม (Temwiset, *et al.,* 2012) ปัจจุบันในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีการใช้กะเม็งตัวเมียในตำรับยาผสมเพชรสังฆาตสูตรที่ 2 เพื่อบรรเทาอาการริดสีดวงทวารหนัก (National Drug System Development Committee, 2013) และผสมในตำรับยาสมุนไพรครีมกะเม็งเพื่อใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังในโรงพยาบาลคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ แต่ไม่พบการใช้กะเม็งตัวผู้หรือกระดุมทองเลื้อยทางยา งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานผลการสอบถามร้านขายเครื่องยาสมุนไพรทั่วประเทศจำนวน 25 ร้าน พบว่ามีกะเม็งตัวเมียจำหน่ายทุกร้าน แต่ไม่พบการจำหน่ายกะเม็งตัวผู้ (Sriwisase, *et al.,* 2017) จากชื่อไทยและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย รวมถึงข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นที่มีแนวโน้มว่าไม่สามารถพบกะเม็งตัวผู้ได้ทั่วไป ประกอบกับการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยในชื่อกะเม็งตัวผู้ อาจทำให้เกิดความเข้าใจผิดโดยนำกระดุมทองเลื้อยมาใช้แทนกะเม็งตัวผู้ นำไปสู่การใช้สมุนไพรไม่ถูกต้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม และศึกษารอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย ซึ่งเป็นฤทธิ์ที่สอดคล้องกับการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน เปรียบเทียบระหว่างการสกัดด้วยน้ำและ ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมยาตามวิธีทางการแพทย์แผนไทยทั้งยาใช้ภายในและภายนอก เช่น ยาต้ม ยาดอง ยาฝน เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลในการพิสูจน์ความแตกต่างระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิด ที่จะนำไปสู่การใช้สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สมุนไพรและสารเคมีที่ใช้

เก็บตัวอย่างส่วนเหนือดินของพืชทั้ง 3 (authentics) กะเม็งตัวเมียเก็บจากหมู่บ้านชิดชล อ.เมือง จ.มหาสารคาม กะเม็งตัวผู้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากอุทยานธรรมชาติวิทยาสิรีรุกขชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม และกระดุมทองเลื้อยเก็บจากบริเวณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตรวจสอบยืนยันชนิดโดย ผศ.ดร.รุจิลักขณ์ รัตตะรมย์ 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

จัดซื้อเครื่องยากะเม็งตัวเมียจากร้านเวชพงศ์โอสถ แขวงจักรวรรดิ์ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร ซื้อเครื่องยากะเม็งตัวผู้ ภายใต้ชื่อภาษาจีนว่า “peng qi ju” (eFloras, 2008) จากร้านขายสมุนไพรเถียนเกิ่งซ้างซีหลิวหลี่ เมืองเซียะเหมิน 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®), 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 เตรียมสารสกัดethanol โดยการสกัดด้วย soxhlet apparatus ชั่งน้ำหนักพืช 50 กรัม สกัดด้วย 95% ethanol เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน จากนั้นนำไประเหยแห้งต่อบนอ่างน้ำร้อน 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 เตรียมเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard No. 0.5 เตรียมสารสกัดน้ำและ ethanol ของพืชที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 60% DMSO ใน tween 80 เป็นตัวทำละลาย นำมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ความเข้มข้นลดลงแบบสองเท่าลำดับส่วน โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เติมเชื้อที่เตรียมไว้ลงในทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดย positive control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับเชื้อแบคทีเรีย negative control ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ยาปฏิชีวนะ ceftriaxone ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวเปรียบเทียบ ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของแบคทีเรียหรือไม่มีความขุ่น บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC นำหลอดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจากการหาค่า MIC ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไป spread ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ คือไม่มีโคโลนีของเชื้อบนจานเพาะเลี้ยง บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MBC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

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

เพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96-well plate จำนวน 2 × 10^6 cells/well ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin และ 1% streptomycin บ่มในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติม LPS ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดลอง ส่วนหลุมควบคุมเติม DMEM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 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_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดของเหลวเหนือตะกอนแต่ละหลุม 50 ไมโครลิตร ใส่ใน 96-well plate ใหม่ เติม Griess reagent (Promega®) โดยเติม sulfanilamide solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที จากนั้นเติม NED solution 50 ไมโครลิตร บ่มในที่มืด 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยเติมสารละลาย MTT 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน phosphate buffer saline ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใน 96-well plate เดิมที่มีเซลล์ RAW 264.7 อยู่ บ่มในตู้บ่ม 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดของเหลวเหนือตะกอนออก เติม 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 ดัดแปลงจาก Uthairung *et al.* (2020)

เตรียมสารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยใน 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 ดัดแปลงจาก Zhang *et al.* (2006)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 25-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน ethanol สารสกัดน้ำและ ethanol ของกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย 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 แสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัม 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_{254} 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 มิลลิลิตร จากนั้นนำแผ่น TLC ไปส่องภายใต้ UV cabinet ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร บันทึกภาพ นำไปสเปรย์ด้วย anisaldehyde/H_2SO_4 บันทึกภาพ รายงานผลเป็นค่า hRf

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± 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 กระดุมทองเลื้อยใช้พืช authentic ในการสกัดเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่างๆ รวมถึงการเปรียบเทียบเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยเทคนิค TLC ผลการสกัดกะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อยได้ปริมาณสารสกัดน้ำคิดเป็นร้อยละ 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 พบว่าสารสกัดส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ 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	*S. aureus*		*P. aeruginosa*		MRSA	
		MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	MIC	MBC
Water	***E. prostrata***	12.5	25	50	>100	50	>100
	S. calendulacea	12.5	25	50	>100	50	>100
	S. trilobata	50	50	100	100	>100	>100
95% ethanol	***E. prostrata***	25	25	50	>100	100	100
	S. calendulacea	25	25	50	>100	100	>100
	S. trilobata	25	50	50	100	50	>100
	Ceftriaxone	**-**	**10**	**-**	**10**	**-**	**10**

การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการสร้าง NO พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชทั้ง 3 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีกว่าสารสกัดน้ำและยา diclofenac ซึ่งเป็น positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.43±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±1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีกว่าสารสกัดน้ำที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 91.55±1.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังต่ำกว่า ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.68±0.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (20.89 มิลลิโมล) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนสารสกัดกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อยที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าร้อยละ 50 (Table 2)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay พบว่าสารสกัด ethanol ของพืชแต่ละชนิดมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำ สารสกัดทั้งสองของกะเม็งตัวผู้มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดของพืชอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสารสกัด ethanol มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากกว่าสารสกัดน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า 55.46±7.18 และ 39.58±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_{50} (µg/mL) [mM]	% cell viability (100 µg/mL)	% inhibition (100 µg/mL)	IC_{50} (µg/mL) [mM]	(mg GAE/g crude extract)
Water	***E. prostrata***	9.76±0.45	>100	97.99±1.74	27.41±1.50	>100	22.22±0.72^{d}
	S. calendulacea	**39.95±1.47**	**>100**	**96.11±0.30**	**51.97±0.53**	**91.55±1.0**^{7}c	39.58±3.74^{b}
	S. trilobata	5.44±0.80	>100	98.25±4.55	20.45±1.46	>100	12.88±2.58^{d}
95% ethanol	***E. prostrata***	75.66±2.66	62.21±2.04^{c}	96.41±1.56	36.31±1.74	>100	25.63±2.34^{c}
	S. calendulacea	**79.83±0.65**	**56.64±1.82**^{c}	**99.71±1.07**	**86.14±0.29**	**43.48±1.0**^{0}b	55.46±7.18^{a}
	S. trilobata	98.23±1.45	33.43±4.76^{b}	97.16±1.18	17.07±0.84	>100	15.62±2.51^{d}
Diclofenac		66.79±0.97	70.82 ±2.26^{a} [239.14 mM]	103.03±2.91	-	-	-
Ascorbic acid		-	-	-	-	3.68±0.21^{a} [20.89 mM]	-

Values are expressed as mean ± SD (n = 3), IC_{50} 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 (^{a,b,c,d}) indicate statistical significant (p<0.05), when IC_{50}>100 µg/mL not included.

การศึกษาเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธี TLC วิเคราะห์ผลที่ความยาวคลื่น 254 nm, 366 nm และ spray anisaldehyde/H_2SO_4 พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีที่แตกต่างกัน (Figure 2) โดยกะเม็งตัวเมียและกะเม็งตัวผู้ที่จัดซื้อจากร้านขายเครื่องยาสมุนไพรมีลักษณะแถบสารรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีตรงกับสมุนไพร authentic แตกต่างกันเพียงความเข้มของแถบสาร ที่แสดงถึงปริมาณสารที่แตกต่างกัน ระบบตัวทำละลายที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ชัดเจนที่สุดคือ chloroform: hexane: ethanol (6:3:1) โดยมีแถบสารที่แตกต่างกันอย่างน้อย 1 จุด

