แบบรายงานการวิจัยการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์

เสนอ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน)

รหัสโครงการ CRP5605020930 (ปีที่ 1)

โครงการพัฒนายาทาภายนอกจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม เพื่อใช้รักษาแผลไหม้ที่เป็นและไม่เป็นเบาหวาน

Topical preparation of tamarind seed coat on second degree burn wound healing in diabetic and non-diabetic rats

คณะผู้วิจัย

ดร.วนิดา สุขเกษศิริ

ดร.เพ็ญนภา ชลปฐมพิกุลเลิศ

ดร.ศุภิตา ธนะเศวตร

ดร.ตุลาภรณ์ ว่องธวัชชัย

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จลุล่วงหากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความร่วมมือจากบุคคลและหน่วยงานต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ ภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และสถานเลี้ยงสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร ประเภทโครงการมุ่งเป้า เรื่อง อาหารและความมั่นคงด้านอาหารแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556

บทคัดย่อ

มะขาม (*Tamarindus indica* L.) จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) นำมาใช้ในการแพทย์ทางเลือกในการรักษาแผลสด แผลที่ถูกไฟลวกและแผลเบาหวาน การศึกษาครั้งนี้ใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามสกัดด้วย 80% เอทานอล นำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพและความเป็นพิษของสารสกัด รวมทั้งการเตรียมสารสกัดในรูปแบบครีมและการแพ้ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีปริมาณสารประกอบฟีนอลและแทนนินในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และโปรแอนโธไซยานิดินด้วย และยังพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยมีค่าต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibition concentration; MIC) 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Escherichia coli* โดยมีค่า MIC 1204 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผลของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อนำมาพัฒนาเป็นครีมที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามร้อยละ 2.5, 5 และ 10 พบว่าผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางกายภาพและความคงตัวที่ดี ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง

Abstract

Tamarind (*Tamarindus indica* L.) is a plant in family Leguminosae. This plant has been traditionally used for wound healing. In this study, tamarind seed coat was extracted with 80% ethanol and its phytochemical was determined. Antimibrobial activity and skin toxicity were measured. Tamarind seed coat ethanolic extract, consisting of the highest phenolic content and tannin. Tamarind seed coat ethanolic extract was not toxic to skin cell and also inhibit growth of gram positive *Staphylococcus aureus* (MIC 64 ug/mL) but gram negative *Escherichia coli* was not observed. The cream formulation of tamarind seed coat ethanolic extract (2.5, 5, and 10%) was prepared by using the most stable cream base and their physical properties and stability of formulation were investigated. As the result, the skin irritation was not observed for these products.

สารบัญ

รายการ	**หน้า**
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
ABSTRACT	4
สารบัญ	5
รายการตาราง	6
รายการภาพประกอบ	7
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	8
บทที่ 1 บทนำ	9
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินวิจัย	17
บทที่ 3 ผลการศึกษา	27
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	34
เอกสารอ้างอิง	36

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณสารประกอบฟินอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ โปรแอนโธไซยานิดินและแทนนินในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	28
2	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	29
3	ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้นและ ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ	31
4	ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หลังการทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze and thaw cycle	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ผงสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	27
2	สารสำคัญที่พบในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยใช้ NMR	27
3	ผลของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อความเป็นพิษ ในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT	29
4	ครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	30
5	การทดสอบการระคายเคืองของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ	33

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°C	=	degree celsius
AlCl3	=	aluminium chloride
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
GAE	=	Gallic acid equivalents
G6PD	=	glucose-6-phosphate dehydrogenase
HCl	=	hydrogen chloride
IC50	=	half maximal inhibition concentration
$NH_4Fe(SO_4)_2$	=	ammonium iron(III) sulfate dodecahydrate
nm	=	nanometer
NMR	=	nuclear magnetic resonance
MDA	=	malondialdehyde
MIC	=	minimum inhibition concentration
MTT	=	3-(4,5,-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
mg	=	milligram
mL	=	milliliter
OD	=	optical density
TBSA	=	total body surface area
µL	=	microliter
µg	=	microgram

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

บาดแผล (wound) คือ รอยฉีกขาดของเยื่อบุผิวหนังหรือเนื้อเยื่อ และส่วนที่ลึกกว่าชั้นผิวหนังถูกทำลาย ทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์ผิวหนัง การเกิดแผลอาจเป็นผลมาจากการผ่าตัด (incision or surgical wound) จะมีการชอกช้ำของเนื้อเยื่อและมีโอกาสติดเชื้อน้อย และแผลที่เกิดจากอุบัติเหตุ (traumatic wound) แผลมักชอกช้ำ ฉีกขาด ปนเปื้อนสิ่งสกปรกและเชื้อโรคมากกว่าแผลผ่าตัด เช่น แผลถูกแทง แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก (Enoch and Leaper, 2004)

การบาดเจ็บจากความร้อนหรือแผลไหม้สามารถเจอได้บ่อยและกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บทันที ความรุนแรงของการเกิดบาดเจ็บขึ้นอยู่กับระดับของการเกิดแผลไหม้ แผลไหม้ระดับแรก (first degree burn) แผลไหม้จำกัดอยู่ที่ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เท่านั้น โดยบาดแผลจะแดง (erythema) แต่ไม่มีตุ่มพอง (blister) มีความรู้สึกเจ็บปวดหรือแสบร้อน ได้แก่ แผลไหม้จากแสงอาทิตย์ (sun burn) การถูกน้ำร้อน ไอน้ำเดือดหรือวัตถุที่ร้อนเพียงเฉียดๆและระยะเวลาไม่นาน แผลไหม้ระดับที่สอง (second degree burn) แบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิด คือ บาดแผลระดับที่สองชนิดตื้น (superficial partial-thickness burn) จะเกิดการไหม้ขึ้นที่ชั้นหนังกำพร้าทั้งชั้นผิวนอกและชั้นในสุดและหนังแท้ (dermis) ส่วนที่อยู่ตื้นๆใต้หนังกำพร้า แต่ยังคงมีเซลล์ที่สามารถเจริญทดแทนส่วนที่ตายได้จึงหายได้เร็วและไม่เกิดแผลเป็น ยกเว้นถ้าแผลมีการติดเชื้อ มักเกิดจากถูกของเหลวลวกหรือถูกเปลวไฟ พบมีตุ่มพองใส ถ้าลอกเอาตุ่มพองออก พื้นแผลจะมีสีชมพู มีน้ำเหลืองซึมและมีอาการปวดแสบมากเพราะเส้นประสาทบริเวณผิวหนังยังเหลืออยู่ การหายของแผลใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์และมักไม่เกิดแผลเป็น ส่วนบาดแผลระดับที่สองชนิดลึก (deep partial-thickness burns) จะเกิดการไหม้ขึ้นที่ชั้นของหนังแท้ส่วนลึก ลักษณะบาดแผลจะตรงกันข้ามกับบาดแผลระดับที่สองชนิดตื้น คือ ไม่ค่อยมีตุ่มพอง แผลสีเหลืองขาว แห้งและไม่ค่อยปวด บาดแผลชนิดนี้มีโอกาสเกิดแผลเป็นได้ถ้าไม่มีการติดเชื้อซ้ำเติม แผลมักจะหายได้ภายใน 3-6 สัปดาห์ แผลไหม้ระดับที่สาม (third degree burn) บาดแผลไหม้จะลึกลงไปจนทำลายหนังกำพร้าและหนังแท้ทั้งหมด รวมทั้งต่อมเหงื่อ รูขุมขนและเซลล์ประสาท มักไม่มีความรู้สึกเจ็บปวดที่บาดแผล แผลอาจกินลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อหรือกระดูก บาดแผลจะมีลักษณะขาว ซีด เหลือง น้ำตาลไหม้หรือดำ หนาแข็งเหมือนแผ่นหนัง แห้งและกร้าน อาจเห็นรอยเส้นเลือดหรือเส้นประสาทที่อยู่บริเวณผิวหนังแท้ถูกทำลาย ทำให้ไม่มีความรู้สึกเจ็บปวด บาดแผลประเภทนี้จะไม่หายเอง

จำเป็นต้องรักษาด้วยการผ่าตัดปลูกผิวหนัง นอกจากนี้จะมีการดึงรั้งของแผลทำให้ข้อยึดติด เมื่อหายแล้วจะเป็นแผลเป็น บางรายอาจพบแผลเป็นที่มีลักษณะนูนมาก (hypertrophic scar or keloid) มักเกิดจากไฟไหม้หรือถูกของร้อนนานๆหรือไฟฟ้าช็อต ถือเป็นบาดแผลที่ร้ายแรง การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยเน้นการเกิดแผลไหม้ระดับที่สอง ซึ่งเป็นความรุนแรงระดับปานกลางและสามารถรักษาให้หายได้ภายใน 3-6 สัปดาห์

