

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำเวฬุ

Investigation of anti-inflammatory activity of medicinal plants
from Welu wetland

โดย

ผศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผศ.ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

๗ ก.ค. 2557

339578
167768

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2555

เริ่มบริการ

- 1 S.A. 2557

บทคัดย่อ

สำมะง่าเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน เพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ ในการศึกษาทำการตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสำมะง่าในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาร์ไรด์ (LPS) สาร p-anisic acid, acacetin, hispidulin และ diosmentin ซึ่งได้จากการแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีซิลิกาเจลโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และพิสูจน์โครงสร้างด้วยการวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโคปีและเปรียบเทียบข้อมูลกับสเปกตรัมของ NMR ของรายงานก่อนหน้านี้ สารประกอบ acacetin, hispidulin และ diosmentin สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์แมคโครฟาจ โดยสารประกอบทั้งสามชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า p-anisic acid และ aminoguanidine (สารยับยั้ง iNOS) สาร hispidulin ถูกเลือกไปศึกษาต่อเพื่อตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของมัน สาร hispidulin ยังสามารถลดการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น hispidulin ถูกพบว่ายับยั้งการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า acacetin, hispidulin และ diosmentin ที่แยกได้จากใบสำมะง่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบ กลไกในการต้านอักเสบของ hispidulin เกิดผ่านการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 ที่ระดับการถอดรหัสและการแปลรหัสของยีน นอกจากนี้รายงานนี้เป็นการรายงานครั้งแรกของการแยกสาร hispidulin และ diosmentin ได้จากใบสำมะง่า ผลการศึกษาครั้งนี้อาจช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของใบสำมะง่าได้

คำสำคัญ : สำมะง่า, hispidulin, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E_2 , การต้านอักเสบ

ABSTRACT

Clerodendrum inerme (L.) Gaertner is medicinal plant which has been used in traditional medicine for treating various inflammation-related diseases. In this study, anti-inflammatory effects of compounds isolated from ethylacetate fraction of *C. inerme* leaves were determined on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophage cells. p-Anisic acid, acacetin, hispidulin and diosmentin were isolated by silica gel column chromatography. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis and by comparison of their NMR spectroscopic data with those reported in the literature. Acacetin, hispidulin and diosmentin inhibited NO production without cytotoxicity toward macrophages. They showed stronger inhibitory effect on NO production than p-anisic acid and aminoguanidine (a well-known iNOS inhibitor). Among them, hispidulin was selected to investigate the mechanism underlying its anti-inflammatory activity. The compound also inhibited the production of prostaglandin E₂ in RAW264.7 cells treated with LPS in dose-dependent manner. Hispidulin was found to suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA and protein expressions in dose-dependent manners. The obtained results suggest that acacetin, hispidulin and diosmentin isolated from *C. inerme* leaves exert anti-inflammatory activity. The mechanism of anti-inflammation of hispidulin was the inhibition of iNOS and COX-2 expression at transcriptional and translational level. Additionally, this is the first report of the isolation of hispidulin and diosmentin from *C. inerme* leaves. The present study might support the effectiveness of traditional use of *C. inerme* leaves for treatment of inflammatory diseases.

Keywords: *Clerodendrum inerme*, hispidulin, nitric oxide, PGE₂, anti-inflammation

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ สุดท้ายขอขอบคุณ นางสาวศศิธร ชาวสวนทอง นางสาวคณิดา วรรณศรี นางสาวกึ่งกาญจน์ วัชรนาวิ นางสาวสุดารัตน์ อินทสุวรรณ นางสุพัตรา ปุรินทรกุล นางสาวเวณิกา นาไชโย และนางสาวมิ่งขวัญ จันทร อินทร์ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทนำ	6
วิธีการทดลอง	12
ผลการทดลอง	27
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก	62
ผลผลิตของโครงการวิจัย	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การอักเสบ เป็นปฏิกิริยาของร่างกาย ที่ทำการตอบโต้ ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรงของอันตราย ที่กำลังกระทำต่อร่างกาย การอักเสบ เป็นกระบวนการปกป้อง กู้มครองตั้งแต่ระดับเซลล์ จนถึงชีวิตมนุษย์ การอักเสบมีสาเหตุจากการติดเชื้อ (infection) และสาเหตุที่ไม่ใช่การติดเชื้อ เช่น สารเคมี หรือปฏิกิริยาของภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็นต้น เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันร่างกายที่ซับซ้อน จะทำการตอบสนองในขั้นแรก ด้วยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุมลด จำกัดและทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบในทันที รวมทั้งกำจัดเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายด้วย เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน (acute inflammation) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ การขยายตัวของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทำให้เซลล์เม็ดเลือดออกนอกหลอดเลือดได้ และเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้าสู่เนื้อเยื่อที่เกิดภัยอันตราย ความเสียหายหรือผลจากการอักเสบเช่นนี้ ร่างกายมักจะซ่อมแซมจนหายได้ดีแทบไม่พบความผิดปกติของอวัยวะหรือการทำงานของระบบบกพร่องรุนแรง แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อนการอักเสบเฉียบพลันไม่ได้ดี ทำให้มีการทำลาย ลูกกลม รุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกันจะขยายผลการควบคุม เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อนการอักเสบอีก เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) สิ่งที่แตกต่างกันจากการอักเสบเฉียบพลันคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมยังทำได้ไม่ดีจะทำให้เกิดความบกพร่องของระบบและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005)

ในการอักเสบทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง จะมีการหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบหลายชนิด เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) พรอสตาแกลนดิน (prostaglandins) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้จะเป็นเครื่องมือทำให้เกิดการตอบสนอง และการอักเสบมากขึ้น (Van der Vliet, 2000) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการยับยั้งการหลั่งสารเหล่านี้จะทำให้การอักเสบลดลง เป้าหมายของยาต้านการอักเสบจึงมุ่งยับยั้งหรือลดการหลั่งสารเหล่านี้ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆที่ไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลน

ดิน E2 เข้าไปเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบ และประเทศไทยมีการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นมูลค่าปีละหลายพันล้านบาท ดังนั้นเพื่อเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาต้านการอักเสบจึงมีความจำเป็น นอกจากนี้ การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลก็มีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสารที่มีศักยภาพจะนำไปเป็นยาต้านการอักเสบ

สารจากพืชสมุนไพรเป็นทางเลือกที่สำคัญ ในการได้มาของสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง และป้องกันการหลั่งสารที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ ทั้งในแง่ของการรักษาชีวิตผู้ป่วย และการป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากการอักเสบแบบเรื้อรัง จากการศึกษาเก็บข้อมูลเบื้องต้นจากนายธนู พูลทวี ประธานศูนย์องค์กรประสานงานชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี และเป็นหมอยาพื้นบ้านในอำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี มีประสบการณ์ในการใช้สมุนไพรรักษาโรคนานกว่า 50 ปี พบว่าพืชสมุนไพรป่าชายเลนบริเวณลุ่มน้ำเวฬุที่ใช้ในการรักษาอาการอักเสบที่อยู่ในตำรายาของหมอยาพื้นบ้านแถบลุ่มน้ำเวฬุ เช่น สำมะง่า (*Clerodendrum inerme*) และใบเบญจมาศน้ำเค็ม (*Wedelia biflora*) เป็นพืชป่าชายเลนที่มีการนำใบ มาใช้ในการรักษาบาดแผลสด แผลฟกช้ำ อาการบวมแดง และอาการที่เกิดจากการอักเสบต่างๆ เช่น ไข้ข้ออักเสบ อาการปวดกระดูก รักษาอาการอักเสบบวม (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, ม.ป.ป.) ในปี พ.ศ. 2554 กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตดของส่วนสกัดเอทานอลจากใบสำมะง่าว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีกว่าส่วนสกัดจากใบเบญจมาศน้ำเค็ม ดังนั้นเพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านนี้ และเพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศ นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาค้นแบบรักษาโรคจากการอักเสบต่างๆ ต่อไป จึงเลือกนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตดของส่วนสกัดเอทานอลจากใบสำมะง่ามาศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่อยู่ในใบสำมะง่า คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตดจากใบสำมะง่าในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรสำมะง่า และสารประกอบที่แยกได้จากใบสำมะง่าอาจนำไปผลิตและพัฒนาเป็นยาตัวใหม่ที่สามารถต้านการอักเสบต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อแยกสกัดสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตดของใบสำมะง่า
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสามเงา ซึ่งเป็นส่วนสกัดพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีที่สุด มาสกัดแยกสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ในลักษณะ activity-guided isolation จากนั้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูง ในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง

1.4 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review) และเอกสารอ้างอิง

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาอันซับซ้อนที่เนื้อเยื่อต่างๆ ตอบสนองต่อเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ โดยไนตริกออกไซด์มีฤทธิ์ส่งเสริมการอักเสบ ไนตริกออกไซด์เป็นอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นจากการเปลี่ยน L-arginine ได้เป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) ในปัจจุบันพบว่า NOS มี 3 isoform ได้แก่ neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) และ inducible NOS (iNOS) โดยที่ nNOS และ eNOS เป็น constitutive form ในขณะที่ iNOS เป็น inducible form การเร่งปฏิกิริยาของ NOS ต้องการโคแฟกเตอร์ เช่น nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), calmodulin (CaM), tetrahydrobiopterin (BH₄) และอีเอ็ม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF-KB ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF-KB จะถูกจับโดย IKB และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวภาพให้มีการสลาย IKB ส่งผลให้ NF-KB เกิด translocation เข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน iNOS

ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการกำจัดจุลชีพที่บุกรุกโดยเซลล์แมคโครฟาจ (Coleman, 2001) ไนตริกออกไซด์ที่สร้างในเซลล์แมคโครฟาจนี้ ถูกผลิตโดยเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมื่อมีการสัมผัสกับ cytokine endotoxin หรือ lipopolysaccharide (LPS) จากแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าไนตริกออกไซด์จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดจุลชีพที่รุกรานร่างกายมนุษย์ แต่ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่มากเกินไปจาก iNOS ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการ

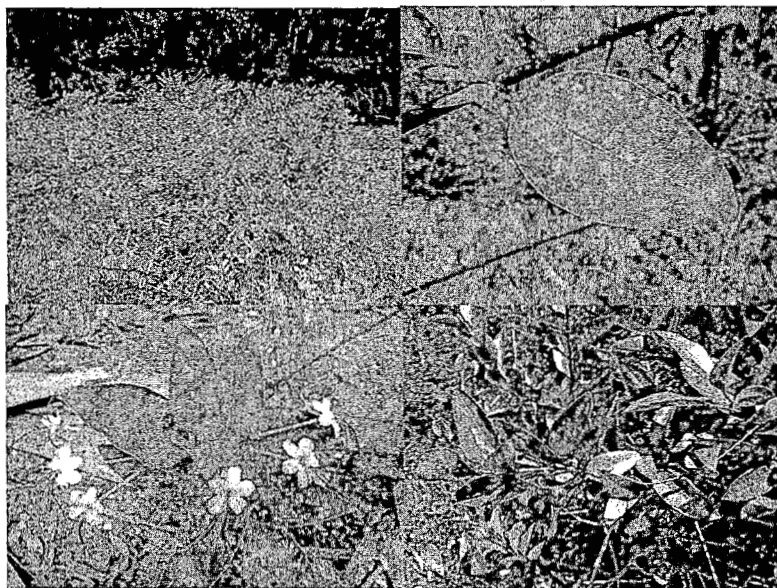
ของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อคจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ และโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็น inflammatory mediator ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆนี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ iNOS (iNOS inhibitor) การยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS (iNOS regulator) หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบต่อไป

พรอสตาแกลนดิน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อหลอดเลือด ระบบประสาท และเซลล์ ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ในการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตไตรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อกระเพาะอาหาร และอีกไอโซฟอร์ม คือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของพรอสตาแกลนดิน E2 ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) มียาที่ให้ผลยับยั้งต่อ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้น และใช้ในการรักษาอาการอักเสบ (Dhikav, 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดต่อการตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tunctan, 2003)

ตำมะง่า (*Clerodendrum inerme* (L.) Gaertner) เป็นพืชในวงศ์ Verbenaceae (Lamiaceae) มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ลำต้นทอคนอน แผ่นกระจัดกระจายโดยรอบ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม แผ่นใบเป็นรูปใบหอกหรือรูปรี ขอบใบเรียบ ดอกออกตามง่ามใบและปลายกิ่งเป็นช่อกระจุก มี 3 ดอก มักจะขึ้นตามบริเวณที่ชื้นและและตอนบนของป่าชายเลน (พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 1-1 มีการใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในหลายประเทศ เช่น ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ใบใช้ตำพอกคัมภ์น้ำชะล้างบาดแผลเลือดออก หรือคัมภ์เหล้าพอกอุ้งทาบบริเวณแผลฟกช้ำ จากการกระแทก และบวม แก้แผลอักเสบและแผลพุพอง ใบยังใช้รักษาอาการไข้ อาการไข้ข้ออักเสบ รากมีฤทธิ์แก้ลม ไขหวัด ขับอักเสบ ขับน้ำมันโตะแผลบวมจากการกระแทก (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, มปป.; Wijesundara, 2004; Shrivastava and Patel, 2007)

ตำมะง่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่าง เช่น ส่วนสกัดจากใบและดอกมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (Shrivastava and Patel, 2007) ส่วนสกัดจากต้นแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบบี (Mehdi และคณะ, 1997) ส่วนสกัดจากใบยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Masuda และคณะ, 1999), ฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (Manoharan และคณะ, 2006) ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคในคนและพืช (Anitha and Kannan, 2006) ฤทธิ์ป้องกันตับจากพิษ

ของ CCl_4 (Gopal and Sengottuvelu, 2008) และฤทธิ์การต้านการอักเสบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยฟอร์มัลลิน และมีฤทธิ์แก้ปวดในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยกรดอะซิติค (Yankanchi and Koli, 2010) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอักเสบจากส่วนสกัดใบสามะง่าในเซลล์แมคโครฟาจที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกัฐ ศรีสุข, 2554)



ภาพที่ 1-1 ลักษณะของต้นสามะง่า (ถ่ายภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของสามะง่า ดังนี้

1. β -sitosterol (Chirva and Garg, 1980)
2. 5,8-epoxy-6,7-dimethyl 2',3',2'',3''-dimethylene dioxy-4',1''-dimethoxy-1,2:3,4-dibenzo-1,3-cyclooctadiene (Neolignan) (Spencer and Flippen-Anderson, 1981)
3. (24S)-ethylcholestra-5,22,25-triene-3 β -ol (Singh and Singhi, 1981)
4. 24,24-Dimethyl-25-dehydrolophenol, 4 α -methyl sterols (Akihisa et al., 1990)
5. friedelin, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, salvigenin, acacetin และ apigenin (Achari et al., 1990)
6. iridoid glycosides ได้แก่ 2'-O-(β -D-apiofuranosyl)-mussaenosidic acid (inermisides A1), 2'-O-[5''-O-(8-hydroxy-2,6-dimethyl-2(E)-octenoyl)- β -D-apiofuranosyl]-gardoside (inermisides C) และ 2'-O-[5''-O-(p-hydroxy-benzoyl)- β -D-apiofuranosyl]-mussaenosidic acid (inermisides D) (Calis et al., 1994)
7. 4'-Methylscutellarein and pectolinarigenin (Vendantham et al., 1997)
8. megastigmaneglucosides ได้แก่ (3S,5R, 6S, 7E, 9S)-3-hydroxy-5,6-epoxy- β -ionyl-9-O- β -glucopyranoside (sammangaoside A) และ (3S,5R,6S,9R)-3-hydroxy-5,6-epoxy- β -dihydroion yl-9-O- β -

glucopyranoside (sammangaoside B) และ a iridoidglucoside ได้แก่ melittoside 3''-O- β -glucopyranoside (sammangaoside C) (Kanchanapoom et al., 2001)

9. sterols ได้แก่ 4 α -methyl-24 β -ethyl-5 α -cholesta-14,25-dien-3 β -ol และ 24 β -ethylcholesta-5,9(11),22E-trien-3 β -ol) และ aliphatic ketone ได้แก่ 11-pentacosanone (Pandeye et al., 2003)

10. neo-clerodanediterpenoids ได้แก่ inermes A, inermes B และ 14,15-dihydro-15 β -methoxy-3-epicaryoptin (Pandeye et al., 2005)

11. 2-(3-methoxy-4-hydroxylphenyl) ethyl-O-2'',3''-diacetyl-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-4-O-(E)-feruloyl-beta-D-glucopyranoside (phenylethanoidglycoside), monomelittoside, melittoside, inermoside A1, verbascoside, isoverbascoside และ campneoside I (Nan et al., 2005)