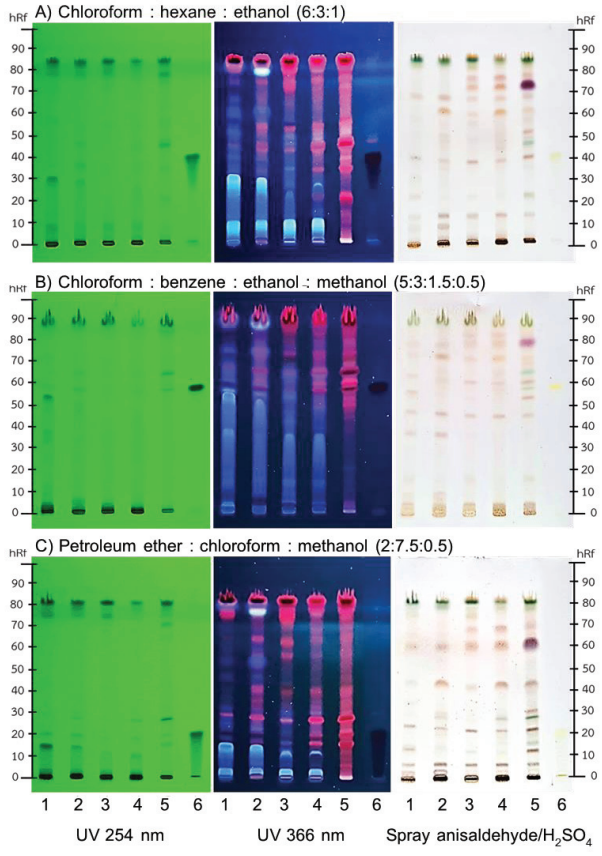

Figure 2 TLC fingerprint analysis in three different solvent systems A) chloroform: hexane: ethanol (6:3:1), B) chloroform: benzene: ethanol: methanol (5:3:1.5:0.5) and C) petroleum ether: chloroform: methanol (2:7.5:0.5) and identify by UV 254 nm, UV 366 nm and spray anisaldehyde/H_2SO_4. The samples 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 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่ากะเม็งตัวเมีย กะเม็งตัวผู้ และกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพอย่างกว้างขวาง (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 เป็นสารกลุ่ม 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 โดยมีรายงานว่าการติดเชื้อที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวานในทุกระดับความรุนแรง มักพบการติดเชื้อ *S. aureus* ร่วมด้วยบ่อยที่สุด และมีแนวโน้มที่จะมี MRSA มากขึ้นเรื่อยๆ (Stapanavatr & Karnjanabatr, 2010) แม้ว่าค่า MBC ในการศึกษาครั้งนี้จะค่อนข้างสูง แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดกะเม็งตัวเมียได้โดยการพัฒนาวิธีการสกัด การพัฒนาระบบนำส่งยาทางผิวหนัง หรือการใช้สมุนไพรกะเม็งตัวเมียร่วมกับสมุนไพรอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA เช่น น้ำมันอบเชย (Caichompoo *et al*., 2020) ขมิ้นชัน (Supannapan, *et al*., 2010)

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบเป็นไปในทิศทางเดียวกับการใช้พืชทั้งสามในการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาแผลและลดอาการบวม (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-β-D-glucoside, quercetin-3-O-β-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-[β-D-glucopyranosyl (1-4)-β-D-glucoronopyranosyl] oleanolic acid 28-O-β-D-glucopyranosyl ester (Thao *et al.,* 2019) และ (3α)-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19-oic acid (Xu *et al.,* 2021) จากรายงานจะเห็นว่ามีสาร