เมื่อผิวหนังถูกทำลายจะมีกระบวนการทางสรีรวิทยาปกติเพื่อทำการรักษาบาดแผลเกิดขึ้น โดยร่างกายจะหลั่งสารเคมีต่างๆ เป็น dynamic response มายังบริเวณ microcirculation เช่น การหลั่ง noxious vasoactive agent จำนวนมาก ทำให้หลอดเลือดหดตัว (Korthuis et al., 1994; Mayers and Johnson, 1998) และหลังจากนั้นทำให้หลอดเลือดขยาย (vasodilatation) และเพิ่มการซึมผ่านของสารน้ำออกจากหลอดเลือดฝอย (microvascular permeability) เป็นสาเหตุให้เกิดการบวม ลด perfusion และ impaired circulation นำไปสู่การขาดเลือดในบริเวณที่มีแผล (Kloppenberg et al., 2000) เกิด cellular dysfunction, เกิดการตายของเซลล์ผิวหนังเฉพาะที่ (local skin necrosis) และ เกิดการบาดเจ็บของอวัยวะที่เกิดแผลไหม้ (Till et al., 1989; Demling and LaLonde, 1990; Thompson et al., 1990)

อนุมูลอิสระ (free radical) และระบบต้านการเกิดอนุมูลอิสระ (scavenging system) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหายของแผลและทำให้เกิดความล่าช้าในการหายของแผลแต่ละชนิดได้ (Shula et al., 1997; McDaniel et al., 1998) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเกิดอนุมูลอิสระกับความล่าช้าของการหายของแผล ซึ่งถ้ามีปริมาณอนุมูลอิสระมากจะส่งผลให้กระบวนการหายของแผลล่าช้าไป ดังนั้นปัจจัยที่สามารถลดระดับอนุมูลอิสระได้ เช่น การลดระดับการเกิดออกซิไดส์ของไขมัน เช่น malondialdehyde (MDA) ก็จะช่วยส่งเสริมกระบวนการหายของแผลไหม้ได้ (Mallikarjuna et al., 2002)

การรักษาแผลไหม้ที่เหมาะสมและถูกต้องจะส่งผลให้ลดความพิการและสูญเสียชีวิตของผู้ป่วย เช่นเดียวกับทำให้ระยะเวลาการหายของแผลสั้นลงและกลับสู่ภาวะปกติ (normal function) ได้เร็วขึ้น รวมทั้งลดความต้องการสำหรับการฟื้นฟูภายหลังการหายของแผล (Papini, 2004) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการหายของแผล เช่น การดูแลแผล (wound care) ภาวะโภชนาการที่ดี (good nutrition) การเพิ่ม blood supply ไปยังบริเวณที่เกิด partial-thickness burns การป้องกันการติดเชื้อและลดการบวมของแผล (Cioffi, 2001; Sim, 2002) รวมทั้งแก้ไขภาวะการเจ็บป่วยที่เป็นอยู่

เดิมของผู้ป่วย เช่น โรคเบาหวาน (Napoli et al., 1999; Blakytny and Jude, 2006) ก็จะทำให้การสมานแผลเกิดขึ้นได้สมบูรณ์และหายได้เร็วขึ้น

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นความผิดปกติของการแมแทบอลิซึมแบบเรื้อรัง (chronic metabolic disorder) ซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพระดับโลก ซึ่งเป็นภาวะที่ร่างกายมีน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติอาจเกิดจากความผิดปกติของการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินทั้งชนิดไม่มีการหลั่งอินซูลินหรือชนิดที่มีการหลั่งอินซูลินบางส่วน ทำให้ขาดฮอร์โมนอินซูลินหรือเกิดจากการดื้อต่อฤทธิ์ของอินซูลินทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในเลือดไปใช้ได้ เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง (chronic hyperglycemia) และเกิดความผิดปกติของการแมแทบอลิซึม (metabolism) ของคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีนจนนำไปสู่การเกิดภาวะแทรกซ้อนทั้ง macro และ microvascular dysfunctions เช่น โรคหัวใจ หลอดเลือดตีบแข็ง เป็นต้น (Duckworth, 2001) การศึกษาจำนวนมากพบว่าโรคเบาหวานทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นและลดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต่างๆ นำไปสู่การเพิ่มภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในหลายๆ เนื้อเยื่อ (Evan et al., 2002) ซึ่งโรคเบาหวานทั้งชนิด insulin dependent (type I) และ non-insulin dependent (type II) จะมีผลการเพิ่มภาวะ oxidative stress (Nazirogilu and Butterworht, 2005) ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของเซลล์โดยเฉพาะ fibroblasts และ neutrophils ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการหายของแผล ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์และการเจริญเติบโตของ epidermis ครอบคลุมแผลลดลงร่วมกับมีการตีบของหลอดเลือดภายในบริเวณของแผล (Ferguson et al., 1996) ในผู้ป่วยเบาหวานจะมีกระบวนการหายของแผลช้า การสร้างเนื้อเยื่อลดลง มีการติดเชื้อเนื่องจากการไหลเวียนเลือดไม่ดี หลอดเลือดตีบแข็ง ส่งผลให้ออกซิเจนไปเลี้ยงแผลน้อย (Ehrlichment et al., 1991; Jeffcoate and Harding, 2003) ซึ่งเป็นผลจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจากการหลั่งอินซูลินลดลงหรือภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin insufficiency or resistant) (Napoli et al., 1999)

การจัดการและการรักษาแผลไหม้ถึงชั้น cutaneous ยังคงเป็นปัญหาในปัจจุบัน ซึ่งการดูแลแผลไหม้ขึ้นกับระดับความรุนแรงของแผลไหม้ดังกล่าวข้างต้น เป้าหมายของการรักษาผู้ป่วยแผลไหม้อยู่ที่การป้องกันการติดเชื้อ การใช้ยาทาแผลเฉพาะภายนอก (topical antibiotic treatment) หรือปิดด้วยผลิตภัณฑ์ปิดแผล ร่วมกับการทำความสะอาดแผลทั้งแบบ occlusive dressing และ wet dressing จนกระทั่งเกิดกระบวนการ epithelialization ซึ่งจะมีเซลล์เยื่อบุผิวเคลื่อนที่เข้าหากันเซลล์งอกขยายตัวและปรับเรียงตัวครอบคลุมแผล โดยเซลล์เยื่อบุผิวที่บริเวณขอบบาดแผลจะแบ่งตัว

แล้วเคลื่อนไปบน granulation tissue เข้าหากลางบาดแผลทำให้เกิดการหายของแผล ในขณะที่แผลไหม้รุนแรงจำเป็นต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลร่วมกับการรักษาดังกล่าวข้างต้น ซึ่งยากแก่การประเมินผลและการรักษา (Heimbach et al., 1996; Papani, 2004)

ปัจจุบันการดูแลรักษาแผลไหม้จากความร้อน (burn) มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก มีวัสดุปิดแผล (burn wound dressing product) ใหม่ๆ ที่มีคุณภาพหลายชนิด การเลือกใช้วัสดุปิดแผลอย่างถูกต้องและการดูแลอย่างใกล้ชิดของแพทย์ จะทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้น ลดความทุกข์ทรมานของผู้ป่วยจากบาดแผลได้มากและลดการเกิดแผลเป็นหลังจากหาย การรักษาโดยการใช้ยาทาภายนอก (topical antibiotic) และวัสดุปิดแผลนั้นเหมาะที่จะใช้ในบาดแผลไฟไหม้แบบตื้น โดย topical antibiotic ที่นิยมใช้ในการรักษาแผลไหม้กันมากสุดคือ 1% ซิลเวอร์ซัลฟาไดอะซีน (silver sulfadiazine) เพราะมีฤทธิ์กว้างครอบคลุมเชื้อแบคทีเรีย ซึ่ง silver sulfadiazine ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียในการเกิดแผลไหม้ระดับสองและระดับสาม โดยการยับยั้งกระบวนการ DNA replication และเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของเชื้อจุลชีพ (Fox et al., 1968) แต่มักใช้ไม่ได้ผลในการรักษาแผลไหม้ขนาดใหญ่ (>50% total body surface area; TBSA) แม้ว่ายาตัวนี้จะเป็น broad spectrum antibiotic แต่มีข้อเสียอยู่มากคือไม่ดูดซึมผ่านผิวหนังที่ถูกทำลายตายติดยึดกับผิวนอกของแผล (eschar) ทำให้มีประสิทธิภาพต่ำในการรักษาแผลไหม้ที่เกิด eschar ร่วมกับมีการติดเชื้อ ส่วนอาการข้างเคียงของยาตัวนี้ก็เกิดขึ้นในระดับที่สูง เช่น ทำให้เกิดผื่น (rash) และเม็ดเลือดขาวต่ำ (leukopenia) จนทำให้กดไขกระดูก (bone marrow suppression) ได้เมื่อใช้ยาติดต่อกันเป็นเวลานานและนอกจากนี้การใช้ silver sulfadiazine ในผู้ป่วยขาดเอนไซม์ glucose-6-hosphate dehydrogenase (G6PD) อาจเป็นสาเหตุให้เกิด hemolytic anemia (Lodah et al., 1988; Noronha and Almeida, 2000; Chaiyaphruk, 2003) ได้