12. Flavones (Vendantham et al., 1997, Shrivastava and Patel, 2007)

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

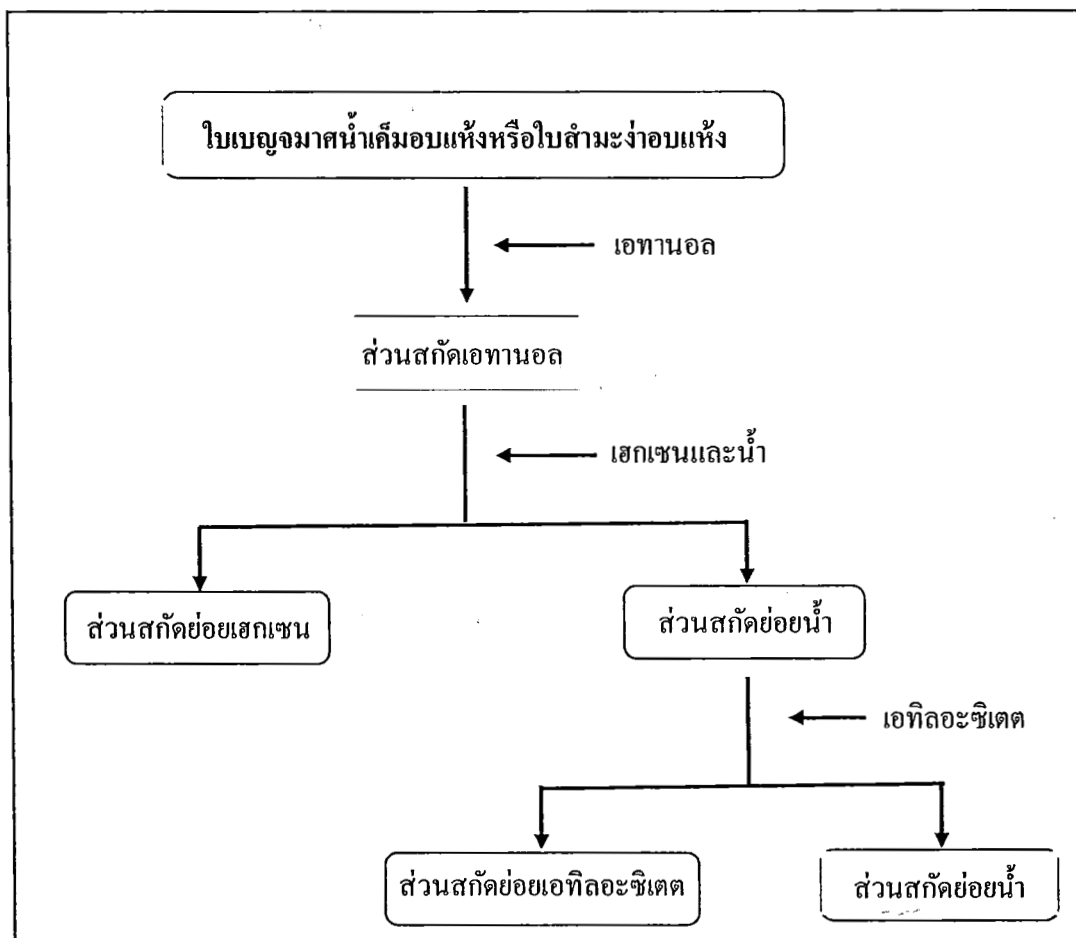
2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ใบเบญจมาศน้ำเค็ม และใบส้มเงาะ จากศูนย์การเรียนรู้และการท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนลุ่มน้ำเวฬุ สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (บ้านท่าสอนอำเภอของจังหวัดจันทบุรี) และระบุนิคมของพืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำใบสดมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด และอบที่อุณหภูมิ 50 °C จนกระทั่งแห้ง ก่อนนำใบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วชั่งน้ำหนักใบพืชหลังจากที่ปั่นได้ทั้งหมด

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพร

นำใบเบญจมาศน้ำเค็มที่บดละเอียด 435 g และใบส้มเงาะ 1200 g ใส่ลงในถุงผ้ามัดปากถุงให้แน่น จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ปริมาตร 4.4 และ 12 L ตามลำดับ ในขวดแก้วเป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าสารให้ผสมกันวันละ 2 ครั้ง จากนั้นกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยใช้เครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำผงของพืชทั้งสองชนิดไปทำการสกัดด้วยเอทานอล ปริมาตร 4.4 และ 12 L ซ้ำอีก 2 ครั้ง และทำการรวมส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมด ก่อนที่จะนำไปทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ และเก็บไม่ให้โดนแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ทำการสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอลของพืช โดยนำส่วนสกัดเอทานอลของใบเบญจมาศน้ำเค็มมา 83 g และใบส้มเงาะมา 195 g ละลายด้วยเอทานอล 800 และ 2000 mL ตามลำดับ จากนั้นทำการแบ่งสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลมา 400 mL ใส่ลงในกรวยแยก ขนาด 1000 mL ตามแผนผังการสกัด (รูปที่ 2-1) เติมน้ำ 100 mL และเติมเฮกเซน 400 mL แยกส่วนที่เป็นชั้นเฮกเซนออก (ชั้นบน) นำส่วนที่เป็นชั้นน้ำมาสกัดด้วยเฮกเซน 400 mL อีกครั้ง นำชั้นเฮกเซนที่ได้มารวมกัน จากนั้นนำส่วนชั้นน้ำสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต 2 ครั้งๆละ 400 mL นำชั้นเอทิลอะซิเตตที่ได้รวมกัน เก็บชั้นน้ำ และนำแต่ละชั้นที่แยกได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ให้โดนแสง เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป



รูปที่ 2-1 แผนผังการสกัดแยกส่วนของใบส้มเงาโดยสรุป

2.2.1 การแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงา

แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel 1.07734 เป็นเฟสคงที่ silica gel ถูกแช่ด้วยตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทน จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากส้มเงามา 17 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตจนส่วนสกัดละลายหมดแล้วผสมกับ silica gel (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัด) ผสมให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำสารไประเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนและเครื่องปั๊มสุญญากาศ แล้วนำ silica gel ไปบรรจุลงคอลัมน์ และใส่ตัวทำละลาย 100% ไดคลอโรมีเทนให้ท่วมผิว silica gel และปรับผิวให้เรียบ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล ในระบบ gradient elution คือ เริ่มชะสารที่ 100 : 0 (3 ลิตร), 99.9 : 0.1 (2 ลิตร), 99.8 : 0.2 (7 ลิตร), 99.7 : 0.3 (3 ลิตร), 99.3 :

0.7 (3 ลิตร), 99 : 1 (3 ลิตร), 98 : 2 (4 ลิตร), 97 : 3 (2 ลิตร), 95 : 5 (2 ลิตร), 93 : 7 (2 ลิตร), 90 : 10 (2 ลิตร), 80 : 20 (2 ลิตร), 70 : 30 (2 ลิตร) และ 50 : 50 (2 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณ ตัวอย่างละ 50 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสารได้สารทั้งหมด 8 ส่วน สกัดย่อย (sub fractions, SF 1-8)

2.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาะ SF8

นำส่วนสกัดย่อย SF8 แยกในเฟลชคอลัมน์ (เฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ความยาว 22 เซนติเมตร) ใช้ silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแซ่ silica gel ในตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:99 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในเฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel ประมาณ 3 ใน 4 ของความยาวคอลัมน์ สูง 18 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่

นำส่วนสกัดย่อย SF8 มา 2.9363 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 9.0000 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบนใส่ตัวทำละลายเมทานอล: ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:99 และปรับผิวหน้าให้เรียบ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ แซ่ด้วยสารละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:99 (500 มิลลิลิตร) 2:98 (750 มิลลิลิตร) 3:97 (600 มิลลิลิตร) 4:96 (1000 มิลลิลิตร) 5:95 (500 มิลลิลิตร) 10:90 (500 มิลลิลิตร) 15:85 (500 มิลลิลิตร) และ 20:80 (500 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (SF8.1 ถึง SF8.4) ดังแสดงในแผนภาพที่ 2-2 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

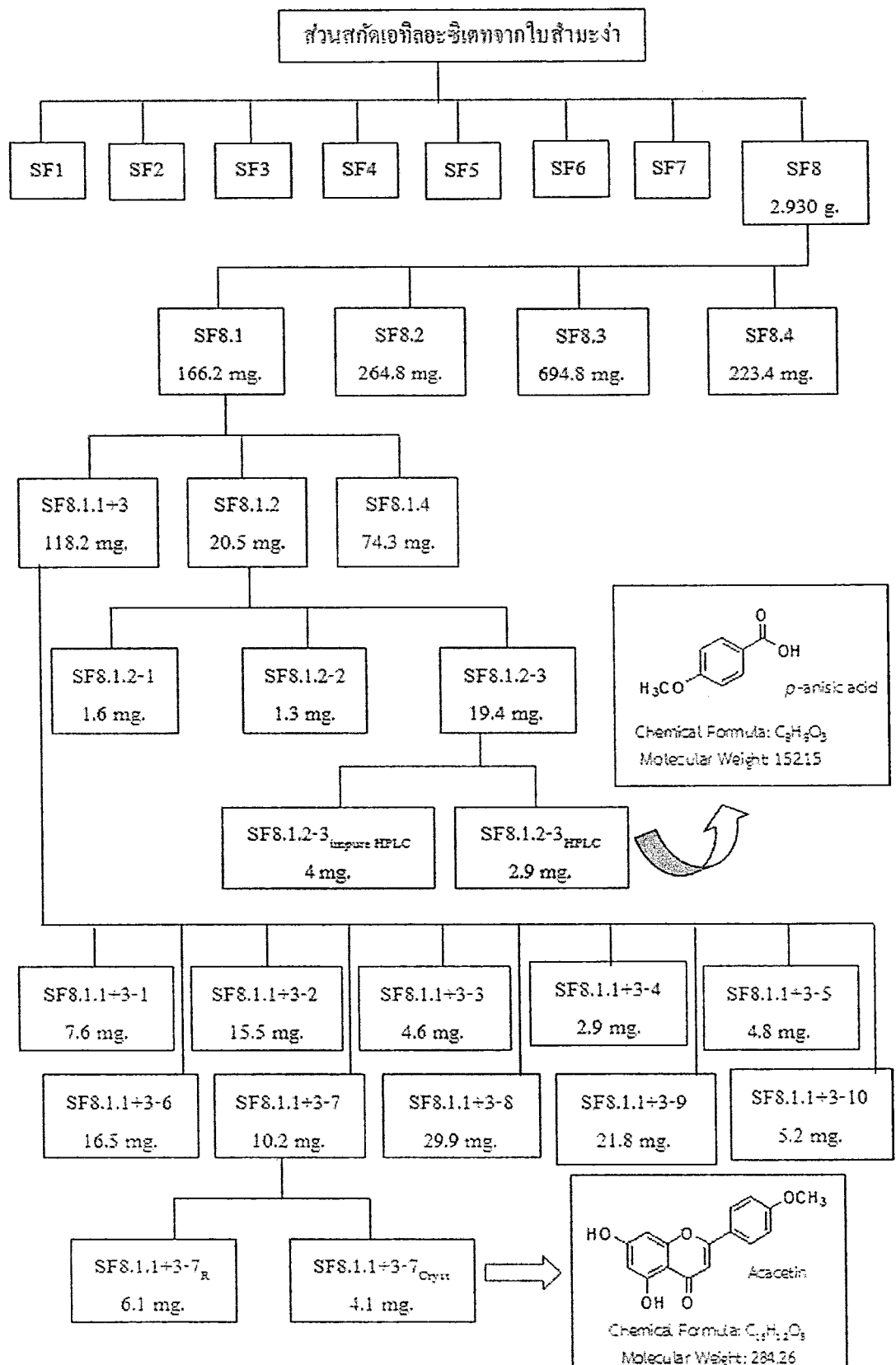
นำส่วนสกัดย่อย SF8.1 แยกในเฟลชคอลัมน์ (เฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร) silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแซ่ silica gel ในตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:97 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในเฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel สูงประมาณ 19 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่นำส่วนสกัดย่อย SF8.1 มา 0.1662 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 0.5000 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้

เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:97 และปรับผิวหน้าให้เรียบ

แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ จะด้วยสารละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:97 (500 มิลลิลิตร) 4:96 (500 มิลลิลิตร) 5:95 (200 มิลลิลิตร) และ 8:92 ไดคลอโรมีเทน (200 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (SF8.1.1 ถึง SF8.1.4) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.2 แยกในแฟลชคอลัมน์ (แฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ความยาว 27 เซนติเมตร) silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแช่ silica gel ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 20:80 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในแฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel สูงประมาณ 20 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่ นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.2 มา 0.0205 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 0.0634 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 20:80 และปรับผิวหน้าให้เรียบ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ จะด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 20:80 (100 มิลลิลิตร) 30:70 (200 มิลลิลิตร) 50:50 (500 มิลลิลิตร) 60:40 (100 มิลลิลิตร) และ 80:20 (100 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 3 ส่วนสกัดย่อย (SF8.1.2-1 ถึง SF8.1.2-3) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 แยกในแฟลชคอลัมน์ (แฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร) silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแช่ silica gel ในตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 0.1:99.9 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในแฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel สูงประมาณ 14 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่ นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 มา 0.1182 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 0.3570 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้)



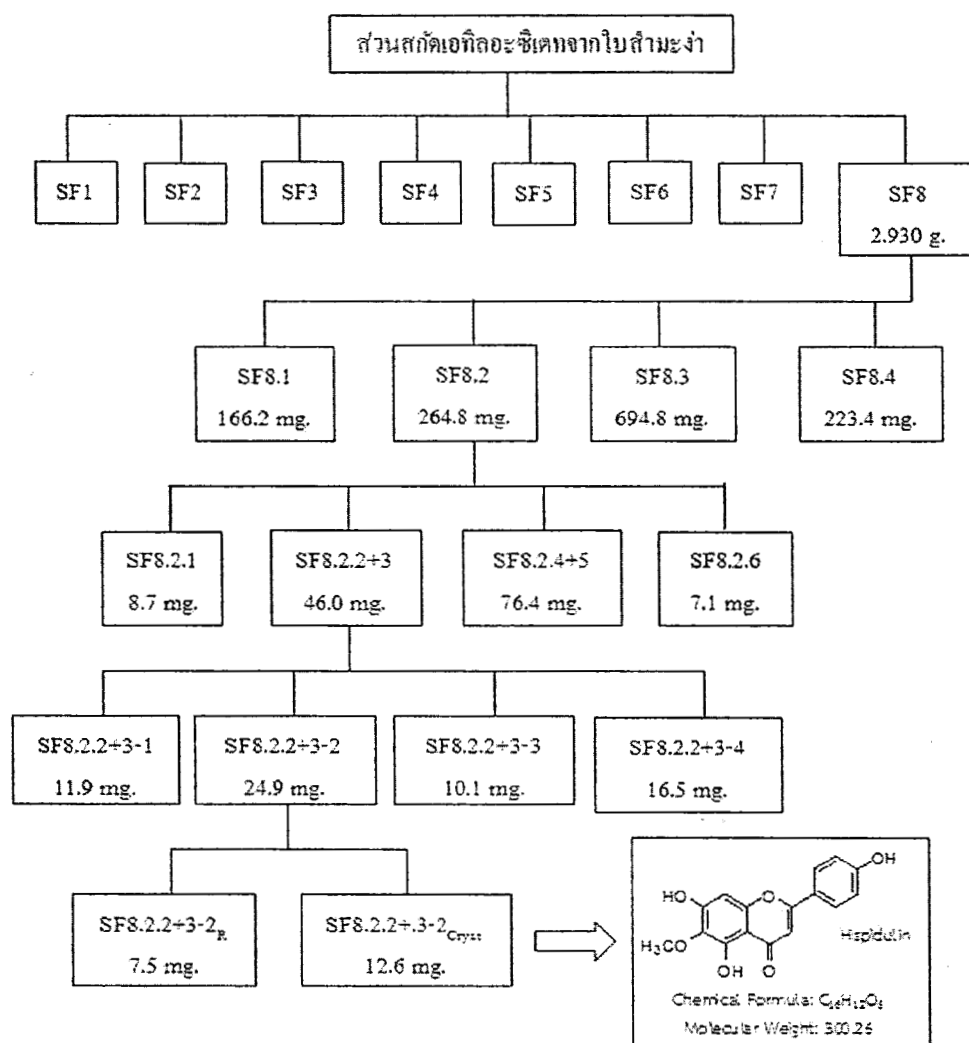
รูปที่ 2-2 แผนผังการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อย SF8.1

ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 0.1:99.9 และปรับผิวหน้าให้เรียบ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ ะด้วยสารละลายเมทานอล: ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 0.1:99.9 (200 มิลลิลิตร) 0.2:99.8 (200 มิลลิลิตร) 0.4:99.6 (400 มิลลิลิตร) 0.6: 99.4 (200 มิลลิลิตร) 0.8:99.2 (200 มิลลิลิตร) 1:99 (400 มิลลิลิตร) 1.5:98.5 (400 มิลลิลิตร) 2:98 (800 มิลลิลิตร) 3:97 (400 มิลลิลิตร) 4:96 (400 มิลลิลิตร) และ 5:95 (400 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 10 ส่วนสกัดย่อย (SF8.1.1+3-1 ถึง SF8.1.1+3-10) ดังแสดงในรูปที่ 2-2 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

นำส่วนสกัดย่อย SF8.2 แยกในแฟลชคอลัมน์ (แฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร) silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแช่ silica gel ในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 30:70 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในแฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel สูงประมาณ 20 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่ นำส่วนสกัดย่อย SF8.2 มา 0.2648 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 0.8014 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต: เฮก เซนในอัตราส่วน 30:70 และปรับผิวหน้าให้เรียบ แยกสาร โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ ะด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 30:70 (800 มิลลิลิตร) 40:60 (300 มิลลิลิตร) 50:50 (900 มิลลิลิตร) 60:40 (500 มิลลิลิตร) 80:20 (500 มิลลิลิตร) 100:0 (200 มิลลิลิตร) 1:99 (500 มิลลิลิตร) และ 5:95 (300 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 6 ส่วนสกัดย่อย (SF8.2.1 ถึง SF8.2.6) ดังแสดงในรูปที่ 2-3 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

นำส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3 แยกในแฟลชคอลัมน์ (แฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ความยาว 27 เซนติเมตร) silica gel ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตร เป็นเฟสคงที่โดยแช่ silica gel ในตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98 จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในแฟลชคอลัมน์โดยใช้ silica gel สูงประมาณ 22 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในเฟสเคลื่อนที่ นำส่วน

สกัดย่อย SF8.2.2+3 มา 0.0460 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน จนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ silica gel 0.1398 กรัม (silica gel ประมาณ 3 เท่าของน้ำหนักของส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องกลั่น ระเหยแบบหมุนและปั๊มสุญญากาศ แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 2:98 และปรับผิวหน้าให้เรียบ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ จะด้วยสารละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98 (300 มิลลิลิตร) 3:97 (100 มิลลิลิตร) 4:96 (100 มิลลิลิตร) 5:95 (100 มิลลิลิตร) และ 8:92 (100 มิลลิลิตร) ตามลำดับเก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 4 ส่วน สกัดย่อย (SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป

