บทที่ 1

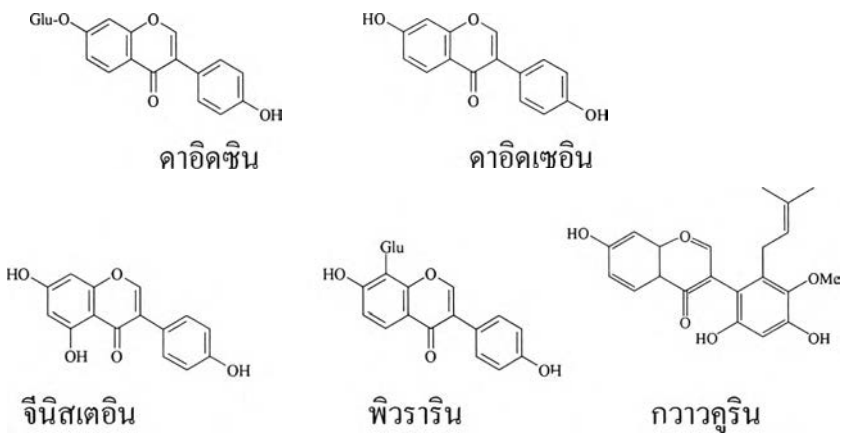
บทนำ

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีสำคัญ หรือสมมติฐาน

กวาวเครือขาวจัดเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองที่มีอยู่ในวิถีชีวิตของคนไทยมาอย่างช้านาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatabandhu อยู่ในวงศ์ Leguminosae [ยุทธนา: 2542] ชื่อสามัญ เช่น กวาว กวาวหัว กวาวเครือขาว (พายัพ) กวาวเครือ เครือขาว จานเครือ (อีสาน) ตานเครือ ทองเครือ ทองกวาว จอมทอง (ใต้) ตานจอมทอง (ชุมพร) โพ้ต้น (กาญจนบุรี) โพะตะกู กวาวเครือขาวมักขึ้นในป่าเบญจพรรณบนที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 250 – 800 เมตร โดยเฉพาะในป่าสูงแถบภาคเหนือเป็นพื้นที่ภูเขา อากาศดี ดินอุดมสมบูรณ์ แต่ตามการสำรวจของสถาบันการแพทย์แผนไทยมีรายงานว่าสามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศ [เพ็ญนภา: 2542] ปัจจุบันพบว่าหัวกวาวเครือขาวมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีคุณสมบัติที่เรียกว่าไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) หมายความว่าเป็นเอสโตรเจนที่ได้จากพืช และออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิงเอสโตรเจน เนื่องจากมีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเพศหญิง estradiol [Davis *et al.*: 1998] สารไฟโตเอสโตรเจนช่วยในการลดอัตราการเสี่ยงของมะเร็งเต้านม [Dai *et al.*: 2002, Wu *et al.*: 2002] มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งต่อมลูกหมากได้ [Dai *et al.*: 2002] และช่วยให้โรคระบบหลอดเลือดและหัวใจดีขึ้น [Sacks: 2005] สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ได้แก่ ดาอิดเซอิน ดาอิดซิน เจนิสเตอิน พิวรารินและกวาวคูริน เป็นต้น โดยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา อาทิเช่น ลดการเกิดภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน [Knight and Eden: 1996, Ma *et al.*: 2008] ลดการเกิดไขมันอุดตันในเส้นเลือดโดยทำให้คลอเลสเตอรอลชนิด LDL (low-density lipoprotein cholesterol) ลดต่ำลงอีกทั้งยังช่วยเพิ่มคลอเลสเตอรอลชนิด HDL (high-density lipoprotein cholesterol) [Han *et al.*: 2002] เจนิสเตอินในสารสกัดกวาวเครือขาวมีผลในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากวาวเครือขาวสามารถลดอัตราการเสี่ยงของมะเร็งเต้านมได้ [Cherdshewasart *et al.*: 2004] เพิ่มสีผิวของ cynomolgus monkeys เพศเมียวัยหมดประจำเดือนให้มีผิวสีแดงเพิ่มขึ้นได้ [Trisomboon *et al.*: 2006] ลดอัตราการเสี่ยงของโรคอัลไซเมอร์ [Sawatsri *et al.*: 2004] ดาอิดเซอิน เจนิสเตอินและพิวราริน สามารถยับยั้งการหลั่งเอนไซม์หลายชนิด [Keung *et al.*: 1993] พิวราริน จีนิสเตอินและดาอิดเซอินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [Cherdshewasart *et al.*: 2008, Ungar: 2005, Wang *et al.*: 1998] จีนิสเตอินสามารถป้องกัน photocarcinogenesis ในผิวหนังของสัตว์ทดลองได้ [Wei *et al.*: 2003] ปัจจุบันกวาวเครือขาวได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนเป็นตำรับยาแผนโบราณ ควรรับประทานในปริมาณไม่เกิน 50 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย และใช้ร่วมกับสมุนไพรตัวอื่น เช่น