การรักษาแผลไหม้ที่เกิดจากความร้อนในปัจจุบันยังประสบปัญหาทั้งในเรื่องประสิทธิภาพของยาที่สามารถให้ผลดีในการรักษาแผลไหม้ระดับตื้นเท่านั้น รวมทั้งมีอาการข้างเคียงของยาค่อนข้างสูงและตัวยามีราคาสูงเนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นการพัฒนายาที่มีประสิทธิภาพผลข้างเคียงต่ำและราคาไม่แพงจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้ป่วย ทั้งนี้ประเทศไทยอุดมไปด้วยพืชพื้นบ้านและพืชสมุนไพรซึ่งใช้ในทางการแพทย์แผนโบราณ (traditional medicine) มานาน อีกทั้งปัจจุบันองค์กรต่างๆได้สนับสนุนและพยายามทำการศึกษาเพื่อพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทยมากขึ้น จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงเป็นแนวทางที่ดีในการที่จะเลือกมองหา

ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่มาต่อยอดองค์ความรู้และจัดเตรียมให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัย ใช้ง่าย ราคาถูก เพื่อเป็นทางเลือกให้กับผู้ป่วย

มะขามหวานเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคมากชนิดหนึ่งในประเทศไทยและสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน ปัจจุบันเริ่มมีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศแต่ยังมีปริมาณน้อย แหล่งปลูกมะขามหวานในประเทศไทยพบได้หลายพื้นที่ เช่น เพชรบูรณ์ แพร่ น่าน ลำปาง พิษณุโลก อุตรดิตถ์ พะเยา เลย มุกดาหาร นครราชสีมา อุบลราชธานี ชัยภูมิ หนองคาย สกลนคร นครพนม อุดรธานี ขอนแก่น หนองบัวลำภู อำนาจเจริญ จันทบุรี สระแก้ว จังหวัดที่ปลูกมะขามหวานมากที่สุด จังหวัดเพชรบูรณ์ 98,240 ไร่ รองลงมาคือ จังหวัดเลย 95,491 ไร่ จะเห็นได้ว่าประเทศไทยมีทรัพยากรมะขามในปริมาณมากและสามารถรองรับการผลิตปริมาณมากได้ มะขาม (*Tamarindus indica* L.) จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ที่เติบโตในแถบภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประกอบด้วยมะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน พันธุ์มะขามหวานในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์สีทอง พันธุ์ศรีชมพู พันธุ์ขันตี พันธุ์อินทผลัมและพันธุ์ประกายทอง ส่วนพันธุ์มะขามเปรี้ยวในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ฝักโตและพันธุ์ศรีสะเกษ 019 โดยมะขามมักนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหาร นอกจากนี้มะขามยังจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีบทบาทในด้านการแพทย์ทางเลือกเนื่องจากมีสรรพคุณทางการบำบัดรักษา โดยมีสรรพคุณช่วยในการย่อย บำรุงเลือด ระบายและขับลม ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดยังช่วยสมานแผลจากไฟไหม้ รักษาแผลสดและรักษาแผลที่ถูกไฟลวก รักษาแผลเบาหวาน ส่วนเมล็ดยังมีฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วง ช่วยขับพยาธิและทำให้อาเจียน (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992; Sudjaroen et al., 2005; Komutarina et al., 2004) เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นส่วนที่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่าน่าจะนำมาใช้ประโยชน์และสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับเกษตรกรได้ การศึกษาในปัจจุบันพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะขามและเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างและมีสารต้านอนุมูลอิสระสูงโดยเฉพาะมีสารประกอบ flavonoids เช่น tannins, polyphenol, anthocyanidin และ oligomeric proanthocyanidins (Pumthong, 1999) อยู่ในปริมาณสูง ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial effect)

จากการศึกษาหลายการศึกษา พบว่ามะขามมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยออกฤทธิ์เป็น broad spectrum เช่น การศึกษาสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบมะขามมีผลต้านเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ทำให้มีบทบาทในการรักษา melioidosis (Muthu et al., 2005) สารสกัดมะขามด้วยเมทานอลและอะซีโตนมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Klebsiella pneumoniae* ซึ่งฤทธิ์

ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเทียบเท่ากับยาต้านจุลชีพมาตรฐาน amikacin และ piperacillin (Vaghasiya and Chanda, 2009) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยน้ำ เอทานอลและอะซีโตน ในหลอดทดลองพบว่ายับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบ แกรมบวกและเชื้อรา โดยมีความแรงในการต้านเชื้อ *Salmonella paratyphi, Bacillus subtilis, Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสารประกอบเคมี favonoids และ polyphenols มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก (Doughari, 2006; Abukakar et al., 2008)

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant effects)

เมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ phenolic เป็นหลัก (Soong et al., 2004; Sudjaroen et al., 2005) สารสำคัญ 4 ตัวที่สกัดได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ 2-hydroxy-3', 4'-dihydroxyacetophenone, methyl 3,4-dihydroxybenzoate, 3,4-dihydroxyphenyl acetate และ epicatechin (Tsuda et al., 1994) สารสกัดจากมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (64.5-71.7%) โดยยับยั้งการเกิดอิมัลชันของกรดไขมันไลโนเลอิกในหลอดทดลองและพบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ butylated hydroxyl anisole แต่สูงกว่าวิตามินซี (Siddhuraju, 2007) สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอทานอลพบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเปอร์ออกไซด์ (peroxide) (Luengthanaphol et al., 2004) และออกฤทธิ์โดยการไปจับกับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) โดยตรง เมื่อทดสอบด้วยวิธี 2, 2–diphenyl–1– picrylhydrazyl (DPPH) (Vyas et al., 2009) และ โดยวิธี thiocyanate และ thiobarbituric (Osawa et al., 1994) โดยพบว่าสารสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด (Luengthanaphol et al., 2004) สารสกัดเอทานอลของผลอ่อนมะขามพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดโคเลสเตอรอลในหนูแฮมสเตอร์ที่มีโคเลสเตอรอลสูง (Martinello et al., 2006; Ramos et al., 2003) การศึกษาของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ยังพบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าวิตามินอี (α-tocopherol) ถึง 3.14 เท่าซึ่งมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (half maximal inhibitory concentration; IC_{50}) เท่ากับ 53.42 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3. ฤทธิ์ต้านการอักเสบและลดปวด (anti-inflammatory and analgesic effects)

เปลือกต้นมะขามถูกนำมาใช้ในการรักษาทางการแพทย์แผนโบราณเพื่อรักษาอาการปวดและลดการอักเสบ การศึกษาในปัจจุบันได้ทำการทดสอบฤทธิ์ลดปวดของสารสกัดจากเปลือกต้นมะขาม

โดยใช้วิธี hot plate test และ writing test ซึ่งใช้กรดอะซิติกกระตุ้น พบว่าสารสกัดด้วย petroleum ether มีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ และองค์ประกอบทางเคมี sterols และ triterpenes ในสารสกัดอาจจะเป็นตัวที่มีฤทธิ์ในการลดปวด (Dighe et al., 2009) นอกจากนี้สารสกัดผลอ่อนมะขามด้วยน้ำมีฤทธิ์ลดปวดทั้งในระดับ peripheral และ central (Khalid et al., 2010) และสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยลดการสร้าง nitric oxide และ interferon gamma ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ได้รับทั้งในการศึกษาแบบนอกร่างกาย (*in vitro*) และในร่างกาย (*in vivo*) (Komutarin et al., 2004) เช่นเดียวกับสารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลของใบมะขามพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยขึ้นกับขนาดที่ได้รับในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan และมีฤทธิ์ลดปวดที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยความร้อนโดยขึ้นกับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ (Bhadoriya et al., 2012)

