

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของสารสกัดว่านม้าเหลือง

ณิชารีย์ ใจคำวัง^{*§}, ภัฏญารัตน์ ผึ้งบรรหาร[†], ธนัญชัย จวบประสพ[‡], วชิราภรณ์ เขียวมั่ง[§],

จงรัก ดวงทอง^{*}

^{*}สาขาวิชาสาธารณสุขศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ตำบลป่าเซ่า อำเภอเมืองอุดรดิตถ์ จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

[†]สาขาวิชาพยาบาลศาสตร์ คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ตำบลป่าเซ่า อำเภอเมืองอุดรดิตถ์ จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

[‡]โรงพยาบาลค่ายพิชัยดาบหัก ตำบลท่าเสา อำเภอเมืองอุดรดิตถ์ จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

[§]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ ตำบลป่าเซ่า อำเภอเมืองอุดรดิตถ์ จังหวัดอุดรดิตถ์ 53000

§ ผู้รับผิดชอบบทความ: jkwnicharee@uru.ac.th

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ว่านม้าเหลือง (*Curcuma* sp.) อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นสมุนไพรพื้นบ้านมีสรรพคุณช่วยแก้อาการปวดเมื่อย เคล็ดขัดยอก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดว่านม้าเหลือง

วิธีการศึกษา: นำสมุนไพรว่านม้าเหลือง จากตำบลสูงตะเภา จังหวัดอุดรดิตถ์ มาสกัดด้วยเทคนิคการหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และการสกัดด้วยน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดว่านม้าเหลือง นำสารสกัดว่านม้าเหลืองมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS assay การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบจากกระบวนการเกิด nitric oxide (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ

ผลการศึกษา: การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี LC-MS ของสารสกัดว่านม้าเหลืองด้วยเมทานอล เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (reflux) พบสารที่มีคล้ายกัน คือสาร demethoxycurcumin และ curcumin การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านม้าเหลือง ด้วยเทคนิค DPPH เท่ากับ 0.63 ± 0.03 , 0.76 ± 0.04 และ 1.31 ± 0.20 mg/ml ตามลำดับ และ การทดสอบด้วยเทคนิค ABTS เท่ากับ 169.00 ± 4.32 , 136.55 ± 4.35 และ 70.83 ± 7.07 μ M/g ตามลำดับ ผลการทดสอบสารสกัดว่านม้าเหลืองจากตัวทำละลายเอทานอล ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 μ g/mL เป็นความเข้มข้นที่มีการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 90% และมีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ร้อยละโดยเฉลี่ย 55.30

อภิปรายผล: จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดว่านม้าเหลืองพบสารสำคัญในการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมากที่สุด รองลงมาคือ เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์สารสำคัญทั้ง 3 สารสกัดว่านม้าเหลืองด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบสารที่มีคล้ายกัน คือสาร curcumin และ demethoxycurcumin

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารสกัดว่านม้าเหลืองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ด้านการอักเสบ สามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าว่านม้าเหลืองต่อไป

คำสำคัญ: ว่านม้าเหลือง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

Free Radical Scavenging and Anti-inflammatory Activities of *Wan Ma Lueang* (*Curcuma* sp.) Extracts

Nicharee Jaikhamwang^{*,§}, Kanyarat Phuengbanhan[†], Thananchai Juapprasop[‡],
Wachiraporn Khewman[¶], Jongrak Daungthong^{*}

^{*}Public Health Program, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, Pa Sao Subdistrict, Mueang Uttaradit District, Uttaradit 53000, Thailand.

[†]Nursing Program, Faculty of Nursing, Uttaradit Rajabhat University, Pa Sao Subdistrict, Mueang Uttaradit District, Uttaradit 53000, Thailand.

[‡]Fort Pichai Dab Hak Hospital, Tha Sao Subdistrict, Mueang Uttaradit District, Uttaradit 53000, Thailand.

[¶]Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University, Pa Sao Subdistrict, Mueang Uttaradit District, Uttaradit 53000, Thailand.

[§]**Corresponding author:** jkwnicharee@uru.ac.th

Abstract

Introduction and Objectives: *Wan Ma Lueang* (*Curcuma* sp.) in the Zingiberaceae family is a local Thai herb with properties for relieving body aches and sprains. This study aimed to investigate the free radical scavenging and anti-inflammatory activities of *Wan Ma Lueang* extracts.

Methods: *Wan Ma Lueang* from Khung Taphao subdistrict in Uttaradit province was used for the extraction using fermentation techniques with methanol, ethanol and hot water reflux. The chemical components in the *Wan Ma Lueang* extracts were studied; and the extracts were tested for free radical scavenging activities by DPPH and ABTS assays. The concentrations of the extracts were tested for the effect on cell survival rate; and anti-inflammatory activities were tested using the nitric oxide (NO) production process in macrophage cells.

Results: The chemical components were studied using LC-MS analysis of *Wan Ma Lueang* extracts with methanol, ethanol, and hot water reflux. Similar compounds were found, namely demethoxycurcumin and curcumin. The free radical scavenging values of *Wan Ma Lueang* extracts using the DPPH assay were 0.63 ± 0.03 , 0.76 ± 0.04 and 1.31 ± 0.20 mg/mL respectively; and the values derived from the ABTS assay were 169.00 ± 4.32 , 136.55 ± 4.35 and 70.83 ± 7.07 μ M/g respectively. The *Wan Ma Lueang* ethanol extracts did not exhibit any cytotoxicity to cells at the highest concentration of 10 μ g/mL. The concentration exhibited a cell survival rate of over 90% and inhibited NO by an average of 55.3%.