มะขามป้อม สมอไทย และความเป็นพิษในระยะยาวของกวาวเครือได้ผ่านการวิจัยในหนูทดลอง แล้วพบว่าปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าวจะไม่มีอันตราย [สมพิศ: 2548]



รูปที่ 1.1 สูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดต่างๆ ในกวาวเครือขาว

ปัจจุบันวิธีที่ใช้สำหรับการแยกและวิเคราะห์หาปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว คือ ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) [Cherdshewasart *et al.*: 2007] เทคนิคนี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากจะเสียเวลาในขั้นตอนของการไล่สารประกอบอื่นๆ ออกไปจากคอลัมน์หลังจากที่ทำการตรวจวัดสารตัวอย่างแล้ว คือ ประมาณ 15-30 นาที จึงทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างนาน นอกจากนี้จำเป็นต้องเลือกชนิดของคอลัมน์ และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase ,MP) ให้เหมาะสม อีกทั้งปริมาณของ MP ที่ใช้มีปริมาณมาก ทำให้สิ้นเปลือง

อีกเทคนิคหนึ่ง คือ คะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิส (capillary electrophoresis, CE) ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ของการแยกสารในคะพิลลารีที่บรรจุด้วยสารละลายอิเล็กโทรไลต์ (background electrolyte, BGE) ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า หลักการแยกของสารอาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoresis mobility) ของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสาร และเนื่องจาก CE เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว ประหยัด มีขั้นตอนในการเตรียมสารตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ไม่เสี่ยงต่อการอุดตันของคอลัมน์คะพิลลารี และ CE ยังใช้ BGE ในปริมาณน้อยระดับนาโนลิตร นอกจากนั้นในขั้นตอนของการไล่สารประกอบอื่นๆ ออกไปจากคอลัมน์หลังจากที่ทำการตรวจวัดสารตัวอย่างแล้ว จะใช้เวลาน้อยกว่า HPLC มาก คือ ใช้เวลาประมาณ 10-20 วินาทีเท่านั้น จึงทำให้การวิเคราะห์ด้วย CE ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างน้อย

Capillary zone electrophoresis (CZE) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายของ CE อาศัยความแตกต่างของความสามารถในการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้าของสาร ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของ

อัตราส่วนของค่าประจุต่อขนาดของสารตัวอย่าง สารละลายอิเล็กโตรไลต์ส่วนใหญ่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ทั่วไป หรือบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยสารเติมแต่งบางชนิดที่ไม่ทำให้กลไกของการแยกเปลี่ยนแปลงไป สารเติมแต่งบัฟเฟอร์ เช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ สารเติมแต่งไครัลบางชนิด เป็นต้น

สำหรับ Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) ต่างกับ CZE ตรงที่ MEKC มีการเติมสารลดแรงตึงผิวในปริมาณที่มากกว่า Critical Micellar Concentration (CMC) เพื่อให้เกิดไมเซลล์ เช่น โซเดียมโดเด็กซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) ลงไปในบัฟเฟอร์ และไมเซลล์ทำหน้าที่เป็น pseudo stationary phase กลไกการแยกของสารขึ้นอยู่กับ partitioning ของสารระหว่างไมเซลล์เฟสและเอเควียสเฟสและความสามารถของการเคลื่อนที่ทางไฟฟ้า (electrophoretic mobility) MEKC เหมาะสำหรับการแยกสารทั้งที่มีประจุและไม่มีประจุ ซึ่งเทคนิคดังกล่าวน่าจะเหมาะสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจพัฒนา CE สำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกจากเมทริกซ์ในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว จากนั้นเปรียบเทียบผลของปริมาณวิเคราะห์ที่ได้กับ HPLC

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว

ในงานวิจัยที่ผ่านมาเทคนิคสำหรับแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography, TLC) [Zhang *et al.*: 2002], แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) [Lee *et al.*: 2004], HPLC [Chansakaow *et al.*: 2000, Cherdshewasart *et al.*: 2007, Hutabarat *et al.*: 2001, Kirakosyan *et al.*: 2003, Lin *et al.*: 2005, Prasain *et al.*: 2003] และ CE [Chen *et al.*: 2001, Lin *et al.*: 2005, Micke *et al.*: 2006, Wang *et al.*: 1998] สำหรับ TLC การหาปริมาณด้วยเทคนิคนี้ทำได้ยากและใช้เวลานานมาก สำหรับ GC และ HPLC การใช้เครื่องตรวจวัดเป็นแมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer, MS) [Lee *et al.*: 2004, Prasain *et al.*: 2003] สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างและขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำ แต่เครื่องมือมีราคาแพงและมีค่าใช้จ่ายสำหรับการวิเคราะห์สูง สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชตระกูล *Pueraria* ด้วย CE ที่ผ่านมานั้น ได้มีการรายงานโดยใช้ CE แบบ CZE [Chen *et al.*: 2001] และ MEKC [Cao *et al.*: 2002, Lin *et al.*: 2005, Micke *et al.*: 2006, Wang *et al.*: 1998] แต่ยังไม่มีรายงานการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหัวกวาวเครือขาวด้วยเทคนิคนี้

ในการสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในผงแห้งและยาต่างๆ ที่ได้จากพืชตระกูล *Pueraria* ได้แก่ การสกัดพืช *Pueraria lobata* ด้วยการรีฟลักซ์ในเอทานอลที่อุณหภูมิ 80 °C [Chen *et al.*: 2001], การสกัดยาสมุนไพร *Puerariae radix* ด้วยการกวนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g [Keung and ValleeProc: 1993], การสกัดหัวกวาวเครือขาวด้วยเครื่องอัลตราโซนิก [Cherdshewasart *et al.*: 2007] เทคนิคทั่วไปที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในพืช

ต่าง ๆ คือ HPLC ได้แก่ การใช้คอลัมน์เป็น C_8 reversed-phase HPLC [Prasain *et al.*: 2003], C_{18} reversed-phase HPLC [Cherdshewasart *et al.*: 2007, Kirakosyan *et al.*: 2003, Lin *et al.*: 2005], phenyl reversed-phase HPLC [Hutabarat *et al.*: 2001] โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสม ได้แก่ ตัวทำละลาย A (0.1% Trifluoroethanoic acid (TFA) ในน้ำ): ตัวทำละลาย B (0.1% TFA ในอะซิโตไนไทรล์) [Kirakosyan *et al.*: 2003], ตัวทำละลาย A (สารละลาย KH_2PO_4 pH 3.0): ตัวทำละลาย B (อะซิโตไนไทรล์: น้ำ) [Lin *et al.*: 2005], อะซิโตไนไทรล์:กรดอะซิติก [Cherdshewasart *et al.*: 2007], อะซิโตไนไทรล์: น้ำ และเติม TFA [Antonelli *et al.*: 2006], อะซิโตไนไทรล์: น้ำ [Hutabarat *et al.*: 2001], อะซิโตไนไทรล์: 0.1% TFA [Prasain *et al.*: 2003] ส่วนเครื่องตรวจวัดที่ใช้ได้แก่ เครื่องตรวจวัดแบบ UV [Cherdshewasart *et al.*: 2007, Hutabarat *et al.*: 2001, Kirakosyan *et al.*: 2003, Lin *et al.*: 2005, Prasain *et al.*: 2003] และเครื่องตรวจวัดแบบ mass spectrometry [Antonelli *et al.*: 2006] เป็นต้น

ดังนั้นเหตุผลที่สำคัญของงานวิจัยนี้ จึงต้องการพัฒนา CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวต่างๆ

1.3 วัตถุประสงค์ในการทดลอง

พัฒนาวิธีการของคะพิลลารีอิเล็กโทรฟอริซิสสำหรับปริมาณวิเคราะห์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในหัวกวาวเครือขาว

1.4 ขอบเขตการวิจัย

หาภาวะที่เหมาะสมของ CE สำหรับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกวาวเครือขาว จากนั้นประยุกต์ CE ที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนสกัดของกวาวเครือขาวจากแหล่งต่างๆ และเปรียบเทียบผลของปริมาณวิเคราะห์ที่ได้กับ HPLC

1.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

1) ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง

2) หาภาวะที่เหมาะสมของ CE สำหรับการแยกสารมาตรฐานดาอิดเซอิน พิวรารินกวาวคูรินดาอิดซิน และเจนิสเตอิน และสารมาตรฐานที่เติมในส่วนสกัดของตัวอย่าง

2.1) หาภาวะที่เหมาะสมของ CZE

โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ pH 9.2 ความเข้มข้นต่างๆ (10 ถึง 100 mM) ชนิดและตัวทำละลายอินทรีย์ (อะซิโตไนไทรล์หรือเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 20% v/v) และความต่างศักย์ของการแยกสาร (20 ถึง 30 kV)

2.2) หาภาวะที่เหมาะสมของ MEKC

โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.2 ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ SDS ต่างๆ กัน (30 ถึง 80 mM) ชนิดและตัวทำละลายอินทรีย์ (อะซิโตไนไทรล์หรือเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 20% v/v)

3) ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการ ได้แก่ ความแม่น (accuracy) ความเที่ยง (precision) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (LOQ) ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรง (linearity range)

4) วิเคราะห์หาปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวจากแหล่งต่างๆ ด้วย CE ที่พัฒนาขึ้น

5) เปรียบเทียบผลของการวิเคราะห์ที่ได้จาก CE ในข้อ 4 กับ HPLC

6) วิเคราะห์ผลการทดลองและสรุปผลการดำเนินงานวิจัย

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการของ CE ที่เหมาะสมสำหรับการแยกและวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่างหัวกวาวเครือขาว