4. ฤทธิ์สมานแผล (wound healing)

เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามถูกระบุไว้ในการแพทย์แผนโบราณว่าใช้ในการรักษาแผลทั้งที่เกิดจากการผ่าตัด แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก แผลสดและฝี นอกจากนี้เปลือกหรือใบมะขามก็สามารถใช้ในการรักษาแผลซึ่งใช้เป็นยาภายนอก รักษาเฉพาะจุดที่เป็น ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบยาต้มหรือเป็นผงหรือยาพอก และอาจใช้ตัวเดียวหรือใช้ร่วมกับยาอื่นๆ (Kheraro and Adam, 1974; Fandohan, 2007; Diallo et al., 2002; Inngjerdingen et al., 2004)

การเกิดแผลไหม้อาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น น้ำร้อนลวก การสัมผัสกับพื้นผิวที่ร้อน รังสีอัลตราไวโอเล็ต สารเคมี กระแสไฟฟ้า เป็นต้น แม้กระทั่งการแพ้ยาบางอย่างก็ยังทำให้เกิดแผลที่มีลักษณะเหมือนแผลไหม้ได้ จากสถิติขององค์การอนามัยโลกเมื่อปี 2002 พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากแผลไฟไหม้ถึง 332,000 คน มากกว่าครึ่งอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสองในสามเป็นสตรี นอกจากนี้แผลไหม้ที่ไม่ทำให้ถึงตายก็ยังเป็นสาเหตุของความสูญเสียต่างๆ มากมายทั้งค่าใช้จ่ายในการรักษาต้องพักรักษาตัวในโรงพยาบาล การสูญเสียอวัยวะหรือแม้กระทั่งทำให้เกิดความพิการถาวรซึ่งยังเป็นปัญหาทางการแพทย์เกี่ยวกับการรักษาแผลไหม้ในปัจจุบัน นอกจากนี้ยาที่มีใช้ในปัจจุบันให้ผลดีในการเกิดแผลไหม้ระดับแรกเท่านั้นและยังประสบปัญหาเรื่องอาการข้างเคียงของยาและค่าใช้จ่ายที่สูง จากข้อมูลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาดังกล่าวข้างต้นของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและส่วนต่างๆของมะขามมีฤทธิ์สมานแผล ต้านจุลชีพ ต้านการอักเสบและลดปวด ทั้งยังประกอบด้วยสารสำคัญที่เป็นประโยชน์และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จากข้อมูลดังกล่าวชี้บ่งแนวโน้มว่ามะขามและส่วนของมะขามเป็นพืช

สมุนไพรไทยที่มีศักยภาพสูงที่จะได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาและสมานแผล ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลงานวิจัยในประเทศไทย ที่ทำการศึกษาในรูปแบบยาเตรียมของยาทาภายนอก (topical administration) ในการรักษาแผลไหม้ทั้งในภาวะปกติและในคนที่เป็นเบาหวาน ซึ่งถ้าผลการวิจัยในครั้งนี้ได้ผลที่มีประสิทธิภาพสูง คณะผู้วิจัยจะดำเนินการผลิตในรูปแบบผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกในการรักษาแผลไหม้และดำเนินการวิจัยในมนุษย์ในขั้นต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกที่มีประสิทธิภาพในการสมานแผลไหม้จากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ภายในระยะเวลา 2 ปี

ปีที่ 1

1. เพื่อทราบปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์รูปแบบครีมจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดและการแพ้ของผลิตภัณฑ์ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

ปีที่ 2 (ยังไม่ได้รับอนุมัติ)

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์สมานแผลไหม้ระดับสองของผลิตภัณฑ์ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในหนูที่เป็นและไม่เป็นเบาหวาน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและกลไกการออกฤทธิ์ของครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในหนูที่เป็นและไม่เป็นเบาหวานที่ทำให้เกิดแผลไหม้ระดับสอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากผลงานวิจัย

ปีที่1 ได้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและรูปแบบผลิตภัณฑ์ครีมที่นำไปใช้ทดสอบฤทธิ์สมานแผลไหม้ในสัตว์ทดลองที่เป็นและไม่เป็นเบาหวาน

ปีที่2 ได้ข้อมูลประสิทธิภาพ ชนิด ปริมาณและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม และได้ผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีประสิทธิภาพในการสมานแผลไหม้ระดับที่ 2 และยื่นจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินวิจัย (Material and Method)

2.1 อุปกรณ์

1. Centrifuge (Hettich, Germany)
2. CO_2 incubator (Thermo Forma Scientific, USA)
3. ELISA microplate reader (Biotex, USA)
4. Freezer -80 °C (Thermo Forma Scientific, USA)
5. Freezer -20 °C (Thermo Forma Scientific, USA)
6. Inverted microscope (Olympus IX70, Japan)
7. Rotary evaporator (Buchi, Japan)
8. UV-spectrophotometer (Thermo Forma Scientific, USA)
9. Vertical laminar flow cabinet

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1.1 การเตรียมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

คณะผู้วิจัยเลือกเมล็ดมะขามสายพันธุ์ที่ปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์ ได้แก่ มะขามหวานพันธุ์สีทองหนัก มะขามหวานพันธุ์สีทองเบา มะขามหวานพันธุ์ศรีชมพู มะขามหวานพันธุ์ขันตี และมะขามพันธุ์เปรี้ยวยักษ์ ซึ่งอ้างถึงจากการศึกษาของ ผศ.ดร.ทรงวุฒิ ยศวิมลวัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่ามีปริมาณสารประกอบ phenolic ซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงยึดตามการศึกษาดังกล่าวโดยเลือกใช้เมล็ดมะขามโดยไม่ระบุสายพันธุ์ นำเมล็ดมะขามไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน จากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออก นำเปลือกมาบดละเอียดและสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% ในอัตราส่วน 1:5 จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และทำการระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นแยกสาร (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีลักษณะเป็นผงสีแดงน้ำตาล จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้ดูดความชื้น

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

2.1.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (total phenolic compound) ในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

วิธีการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์- สารละลายมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 1, 5, 10, 25, 50, และ 100 ug/mL มาทำปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐาน gallic acid แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตรกับ Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2. ตั้งสารละลายในข้อ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3. เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 765 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ gallic acid โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน y และความเข้มข้นของ gallic acid เป็นแกน x

วิธีวิเคราะห์- ตัวอย่างสารสกัด

1. นำสารละลายสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น100 ug/mL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2. ตั้งสารละลายในข้อ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3. เติมโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 765 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากข้อ 4 ไปเทียบหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกรวมเฉลี่ยในรูปกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัด 100 กรัม

2.1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoid content) ในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

วิธีการวิเคราะห์

วิธีวิเคราะห์- สารละลายมาตรฐาน

1. นำสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ug/mL มาทำปฏิกิริยาเพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐาน quercetin แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 500 ไมโครลิตรกับอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2. เติม 1 โมล โปแทสเซียมอะซิเตต ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร

3. ตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 415 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ quercetin โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน y และความเข้มข้นของ quercetin เป็นแกน x

วิธีวิเคราะห์- ตัวอย่างสารสกัด

1. นำสารละลายสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 100 ug/mL ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2. เติม 1 โมล โปแทสเซียมอะซิเตต ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร

3. ตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที ในที่มืด

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 415 นาโนเมตร

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากข้อ 4 ไปเทียบหาความเข้มข้นของสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเฉลี่ยในรูปกรัมของ quercetin equivalents ต่อสารสกัด 100 กรัม

2.1.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidinns content) ในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

<u>วิธีวิเคราะห์- ตัวอย่างสารสกัด</u>

1. นำสารละลายสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 100 ug/mL ปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับ 5 % HCl in n-butanol 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

2. เติม 10% $NH_4Fe(SO_4)$ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

3. ตั้งสารละลายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ในที่มืดและตั้งสารละลายจนเย็น

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 500 นาโนเมตร

5. ความเข้มข้นของสารประกอบโปรแอนโธไซยานิดินรวมเฉลี่ยแสดงเป็น observed absorbance value

2.1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินรวม (tannin content) ในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

1. ชั่งสารสกัด 100 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ 10 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและแบ่งมา 5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร และกรอง

2. แบ่งสารละลายที่ได้ในข้อ 1 มา 2 มิลลิลิตรและเติม phosphomolybdotungstic reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