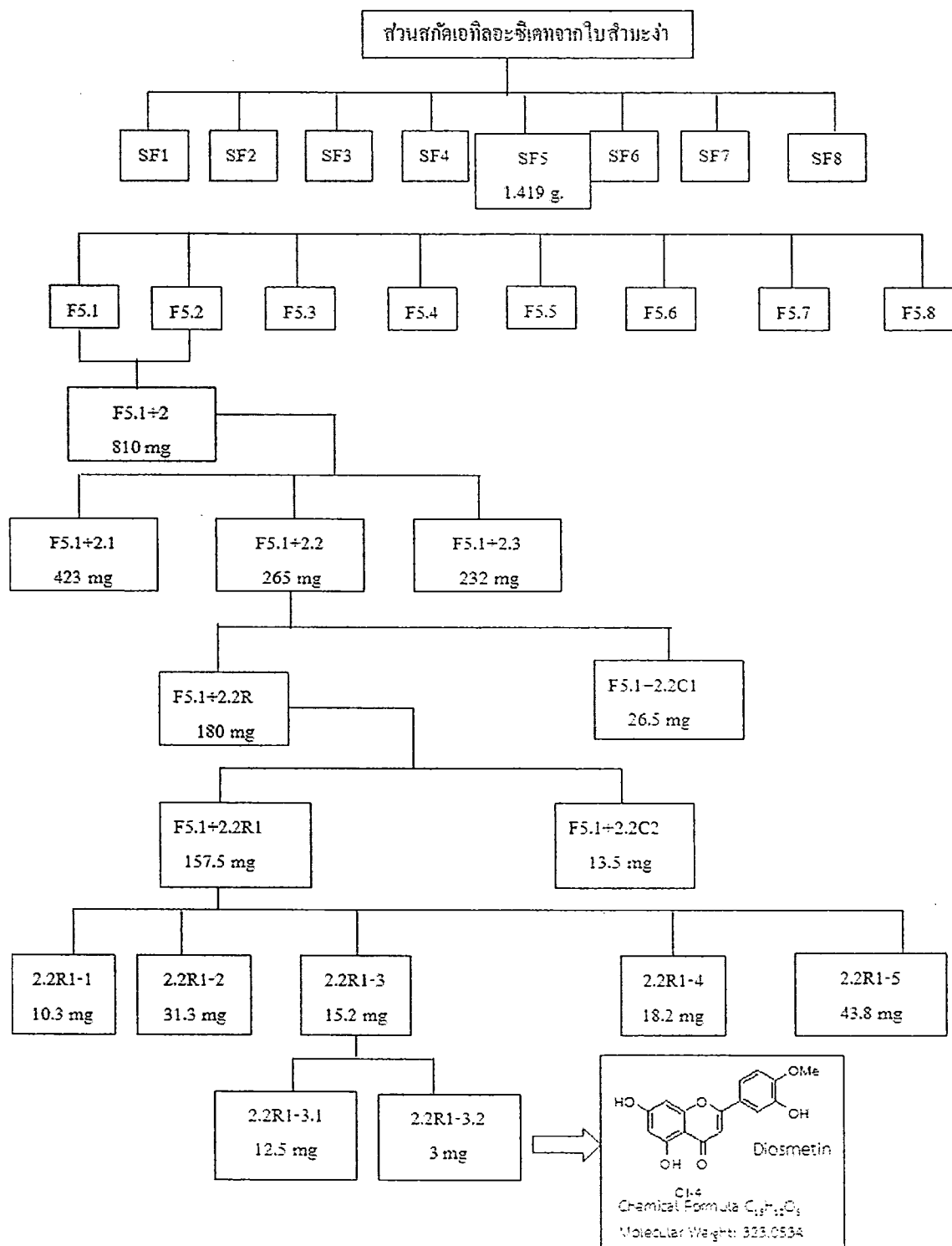


รูปที่ 2-3 แผนผังการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อย SF8.2

2.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาะ SF5

นำส่วนสกัดย่อย SF5 จำนวน 1.419 กรัม แยกในเฟลชคอลัมน์ (เฟลชคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร ความยาว 40 เซนติเมตร) silica gel 1.09385 เป็นเฟสคงที่โดยแซ่ silica gel ในตัวทำละลาย 30% เอทิลอะซิเตต : 70% เฮกเซน จนกระทั่ง silica gel อิ่มตัว จากนั้นบรรจุ silica gel ลงในเฟลชคอลัมน์ นำส่วนสกัดย่อย SF5 มา 1.3549 กรัม ละลายในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ Isocratic elution คือ ชะสารที่ 30% เอทิลอะซิเตต : 70% เฮกเซน (3.5 ลิตร), 50% เอทิลอะซิเตต : 50% เฮกเซน (2.5 ลิตร) และ 70% เอทิลอะซิเตต : 30% เฮกเซน (2.5 ลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 8 ส่วนสกัดย่อย (SF5.1-SF5.8) ดังแสดงในรูปที่ 2-4 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

นำส่วนสกัดย่อย SF5.1 และ 5.2 แยกในคอลัมน์ที่มี silica gel 1.09385 เป็นเฟสคงที่ นำส่วนสกัดย่อย SF5.1 และ 5.2 มารวมกันได้น้ำหนัก 0.8102 กรัม ละลายในตัวทำละลาย 30% เอทิลอะซิเตต : 70% เฮกเซน แล้วบรรจุลงคอลัมน์ส่วนบน แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ ชะสารที่ 30% เอทิลอะซิเตต : 70% เฮกเซน (700 มิลลิลิตร), 40% เอทิลอะซิเตต : 60% เฮกเซน (500 มิลลิลิตร), 50% เอทิลอะซิเตต : 50% เฮกเซน (300 มิลลิลิตร), 60% เอทิลอะซิเตต : 40% เฮกเซน (300 มิลลิลิตร) และ 100% เอทิลอะซิเตต (300 มิลลิลิตร) ตามลำดับ เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ ประมาณตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 3 ส่วนสกัดย่อย (SF5.1+2.1-SF5.1+2.3) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF5.1+2.2 มาทำการตกผลึกได้ 2 ส่วนคือ SF5.1+2.2R และ SF5.1+2.2C1 และนำส่วนสกัดย่อย SF5.1+2.2R มาทำการตกผลึกได้ 2 ส่วนคือ SF5.1+2.2R1 และ SF5.1+2.2C2 จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF5.1+2.2R1 มาแยกในคอลัมน์ที่มี silica gel เป็นเฟสคงที่ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 40-80% เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 5 ส่วนสกัดย่อย (SF5.1+2.2R1-1 ถึง SF5.1+2.2R1-5) ดังแสดงในรูปที่ 2-4 จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF5.1+2.2R1-3 มาแยกในคอลัมน์ที่มี silica gel เป็นเฟสคงที่ แยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 2-5% เมทานอล : ไดคลอโรมีเทน เก็บส่วนสกัดย่อยที่ผ่านคอลัมน์ นำไปตรวจด้วยเทคนิค TLC เพื่อแยกและรวมสาร ได้สารทั้งหมด 2 ส่วนสกัดย่อย (SF5.1+2.2R1-3.1 ถึง SF5.1+2.2R1-3.2)



รูปที่ 2-4 แผนผังการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อย SF5.1+2

2.2.4 การแยกสารโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-3 จากข้อ 2.2.3 มาละลายในอะซิโตนไตรล์ จากนั้นนำมาแยกโดยเทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์ Purospher STAR, RP-18 endcapped (5 ไมโครเมตร) วิเคราะห์หาใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ สารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 10:90, 20:80 30:70, 50:50 พบว่าที่สารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 10:90 เป็นช่วงที่สารมีฟีกสูงสุดและแยกสารได้ดีที่สุดจึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 10:90 โดยใช้อัตราการไหลของสาร คือ 1 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจวัดการแยกสารที่ Range 0.32 ความยาวคลื่นที่ 220 นาโนเมตรโดยทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 100:0 เป็นเวลา 30 นาที ใช้สารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 100:0 เป็นเวลา 30 นาที และใช้สารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 10:90 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-3 ที่ละลายด้วยในอะซิโตนไตรล์มาฉีดผ่านคอลัมน์และชะด้วยสารละลายอะซิโตนไตรล์ : น้ำในอัตราส่วน 100:0 เป็นเวลา 30 นาที และทำการเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วนสกัดย่อย และนำไปตรวจสอบสารด้วยเครื่อง NMR ได้สารทั้งหมด 2 ส่วนสกัดย่อย (SF8.1.2-3HPLC และ SF8.1.2-3impure HPLC)

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO_2 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะ ทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

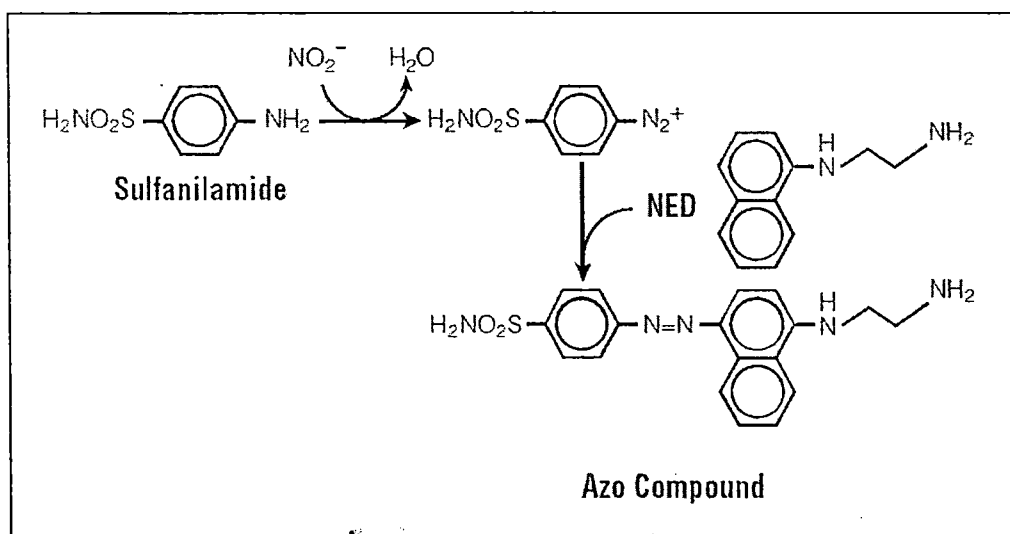
2.4 การ subculture โดยวิธี scraping

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เดิมบัฟเฟอร์ HBSS [5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 136 mM NaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , 5.6 mM Glucose, 4 mM NaHCO_3] ที่ปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียมลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ ใช้ cell scraper ขูดเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ ดูดสารละลายตะกอนเซลล์ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,200 g นาน 10 นาที เพื่อเก็บเซลล์ และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) FBS-DMEM ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue และนับเซลล์บนเครื่อง hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วแบ่งเซลล์ลงในภาชนะอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนโตรที่เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์

iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนไตรท์จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร (รูปที่ 2-5) ดังนั้นปริมาณไนไตรท์จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS ทำการทดลองโดยการแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 µL ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM



รูปที่ 2-5 ปฏิกิริยา Griess

(ที่มา : www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf)

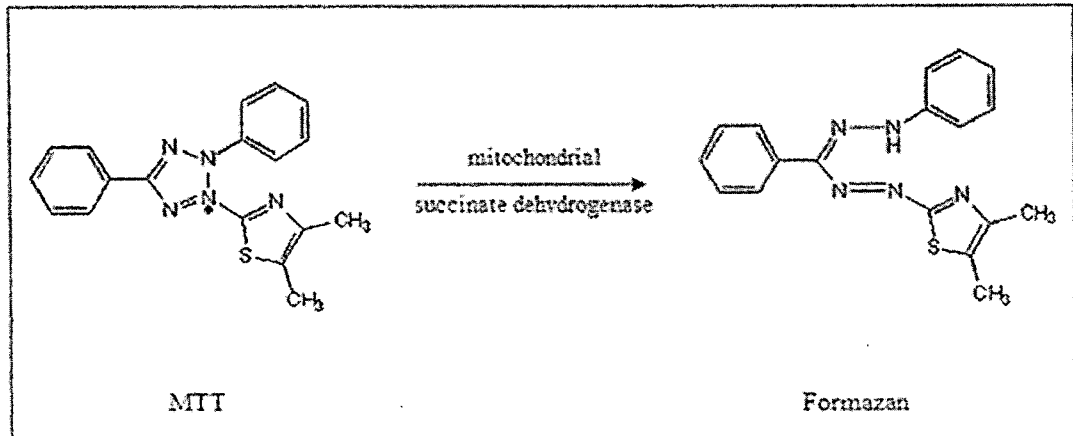
2.6 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/mL) จำนวน 10 µL แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายตะกอน formazan ด้วย DMSO จำนวน 500 µL และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่ง MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง (รูปที่ 2-6) ปริมาณ formazan จะมีความสัมพันธ์ตรงกับจำนวนเซลล์

$$\% \text{ การมีชีวิตของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}}$$



รูปที่ 2-6 ปฏิกริยการรีดักชันของ MTT

(ที่มา : www.mclab.com/product.php?productid=19249&cat=91)

2.7 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของเร่วหอมที่ความเข้มข้น ต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการดูดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมีวิธีดังนี้ เติมนิวคลีโอไรฟอร์มจำนวน 0.2 mL และผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอลจำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดบรรจุ RNA เข้าเครื่อง heat block ที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อระเหย เอทานอล ก่อนเติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 µL แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ RNA ละลายได้ดีขึ้น ทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 nm ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer โดย 1 A₂₆₀ เท่ากับ 40 µg/mL ของ RNA

บร. 321
กชก ก
2555
น. 2

2.8 การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR)

ปฏิกิริยาสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ประกอบด้วย RNA จำนวน 2 µg, 3U AMV reverse transcriptase, 5X buffer [250 Tris-HCl (pH 8.3), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidine และ 50mM DTT], 0.083 mM oligo (dT)₁₅ primer, 0.67 mM dNTPs, 20 U RNase inhibitor และเติมน้ำปราศจาก RNase และ DNase ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 30 µL สภาวะที่ใช้สังเคราะห์ cDNA คือ 42°C นาน 45 นาที และ 99 °C นาน 5 นาที จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ด้วยเทคนิค Real-Time RT-PCR โดยใช้ SYBR Green และไพรเมอร์จำเพาะ iNOS และ elongation factor-2 (EF-2) ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ขนาดของผลผลิต และเลข Accession ในการทำปฏิกิริยา Real time RT-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาดของ ผลผลิต (bp)	เลข Accession
iNOS	5' GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC 3'	156	NM_010927.2
	5' AGCCAGCATACCGGATGAGC 3'		
EF-2	5'CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA 3'	156	NM_007907.2
	5'GGGTCAGATTTCTTGATGGGGATG 3'		

ปฏิกิริยาสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ประกอบด้วย 2X Prime Q-Master Mix with SYBR Green I จำนวน 10 µL, 10 µM Forward primer จำนวน 0.4 µL, 10 µM Reverse primer จำนวน 0.4 µL, cDNA จำนวน 1 µL และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 25 µL ด้วยน้ำปราศจาก DNase และ RNase สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 95 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 95 °C นาน 30 วินาที, 60 °C นาน 30 วินาที, 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ในเครื่อง real-time PCR และวิเคราะห์หาค่า cycle of threshold (C_T) ของแต่ละปฏิกิริยา (Giulietti et al., 2001) จากนั้นนำมาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับยีน iNOS และ EF-2 จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน iNOS และ EF-2 ซึ่งแสดงผลในรูปแบบของอัตราส่วนของ copy number ของ iNOS ต่อ EF-2

2.9 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm.(1x10⁶ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของไบเบญจมาศน้ำเค็มและใบส้มอังกาบที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ (1X) PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄] ที่เย็น 1 ครั้ง ก่อนเติม RIPA protein lysis

buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 และ protease inhibitors] ที่เย็น จำนวน 150 μ L และใช้ cell scraper ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดทดลอง 1.5 mL ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g นาน 5 นาที เก็บน้ำใสส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BCA

2.10 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bicinchoninic acid (BCA)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมของสารตัวอย่างด้วยวิธี BCA ตามคำแนะนำของผู้ผลิต (Pierce) โดยนำสารตัวอย่าง 2 μ L และน้ำกลั่น 8 μ L ผสมกับสารละลาย working BCA (อัตราส่วนของสารละลาย A:B เท่ากับ 50:1) จำนวน 200 μ L แล้วเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จะได้สารเชิงซ้อนสีม่วงที่เสถียรและละลายน้ำได้ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA ที่ปริมาณ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 μ g โดยแกน y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm และแกน x เป็นค่าปริมาณของโปรตีน

2.11 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

เตรียม SDS-polyacrylamide gel ที่มี separating gel 10% และ stacking gel 4% จากนั้นหยอดโปรตีนลงในปริมาณเท่ากันหลุมละ 60 μ g ลงในเจลและผ่านกระแสไฟฟ้าใน (1X) running buffer [0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) SDS] ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้ายแถบโปรตีนลงบนแผ่น PVDF ใน transfer buffer [(192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) methanol) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 25 โวลต์ และที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน ก่อนทำการบ่ม membrane ด้วยสารละลาย blocking [5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) nonfat dry milk ในบัฟเฟอร์ TBS-T] ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้าง membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แซะในสารละลาย mouse anti-iNOS antibody (1:500) ที่ละลายในตัวทำละลาย [1X PBS, 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BSA, 0.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) Tween 20] ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน หรือสารละลาย mouse anti- β -actin (1:5,000) ที่ละลายในสารละลาย blocking เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane แซะในสารละลาย goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase secondary antibodies conjugated ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอัตราส่วน 1:5,000 สำหรับ iNOS, และ 1:10,000 สำหรับ β -actin ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนล้างแผ่น membrane ด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่น membrane บ่มในสารละลายขับเคลื่อนสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS และ β -actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.12 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF-KB เข้าสู่นิวเคลียส

NF-KB เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ดังนั้นจึงทดสอบโดยวิเคราะห์ปริมาณ NF-KB/p65 ใน nuclear extract โดยวิธี Western blot analysis และเปรียบเทียบความเข้มของแถบผลผลิตที่ได้จากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ กับสภาวะที่เติมสารสกัด วิธีแยกโปรตีนจาก nuclear extract อธิบายไว้ใน Srisook และคณะ (2011)

2.13 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E2 โดยปฏิกิริยา Griess

แบ่งเซลล์แมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ 500 µL ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E2 ที่ถูกผลิตในแมคโครฟาจ และหลังจากออกจากเซลล์มาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ การวิเคราะห์ทำโดยใช้ ELISA kit (R&D system, USA.) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองที่อิสระต่อกัน ทำ 3 ซ้ำ สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยจากข้อมูลที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายกลุ่ม เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป และใช้ Student's t test สำหรับวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างการทดลองที่เป็นอิสระต่อกันของ 2 กลุ่มข้อมูล โดยใช้โปรแกรม SPSS 15.0