Discussion: In the chemical analysis of *Wan Ma Lueang* extracts, the largest amount of active ingredients was found in the methanol extract, followed by those in the ethanol and hot water reflux extracts. A comparative analysis of main active ingredients in all three *Wan Ma Lueang* extracts with different solvents revealed similar compounds, namely curcumin and demethoxycurcumin.

Conclusion and Recommendation: The *Wan Ma Lueang* extracts were found to have free radical scavenging and anti-inflammatory activities. The knowledge could be applied when developing products for further raising the values of *Wan Ma Lueang* in the future.

Key words: *Wan Ma Lueang*, free radical scavenging, anti-inflammatory activities

บทนำและวัตถุประสงค์

ว่านม้าเหลียง (*Wan Ma Lueang*) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma* sp. อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณช่วยแก้อาการปวดเมื่อย เคล็ดขัดยอก^[1] โดยส่วนที่ใช้ประโยชน์คือเหง้า รสทางยาคือ รสขม เผ็ด ช้า กลิ่นหอมฉุน ว่านม้าเหลียงได้ถูกนำไปใช้ตามภูมิปัญญาหมอพื้นบ้านอย่างหลากหลาย เช่น ใช้เหง้าว่านม้าเหลียง อมหรือฝนทาแก้ช้ำในเวลาเดินทางไกล ขึ้นเขาลงห้วยจะทำให้ไม่เหนื่อยเร็ว หรือใช้กินและฝนทาแก้ปวดเมื่อย เคล็ดขัดยอก รวมถึงใช้ร่วมกับว่านมาห่อ ต้มรับประทานแก้ปวดเมื่อย ปวดในข้อ ในกระดูก แก้ก้นเอ็นยึด^[2]

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อสิ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับบาดเจ็บ เช่น เชื้อโรค เซลล์หรือเนื้อเยื่อได้รับความเสียหายหรือตายลง โดยการอักเสบสามารถบ่งบอกได้จากปริมาณที่สูงขึ้นของสารสื่อกลางต่าง ๆ เช่น สารอนุมูลอิสระ รวมถึง cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) เป็นอีกหนึ่งสารสื่อกลางที่เกิดจากกระบวนการอักเสบเมื่อเซลล์ macrophage ถูกกระตุ้นจะผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบออกมา หนึ่งในนั้นคือสารไนตริกออกไซด์ หากเกิดการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ NO ในปริมาณสูงจนถึงระดับที่เป็นโทษต่อร่างกาย โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ดังนั้นการยับยั้งการผลิตของ NO ที่มากเกินไปจึงเป็นความพยายามอย่างยิ่งในการค้นหาสารจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการผลิต NO เพื่อพัฒนาเป็นยาสำหรับต้านการอักเสบ จากการศึกษา^[3] สารสำคัญที่ได้จากการสกัดพืชสกุล *Curcuma* species พบว่าสารประกอบส่วน

ใหญ่เป็นสารในกลุ่ม curcuminoids ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา^[4] องค์ประกอบทางเคมีของ *Curcuma* sp. จะพบสาร curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, diacetyl curcumin, triethyl curcumin และ tetrahydrocurcumin โดยการศึกษา^[5] ที่สนับสนุนคุณสมบัติของสารในกลุ่ม curcumin ว่าเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ การศึกษากลไกของฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบของขมิ้นและเคอร์คูมินที่สามารถควบคุมสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ^[6-7] ได้แก่ cytokine, transcription factor รวมทั้งสารกระตุ้นการอักเสบอื่น ๆ^[8] นอกจากนี้ยังกล่าวถึง curcumin สามารถยับยั้ง nuclear factor-kappa B (NF- κ B) จะช่วยลดระดับการแสดงออกของ cyclooxygenase-2 (COX-2), matrix metalloproteinases (MMP) ซึ่งเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ รวมทั้ง Curcumin ยังลดการปลดปล่อย glycosaminoglycans และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2 proteoglycans, integrin beta-1 และยับยั้งเอนไซม์ caspase-3 และ COX-2 ซึ่งเป็นการแสดงประสิทธิผลของ curcumin ต่อการต่อต้านการตายแบบ apoptosis และการอักเสบของเซลล์กระดูกอ่อนซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย Interleukin-1-beta (IL-1 β) และมีรายงานว่า curcumin สามารถยับยั้ง transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านความเจ็บปวด สอดคล้องกับผลการวิจัยสารกลุ่ม arylbutanoids, curcuminoids และ cyclohexene derivatives มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและแก้ปวดในสัตว์ทดลอง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยาในกลุ่มต้าน

อักเสบชนิดไม่ใช้สเตียรอยด์ (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)^[9-11]

จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่มีการศึกษาถึงสารสำคัญและฤทธิ์ของสารสกัดว่านม้าเหลืองการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดว่านม้าเหลือง ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิธี ABTS radical scavenging assay และฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดว่านม้าเหลือง เพื่อพัฒนาตำรับในการบรรเทาอาการปวดและช่วยลดการอักเสบต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

1. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1 สารเคมี

- 1) เมทานอล
- 2) เอทานอล
- 3) น้ำปราศจากไอออน
- 4) Trolox
- 5) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 6) Dimethyl sulfoxide
- 7) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 8) Dexamethasone
- 9) Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)
- 10) Penicillin-streptomycin (P/S)
- 11) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
- 12) Fetal bovine serum (FBS)
- 13) Lipopolysaccharide (LPS)

14) Sodium nitrite

15) N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NEDD)

16) Sulphanilamide (SA)

1.2 อุปกรณ์

- 1) ตู้อบสมุนไพร รุ่น UN110 บริษัท Memmert
- 2) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) รุ่น V-700 บริษัท Buchi
- 3) เครื่องเขย่าสารแบบหมุนวน (shaker) รุ่น SK-O330-Pro บริษัท SCILOGEX
- 4) เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Universal 320 R บริษัท Microtitre centrifuges
- 5) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท ระบบ UV-Vis absorbance รุ่น EON บริษัท Biotek
- 6) เครื่อง Vortex รุ่น MTV-1 บริษัท Bioline
- 7) Agilent 6540 Q-TOF-MS spectrometer รุ่น Agilent 6540 บริษัท Agilent
- 8) MassHunter Workstation Qualitative Analysis Software Version B.06.00 บริษัท Agilent

2. การเตรียมสมุนไพร และการสกัดสารจากว่านม้าเหลือง

เตรียมสมุนไพรว่านม้าเหลืองจากตำบลคันทะนา จังหวัดอุดรธานี ที่ปลูกไว้นาน 2 ปี ตรวจสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นโดยการส่งตรวจ ณ หอพรรณไม้ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าอยู่ในสกุล *Curcuma* sp.

2.1 การเตรียมสารสกัดว่านม้าเหลืองด้วยเทคนิคการแช่ในตัวทำละลายเมทานอล (Methanol

maceration) และเอทานอล (Ethanol maceration) ที่อุณหภูมิห้อง

ทำการชั่งตัวอย่างผงว่านม้าเหลือง 50 กรัม ใส่ขวดลูกขมพูนขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายเมทานอลปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารแบบหมุนวนที่ความเร็วรอบ 270 รอบ/นาที เป็น เวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman filter no 1) และนำกากผงว่านม้าเหลืองไปสกัดซ้ำอีกครั้ง ที่สภาวะข้างต้น นำสารละลายสกัดว่านม้าเหลืองที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้ถูกนำไปเก็บที่ -20°C โดยทำการสกัดจำนวน 3 ชุดการทดลอง (3n)

การเตรียมสารสกัดว่านม้าเหลืองด้วยเทคนิคการแช่ในตัวทำละลายเอทานอล (ethanol maceration) เหมือนกับขั้นตอนการเตรียมข้างต้น แต่เปลี่ยนตัวทำละลายจากเมทานอลเป็นเอทานอล

2.2 การเตรียมสารสกัดว่านม้าเหลืองด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (reflux) ชั่งตัวอย่างผงว่านม้าเหลือง 50 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และทำการสกัดแบบกลั่น reflux เป็น เวลา 60 นาที จากนั้นนำสารละลายสกัดไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้ระเหยแห้ง ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้ถูกนำไปเก็บที่ -20°C โดยทำการสกัดจำนวน 3 ชุดการทดลอง (3n)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดว่านม้าเหลือง

การวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดว่านม้าเหลือง วิเคราะห์สารสกัดโดยใช้ Agilent 6540 Q-TOF-MS spectrometer (Agilent Technologies, Singapore) ร่วมกับระบบ HPLC รุ่น Agilent 1260 infinity Series (Agilent, Waldbronn, Germany) ซึ่งประกอบด้วยระบบ Vacuum degasser, An autosampler, A binary pump, และคอลัมน์ควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้งานร่วมกับเทคนิค Electrospray ionization (ESI) และ Agilent dual nebulizer

ปริมาตรการฉีดคือ 10 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์ HPLC โดย Mobile phase ใช้กรดฟอร์มิก 0.1% ในน้ำ (v/v) (A) และ กรดฟอร์มิก 0.1% ในอะซีโตไนไตรล์ (v/v) (B) ถูกใช้ใน Gradient mode ที่มีตัวทำละลาย B อยู่ในช่วง 5-95% ที่ 0-30 นาที ที่ 95% B ค้างไว้ 10 นาที และ Run เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกด้วยคอลัมน์ Luna C18(2) 4.6 มม. $\times$ 150 มม., 5 μm , 100A (S/No.728946-40) ที่อัตราการไหล 0.5 มล./นาที และอุณหภูมิของคอลัมน์ 35°C กำหนดค่าพารามิเตอร์ในการทดสอบ ดังนี้: Drying gas (N₂) flow rate 10.0 L/min, Drying gas temperature 350°C , Nebulizer pressure 30 psig, Capillary 3500V, Skimmer 65V, Octapole RFV 750V, และ Fragmentor voltage 250V ใน Negative mode และ 100V in positive mode กำหนด Mass ไว้ที่ m/z 100-1,000 Da ด้วย 250 ms/spectrum

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Agilent LC-MS-QTOF MassHunter Data Acquisition Software เวอร์ชัน B.05.01 และ Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software B.06.00