4. เติม 29% sodium carbonate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร จะได้ค่า **A1**

6. ชั่ง hide powder จำนวน 6 กรัม เขย่ากับน้ำ 80 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองตะกอนทิ้ง เก็บส่วนที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร

7. แบ่งสารละลายที่ได้ในข้อ 6 มา 5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร

8. ดูด hide powder solution ที่ได้ในข้อ 7 จำนวน 2 มิลลิลิตรและเติม phosphomolybdotungstic reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

10.เติม 29% sodium carbonate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

11.วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร จะได้ค่า **A2**

12.ชั่ง pyrogallol จำนวน 12.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำ 500 มิลลิลิตร

13. ดูดสารละลายในข้อ 12 จำนวน 2 มิลลิลิตรและเติม phosphomolybdotungstic reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

14.เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

15.เติม 29% sodium carbonate ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและตั้งสารละลายที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด

16.วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร จะได้ค่า **A3**

17. คำนวน %tannin content $= \frac{62.5(A1-A2)m2}{A3 \times m1}$

2.1.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในเซลล์เพาะเลี้ยงคีราติโนไซต์ HaCaT โดยวิธี MTT assay

เป็นการวิเคราะห์ผลเชิงปริมาณ โดยทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) ซึ่งเอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่อยู่ใน mitochondria ยังคงสามารถทำงานได้ในเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสาร MTT ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น formazan product ที่มีสีม่วง หลังจากนั้นละลายผลึก formazan ภายในเซลล์ด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวัดหาปริมาณ formozan product ที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นตัวชี้วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยวัดค่า Optical Density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

เลี้ยงเซลล์ HaCaT จำนวน 5 x 10^4 เซลล์ ใน 96 well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10, L-glutamine ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ Penicillin-Streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน culture flask บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25 และ 50 บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 3 ครั้ง แล้วเติม MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติม DMSO นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

2.1.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยวิธี Broth microdilution method

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ *Staphylococcus aureus* ATCC29213 และ *Escherichia coli* ATCC25922

Broth microdilution test ทำใน microtiter plate 96-well โดยเจือจาง stock solution ด้วย broth แบบ 2-fold serial dilution มีหลุมควบคุมเป็น broth ที่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร ในแต่ละหลุมจะมีปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับขนาดแล้ว (ใช้

เชื้อประมาณ 10^5 CFU/มล.) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมแล้วปิดฝาก่อนนำไปบ่มเพาะ อ่านค่า minimal inhibition concentration (MIC) โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่า และใช้ tetrazolium dye ชนิด p-Iodonitrotetrazolium violet (INT) ซึ่งเป็นสารบ่งชี้การเจริญของแบคทีเรีย (biologically active organisms) โดยหากเชื้อมีการเจริญจะสามารถเปลี่ยนสาร INT เป็นสารสี

2.1.5 วิธีการเตรียมสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในรูปแบบครีม

2.1.5.1 สูตรครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

Oil phase

Cetosteryl alcohol 10.0 %

White soft paraffin 10.0 %

Liquid paraffin 10.0 %

Chlorocresol 0.15 %

Water phase

Cetomacrogol 1000 3.0 %

Sodium dihydrogen phosphate 2.50 %

Citric acid monohydrate 0.5 %

EDTA 0.01 %

Propylene glycol 5.00%

Water

Dye, Perfume

สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10

2.1.5.2 การประเมินคุณภาพครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

การประเมินคุณภาพของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม มีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

<u>ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ</u> โดยดูจากลักษณะภายนอกของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม เมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ และหลังการทดสอบความคงตัว โดยพิจารณาในเรื่องต่อไปนี้

1. ลักษณะเนื้อครีม สังเกตลักษณะเนื้อครีมที่มองเห็นโดยดูเนื้อละเอียด หยาบ มันวาว มีผลึก แห้ง มี oil droplet

2. สี สังเกตสีของครีมที่มองเห็นว่าเป็นน้ำตาลแดงของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หรือสีอื่นๆ

3. กลิ่น ให้ดมกลิ่นของครีมแล้วพบว่ามีกลิ่นของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ไม่มีกลิ่นหรือมีกลิ่นอื่นๆ

4. การไหลของครีม นำขวดของครีมมาเอียงทำมุม 45 องศาเซลเซียสกับแนวระดับ จับเวลาตั้งแต่เริ่มเอียงจนครีมไหลมาถึงปากภาชนะ โดยแบ่งเป็นระดับดังนี้

≤ 3 วินาที	ไหลได้ดีมาก	++++
4-10 วินาที	ไหลได้ดี	+++
≥ 10 วินาที	ไหลได้ช้า	++
	ไม่ไหลเลย	+

2.1.5.3 การเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา สังเกตว่าครีมมีจุดดำหรือเส้นใย ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นหรือไม่

\+ มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา

\- ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา

2.1.5.4 การเกิด creaming เป็นลักษณะที่วัตภาคภายในแยกไปรวมตัวกันลอยอยู่ชั้นบนหรือนอนก้นภาชนะ ทำให้เห็นแยกเป็นชั้นครีมและชั้นอีมัลชั่นที่เจือจาง เกิดขึ้นไม่ถาวร เมื่อเขย่าสามารถทำให้ชั้นที่แยกผสมนี้ผสมกันได้ดังเดิม

\+ มีการเกิด creaming

\- ไม่มีการเกิด creaming

2.1.5.5 การเกิด cracking เป็นลักษณะที่หยดวัตภาคภายในเกิดหลอมรวมเข้ากันเป็นหยดที่โตขึ้น จนแยกออกเป็นชั้นน้ำและน้ำมันอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นความคงตัวที่เกิดขึ้นถาวร

\+ มีการเกิด cracking

- ไม่มีการเกิด cracking

2.1.5.6 ประเมินคุณสมบัติทางเคมี โดยทดสอบความเป็นกรด–ด่างโดยใช้ universal indicator pH 1-11

2.1.5.7 ประเมินความคงตัวของครีมเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยวิธี freeze and thaw cycle โดยนำครีมที่เตรียมไว้มาใส่ตู้เย็นที่ประมาณ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่งโมง แล้วนำมาใส่ตู้อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่งโมง ทำเช่นนี้นับเป็น 1 cycle ทำการทดสอบทั้งหมด 6 cycle ครีมที่ไม่แยกชั้นจึงจะถือว่ามีความคงตัวทางกายภาพดี

2.1.6 การทดสอบอาการแพ้ต่อผิวหนังของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยทดสอบด้วยวิธี skin allergy test

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 180-250 กรัม ทั้ง 2 เพศ จากสถาบันสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา จำนวน 20 ตัวต่อเพศ นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของสถาบันสัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นาน 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง โดยควบคุมสลับช่วงมืดและสว่าง ช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้น้ำและอาหารโดยไม่จำกัดปริมาณ ก่อนเริ่มการทดลองจะต้องผ่านจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการพิจารณการใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ก่อน นำสัตว์ทดลองมา 24 ตัวแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มต่อเพศ กลุ่มละ 5 ตัวต่อเพศ หลังจากนั้นโกนขนบริเวณที่ต้องการทดสอบคือด้านหลังออกจนเกลี้ยงขนาด 2x2 เซนติเมตร นำสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ในรูปแบบครีม ทาบริเวณที่โกนขน ส่วนกลุ่มควบคุมทาครีมพื้นที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หลังจากนั้นสังเกตุการเปลี่ยนแปลง ถ้าสารทำให้เกิดปฏิกิริยาแพ้ จะแสดงปฏิกิริยาภายใน 48-72 ชั่วโมง การทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ เป็นการทดสอบว่าผลิตภัณฑ์มีผลเสียหรือเป็นอันตรายต่อร่างกายหรือไม่ เช่น ทำให้เกิดการแพ้หรือระคายเคืองหรือไม่ โดยการทำ patch test โดยแสดงการกำหนดค่าการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังดังนี้

0 ไม่มีการปลี่ยนแปลงของผิวหนัง (ผิวหนังปกติ)