บทที่ 3

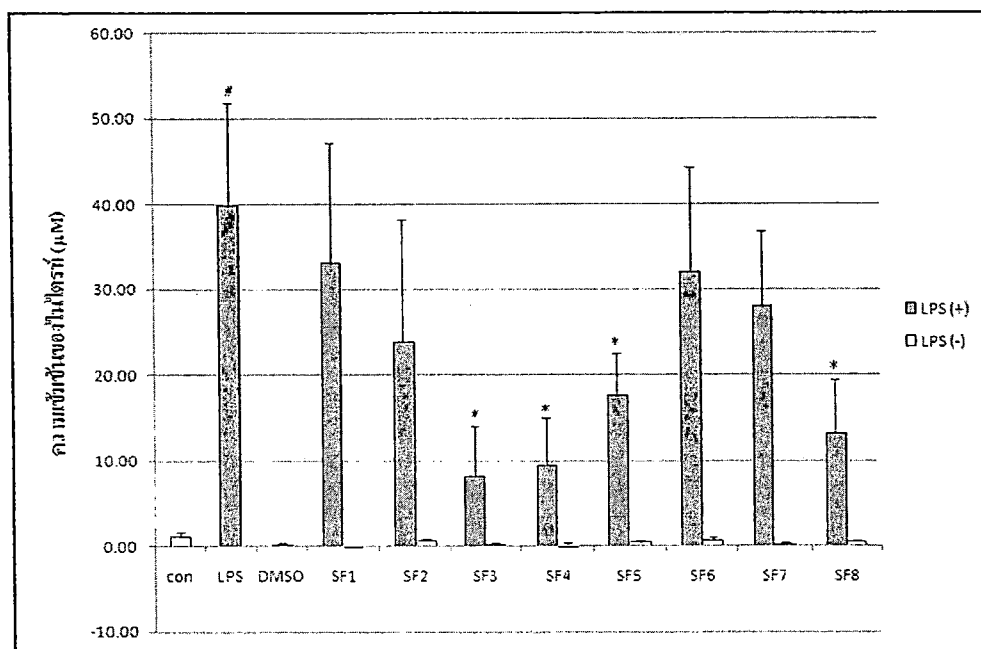
ผลการทดลอง

3.1 การแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มะง่า

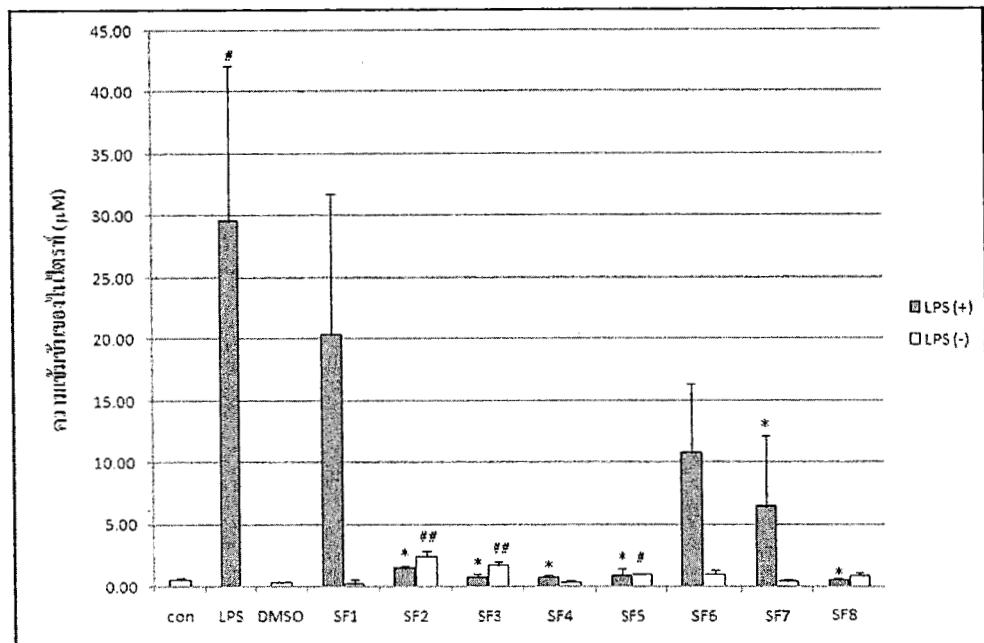
แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มะง่าโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารทั้งหมด 8 ส่วนสกัดย่อย (sub fractions, SF 1-8) ดังแสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งในตารางที่ 3-1 จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มะง่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และความมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-1 ถึง 3-4

ตารางที่ 3-1 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบส้มะง่า

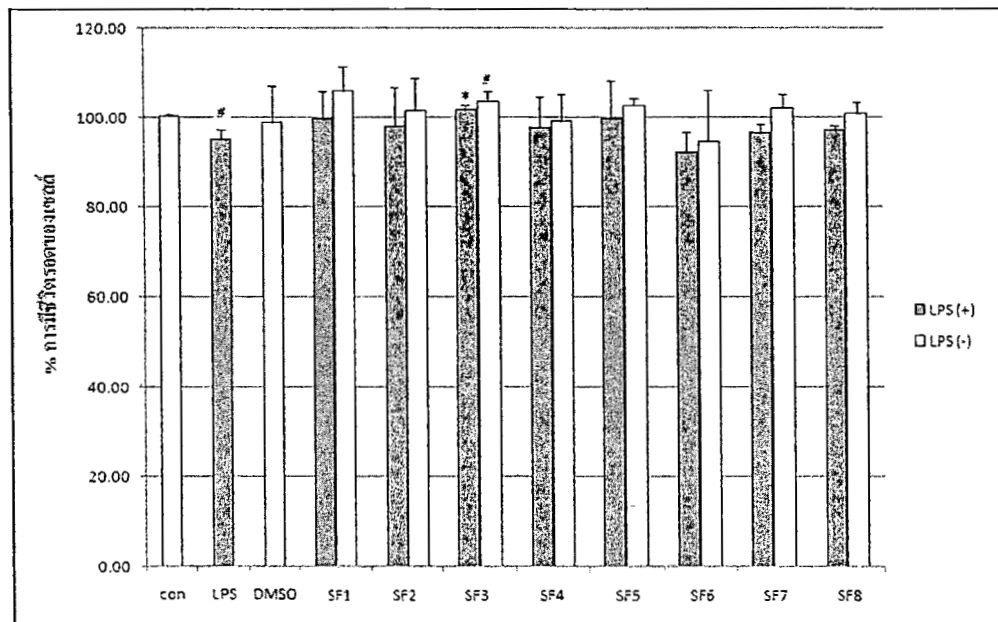
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF1	0.0205	0.12
SF2	0.5980	3.52
SF1	0.1816	1.07
SF4	0.0452	0.12
SF1	1.4199	3.52
SF6	1.1673	1.07
SF7	2.6616	15.66
SF6	2.9363	17.27
รวม	9.0304	53.12



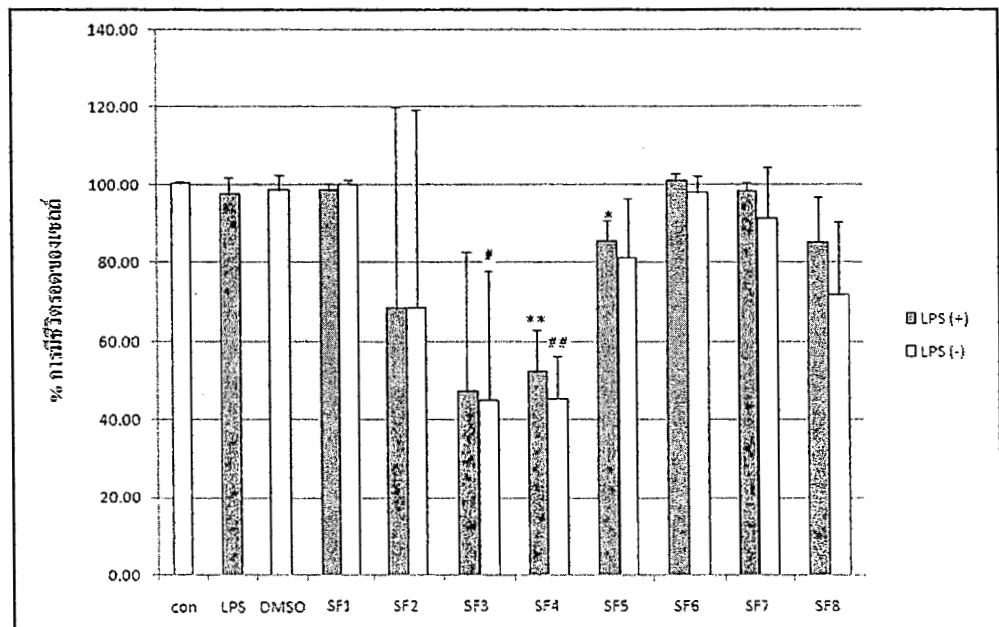
รูปที่ 3-1 ความเข้มข้นของไนโตรที่ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF1 = sub fraction 1, SF2 = sub fraction 2, SF3 = sub fraction 3, SF4 = sub fraction 4, SF5 = sub fraction 5, SF6 = sub fraction 6, SF7 = sub fraction 7, SF8 = sub fraction 8, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-2 ความเข้มข้นของไนไตรท์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF1 = sub fraction 1, SF2 = sub fraction 2, SF3 = sub fraction 3, SF4 = sub fraction 4, SF5 = sub fraction 5, SF6 = sub fraction 6, SF7 = sub fraction 7, SF8 = sub fraction 8, * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ # $p < 0.05$ และ ## $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-3 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF1 = sub fraction 1, SF2 = sub fraction 2, SF3 = sub fraction 3, SF4 = sub fraction 4, SF5 = sub fraction 5, SF6 = sub fraction 6, SF7 = sub fraction 7, SF8 = sub fraction 8, * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



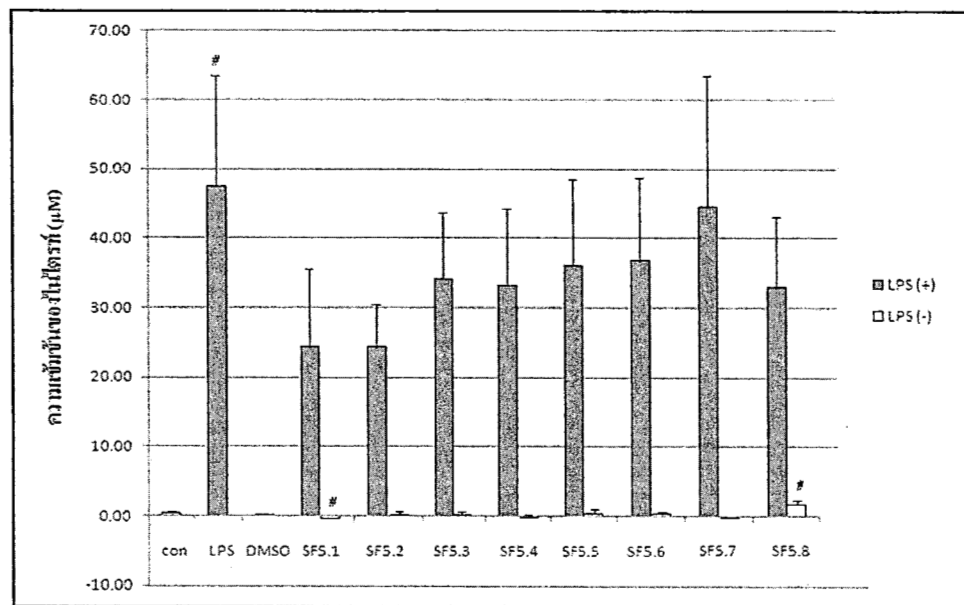
รูปที่ 3-4 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF1 = sub fraction 1, SF2 = sub fraction 2, SF3 = sub fraction 3, SF4 = sub fraction 4, SF5 = sub fraction 5, SF6 = sub fraction 6, SF7 = sub fraction 7, SF8 = sub fraction 8, * $p < 0.05$ และ ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ # $p < 0.05$ และ ## $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

3.2 การแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบส้มมะง่า (SF5)

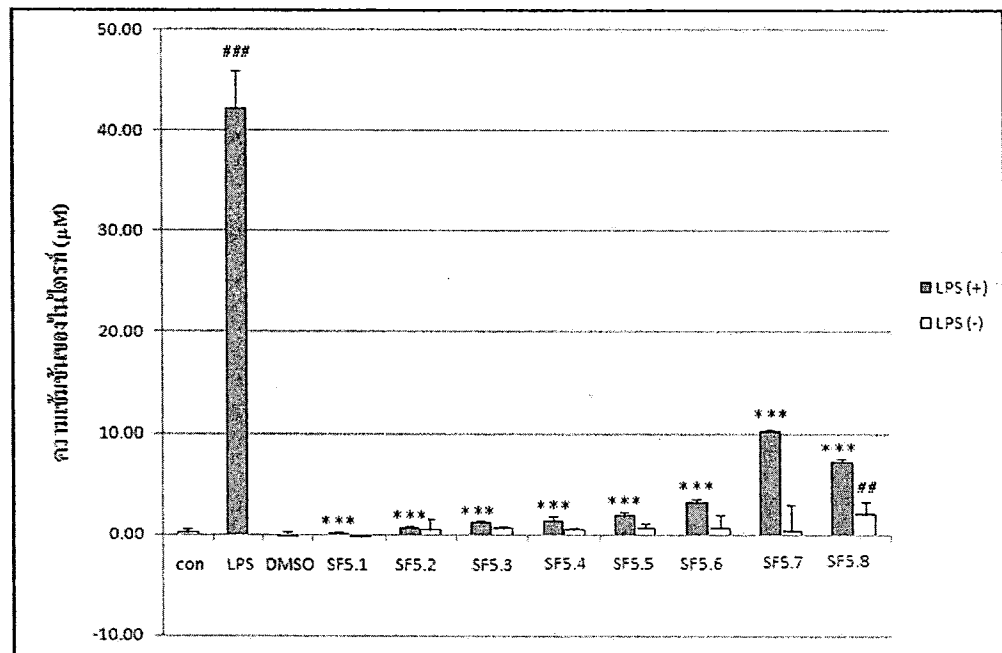
นำส่วนสกัดย่อย SF5 แยกในเฟลชคอลัมน์ ได้สารทั้งหมด 8 ส่วนสกัดย่อย (SF5.1-SF5.8) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ดังแสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งในตารางที่ 3-2 จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มมะง่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS และความมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3-5 ถึง 3-8

ตารางที่ 3-2 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF 5

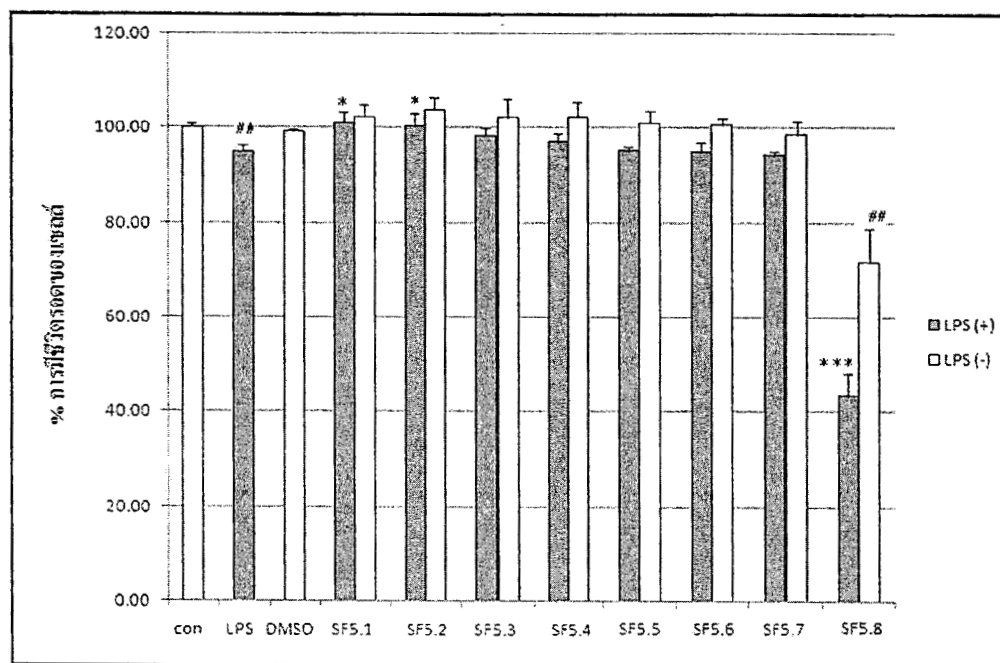
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF5.1	0.6786	50.08
SF5.2	0.1316	9.71
SF5.2	0.0205	1.51
SF5.1	0.0205	1.51
SF5.1	0.0205	2.03
SF5.6	0.0205	0.80
SF5.2	0.0036	0.71
SF5.6	0.0339	1.51
รวม	0.916	67.61