ตามลำดับ (Agilent Technologies, USA) การวิเคราะห์แต่ละตัวอย่างดำเนินการในโหมดไอออน-เซชันทั้งแบบบวกและแบบลบ การตรวจวัดมวลที่แม่นยำ (กำหนด Error < 5 ppm) การระบุสารสำคัญได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูลจาก MassHunter Metabolite PCD/PCDL (Agilent Technologies) และสูตรโมเลกุลสร้างขึ้นโดยโปรแกรม Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software B.06.00

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี

DPPH radical scavenging assay

เตรียมสารละลาย DPPH radical ความเข้มข้น

$$\% \text{ Free radical scavenging} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

4.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay

เตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 mM และสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 mM บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยเก็บในที่ที่บ่มแสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 732 nm เพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS อยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02 หลังจากนั้นเตรียมสารสกัดว่านม้าเหลียงด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และสารมาตรฐาน ascorbic acid ที่เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ 0.003-0.050 mg/ml

0.2 mM ใน 95% เมทานอล และเตรียมตัวอย่างสารสกัดว่านม้าเหลียงด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml ใน 95% เมทานอล และเติม DPPH ลงไปในสารละลายสารสกัดตัวอย่าง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยเก็บในที่ที่บ่มแสงเป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ($n = 3$) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox จากนั้นทำการคำนวณ % radical scavenging ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆของสารสกัด เพื่อใช้คำนวณหาค่า Half maximal effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่มีผลต่อการลดจำนวนของอนุมูลอิสระลงไปครึ่งหนึ่งจากจำนวนของอนุมูลอิสระเริ่มต้น

จากนั้นบีบคั้นสารตัวอย่าง สารละลาย ABTS บ่มในที่ที่บ่มแสงเป็นเวลา 6 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 732 นาโนเมตร ($n = 3$) คำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS โดยแสดงค่าในรูปของไมโครโมลาร์สมมูลของกรดแอสคอร์บิก/มิลลิกรัมของสารสกัด

5. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดว่านม้าเหลียง

5.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ macrophage (Murine macrophage cell line RAW264.7) ถูกใช้เป็นโมเดลในการทดสอบ โดยเซลล์ RAW264.7 จะถูกนำมาเลี้ยงด้วยอาหาร

เลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และ 1% penicillin-streptomycin (P/S) ในตู้เพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ ทั้งนี้ จะทำการ sub-culture ทุก ๆ 3 วัน

5.2 การทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดต่อ อัตราการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability test)

ความเข้มข้นที่หลากหลายของสารสกัดว่านม้า เหลืองถูกนำมาทดสอบอัตราการอยู่รอดของเซลล์ RAW264.7 โดยใช้สาร thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) ทดสอบ กล่าวคือทำการเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ใน 96 well plate (1 × 10⁵ cell/well) จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดอาหารเลี้ยง เซลล์ทิ้ง เติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้น แตกต่างกันไป แล้วทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C พร้อม บรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.3 mg/mL แล้ว นำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยง เซลล์ทิ้งและเติม DMSO เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโน- เมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่า ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability percentage) เปรียบเทียบกับ control ซึ่งความเข้มข้นของสาร สกัดที่มีค่าร้อยละการอยู่รอดของเซลล์สูงมากกว่า 90% จะถูกนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบต่อไป

5.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบจาก กระบวนการเกิด Nitric oxide (NO) ในเซลล์ แมคโครฟาจ Raw 264.7

การทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบโดยยับยั้งการ หลั่ง NO โดยเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ใน 96 well plate (1 × 10⁵ cell/well) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ที่

อุณหภูมิ 37°C ณ บรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง จากนั้นกระตุ้น ให้เกิดการอักเสบด้วย lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 200 ng/mL ปริมาตร 50 µL/well จากนั้นเติมสารตัวอย่าง ปริมาตร 50 µL/well แล้วบ่ม ไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ที่ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บ supernatant เพื่อทดสอบ Griess reagent โดยดูด supernatant 50 µL ลง ใน 96 well plate แล้วเติม 0.1%w/v NEDD 50 µL และ 1%w/v sulphanilamide (ใน 5% phosphoric acid) 50 µL แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ทำการ ตรวจวัดระดับปริมาณไนไตรท์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ NO โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณค่าความ เข้มข้นของการหลั่งระดับ NO โดยเปรียบเทียบกับ standard curve ของไนไตรท์ (1.56-100 µM) โดย คำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A-C) - (B-C)] * 100 / (A-C)$$

โดยที่ A-C คือความเข้มข้นของไนไตรท์ (µM) ซึ่งได้จากการวัด supernatant ด้วย Griess reagent A คือ ได้จากการกระตุ้นด้วย LPS เพียงอย่าง เดียว ปราศจากสารตัวอย่าง

B คือ ได้จากตัวอย่างของสารสกัดว่านม้าเหลือง หรือ positive control ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

C คือ ได้จากอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ด้วย LPS

ผลการศึกษา

1. การสกัดว่านม้าเหลือง

จากการสกัดว่านม้าเหลืองด้วยเทคนิคการหมัก ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ ตัวทำละลาย เมทานอล