1 ผิวหนังแดงเล็กน้อย

2 ผิวหนังแดงปานกลาง บวมที่ขอบและมีตุ่มนูนเล็กน้อย

3 ผิวหนังแดงมาก มีตุ่มบวมนูนรุนแรงและอาจพบตุ่มน้ำใส

4 มีปฏิกิริยาการแพ้อย่างรุนแรง ลามออกไปรอบนอกบริเวณทดสอบ

2.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

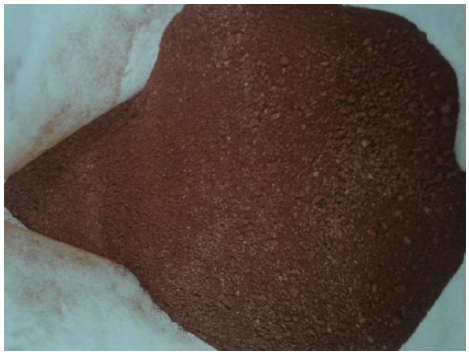
ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean, SEM) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Post-hoc comparisons test ซึ่งพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p <0.05)

บทที่ 3

ผลการทดลอง (Result)

3.1 การเตรียมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

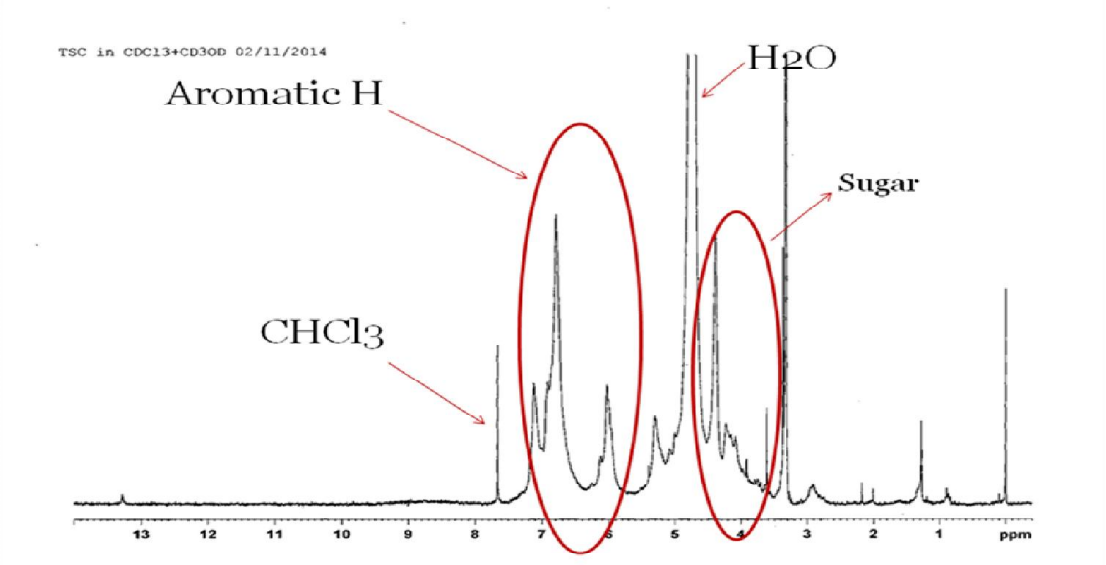
จากรูปที่ 1 การเตรียมสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล ได้ %yeild เท่ากับ 23.84 ซึ่งจะได้สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลแดงดังรูปที่ 1 จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้ดูดความชื้นสำหรับทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 ผงสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

จากรูปที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยใช้วิธี nuclear magnetic resonance (NMR) ซึ่งวิเคราะห์สัญญาณโปรตอนที่พบในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม



รูปที่ 2 สารสำคัญที่พบในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยใช้ NMR

จากรูปที่ 2 พบสัญญาณโปรตอนของ aromatic hydrocarbon (aromatic H) เป็นหลัก ซึ่งน่าจะเป็นสัญญาณของสารกลุ่ม polyphenol เช่น tannin เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสัญญาณโปรตอนของสารกลุ่มน้ำตาลด้วย ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย NMR ยังไม่สามารถสรุปถึงชนิดของสารได้ชัดเจน

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วยการวัดสารประกอบฟินอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ โปรแอนโธไซยานิดินและแทนนินในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ดังตารางที่ 1

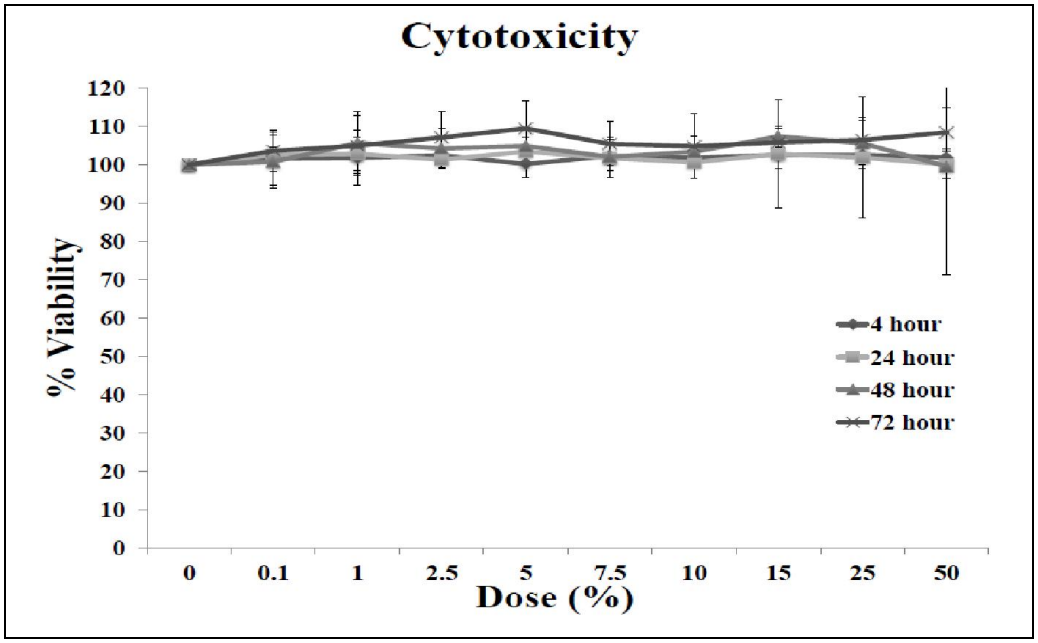
ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟินอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ โปรแอนโธไซยานิดินและแทนนินในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

	Total phenolic compound (g GAE/100 g dry extract)	Flavonoid content (g quercetin/100 g dry extract)	Proanthocyanidin (A500) in 100 ug/mL	Tannin (%pyrogallol equivalent)
Tamarind seed coat extract	26.43±0.56	3.54±0.06	1.43±0.08	21.49±1.49

3.3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT โดยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT ซึ่งดูผลของสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT โดยเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.1, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 25 และ 50%) เป็นเวลา 4, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์จำนวนของเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ (cell viability) ด้วย MTT assay (รูปที่ 3) พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ทุกความเข้มข้นยังสามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT มีการแบ่งตัวและเจริญเติบโตเหมือนกับกลุ่มควบคุม จากรูปที่ 3 จึงสรุปได้ว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไม่มีความ

เป็นพิษต่อเซลล์ทั้งในความเข้มข้นที่ต่ำและสูง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีความปลอดภัยที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ครีม



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อความเป็นพิษของเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง HaCaT แสดงผลเป็น % of control (mean ± SEM) (N=4)

3.4 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยวิธี Broth microdilution method

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยวิธี Broth microdilution method พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมบวก แต่ไม่มีผลต่อเชื้อแกรมลบ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

Bacterial strains	Minimal Inhibitory Concentration (µg/ml)	Minimal bactericidal Concentration (µg/ml)
Staphylococcus aureus ATCC29213	64	>1204
Escherichia coli ATCC25922	>1204	>1204

3.5 การเตรียมครีมจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

3.5.1 สูตรครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและการประเมินคุณภาพครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

จากการเตรียมครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 นั้นประกอบด้วยองค์ประกอบดังนี้

Oil phase: cetosteryl alcohol 10.0 %, white soft paraffin 10.0 %, liquid paraffin 10.0 %, chlorocresol 0.15 %

Water phase: cetomacrogol 1000 3.0 %, sodium dihydrogen phosphate 2.50 %, citric acid monohydrate 0.5 %, EDTA 0.01 %, propylene glycol 5.00%, water, dye, perfume

ได้ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามดังรูปที่ 4

ครีมพื้น สารสกัดร้อยละ 2.5 สารสกัดร้อยละ 5 สารสกัดร้อยละ 10

รูปที่ 4 ครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

การประเมินคุณภาพของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามซึ่งจะประเมินทั้งลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เตรียมเสร็จใหม่ๆ และทดสอบความคงตัวของครีมดังแสดงในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 พบว่าลักษณะทางกายภาพและเคมีของทั้งครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามทั้งที่เตรียมเสร็จใหม่และหลังจากการทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze and thaw cycle พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดี รวมทั้งมีความคงตัวสูง