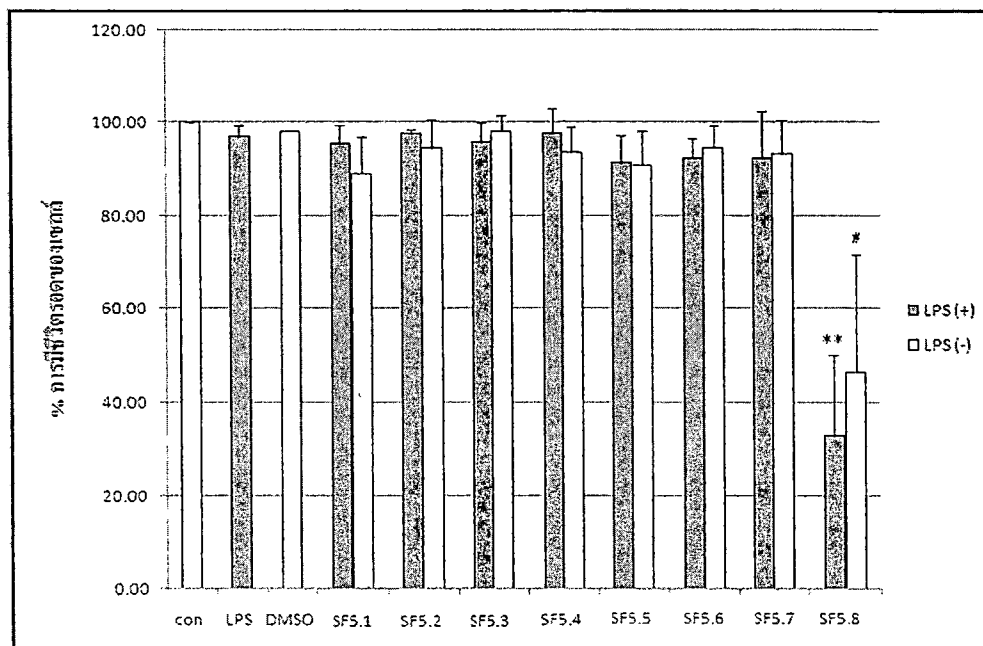
รูปที่ 3-5 ความเข้มข้นของไนโตรที่ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF5.1 = sub fraction 5.1, SF5.2 = sub fraction 5.2, SF5.3 = sub fraction 5.3, SF5.4 = sub fraction 5.4, SF5.5 = sub fraction 5.5, SF5.6 = sub fraction 5.6, SF5.7 = sub fraction 5.7, SF5.8 = sub fraction 5.8, # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-6 ความเข้มข้นของไนไตรท์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF5.1 = sub fraction 5.1, SF5.2 = sub fraction 5.2, SF5.3 = sub fraction 5.3, SF5.4 = sub fraction 5.4, SF5.5 = sub fraction 5.5, SF5.6 = sub fraction 5.6, SF5.7 = sub fraction 5.7, SF5.8 = sub fraction 5.8, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ ## $p < 0.01$ และ ### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-7 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF5.1 = sub fraction 5.1, SF5.2 = sub fraction 5.2, SF5.3 = sub fraction 5.3, SF5.4 = sub fraction 5.4, SF5.5 = sub fraction 5.5, SF5.6 = sub fraction 5.6, SF5.7 = sub fraction 5.7, SF5.8 = sub fraction 5.8, * $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ ## $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม



รูปที่ 3-8 เปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสถานะที่มีและไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2% DMSO เพียงอย่างเดียว, SF5.1 = sub fraction 5.1, SF5.2 = sub fraction 5.2, SF5.3 = sub fraction 5.3, SF5.4 = sub fraction 5.4, SF5.5 = sub fraction 5.5, SF5.6 = sub fraction 5.6, SF5.7 = sub fraction 5.7, SF5.8 = sub fraction 5.8, ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS อย่างเดียว และ # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

นำส่วนสกัดย่อย SF5.1 และ 5.2 รวมกันและแยกในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารทั้งหมด 2 ส่วน สกัดย่อย (SF5.1+2.1.1-SF5.1+2.1.2) และแยกได้สารบริสุทธิ์หนึ่งชนิด คือ สาร CI-1 หรือ *p*-anisic acid

3.3 การแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบส้มมะง่า (SF8)

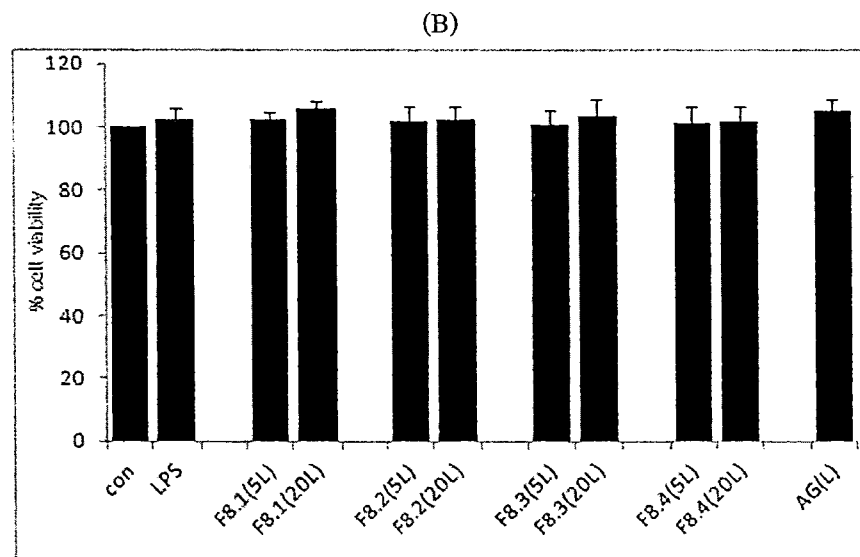
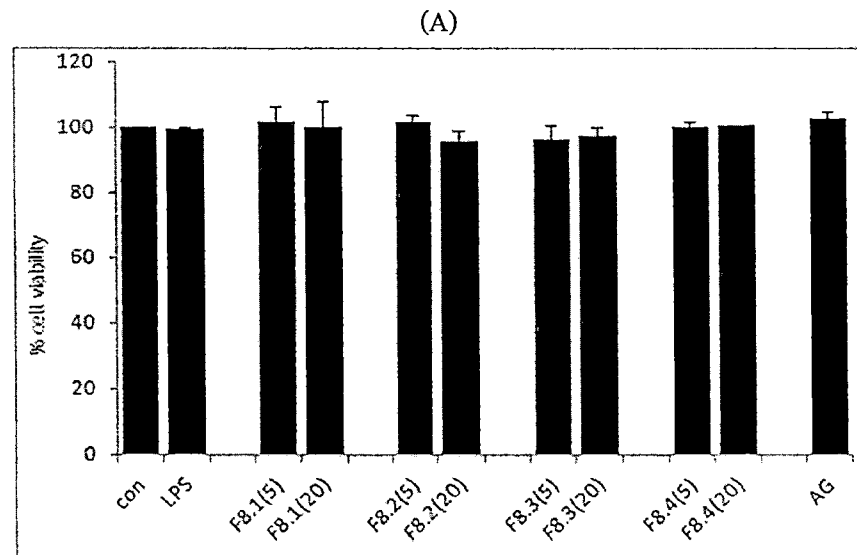
ทำการแยกสารจากส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตของใบส้มมะง่า (SF8) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัด (SF8.1 ถึง SF8.4) พบว่า ส่วนสกัดย่อย SF8.3 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย SF8.1 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF8

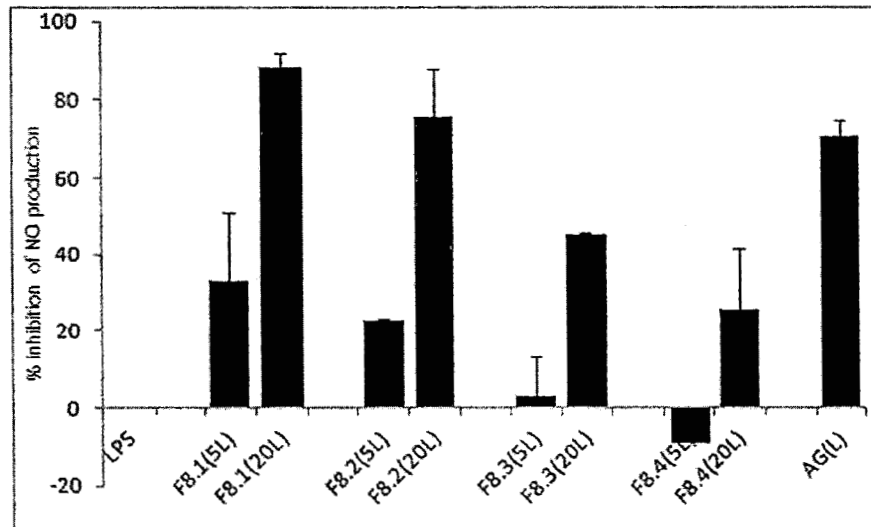
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF8.1	166.2	5.67
SF8.1	264.8	9.08
SF8.1	694.8	23.71
SF8.4	223.4	7.62
รวม	1349.2	46.05

ผลการศึกษาค่าการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1 ถึง SF8.4 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยในสภาวะที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้งเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ไม่แสดงความเป็นพิษกับเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 3-9

ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย และเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนของเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ -1.39 ± 1.18 ไมโครโมลาร์ และปริมาณของไนโตรเจนของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 33.33 ± 24.07 ไมโครโมลาร์ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ SF8.1 ถึง SF8.4 พบว่าส่วนสกัดย่อย SF8.1 มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซนต์การยับยั้ง 20.13 ± 0.23 และ 83.03 ± 3.74 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย SF8.4 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ -1.18 ± 6.08 และ 15.86 ± 2.60 ส่วน aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซนต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 71.57 ± 5.78 (รูปที่ 3-10)



รูปที่ 3-9 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1 ถึง SF8.4 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (A) และ ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1 ถึง SF8.4 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรในขณะที่มี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร LPS (B) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ control = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3-10 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1 ถึง SF8.4 ในขณะที่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัส aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

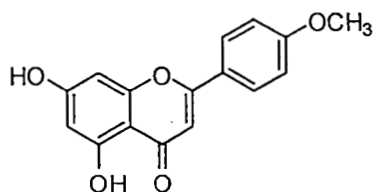
แยกสารจากส่วนย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสามเงา SF8.1 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัด (SF8.1.1 ถึง SF8.1.4) ทำการรวมส่วนสกัดย่อย SF8.1.1 กับ SF8.1.3 เข้าด้วยกันเป็นส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 พบว่าส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย SF8.1.2 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3-4) จากนั้นทำการแยกส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 ต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 3-4 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF8.1

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF8.1.1+3	118.2	66.31
SF8.1.2	20.5	12.33
SF8.1.2	20.5	44.71
รวม	213.0	123.35

นำส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 10 ส่วน (SF8.1.1+3-1 ถึง SF8.1.1+3-10) พบว่า ส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3-8 มีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3-4 มีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3-5) และเมื่อนำส่วน

สกัดย่อย SF8.1.1+3-7 มาทำการตกผลึกได้ 2 ส่วนคือ SF8.1.1+3-7_R และ SF8.1.1+3-7_C พบว่า SF8.1.1+3-7_C คือสาร CI-2 หรือ acacetin (4'-O-methylapigenin) มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 4.1 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองและมีโครงสร้างดังรูปที่ -3-11



รูปที่ -3-11 โครงสร้างของ acacetin

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR และ Mass spectroscopy ของสาร acacetin

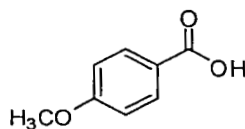
¹H-NMR (CDCl₃+MeOD, 400 MHz): δ3.80 (s, 3H), δ6.18 (s, 1H), δ6.36 (s, 1H), δ6.47 (s, 1H), δ6.92 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), δ7.76 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), ¹³C-NMR (CDCl₃+MeOD, 100 MHz): δ55.2, 94.1, 99.1, 103.5, 104.4, 114.3, 123.3, 127.9, 157.8, 161.4, 162.4, 164.0, 164.1, 182.3. HRMS (ESI): C₁₆H₁₂O₅Na [M+Na]⁺, Anal. Cal. 307.0582, Found. 307.0571.

ตารางที่ 3-5 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF8.1.1+3-1	7.6	6.43
SF8.1.1+3-1	15.5	13.11
SF8.1.1+3-3	7.6	3.89
SF8.1.1+3-4	7.6	2.45
SF8.1.1+3-4	7.6	4.06
SF8.1.1+3-6	16.5	13.96
SF8.1.1+3-6	16.5	5.16
SF8.1.1+3-8	29.9	25.30
SF8.1.1+3-8	29.9	18.44
SF8.1.1+3-10	5.2	7.78
รวม	119.0	100.58

ส่วนสกัดย่อย SF8.1.2 นำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 3 ส่วนสกัด (SF8.1.2-1 ถึง SF8.1.2-3) พบว่า ส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-3 มีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และ

ส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-2 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3-6) จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-3 มาทำการแยกสารด้วยเครื่อง HPLC ได้ 2 ส่วนคือ SF8.1.2-3_{impure HPLC} และ SF8.1.2-3_{HPLC} พบว่า SF8.1.2-3_{HPLC} คือสาร CI-1 หรือ *p*-anisic acid มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.9 มิลลิกรัม ซึ่งที่มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวและมีโครงสร้างดังรูปที่ 3-12



รูปที่ 3-12 โครงสร้างของ *p*-anisic acid

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR และ Mass spectroscopy ของสาร *p*-anisic acid

¹H-NMR (CDCl₃+MeOD, 400 MHz): δ3.83 (s, 3H), δ6.89 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), δ7.98 (d, *J*=8.2 Hz, 2H), ¹³C-NMR (CDCl₃+MeOD, 100 MHz): δ55.3, 113.5, 122.5, 131.9, 163.4, 168.8. HRMS (ESI): C₈H₈O₃Na [M+Na]⁺, Anal. Cal. 175.0371, Found. 175.0370.

ตารางที่ 3-6 เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF8.1.2

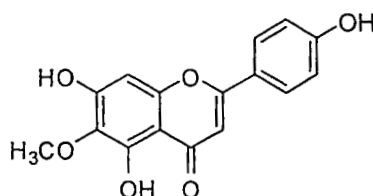
ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง
SF8.1.2-1	1.6	7.80
SF8.1.2-1	1.6	7.80
SF8.1.2-1	1.6	94.63
7.80	1.6	108.77

นำส่วนสกัดย่อย SF8.2 มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 6 ส่วนสกัด (SF8.2.1 ถึง SF8.2.6) ทำการรวมส่วนสกัดย่อย SF8.2.2 กับ SF8.2.3 เข้าด้วยกันเป็นส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3 และรวมส่วนสกัดย่อย SF8.2.4 กับ SF8.2.5 เข้าด้วยกันเป็นส่วนสกัดย่อย SF8.2.4+5 พบว่า ส่วนสกัดย่อย SF8.2.4+5 มีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย SF8.2.6 มีเปอร์เซนต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3-7)

ตารางที่ 3-7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย SF8.2

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
SF8.2.1	8.7	3.29
SF8.2.2+3	8.7	3.29
SF8.2.2+3	8.7	SF8.2.1
SF8.2.1	8.7	3.29
3.29	8.7	3.29

นำส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3 มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัด (SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4) พบว่า ส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3-2 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3-3 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 4-7) และเมื่อนำส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3-2 มาทำการตกผลึกได้ 2 ส่วนคือ SF8.2.2+3-2_r และ SF8.2.2+3-2_c พบว่า SF8.2.2+3-2_c คือสาร CI-3 หรือ hispidulin มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 12.6 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองและมีโครงสร้างดังรูปที่ -3-13



รูปที่ -3-13 โครงสร้างของสารประกอบ hispidulin

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR และ Mass spectroscopy ของสาร hispidulin

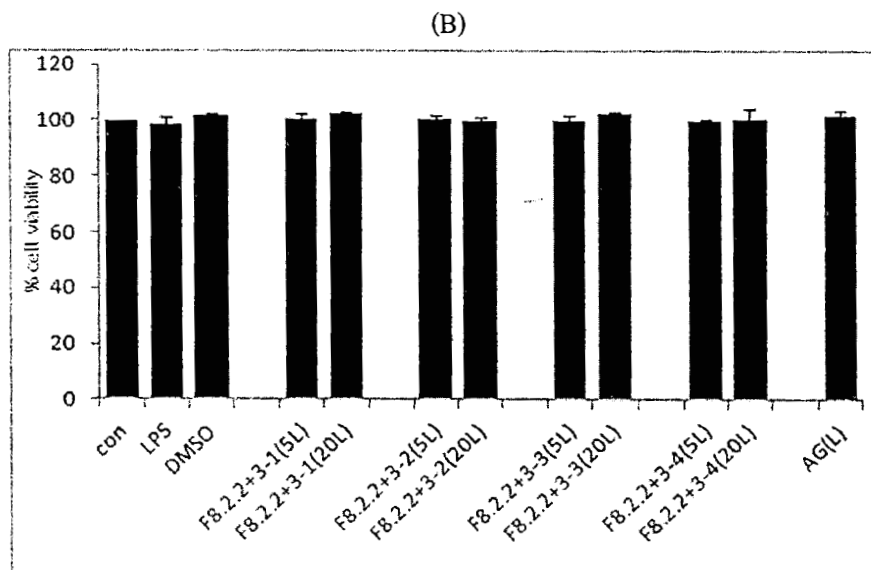
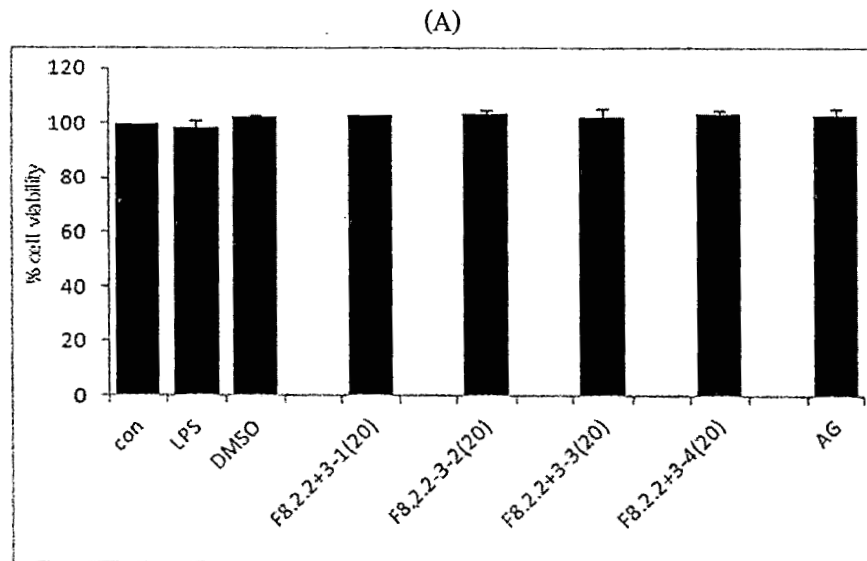
¹H-NMR (CDCl₃+MeOD, 400 MHz): δ3.88 (s, 3H), δ6.47 (s, 1H), δ6.48 (s, 1H), δ6.87 (d, J=7.3 Hz, 2H), δ7.71 (d, J=7.3 Hz, 2H), ¹³C-NMR (CDCl₃+MeOD, 100 MHz): δ60.0, 93.9, 102.2, 104.5, 115.5, 121.7, 127.9, 131.1, 152.2, 152.9, 156.6, 160.6, 164.6, 182.6. HRMS (ESI): C₁₆H₁₂O₆Na [M+Na]⁺, Anal. Cal. 323.0532, Found. 323.0534.