และเอทานอล ที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งการเตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (reflux) ทำการสกัดแต่ละเทคนิคจำนวน 3 ชุด การทดลอง เพื่อหาค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของการสกัด ได้ผลผลิตร้อยละของสารสกัด (percentage of yield) (Table 1) และเมื่อพิจารณาแต่ละชุดการทดลองของการสกัดด้วยเทคนิคการหมักเมทานอล เอทานอล และการสกัดด้วยน้ำร้อน พบว่าการเตรียมสารสกัดด้วยน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับให้ผลผลิต

ร้อยละของสารสกัดสูงกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดว่านม้าเหลืองที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดหมักเมทานอลและเอทานอล เป็นสารสกัดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semi-solid extract) สีน้ำตาลอมเหลือง ขณะที่สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเทคนิคการสกัดด้วยน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับจะได้สารสกัดในรูปแบบผงสีน้ำตาล (Figure 1)

Table 1 Percentage of yield of *Wan Ma Lueang* extracts obtained by maceration with methanol, ethanol, and hot water reflux extraction

<i>Wan Ma Lueang</i> extract	Percentage of yield			
	N1	N2	N3	Mean
Wan Ma Lueang extract by methanol extraction	8.64	8.15	7.96	8.25 ± 0.35
Wan Ma Lueang extract by ethanol extraction	7.81	7.54	7.75	7.70 ± 0.14
Wan Ma Lueang extract by hot water reflux extraction	20.53	20.58	19.73	20.28 ± 0.47

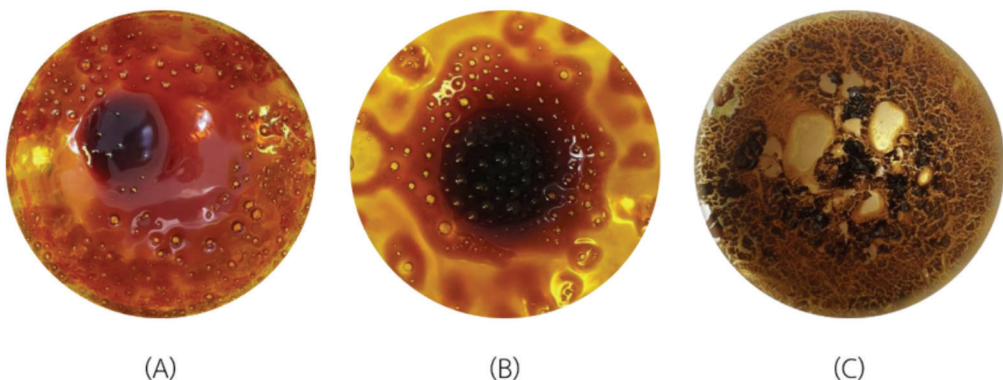


Figure 1 Characteristics of *Wan Ma Lueang* extracts obtained through methanol (A), ethanol (B), and hot water reflux extraction (C)

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดว่านน้ำเหลือง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธี LC-MS ผลการศึกษาพบองค์ประกอบทางเคมีในการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมากที่สุด รองลงมาคือเอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ ตาม

ลำดับ ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์สารสำคัญพบว่าทั้ง 3 สารสกัดว่านน้ำเหลืองด้วยตัวทำละลายที่แตกต่าง พบสารที่มีคล้ายกัน คือสาร demethoxycurcumin ($C_{20}H_{18}O_5$) และ curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$) ที่เวลาเฉลี่ย 23.33 และ 23.87 RT (min) ตามลำดับ

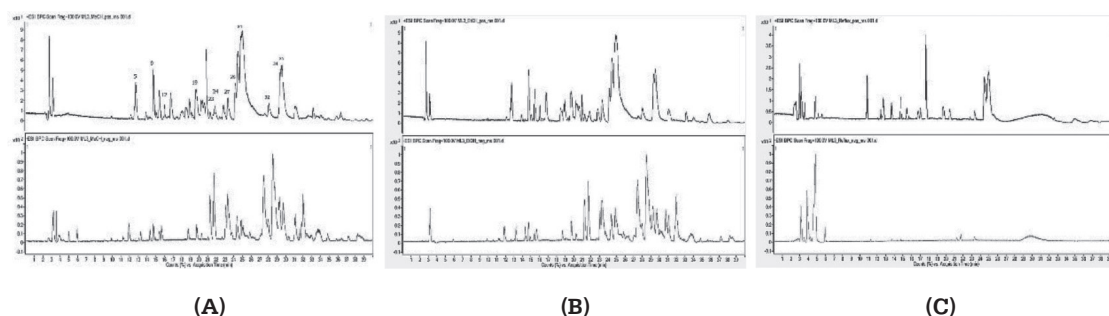


Figure 2 Analysis of Chemical Constituents by LC-MS of Wan Ma Lueang extracts obtained through methanol (A), ethanol (B), and hot water reflux extraction (C)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านน้ำเหลืองด้วยเทคนิค DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดว่านน้ำเหลืองที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล

มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (Table 2 and Figure 2)

Table 2 Results of antioxidant activity testing for Wan Ma Lueang extract

Example of an extract	Results of antioxidant activity testing	
	EC ₅₀ of DPPH (mg/ml)	VEAC value of ABTS (μM/g)
Wan Ma Lueang extract by methanol extraction	0.63 ± 0.03	169.00 ± 4.32
Wan Ma Lueang extract by ethanol extraction	0.76 ± 0.04	136.55 ± 4.35
Wan Ma Lueang extract by hot water reflux extraction	1.31 ± 0.20	70.83 ± 7.07
Trolox standard substance	0.0050 ± 0.0006	-