ตารางที่ 3 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ

การประเมิน	**ครีมพื้น**	**ครีมเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม**		
		2.5% tamarind seed coat extract	**5% tamarind seed coat extract**	**10% tamarind seed coat extract**
ลักษณะเนื้อครีม	เนื้อเนียนละเอียด หนืดพอดี	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด
สี	ขาว	น้ำตาลแดงอ่อน	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดงเข้ม
กลิ่น	หอม	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น
pH	7	6	6	6
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
การไหลของครีม	++	++	++	++
ความรู้สึกเวลาทา	ทาง่าย ซึมเข้าผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมเข้าผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมเข้าผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมเข้าผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ
การเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา
การเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming
การเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking

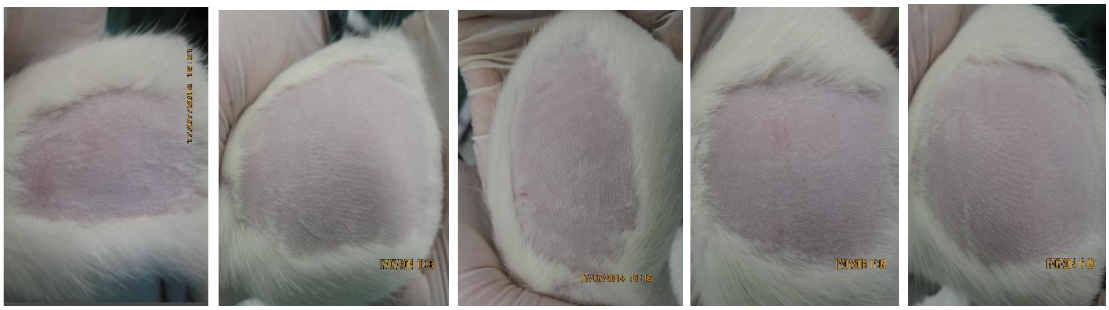
ตารางที่ 4 ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม หลังการทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze and thaw cycle

การประเมิน	**ครีมพื้น**	**ครีมเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม**		
		2.5% tamarind seed coat extract	**5% tamarind seed coat extract**	**10% tamarind seed coat extract**
ลักษณะเนื้อครีม	เนื้อเนียนละเอียด หนืดพอดี	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด	เนื้อเนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด
สี	ขาว	น้ำตาลแดงอ่อน	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดงเข้ม
กลิ่น	หอม	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น
pH	7	6	6	6
การแยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น	ไม่แยกชั้น
การไหลของครีม	++	++	++	++
ความรู้สึกเวลาทา	ทาง่าย ซึมเข้าผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมง่าย ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมง่าย ไม่เหนอะหนะ	ทาง่าย ซึมง่าย ไม่เหนอะหนะ
การเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา	ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา
การเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming	ไม่มีการเกิด creaming
การเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking	ไม่มีการเกิด cracking

3.6 ผลทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นของครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

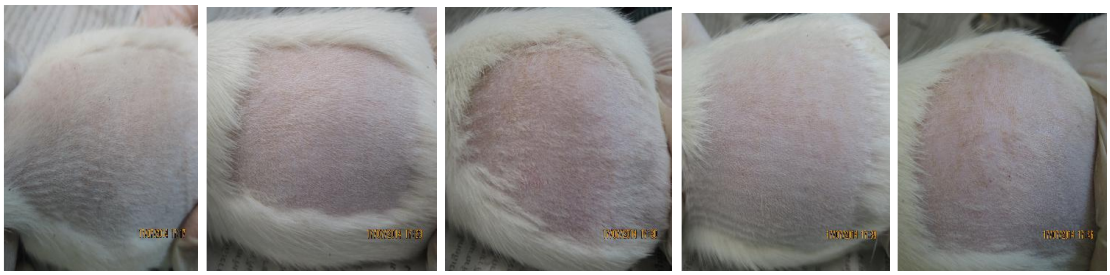
จากการทดลองการระคายเคืองของครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อผิวหนังทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย พบว่าไม่มีสัตว์ทดลองตัวใดมีการระคายเคืองหรือแพ้ต่อครีมพื้น และครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 จึงสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง ดังรูปที่ 5

เพศเมีย



Control ครีมพื้น สารสกัดร้อยละ 2.5 สารสกัดร้อยละ 5 สารสกัดร้อยละ 10

เพศผู้



Control ครีมพื้น สารสกัดร้อยละ 2.5 สารสกัดร้อยละ 5 สารสกัดร้อยละ 10

รูปที่ 5 การทดสอบการระคายเคืองของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 4
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

มะขาม (*Tamarindus indica* L.) จัดเป็นพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) เป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคมากชนิดหนึ่งในประเทศไทยและสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน ประกอบด้วยมะขามเปรี้ยวและมะขามหวาน พันธุ์มะขามหวานในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์สีทอง พันธุ์ศรีชมพู พันธุ์ขันตี พันธุ์อินทผลัมและพันธุ์ประกายทอง ส่วนพันธุ์มะขามเปรี้ยวในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ฝักโตและพันธุ์ศรีสะเกษ 019 โดยมะขามมักนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศสำหรับปรุงอาหาร นอกจากนี้มะขามยังจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย และมีบทบาทในด้านการแพทย์ทางเลือก เนื่องจากมีสรรพคุณทางการบำบัดรักษา โดยผลมีสรรพคุณช่วยในการย่อย บำรุงเลือด ระบายและขับลม ส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดยังช่วยสมานแผลที่โดนไฟไหม้ รักษาแผลสดและรักษาแผลที่ถูกไฟลวก รักษาแผลเบาหวาน ส่วนเมล็ดยังมีฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วง ช่วยขับพยาธิและทำให้อาเจียน (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992; Sudjaroen et al., 2005; Komutarina et al., 2004) เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นส่วนที่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญตรงนี้ การวิจัยครั้งนี้จึงนำเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบครีม เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยการศึกษาในช่วงปีแรกจะเป็นการเตรียมสารสกัด การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและการเตรียมครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามรวมทั้งการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม อีกทั้งยังทดสอบการแพ้ของครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอทานอลจะได้ผงสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยมี % yeild เท่ากับ 23.84 และพบองค์ประกอบของสารในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยพบว่าในสารสกัดมีสารประกอบฟีนอลมากที่สุด รองลงมาเป็นสารแทนนิน ฟลาโวนอยด์และโปรแอนโธไซยานิดิน ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบสารสำคัญเหล่านี้ในองค์ประกอบของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (Suksomtip et al., 2010; Nakchat et al., 2013) การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนัง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม เป็นสารที่มีความปลอดภัยสูงในการใช้ การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามพบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลชีพแกรมบวกแต่มีผลต้านจุลชีพแกรมลบเล็กน้อย ซึ่งจากการทดลองในการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยน้ำ เอทานอล

และอะซีโตนมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบ แกรมบวกและเชื้อรา โดยมีความแรงในการต้านเชื้อ *Salmonella paratyphi, Bacillus subtilis, Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสารประกอบเคมี favonoids และ polyphenols มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก (Doughari, 2006; Abukakar et al., 2008)

การพัฒนาครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเล็ดมะขามมีลักษณะทางกายภาพและเคมีของทั้งครีมพื้นและครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามทั้งที่เตรียมเสร็จใหม่และหลังการทดสอบความคงตัวโดยวิธี freeze and thaw cycle พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีดี รวมทั้งมีความคงตัวที่สูง นอกจากนี้เมื่อนำครีมมาทดสอบการระคายเคืองเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์โดยดูผลการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง พบว่าผลิตภัณฑ์ครีมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังแสดงให้เห็นว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัยต่อผิวหนัง และน่าจะนำมาพัฒนาต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นและเป็นการพัฒนาสูตรครีมเท่านั้น ยังไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการสมานแผลไหม้ในสัตว์ทดลองที่เป็นและไม่เป็นเบาหวาน จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าครีมมีฤทธิ์สมานแผลไหม้หรือไม่ ต้องทำการทดลองในขั้นต่อไปซึ่งอยู่ในปีที่ 2 ของโครงการวิจัยและยังไม่ได้รับอนุมัติทุนวิจัย