ตารางที่ 3-8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสัปดาห์ย่อยที่แยกได้จากส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3

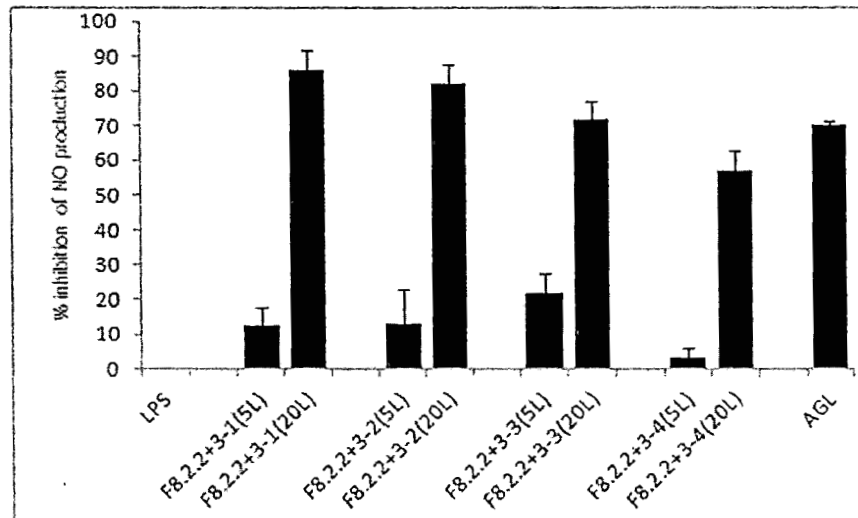
ส่วนสัปดาห์ย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
SF8.2.2+3-1	11.9	25.87
SF8.2.2+3-1	11.9	25.87
SF8.2.2+3-1	11.9	25.87
SF8.2.2+3-4	11.9	25.87
รวม	63.4	137.83

ผลการศึกษาค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ย่อยในสภาวะที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้งเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ไม่แสดงความแตกต่างกับเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ -3-13) ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ย่อย และเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนของเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.15 ± 0.50 ไมโครโมลาร์ และปริมาณของไนโตรเจนของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 32.83 ± 0.59 ไมโครโมลาร์ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4 พบว่าส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-1 และส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-2 มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงสุด โดยส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-1 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 12.53 ± 5.35 และ 86.43 ± 5.60 ตามลำดับ และส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-2 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 13.21 ± 9.47 และ 82.19 ± 5.80 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.2.2+3-4 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ 3.16 ± 2.60 และ 56.87 ± 6.05 ส่วน aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 70.53 ± 1.08 (ดังแสดงในรูปที่ -3-14)

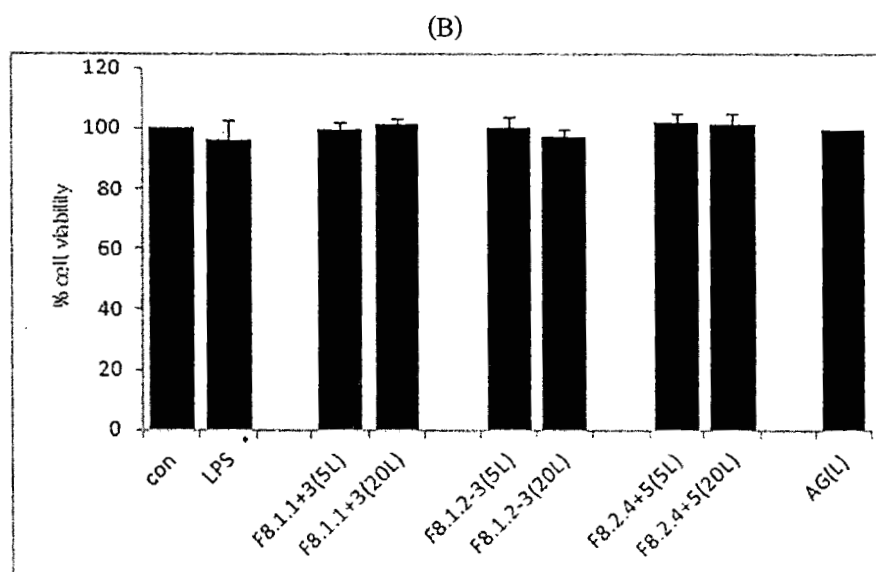
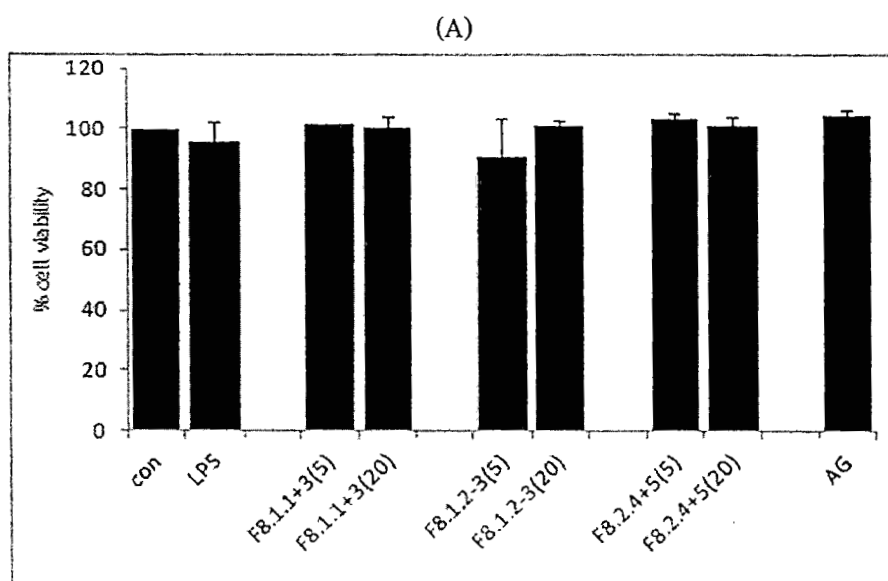
ผลการศึกษาค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ย่อย SF8.1.1+3, SF8.1.2-3 และ SF8.2.4+5 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสัปดาห์ย่อยในสภาวะที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้งเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ไม่แสดงความแตกต่างกับเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในรูปที่ -3-15)



รูปที่ -3-13 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (A) และ ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1 ถึง SF8.4 ในขณะที่มี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร LPS (B) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ control = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ DMSO เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

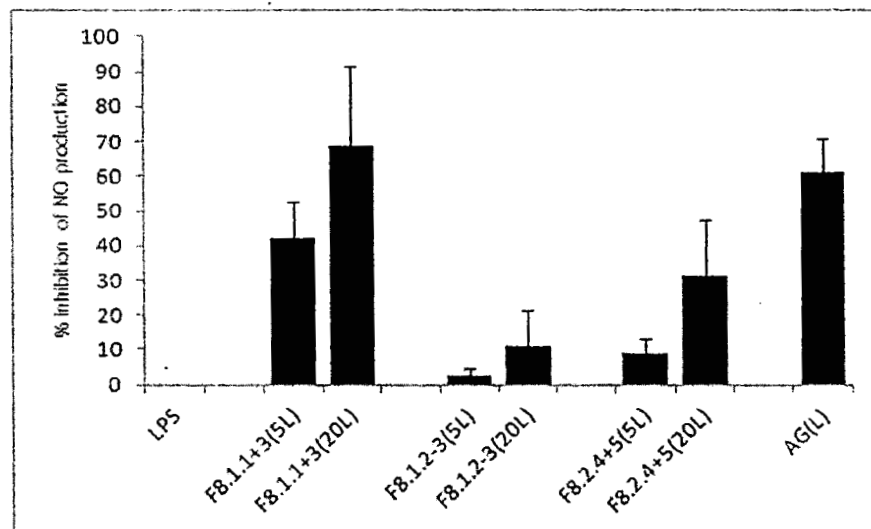


รูปที่ -3-14 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.2.2+3-1 ถึง SF8.2.2+3-4 ในขณะที่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AGI = เซลล์ที่สัมผัส aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



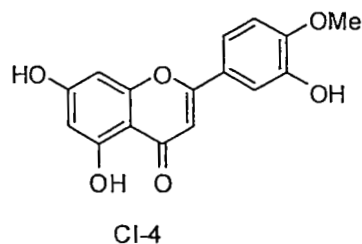
รูปที่ 3-15 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3, SF8.1.2-3 และ SF8.2.4+5 ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (A) และที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3, SF8.1.2-3 และ SF8.2.4+5 ในขณะที่มี 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร LPS (B) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ control = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.6 เปอร์เซ็นต์ DMSO เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย และเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณไนโตรท์ของเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 0.42 ± 0.12 ไมโครโมลาร์ และปริมาณของไนโตรท์ของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 97.87 ± 18.30 ไมโครโมลาร์ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ SF8.1.1+3, SF8.1.2-3 และ SF8.2.4+5 พบว่าส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3 มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 42.29 ± 10.31 และ 68.51 ± 23.05 ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย SF8.1.2-3 ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ที่ความเข้มข้น 5 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ 2.96 ± 1.86 และ 11.21 ± 10.16 และผล SF8.2.4+5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ 8.90 ± 4.23 และ 31.37 ± 16.28 ส่วน aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 61.21 ± 9.83 (รูปที่ 3-16)



รูปที่ 3-16 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF8.1.1+3, SF8.1.2-3 และ SF8.2.4+5 ในขณะที่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัส aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3

นำส่วนสกัดย่อย SF5.1+2.2R1-3 มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 2 ส่วนสกัด (SF5.1+2.2R1-3.1 ถึง SF5.1+2.2R1-3.2) พบว่า SF5.1+2.2R1-3.2 คือสาร CI-4 หรือ diosmetin มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองและมีโครงสร้างดังรูปที่ 3-17



รูปที่ 3-17 โครงสร้างของสารประกอบ diosmetin (4'-O-methyluteolin)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR และ Mass spectroscopy ของสาร diosmetin

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$, 400 MHz): δ 3.89 (s, 3H), δ 6.21 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), δ 6.38 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), δ 6.48 (s, 1H), δ 6.88 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), δ 7.33 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), δ 7.38 (dd, $J=2.2, 8.5$ Hz, 1H), $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$, 100 MHz): δ 55.9, 94.3, 99.2, 103.9, 104.0, 111.0, 112.6, 113.9, 124.0, 146.3, 150.4, 164.0, 164.1. HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Anal. Cal. 323.0532, Found. 323.0534.

3.4ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบที่ได้จากใบตำมะง่า

ผลการศึกษาค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารประกอบ acacetin, *p*-anisic acid, hispidulin และ diosmetin พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับสารประกอบทุกความเข้มข้นในสถานะที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้งเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ไม่แสดงความเป็นพิษกับเซลล์ เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (ดังแสดงในตาราง 3-9)

ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารประกอบ และเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว พบว่าปริมาณไนโตรเจนของเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 1.00 ± 1.33 ไมโครโมลาร์ และปริมาณของไนโตรเจนของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 58.30 ± 7.37 ไมโครโมลาร์ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ *p*-anisic acid, acacetin, hispidulin และ diosmetin พบว่าสารทั้งหมดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น สารประกอบ acacetin และ hispidulin มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุด มีค่า IC_{50} ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ >100, 43.52, 43.66 และ 57.09 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ ค่า IC_{50} ของ aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) มีค่าเท่ากับ 58.97 ไมโครโมลาร์ ดังตารางที่ 3-10

ตารางที่ 3-9 ความเข้มข้นไนไตรท์ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารประกอบ ที่ได้จากใบส้มมะง่า

สารทดสอบ		ความเข้มข้น ไนไตรท์ (ไมโคร โมลาร์)	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการผลิต ไนตริกออก ไซด์	เปอร์เซ็นต์การมี ชีวิตรอดของ เซลล์
control		1.00 ± 1.33	-	100 ± 0.00
LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		58.30 ± 7.37	0.00 ± 0.00	100.26 ± 3.18
DMSO 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)		0.95 ± 1.06	98.66 ± 2.69	100.56 ± 3.84
<i>p</i> -anisic acid (+LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.12 ± 0.85	-1.00 ± 15.78	99.97 ± 1.42
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.55 ± 1.21	-11.68 ± 5.24	99.98 ± 1.86
	25 ไมโครโมลาร์	0.77 ± 1.04	-9.26 ± 7.82	95.19 ± 8.08
	50 ไมโครโมลาร์	0.32 ± 0.52	-1.80 ± 9.60	98.35 ± 2.64
	100 ไมโครโมลาร์	0.13 ± 0.67	2.45 ± 8.84	98.65 ± 2.10
acacetin (+LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.14 ± 0.94	11.05 ± 9.77	99.58 ± 2.77
	12.5 ไมโครโมลาร์	1.03 ± 0.97	21.19 ± 3.50	100.73 ± 3.28
	25 ไมโครโมลาร์	0.70 ± 1.22	43.97 ± 6.88	99.26 ± 2.68
	50 ไมโครโมลาร์	0.65 ± 0.40	67.55 ± 8.20	95.47 ± 5.55
	100 ไมโครโมลาร์	0.21 ± 0.44	87.00 ± 5.31	94.02 ± 6.25
hispidulin (+LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.15 ± 0.60	17.18 ± 9.78	97.62 ± 2.54
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.55 ± 0.97	17.86 ± 7.42	95.97 ± 3.41
	25 ไมโครโมลาร์	0.75 ± 1.57	35.59 ± 7.35	95.16 ± 2.56
	50 ไมโครโมลาร์	0.48 ± 0.92	66.43 ± 7.90	94.76 ± 4.81
	100 ไมโครโมลาร์	0.49 ± 0.97	93.05 ± 1.57	91.81 ± 7.60
diosmetin (+LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	55.76 ± 10.73	5.12 ± 6.13	95.63 ± 4.06
	12.5 ไมโครโมลาร์	51.19 ± 9.25	16.05 ± 8.33	96.33 ± 3.24
	25 ไมโครโมลาร์	37.44 ± 7.40	38.52 ± 7.52	98.05 ± 1.76
	50 ไมโครโมลาร์	20.81 ± 7.99	68.29 ± 10.25	99.69 ± 0.85
	100 ไมโครโมลาร์	21.29 ± 6.74	65.04 ± 6.35	99.74 ± 0.57

<i>p</i> -anisic acid (-LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.12 ± 0.85		104.95 ± 1.83
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.55 ± 1.21		104.30 ± 1.70
	25 ไมโครโมลาร์	0.77 ± 1.04		103.33 ± 1.44
	50 ไมโครโมลาร์	0.32 ± 0.52		102.80 ± 0.80
	100 ไมโครโมลาร์	0.13 ± 0.67		102.80 ± 0.55
acaceticin (-LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.14 ± 0.94	-	102.21 ± 1.68
	12.5 ไมโครโมลาร์	1.03 ± 0.97	-	102.29 ± 2.26
	25 ไมโครโมลาร์	0.70 ± 1.22	-	100.62 ± 3.16
	50 ไมโครโมลาร์	0.65 ± 0.40	-	97.78 ± 6.20
	100 ไมโครโมลาร์	0.21 ± 0.44	-	86.08 ± 18.23
hispidulin (-LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.15 ± 0.60		100.12 ± 1.77
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.55 ± 0.97		99.82 ± 1.68
	25 ไมโครโมลาร์	0.75 ± 1.57		98.10 ± 3.72
	50 ไมโครโมลาร์	0.48 ± 0.92		95.76 ± 7.35
	100 ไมโครโมลาร์	0.48 ± 0.92		87.27 ± 15.86
diosmetin (-LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.57 ± 0.92	-	99.97 ± 1.76
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.57 ± 1.27	-	100.12 ± 2.35
	25 ไมโครโมลาร์	1.57 ± 2.06	-	101.18 ± 1.85
	50 ไมโครโมลาร์	0.11 ± 0.98	-	100.05 ± 1.65
	100 ไมโครโมลาร์	1.33 ± 1.74	-	100.40 ± 1.97
AG (+LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.43 ± 0.41	9.41 ± 2.88	99.93 ± 3.38
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.95 ± 1.02	15.82 ± 4.58	100.99 ± 5.63
	25 ไมโครโมลาร์	1.23 ± 1.25	29.53 ± 1.81	99.62 ± 3.98
	50 ไมโครโมลาร์	0.18 ± 0.76	51.22 ± 5.70	99.76 ± 3.62
	100 ไมโครโมลาร์	2.41 ± 2.30	73.16 ± 2.29	101.80 ± 1.10
AG (-LPS)	6.25 ไมโครโมลาร์	0.43 ± 0.41	-	99.52 ± 0.55
	12.5 ไมโครโมลาร์	0.95 ± 1.02	-	97.38 ± 1.31
	25 ไมโครโมลาร์	1.23 ± 1.25	-	97.64 ± 1.31
	50 ไมโครโมลาร์	0.18 ± 0.76	-	99.54 ± 2.59
	100 ไมโครโมลาร์	2.41 ± 2.30	-	98.28 ± 1.48

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยให้ control = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ DMSO เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัส aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ (+LPS) หมายถึง สารทดสอบที่มี LPS (-LPS) หมายถึง สารทดสอบที่ไม่มี LPS

ตารางที่ 3-10 ค่า IC_{50} ของการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารประกอบ acacetin, *p*-anisic acid และ hispidulin ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS

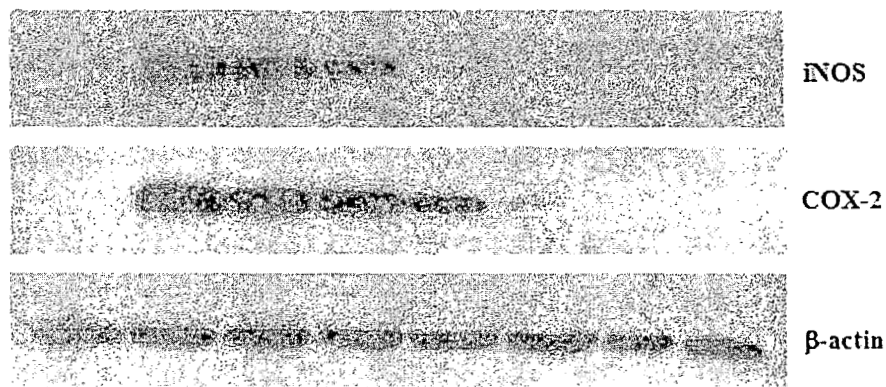
สารประกอบ	ค่า IC_{50} (ไมโครโมลาร์)
<i>p</i> -anisic acid	> 100
acacetin	43.52 ± 6.43
acacetin	43.52 ± 6.43
diosmetin	57.09 ± 4.04
aminoguanidine	58.97 ± 11.19