Note: The data was presented as Mean ± Standard Deviation (S.D.) (n = 3)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดว่านน้ำเหือง

Nitric oxide (NO) จัดเป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ การยับยั้ง NO จึงเป็นการควบคุมและบรรเทาการอักเสบได้จากการทดสอบเบื้องต้นด้วยการใช้ MTT พบว่าสารสกัดว่านน้ำเหืองจากเอทานอล ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 $\mu\text{g/mL}$ โดยความเข้มข้นดังกล่าวมีการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 90% (Figure 3)

และเมื่อทดสอบการยับยั้งการผลิต NO ของสารสกัดว่านน้ำเหืองที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับร้อยละ $55.3 \pm 5.3\%$ (Mean $\pm$ S.D., $n = 3$) และที่ความเข้มข้นสารสกัด 5 $\mu\text{g/mL}$ เท่ากับ $7.8 \pm 3.5\%$ และเปรียบเทียบกับสาร dexamethasone ซึ่งเป็น positive control ที่ความเข้มข้น 8 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ยับยั้งเท่ากับ $80.8 \pm 4.5\%$ (Mean $\pm$ S.D., $n = 3$) โดยสารสกัดว่านน้ำเหืองมีฤทธิ์การยับยั้ง NO น้อยกว่าสาร dexamethasone (Figure 4)

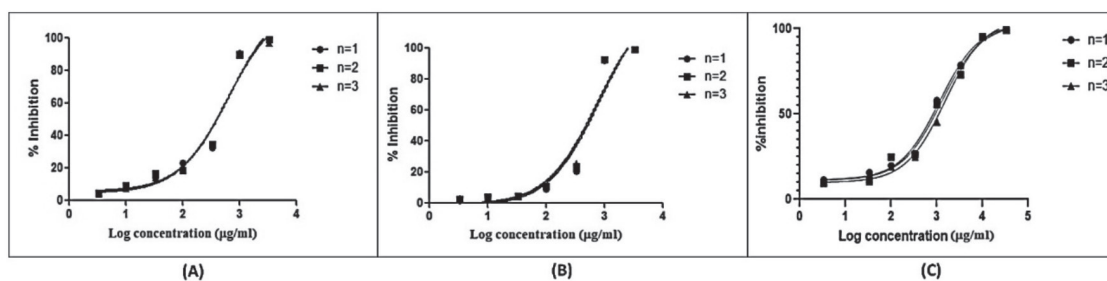


Figure 3 The EC_{50} values of the *Wan Ma Lueang* (*Curcuma* sp.) extracts obtained through methanol (A), ethanol (B), and hot water reflux extraction (C)

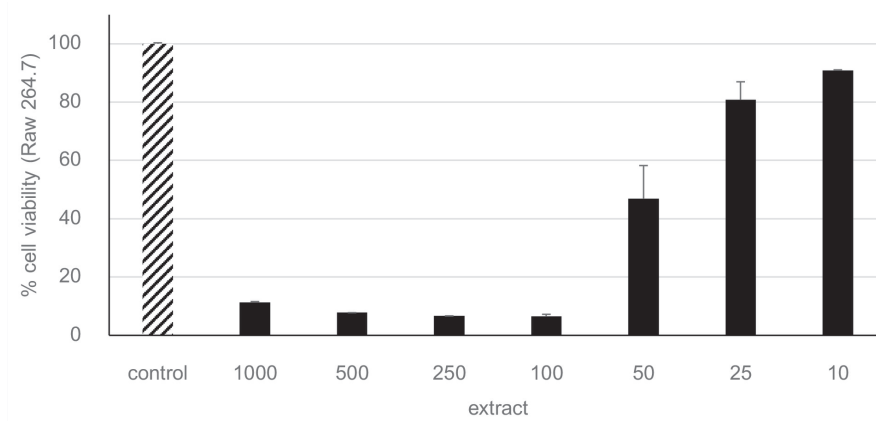


Figure 4 Concentration of the *Wan Ma Lueang* extract by ethanol extraction versus cell viability rate (%cell viability) at 10–1,000 $\mu\text{g/mL}$

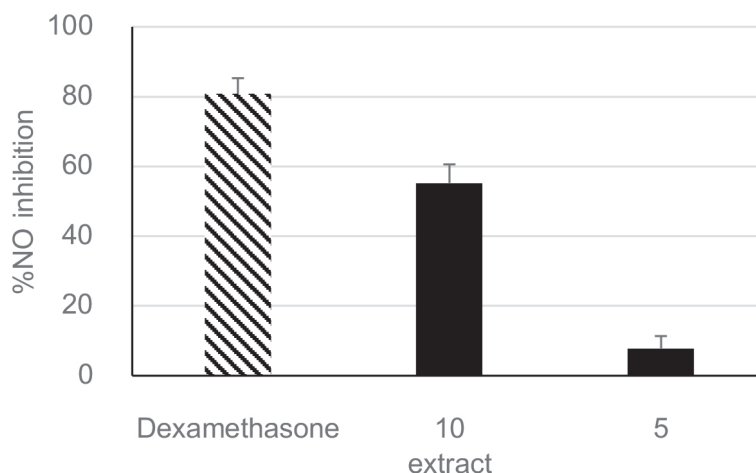


Figure 5 Inhibition of nitric oxide production following inflammation induction by Wan Ma Lueang extract by ethanol extraction (concentration of 10 and 5 $\mu\text{g/mL}$) and dexamethasone (concentration of 4 $\mu\text{g/mL}$)