ออกฤทธิ์ที่พบเหมือนกันในพืชทั้งสามชนิด ได้แก่ luteolin, apigenin และ wedelolactone ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ของพืชทั้งสาม จึงน่าจะมาจากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารหลายชนิด โดยเฉพาะกระดุมทองเลื้อยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ที่โดดเด่นกว่าพืชอีก 2 ชนิด แสดงให้เห็นว่าน่าจะยังมีสารสำคัญอื่นๆ ที่ร่วมออกฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ควรศึกษาวิจัยเพิ่มเติม การที่พืชทั้ง 3 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ได้ดีกว่ายา diclofenac ซึ่งเป็นยากลุ่ม nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) อาจเนื่องมาจากการหลั่ง NO เป็นเพียงกลไกหนึ่งในกระบวนการอักเสบ ยังมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ อาทิเช่น การหลั่งสาร cytokine ต่างๆ ดังนั้นการสรุปว่าสารสกัดพืชใดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีหรือไม่ จำเป็นต้องใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบที่หลากหลายเพื่อยืนยันผลต่อไป เช่น ฤทธิ์ยับยั้งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้แก่ prostaglandin E2 (PGE_2), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) และ interleukin (IL-1β, IL-6 และ IL-10) เป็นต้น รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการพัฒนาสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไปใช้เพื่อรักษาหรือบรรเทาอาการที่มีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่าสารสกัดน้ำของกะเม็งตัวเมียและกระดุมทองเลื้อย มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อย (Karthikumar *et al.,* 2007 ; Govindappa *et al.,* 2011) ในขณะที่กระเม็งตัวผู้ที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ดี (Bari *et al.,* 2021) แม้จะยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ethanol และน้ำในพืชทั้งสามมาก่อน แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ก็สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายออร์แกนิคในการสกัดน่าจะทำให้ได้สารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยในพืชอื่นๆ ที่รายงานว่าสารสกัด ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดน้ำ (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 แตกต่างจากเครื่องยาที่ซื้อจากร้านจำหน่ายเครื่องยาสมุนไพรเล็กน้อย อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารบางชนิดที่เกิดจากการเก็บรักษาเครื่องยาไว้ หรือเกิดจากความแตกต่างของแหล่งที่มาของวัตถุดิบพืชทั้ง 2 ที่ทำให้มีองค์ประกอบของสารบางชนิดแตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีของพืชทั้ง 3 ชนิด ปรากฏแถบสารที่มีสีและค่า hR_f ตรงกันหลายจุด ซึ่งอาจหมายถึงการมีสารชนิดเดียวกันเนื่องจากพืชทั้ง 3 อยู่ในวงศ์ Asteraceae เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะกะเม็งตัวผู้และกระดุมทองเลื้อย ที่แถบสารหลัง spray anisaldehyde/ H_2SO_4 มีสีและค่า hR_f 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_2SO_4 สามารถตรวจสอบสารกลุ่ม terpenes และ steroids โดย monoterpenes ให้สีฟ้า triterpenes ให้สีม่วง และ steroids ให้สีเทา (Gerlach *et al*, 2018) ดังนั้นแถบสารสีชมพู-ม่วงที่มีความโดดเด่นในพืชทั้ง 3 โดยเฉพาะในกระดุมทองเลื้อย จึงน่าจะเป็นสารกลุ่ม triterpenes ซึ่งควรมีการแยกสารบริสุทธิ์และพิสูจน์ทราบชนิดต่อไป การศึกษาครั้งนี้ใช้ 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 hR_f 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 นอกจากนี้อาจมีการใช้สารมาตรฐาน apigenin, luteolin หรือ wedelolactone ซึ่งพบในพืชทั้ง 3 ชนิดในการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพและรอยพิมพ์โครมาโตกราฟีเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ผลการศึกษาเปรียบเทียบสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด สรุปได้ว่า กะเม็งตัวเมียมีความโดดเด่นเรื่องการต้านเชื้อโดยเฉพาะ MRSA และต้านการอักเสบ เหมาะสมต่อการใช้ในปัจจุบันที่ผสมในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับโรคผิวหนัง กะเม็งตัวผู้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมสูง

มีงานวิจัยที่แสดงฤทธิ์ที่หลากหลายสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ที่สำคัญคือการขยายพันธุ์เนื่องจากไม่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและไม่มีจำหน่ายในร้านขายสมุนไพรในประเทศไทย เช่นเดียวกับกระดุมทองเลื้อยที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่โดดเด่น และมีรายงานฤทธิ์อื่นๆ หลายรายงาน จึงเหมาะจะศึกษาและต่อยอดการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเป็นพืชที่พบได้ทั่วไป ปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากะเม็งตัวผู้และกระดุมทองเลื้อยมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากเกิดความเข้าใจผิดจากลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใกล้เคียงกันและการเผยแพร่ข้อมูลรูปภาพกระดุมทองเลื้อยในชื่อกะเม็งตัวผู้ในสื่อต่างๆ อย่างไม่ถูกต้อง และเกิดการนำพืชมาใช้ไม่ถูกต้น ก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้สมุนไพรทั้ง 2 ต้นได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษาของคณะเภสัชศาสตร์ ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

Arunachalam, G., Subramanian, N., Pazhani, G.P. and Ravichadran, V. (2009). Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L. (Astearaceae). *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

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). Compareing 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

Nithin, R., Padmaja, V., Shaji, S., Shiji, S. and Ancy, P. (2018). Comparative study on antimicrobial activity of *Wedelia chinesis* 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 2 6 4.7 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). (3α)-3-(tiglinoyloxy)-ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from *Wedelia trilobata* L., exerts an anti-inflammatory effect via the modulation of NF-$\varkappa$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.