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.5 กลไกระดับโมเลกุลในการต้านอักเสบของสาร hispidulin

ในการทดลองต่อไปทำการศึกษากลไกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารประกอบ hispidulin ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาะ ผลการศึกษาโปรตีนโดยเทคนิค Western blot ในรูปที่ 3-18 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์แมคโครฟาจสัมผัสกับ LPS จะทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารใด แต่เมื่อเซลล์ได้รับ hispidulin ทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS ที่เหนี่ยวนำโดย LPS ลดลง ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน iNOS ในเซลล์ที่สัมผัสกับ hispidulin เพียงอย่างเดียว และเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสาร hispidulin นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของสาร hispidulin ต่อปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค realtime-RT-PCR พบว่า hispidulin สามารถลดปริมาณ mRNA ของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ได้เช่นเดียวกับผลการศึกษาปริมาณโปรตีน iNOS ดังแสดงผลในรูปที่ 3-19

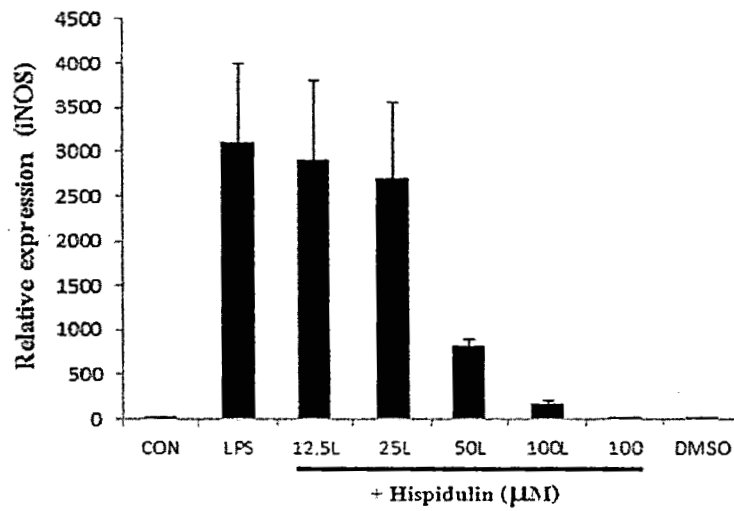
LPS (1 μ g/mL)	-	+	+	+	+	+	-	-
hispidulin (μ M)	-	-	12.5	25	50	100	100	-
DMSO	-	-	-	-	-	-	-	+



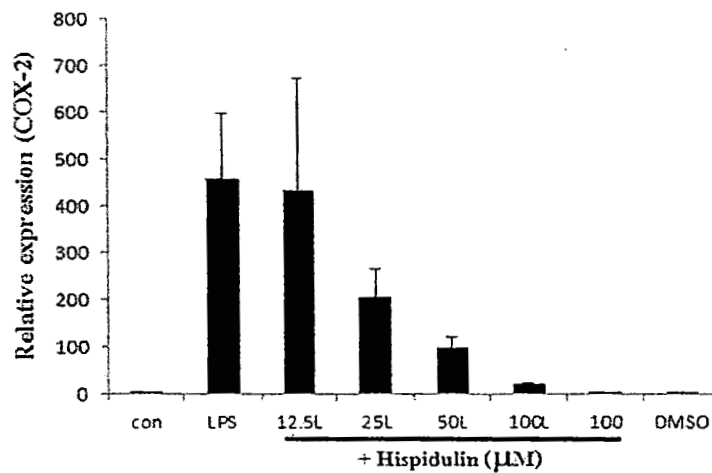
รูปที่ 3-18 การวิเคราะห์ระดับโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค Western blot analysis ในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกบ่มด้วย hispidulin ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 μ g/mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน

โพรستاแกลนดิน E2 เป็นสารสื่อกลางในการอักเสบที่สำคัญอีกชนิดนอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่เกิดกระบวนการอักเสบ โดยเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกในขณะที่มีการอักเสบ ในการศึกษาพบว่าปริมาณโพรستاแกลนดิน E2 ที่พบในอาหารเลี้ยงเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 111.96 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 51678.52 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่เซลล์ที่สัมผัสกับ hispidulin และ LPS จะมีปริมาณโพรستاแกลนดิน E2 ลดลงในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ตารางที่ 3-10) ในการทดลองนี้ใช้ยา Indomethacin เป็นตัวควบคุมแบบเบวกสำหรับเอนไซม์ COX-2 โดยเซลล์ที่สัมผัสกับ Indomethacin (10 μ M) และ LPS มีปริมาณโพรستاแกลนดิน E2 ลดลงเหลือเท่ากับ 19.2 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 99.96

(A)



(B)



รูปที่ 3-19 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน iNOS (A) และ COX-2 (B) ระดับ mRNA ในเซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ที่ถูกบ่มด้วย hispidulin ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน โดยให้ CON = เซลล์ควบคุม, DMSO = เซลล์ที่สัมผัสกับ 0.4% DMSO

ตารางที่ 3-10 แสดงการยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ของ hispidulin ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ hispidulin (ไมโครโมลาร์)		ความเข้มข้นของ PGE ₂ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ^a	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^b
+LPS	6.25	40642.55	21.36
	6.25	25997.89	49.69
	6.25	13057.14	74.73
	6.25	2244.02	95.66
	100	281.04	99.46
-LPS	100	43.10	-
Control		281.04	-
LPS (1 ug/ml)		51678.52	0.00
Indomethacin 10 μ M + LPS		19.2	99.96
DMSO (0.4%)		176.78	74.73

^a ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ครั้ง

^b ค่าการยับยั้งการผลิตโพรสตาแกลนดิน E₂ ของแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับปริมาณโพรสตาแกลนดิน E₂ ที่ได้จากเซลล์ที่สัมผัส LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพียงอย่างเดียว

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การหลังสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ (NO) และพรอสตาแกลนดิน E_2 (PGE_2) ออกมาจากเซลล์แมคโครฟาจในขณะที่มีการอักเสบ เป็นปฏิกิริยาการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ แต่ถ้ามีการหลังสารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้มากเกินไปจะทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) ดังนั้นการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 จะเป็นวิธีการหนึ่งในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบเหล่านี้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการแยกสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบจากใบส้มเงาะ โดยเทคนิคฤทธิ์ทางชีวภาพ นำการสกัด ฤทธิ์ต้านการอักเสบประเมินจากการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ทำการแยกสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของใบส้มเงาะ ซึ่งเป็นส่วนสกัดย่อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ดีที่สุด จากส่วนสกัดย่อย 3 ชนิดจากส่วนสกัดเอทานอลจากใบส้มเงาะ คือ ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดน้ำ (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2554) นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 8 ส่วนสกัดย่อย คือ SF1-SF8 เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่า SF5 และ SF8 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูง จึงได้เลือกนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต SF5 และ SF8 มาศึกษาต่อ

จากการแยกสารประกอบที่จากใบส้มเงาะ โดยเทคนิคฤทธิ์ต้านอักเสบนำการสกัดได้สาร 3 ชนิด คือ acacetin, hispidulin และ diosmentin (ดังภาพสเปกตรัมในภาคผนวก รูป ผ 1-2 ถึง ผ 1-4) ในขณะที่การแยก *p*-anisic acid จากส่วนสกัดย่อยไม่ได้มาจากเทคนิคฤทธิ์ทางชีวภาพนำการสกัดโดยตรงแต่เป็นเพราะส่วนสกัดนี้มีสเปกตรัมไม่ซับซ้อน (ดังภาพสเปกตรัมในภาคผนวก รูป ผ 1-1) และอาจมีอยู่มากในส่วนสกัดย่อยนี้ จึงสามารถแยกออกมาได้ง่าย จากนั้นนำสารประกอบทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *p*-anisic acid, acacetin, hispidulin และ diosmentin มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า acacetin, hispidulin และ diosmentin ซึ่งมีโครงสร้างเป็นฟลาโวน (Flavone) สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดี โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (ดังตารางที่ 3-9) แสดงให้เห็นว่าการทดลองของปริมาณไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สัมผัสสารประกอบ acacetin, hispidulin และ diosmentin ไม่ได้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือการตายของเซลล์ แต่เป็นผลมาจากความสามารถในการยับยั้งการผลิต

ไนตริกออกไซด์ของสารประกอบ acacetin, hispidulin และ diosmentin ในขณะที่ *p*-anisic acid นั้นไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์เช่นกันแต่มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าสาร acacetin และ hispidulin นี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงกว่า aminoguanidine ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ iNOS ที่รู้จักกันดี และใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวกในการทดลองครั้งนี้ โดย acacetin และ hispidulin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 43.52 ± 6.43 ไมโครโมลาร์ และ 43.66 ± 4.04 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า aminoguanidine ที่มี IC_{50} เท่ากับ 58.97 ± 2.45 ไมโครโมลาร์

ในการวิจัยครั้งนี้ยังได้เลือก hispidulin ไปทำการศึกษากลไกในการต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS พบว่า hispidulin นอกจากจะสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์แล้ว ยังยับยั้งการผลิต PGE_2 ได้เช่นกัน (ตารางที่ 3-10) จากผลที่แสดงในรูปที่ 3-18 และ 3-19 พบว่า hispidulin สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน และ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 ของ hispidulin ส่วนหนึ่งมาจากความสามารถในการลดการแสดงออกของ mRNA ของ iNOS และ COX-2 เป็นผลให้มีการลดลงของโปรตีน iNOS และ COX-2 และทำให้ผลผลิตของเอนไซม์ทั้งสอง คือ ไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 ลดลง นั่นคือเซลล์มีการตอบสนองต่อการอักเสบลดลง

การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบ *p*-anisic acid, hispidulin และ diosmentin ในใบสามเงา ในขณะที่การแยกสาร acacetin ได้จากใบสามเงา สอดคล้องกับการรายงานโดย Shrivastava and Patel (2007) ที่พบ acacetin ในใบสามเงา ในขณะที่มีการพบ *p*-anisic acid ในพืชชนิดอื่น เช่น *Coix aquatica* Roxb (Rungprom et al., 2007) และ *Ficus mucoso* (Jean et al., 2011) ส่วน hispidulin พบใน *Clerodendrum indicum*, *Clerodendrum petasited* และ *Clerodendrum infortunatum* (Hazekamp et al., 2001; Shrivastava and Patel, 2007) เป็นต้น ส่วน diosmentin พบใน *Dracocephalum peregrinum* (Dai et al., 2008), *Penstemon gentianoides* และ *Penstemon campanulatus* (Domínguez et al., 2011) *Schizonepeta tenuifolia* (Wang et al., 2012), *Chrysanthemum morifolium* (Lee et al., 2013)

Pan et al. (2006) รายงานว่า acacetin สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน ตามลำดับ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS ในปี ค.ศ. 2005 Cottiglia et al. รายงานว่า hispidulin แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบที่ผิวหนังของหนูที่เหนี่ยวนำด้วยน้ำมันสลัด (croton oil) และสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และ $TNF-\alpha$ ในเซลล์แมคโครฟาจปฐมภูมิจากไขกระดูก (Comalada et al., 2006) และเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 รวมทั้งเซลล์ไมโครเกลีย N-11 (Shanmugam et al., 2008) ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS (Shanmugam et al., 2008) นอกจากนี้ Clavin et al. (2007) รายงานว่า hispidulin ยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ที่เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS ในเซลล์ Jurkat ที่เหนี่ยวนำด้วย $TNF-\alpha$ สำหรับฟลาโวนอีกชนิดหนึ่งคือ diosmetin ถูกพบว่าลดการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในเซลล์แมคโครฟาจจากช่องท้องของหนูที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วย LPS (Matsuda et al.,

2003) ซึ่งรายงานเหล่านี้สนับสนุนผลการทดลองของเราที่ค้นพบว่า acacetin, hispidulin และ diosmentin ที่สกัดได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตในใบส้มเงาะ มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS แสดงว่าสารเหล่านี้น่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์การต้านการอักเสบในใบส้มเงาะ

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า acacetin, hispidulin และ diosmentin ที่แยกจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดี โดยที่ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 สารประกอบนี้เป็นส่วนหนึ่งของสารที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของใบส้มเงาะ และข้อมูลที่ได้นี้จะเป็หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการใช้สมุนไพรส้มเงาะเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ และอาจมีการนำ acacetin, hispidulin และ diosmentin ไปพัฒนาเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

4.2 สรุปผลการทดลอง

1. สารประกอบ acacetin, hispidulin และ diosmentin ที่แยกจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบส้มเงาะมีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบ
2. สารประกอบ hispidulin มีฤทธิ์มีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ มีกลไกการต้านอักเสบคือ ยับยั้งที่การแสดงออกของ mRNA และ โปรตีนของ iNOS และ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS

เอกสารอ้างอิง

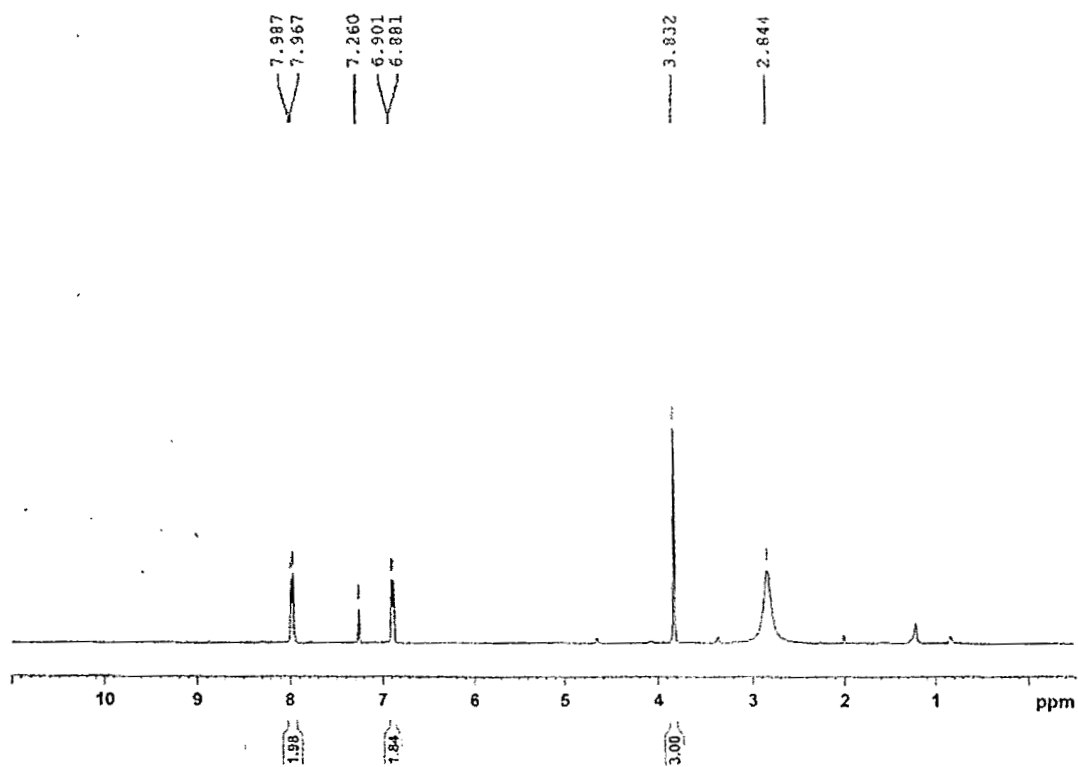
- กล่าวขวัญ ศรีสุข. และเอกรัฐ ศรีสุข (2554). การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสมุนไพรป่าชายเลนลุ่มแม่น้ำ
เวฬุ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย. (2549). สำนักงานอนุรักษ์ทรัพยากรป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเล
และชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน. (มปป.). สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ขลุง) จังหวัดจันทบุรี ส่วน
บริหารจัดการทรัพยากรป่าชายเลนที่ 1 กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวง
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- Achari, B., Chaudhari, C., Saha, C.R., Dutta, P.K. and Pakrashi, S.C. (1990). A clerodane diterpenoid and
other constituents of *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry*. 29:3671-3673.
- Akihisa, T., Ghosh, P., Thakur, S., Nagata, H., Tamura, T. and Matsumoto, T. (1990). 24,24-dimethyl-25-
dehydrolophenol, A-4-methylsterol from *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry*. 29:1639- 1641.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthase: structure, function and
inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- Anitha, R., and Kannan, P. (2006). Antifungal activity of *Clerodendrum inerme* and *Clerodendrum*
phlomidis. *Turkish. Journal Biology*. 30, 139-142.
- Calis, I., Hosny, M., Yürüker, A., Wright, A.D., Sticher, O. (1994). Inerminosides A and B, two novel
complex iridoid glycosides from *Clerodendrum inerme*. *Journal of Natural Products*. 57: 494-500.
- Chirva, V.Y .and Garg, G. (1980). Chemical investigation of leaves and stem of *Clerodendrum*
tomentosum R. Br. *Pharmazie*. 35:500-501.
- Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Munoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C. and Martino, V. (2007).
Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *Journal of*
Ethnopharmacology. 112:585-589.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Inter Immunopharm*. 1: 1397-1406.
- Cottiglia, F., Casu, L., Bonsignore, L., Casu, M., Floris, C., Sosa, S., Altinier, G., Della Logia, R., 2005.
Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from *Santolina insularis*.
Zeitschrift für Naturforschung 60c, 63-66.
- Cross, R. K, Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel*
Disease. 9: 179-189.