อภิปรายผล

จากผลการศึกษาน้ำมะเหลือง ซึ่งเป็นพืชอยู่ในสกุล *Curcuma* sp. วงศ์ Zingiberaceae โดยการสกัดน้ำมะเหลืองด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ด้วยวิธี LC-MS ผลการศึกษาพบสารสำคัญในการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลพบองค์ประกอบทางเคมีมากที่สุดเนื่องจากเมทานอลมีคุณสมบัติขั้วมากกว่าสารอื่น รองลงมาคือ เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์สารสำคัญพบว่าทั้ง 3 สารสกัดน้ำมะเหลืองด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน พบสารที่มีคล้ายกัน คือสาร curcumin และ demethoxycurcumin การศึกษา^[3,12] ได้กล่าวถึง องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Curcuma* sp. พบ curcumin, demethoxycurcumin, bisdeme-

thoxycurcumin, diacetyl curcumin, triethyl curcumin และ tetrahydrocurcumin นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาสารสำคัญที่พบในขมิ้นคือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin^[5]

จากผลการศึกษาสารสกัดที่ใช้ตัวทำละลายเมทานอล ใน positive mode สารประกอบที่พบมี m/z เท่ากัน ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างในไอโซเมอร์หรือสเตอริโอเคมี (stereochemistry) ที่ m/z เท่ากับ 235 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 275 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ และ 527 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ ซึ่งสามารถระบุเป็น guaiane type เนื่องจากสูญเสียหนึ่งโมเลกุลและไม่เห็นไอออนโมเลกุล $[\text{M}-\text{H}]^-$ สารประกอบเหล่านี้มีจุดพิคสูงสุดที่ peak no. 5, 9, 12, 19, 23, 24 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 252 ผล Retention time และตำแหน่งของ -OH ไม่สามารถระบุได้ซึ่งจำเป็นต้องเปรียบเทียบกับ

สารประกอบ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอีกกลุ่มหนึ่งประกอบด้วย m/z 235[M+H]⁺, 257[M+Na]⁺, 491[2M+Na]⁺ และ 469[2M+H]⁺ ซึ่งคล้ายกับสารประกอบที่สามารถระบุเบื้องต้น guaiane type ที่มีมวลโมเลกุล 234 ที่ peak no. 27, 29, 30, 31, 32, 34, 35 ซึ่งสารประกอบดังกล่าวมักพบในพืช *Curcuma haydeana* ซึ่งช่วยสนับสนุนว่าน้ำมันเหลืองอาจเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Curcuma* sp.

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดว่านมาเลียงด้วยเทคนิค DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดว่านมาเลียงที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (reflux) สอดคล้องกับผลวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดว่านมาเลียงด้วยตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ ด้วยวิธี LC-MS เนื่องจากเมทานอลพบองค์ประกอบทางเคมีมากที่สุด และนอกจากนี้ยังพบสาร curcumin, demethoxycurcumin โดยสอดคล้องกับการศึกษา^[5] ซึ่งสนับสนุนว่าสาร curcumin มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และสอดคล้องกับการศึกษาขมิ้นอ้อยซึ่งเป็นพืชสกุล *Curcuma* ว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ^[13]

แม้สารสกัดว่านมาเลียงด้วยตัวทำละลายเมทานอลจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า แต่เมทานอลจะมีความเป็นพิษสูงกว่าเอทานอล ผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกสารสกัดว่านมาเลียงจากตัวทำละลายเอทานอลในการทดสอบความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดว่านมาเลียง จากกระบวนการเกิด nitric oxide (NO) ในเซลล์แมคโครฟาจ raw 264.7 โดยเหนี่ยวนำการอักเสบด้วย LPS พบว่า สารสกัดว่านมาเลียงด้วยตัวทำละลายเอทานอล ไม่

แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มีการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 90% และมีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ร้อยละโดยเฉลี่ย 55.3 สอดคล้องกับการศึกษา^[5] ที่สนับสนุนว่าสาร curcumin มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และสอดคล้องกับการศึกษา^[13] ฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธีการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดเอทานอลของขมิ้นอ้อย มีฤทธิ์ต้านการอักเสบซึ่งสารกลุ่ม sesquiterpenoid ที่สกัดจากขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้ง COX-2 และ iNOS^[14] และสอดคล้องกับการศึกษา^[15] ที่ทดสอบสาร curcumenol ที่แยกได้จากเหง้าขมิ้นอ้อย พบว่าออกฤทธิ์ลดอาการปวดในหนูถีบจักร นอกจากนี้ฤทธิ์ยับยั้ง NO ยังสนับสนุนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) ว่ามีสารสำคัญในกลุ่ม curcuminoid ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เป็นพืชที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS และสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส^[16] การศึกษายังได้สนับสนุนฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ Curcumin ที่สามารถควบคุมสารต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ cytokine, transcription factor^[6-7] รวมทั้งสารกระตุ้นการอักเสบอื่นๆ^[8] และนอกจากนี้ยังกล่าวถึง curcumin สามารถยับยั้ง NF-kB จะช่วยลดระดับการแสดงออกของ COX-2, MMP-9, MMP-1, MMP-3 และ MMP-13 ซึ่งเป็นโปรตีนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ curcumin ยังลดการปลดปล่อย glycosaminoglycans และกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 2 proteoglycans, integrins beta-1 และยับยั้งเอนไซม์ caspase 3 และ COX-2 ซึ่งเป็นการแสดงประสิทธิภาพของ curcumin ต่อการต่อต้านการตายแบบ apoptosis และการอักเสบของเซลล์กระดูกอ่อนซึ่งถูกเหนี่ยวนำ