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านจุลชีพแกรมบวกเนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลและแทนนินที่สูง.รวมทั้งมีความปลอดภัย ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถพัฒนาให้มีศักยภาพต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

1. Abukakar M.G., Ukwuani A.N. and Shehu R.A. 2008. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Tamarindus Indica* pulp extract. *Asian J Biochem*. 3: 134–138.
2. Bhadoriya S. S., Mishra V., Raut S., Ganeshpurkar A. and Jain S. K. 2012. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of a Hydroethanolic Extract of *Tamarindus indica* Leaves. *Sci Pharm*. 80(3): 685–700.
3. Blakytny J.W. and Jude E. 2006. The molecular biology of chronic wound and delay healing in diabetes. *Diabetes Medicine*. 23: 549.
4. Cioffi, W.G. 2001. What's new in burns and metabolism. *J AM Coll Surg*. 192: 241-266.
5. Chaiyaphruk S. Topical antimicrobial agents. *Thailand Medical Time*. (1-15 June 2003): 2-10.
6. Demling G.H. and LaLonde C. 1990. Early postburn lipid peroxidation: effect of ibuprofen and allopurinol. *Surgery*. 107: 85-3.
7. Diallo D., Sogn C., Samaké F.B., Paulsen B.S., Michaelsen T.E. and Keita A. 2002. Wound healing plants in Mali, the Bamako region. An ethnobotanical survey and complement fixation of water extracts from selected plants. *Pharm Biol*. 40: 117-28.
8. Dighe N.S., Pattanl S.R., Nirmal S.A., Kalkotwar R.S., Gaware V.M. and Hole M.B. 2009. Analgesic activity of Tamarindus indica. *Res J Pharmacogn Phytochem*. 1: 69-71.
9. Doughari J.H. 2006. Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. *Trop J Pharm Res.* 5: 597-603
10. Duckworth W.C. 2001. Hyperglycemia and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler*. 3: 383-91.
11. Ehrichman R.J., Seckel B.P., Bryan D.J. and Moschella C.J. 1991. Common complications of wound healing. Prevention and management. *Surg Clin North Am*. 71: 1323-1351.
12. Enoch S. and Leaper D.J. 2004. Basic science of wound healing. *The medicine Publishing Company Ltd .*

13. Evan J.L., Goldfine I.R.A.O., Maddux B.A. and Grodsky G. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathway: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 23(5): 599-622.
14. Fandohan A.B. 2007. Structure des populations et importance socio-culturelle du tamarinier (*Tamarindus indica* L.) dans la commune de Karimama (Bénin). Bénin, Abomey-Calavi, Bénin: Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi (UAC).
15. Farnsworth N.R. and Bunyapraphatsara N. 1992. Thai Medicinal Plants Recommended for Primary Health Care System. Prachachon, Thailand.
16. Ferguson M.W., Herrick S.E., Spencer M.J., Shaw J.E., Boulton A.J. and Sloan P. 1996. The histology of diabetic foot ulcers. *Diabet Med*. 13: s30-33.
17. Heimbach D., Mann R., and Engrav L. 1996. Evaluation of the burn wound. In: Herndon DN. Total Burn Care. London: Saunders. 81.
18. Inngjerdingen K., Nergard C.S., Diallo D., Mounkoro P.P. and Paulsen B.S. 2004. An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland Mali, West Africa. *J Ethnopharmacol*. 92: 233-44.
19. Jeffcoate W.J. and Harding K.G. 2003. Diabetic foot ulcer. *Lancet*. 361: 1545-1551.
20. Khalid S., Shaik Mossadeq W.M., Israf D.A., Hashim P., Rejab S., Shaberi A.M., Mohamad A.S., Zakaria Z.A. and Sulaiman M.R. 2010. In vivo Analgesic Effect of Aqueous Extract of *Tamarindus indica* L. Fruits. *Med Princ Pract*. 19: 255–259
21. Kheraro J. and Adam J.G. 1974. La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et Toxiques. Vigot et Frères, Paris p. 1011.
22. Kloppenberg F.W.H., Beerthuizen G.I.J.M. and Ten Duis H.J. 2000. Perfusion of burn wounds assessed by Laser Doppler Imaging is related to burn depth and healing time. *Burn*. 27: 359-363.
23. Komutarin T., Azadi S., Butterworth L., Keil D., Chitsomboon B., Suttajit M. and Meade B.J. 2004. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by

murine macrophages in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 42(4): 649–658.

24. Korthuis R.J., Anderson D.C. and Granger D.N. 1994. Role of neutronphil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *J Cri Car*. 9(1): 47-71.
25. Lodah S.A.L., Samplh L. and Fox C.L. 1988. Combined topical use of silver sulphadiazine and antibiotics as a possible solution to resistance in burn wound. *J Burn Care Rehabliz*. 45: 810-816.
26. Luengthanaphol S., Mongkholkhajornsilp D., Douglas S., Douglas P.L., Pengsopa L. and Pongamphai S. 2004. Extraction of antioxidants from sweet Thai Tamarind seed coat: Preliminary experiments. *J Food Eng.* 63: 247-52.
27. Matlikarjuna C., Ghosh A., Raghotama C. and Bairy K.L. 2002. Dose metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing. *Burns*. 28: 427-429.
28. Martinello F., Soaresh S.M., Franco J.J., Santos A.C., Sugohara A. and Garcia S.B. 2006. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol*. 44: 810-8.
29. Mayers I. and Johnson D. 1998. The nonspecific inflammatory response to injury. *Can J Anaesth*. 45(9): 871-9.
30. McDaniel D.H., Ash K., Lord L., Newman J. and Zukowski M. 1998. Accelerate laser resurfacing wound healing using a triad of tropical antioxidants. *Dermatol Surg*. 24: 661664.
31. Muthu S.E., Nandakumar S. and Roa U.A. 2005. The effect of methanolic extract of *Tamarindus indica* on the growth of clinical isolates of Burkholderia pseudomallei. *Indian J Med Res*.122: 525-8.
32. Napoli B., D'Arpa N., Laia A. 1999. Antibiotic salicylate vasaline: A topical treatment of choice in burned diabetic patients. Annals of Burns and Fire Disasters. 12. No 3.
33. Nazirogilu M. and Butterworth P. 2005. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Appi Physiol*. 30(2): 172-85.

34. Noronha C. and Almeida A. Local burn treatment-topical antimicrobial agents. Annals of Burns and Fire Disaster. XIII (2000): n4.
35. Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thaiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95: 351-358.
36. Osawa T., Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K. and Yamamoto A. 1994. Antioxidative components isolated from the seeds of Tamarind (*Tamarindus indica* L). *J Agric Food Chem*. 42: 2671-4.
37. Papini R. 2004. Management of burn injuries of various depths. *BMJ*. 329: 158-160.
38. Pumthong G., 1999. Antioxidative activity of polyphenolic compounds extracted from seed coat of *Tamarindus indica* Linn. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
39. Ramos A., Visozo A., Piloto J., Garcia A., Rodriguez C.A. and Rivero R. 2003. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 87: 241-6.
40. Siddhuraju P. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT Food Sci Tech.* 40: 982-90.
41. Sim K.M. 2002. Management of severe burn injury a metabolic prepective. *Current Aesthesia & Critical Care.* 13: 76-82.
42. Shula A., Rasix A.M. and Patnaik G.K. 1997. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in healing cutaneous wound. *Free Res*. 26: 93-101.
43. Soong Y-Y. and Barlow P.J. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*. 88: 411-417.
44. Sudjaroen Y., Haubner R., Wurtele G., Hull W.E., Erben G. and Spiegelhalder B. 2005. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol*. 43:1673-82.
45. Thompson P.D., Till G.O., Woolliscroft J.O., Smith D.J. and Prasad J.K. Superoxide dismutase prevents lipid peroxidation in burned patients. *Burn*. 16: 406-8.

46. Till G.O., Guilds L.S., Mahrous M., Friedl H.P., Trentz O. and Ward P. 1989. Role of xanthine oxidase in thermal injury of skin. *AM J Pathol*. 135: 195-202.

47. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Yamamoto A., Kawakishi S. and Osawa, T. 1994. Antioxidative Components Isolated from the Seed of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 2671-2674.

48. Vaghasiya Y. and Chanda S. 2009. Screening of some traditionally used Indian plants for antibacterial activity against *Klebsiella pneumonia.* *J Herb Med Toxicol*. 3: 161-4.

49. Vyas N., Gavatia N.P., Gupta B. and Tailing M. 2009. Antioxidant potential of *Tamarindus indica* seed coat. *J Pharm Res*. 2: 1705-6.