นำด้วย IL-1 β และมีรายงานว่า curcumin สามารถยับยั้ง transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านความเจ็บปวด สอดคล้องกับผลการวิจัยรายงานว่าสารกลุ่ม arylbutanoids, curcuminoids และ cyclohexene derivatives มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและแก้ปวดในสัตว์ทดลอง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับยาในกลุ่ม NSAIDs^[9-11]

ข้อสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเมทานอล เอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ พบว่าสารสกัดว่านน้ำเหลืองด้านตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดรองลงมา คือ สารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล และการสกัดน้ำร้อนแบบไหลย้อนกลับ (reflux) เมื่อทำการศึกษาความเป็นพิษและฤทธิ์ต้านการอักเสบจากกระบวนการเกิด nitric oxide ในเซลล์แมคโครฟาจ raw 264.7 โดยเหนี่ยวนำการอักเสบด้วย LPS ของสารสกัดว่านน้ำเหลืองด้วยตัวทำละลาย เอทานอล พบว่า สารสกัดความเข้มข้นสูงสุดที่มีการอยู่รอดของเซลล์มากกว่า 90% คือ 10 $\mu\text{g/mL}$ และมีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ร้อยละโดยเฉลี่ย 55.3 ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อเพิ่มมูลค่าว่านน้ำเหลืองต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาพบสารสำคัญหลายชนิดในว่านน้ำเหลือง ซึ่งเป็นข้อมูลในการระบุสารสำคัญเบื้องต้น ดังนั้นควรมีการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบกับสารประกอบโดยตรงเพื่อให้เกิดความแม่นยำในการวิเคราะห์สารสำคัญในสมุนไพร

2. ในการศึกษาที่มุ่งเน้นการสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลายเมทานอล เอทานอล และน้ำ ดังนั้นจึงเป็นโอกาสในการศึกษาครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดว่านน้ำเหลืองในรูปแบบอื่น เพิ่มเติม เช่น น้ำมันหอมระเหย เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (กสว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัย

References

1. Kanahum N. Wan Ma Lueang [Internet]. 2021 [cited 2023 November 9]. Available from: <http://banvanthai.com>
2. Kasetprasert O. Zingiberaceae plant family. Nonthaburi: Chumnum Saha Kor Kaset Co., Ltd.; 2007. (in Thai)
3. Sun W, Wang S, Zhao W, Wu C, Guo S, Gao H, Tao H, Lu J, Wang Y & Chen Y. Chemical constituents and biological research on plants in the genus curcuma. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016.
4. Niranjana A, Prakash D. Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) - A review. J Food Sci Technol. 2008;45(2):109-16.
5. Li S, Yuan W, Deng G, Wang P, Yang P, BB A. Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). Pharmaceutics. 2011;2:28-54.
6. Sehabuth V, Srisombut T. Application of Niosomes in the delivery of local herbal extracts to reduce pain and inflammation of osteoarthritis. PTU Journal of Science and Technology. 2020;1(1):69-82. (in Thai)
7. Basnet P, Skalko-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. Molecules. 2011;16(6):4567-98.
8. Schaffer M, Schaffer PM, Zidan J, Sela GB. Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 2011;14(6):588-97.
9. Panthong A, Kanjanapothi D, Niwatananum V, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Zingiber cassumunar*. Planta Med. 1990;56(6):655.

10. Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003;87(2-3):143-8.
11. Han AR, Kim MS, Jeong YH, Lee SK, Seo EK. Cyclooxygenase-2 inhibitory phenylbutenoids from the rhizomes of *Zingiber cassumunar*. *Chem Pharm Bull*. 2005;53(11):1466-8.
12. Niranjana A, Prakash D. Chemical constituents and biological activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) -A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2008;45(2):109-16.
13. Ouncharoen K, Leelananthakul W. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prasa Khamin-Oi remedy and its herbal components. *Journal of Khon Kaen Provincial Health Office*. 2022;4(2):225-38. (in Thai)
14. Lee SK, Lee SK, Hong CH, Huh SK, Kim SS, Oh OJ, Min HY, Park KK, Chung WY, Hwang JK. Suppressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2002;21(2):141-8.
15. Navarro Dde F, Navarro Dde F, Souza MMde, Neto RA, Golin V, Niero R, Yunes RA, Monache FD, Filho CV. Phytochemical analysis and analgesic properties of *Curcuma zedoaria* grown in Brazil. *Phytomedicine*. 2022;9(5):427-32.
16. Kaewpiboon C, Boonnak N. Biological activities of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe. *Thai Science and Technology Journal*. 2022;30(2):1-13. (in Thai)