- Dai, L.M., Zhao, C.C., Jin, H.Z., Tang, J., Shen, Y.H., Li, H.L., Peng, C.Y., Zhang, W.D. (2008). A new ferulic acid ester and other constituents from *Dracocephalum peregrinum*. Archives of Pharmacol Research. 31:1325-1329.
- Dorheim, M.A., Tracey, W.R., Pollock, J.S., Grammas, P. (1994). Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. Biochemical Biophysics Research Communication. 205: 659-665.
- Domínguez, M., Avila, J.G., Nieto, A., Céspedes, C.L. (2011). Anti-inflammatory activity of *Penstemon gentianoides* and *Penstemon campanulatus*. Pharmaceutical Biology. 49: 118-124.
- Gopal, N. and Sengottuvelu, S. (2008). Hepatoprotective activity of *Clerodendrum inerme* against CCL4 induced hepatic injury in rats. Fitoterapia. 79: 24-26.
- Grisham, M. B, Jourdain, D., Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. American Journal Physiology. 276: G315-321.
- Guzik, T.J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. Journal of Physiology and Pharmacology. 54, 469-487.
- Hazekamp, A., Verpoorte, R., Panthong, A. (2001). Isolation of a bronchodilator flavonoids from Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. Journal of Ethnopharmacology. 78: 45-49.
- Jean, J.K.B, Rustamova, K., Bruno, N.L., Diderot, T.N., Silvere, A.N., Sufyan, A.M., Khalid, A., Mohammed, I.C., Sean, T.P., Ralphred, H., Augustin, E.N., Etienne, T. and Muhammad, S.A.. (2011). Isoflavone dimmers and other bioactive constituents from the figs of *Ficus mucosa*. Journal of Natural Products. 74:1370-1378.
- Kanchanapoom T., Kasai R., Chumsri P., Hiraga Y. and Yamasaki K. (2001). Megastigmane and iridoid glucosides from *Clerodendrum inerme*. Phytochemistry. 58: 333-336.
- Katzung, B.G. Basic & Clinical Pharmacology. (2001). International Edition. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Latham, K.A., Whittington, K.B., Zhou, R., Qian, Z., Rosloniec, E.F. (2005). Ex vivo characterization of the autoimmune T cell response in the HLA-DR1 mouse model of collagen-induced arthritis reveals long-term activation of type II collagen-specific cells and their presence in arthritic joints. Journal of Immunology. 174, 3978-3985.

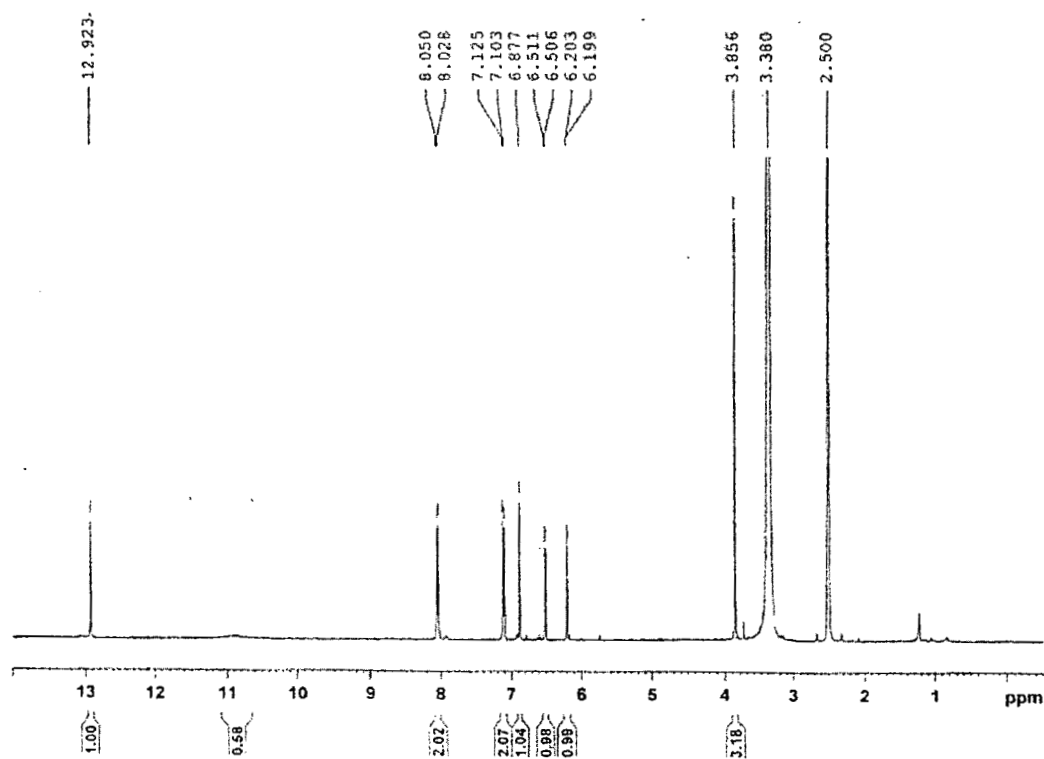
- Lee, S.J., Jung, T.H., Kim, H., Jeong, D., Choi, G., Park, W.K., Kong, J.Y., Jin, M.H., Cho, H. (2013). Inhibition of c-Kit signaling by diosmetin isolated from *Chrysanthemum morifolium*. Archives of Pharmacol Research. 2013 May 26. [Epub ahead of print]
- Manoharan, S., Kavitha, K., Senthil, N., Renju, G.L. (2006). Evaluation of anticarcinogenic effect of *Clerodendron inerme* on 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. Singapore Medical Journal. 47: 1038-1043.
- Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y. et. al. (1999). Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. Journal of Agricultural Food Chemistry 47: 1749-1754.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., Yoshikawa, M. (2003). Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 11: 1995-2000.
- Mehdi, H., Tan, G.T., Pezzuto, J.M. et. al. (1997). Cell culture assay system for the evaluation of natural product mediated anti-hepatitis B virus activity. Phytomedicine. 3: 369-377.
- Nan H., Wu J, Zhang S. (2005). A new phenylethanoid glycoside from *Clerodendrum inerme*. Pharmazie. 60: 798-799.
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J. and Ho, C.T. (2006). Acacetin suppressed LPS-induced up expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. Biochemical Pharmacology. 72: 1293-1303.
- Pandey R., Ram K. Verma, Subhash C. Singh, Madan M. Gupta. (2003). 4 α -Methyl-24 β -ethyl-5 α -cholesta-14, 25-dien-3 β -ol and 24 β -ethylcholesta-5, 9(11), 22E-trien-3 β -ol, sterols from *Clerodendrum inerme*. Phytochemistry. 63: 415-420.
- Pandey R., Ram K. Verma, Madan M. Gupta. (2005). Neo-clerodane diterpenoids from *Clerodendrum inerme*. Phytochemistry. 66: 643-648.
- Rungprom W and Krawkrajang S. (2007). Weed germination inhibitor from rhizomes of *Coix aquatica* Roxb. Journal of Agricultural Science. 38: 299-302.
- Shanmugam, K., Holmquist, L., Steele, M., Stuchbury, G., Berbaum, K., Schulz, O., Benavente-García, O., Castillo, J., Burnell, J., Garcia Rivas, V., Dobson, G., Münch, G. (2008). Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor

- production in murine microglia and macrophages. *Molecular Nutrition Food Research*. 52,:427-438.
- Shrivastava, N. and Patel, T. (2007). *Clerodendrum* and Healthcare. *Medicinal and Aromatic Plant Science Biotechnology*. 1:142-150.
- Singh, P. and Singhi, C.L. (1981). Chemical investigation of *Clerodendrum fragrans*. *Journal of the Indian Chemical Society*. 58:626-627.
- Spencer, F. and Flippen-Anderson, J.L. (1981). Isolation and x-ray structure determination of neolignan from *Clerodendrum inerme* seeds. *Phytochemistry*. 20:2757-3759.
- Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N. and Srisook, E. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-KB activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 133; 1008-1014.
- Tunctan, B., Altug, S., Uludag, O., Demirkay, B., Abacioglu, N. (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* 48, 37-48.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E., 2000. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research* 1, 67-72.
- Vendatham, T.N.C., Subramanian, S.S. and Harbone, J.B. (1977). 4-methylscutellarein and pectolinarigenin from *Clerodendrum inerme*. *Phytochemistry*. 16:294.
- Wang, B.S., Huang, G.J., Tai, H.M., Huang, M.H. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extracts of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *Food Chemical and Toxicology*. 50,:526-531.
- Wijesundara, D.S.A. (2004). Inventory documentation and status of medicinal plants research in Sri Lanka. In Pons, B., Kanniah, J. et.al. (eds). *Medicinal Plants Research in Asia*, vol. 1: the framework and project workplans. International Plant Genetic Resources Institute-Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia.
- Wright, C. E., Rees, D.D., Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*. 26, 48-57.
- Yankanchi, S.R. and Koli, S.A. (2010). Anti-inflammatory and analgesic activity of mature leaves methanol extract of *Clerodendrum inerme* L.(Gaertn). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2:782-785.

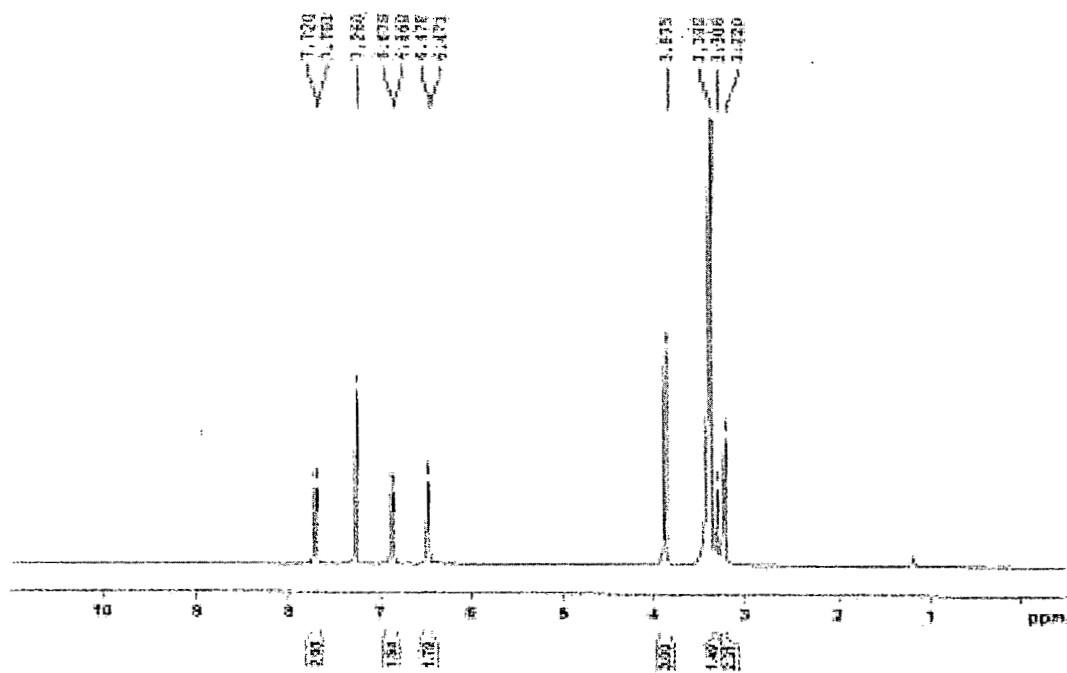
ภาคผนวก



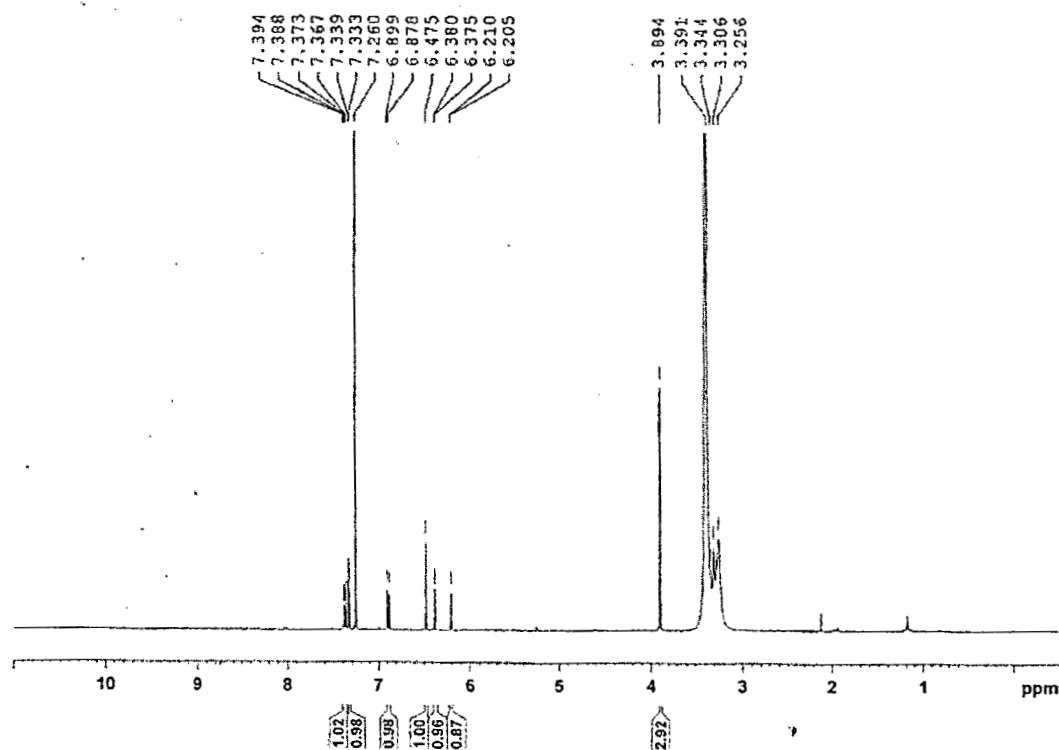
รูปที่ ผ-1-1 สเปกตรัม NMR ของสาร หรือ *p*-anisic acid (CI-1)



รูปที่ ผ-1-2 สเปกตรัม NMR ของสาร acacetin (4'-O-methylapigenin) (CI-2)



รูปที่ ผ-1-3 สเปกตรัม NMR ของสาร hispidulin (CI-3)



รูปที่ พ-1-4 สเปกตรัม NMR ของสาร diosmetin (4'-O-methylfluteolin) (CI-4)

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สุदारัตน์ อินทสุวรรณ, กิ่งกาญจน์ วัชรนาวิ และเอกรัฐ ศรีสุข.ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากใบสามเงา. Proceeding of the 5th Science Research Conference, University of Phayao, Thailand, 2013, pp. 11-15.
2. Ekaruth Srisook, Sudarat Intasuwan, Kingkan Watcharanawee, Mingkwan Chan-in, Wenuka Nachaiyo, Kloakwan Srisook. Anti-inflammatory compounds isolated from *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertner leaves and mechanism of the action in RAW 264.7 macrophages. (Manuscript in preparation).

รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับชาติ

Proceedings of the 5th Science Research Conference

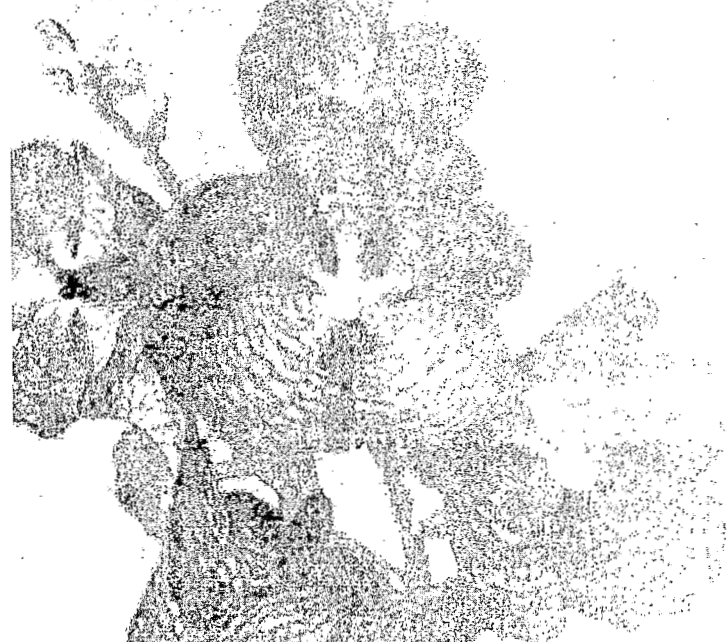
วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 5

4-5 มีนาคม 2556



The 5th Science RESEARCH Conference

ณ อาคารเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร มหาวิทยาลัยพะเยา



ISBN : 978-616-91198-8-3

ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากใบสามเั่ว

Anti-inflammatory Activity of Compounds Isolated from *Clerodendrum inerme* Leavesกล่าวขวัญ ศรีสุข^{1,2*}, สุภารัตน์ อินทสุวรรณ¹, กิ่งกาญจน์ วัชรนาวิ¹ และ เอกรัฐ ศรีสุข^{2,3}¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี 20131²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131³ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี E-mail: klaokwan@buu.ac.th

บทคัดย่อ

สามเั่วเป็นพืชที่ใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านของไทยเพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่าง ๆ ในการศึกษาทำการตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารประกอบที่แยกได้จากใบสามเั่วในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS สาร *p*-anisic acid และ acacetin สามารถแยกได้โดยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างด้วยการวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลกับสเปกตรัมของ NMR ของการรายงานก่อนหน้านี้ สารประกอบทั้งสองสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยไม่เป็นพิษกับเซลล์แมคโครฟาจ โดย acacetin แสดงฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า *p*-anisic acid และ aminoguanidine (สารยับยั้ง iNOS ที่รู้จักกันดี) และจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า acacetin และ *p*-anisic acid มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบและยังช่วยสนับสนุนว่าสามเั่วมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้

Abstract

Clerodendrum inerme (Linn.) Gaertn is medicinal plant which commonly used in Thai traditional medicine to treat various disorders including inflammatory diseases. In this study, anti-inflammatory effects of compounds isolated from *C. inerme* leaves were determined on the production of nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW 264.7 macrophage cells. *p*-anisic acid and acacetin were isolated by silica gel column chromatography. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis and by comparison of their NMR spectroscopic data with those reported in the literature. Both compounds inhibited NO production without cytotoxicity toward macrophages. Acacetin showed stronger inhibitory effect on NO production than *p*-anisic acid and aminoguanidine (a well-known iNOS inhibitor). The results of this study suggest that acacetin and *p*-anisic acid exert anti-inflammatory activity and support the effectiveness of traditional use of *C. inerme* for treatment of inflammatory diseases.

Keywords: *Clerodendrum inerme*/ *p*-anisic acid/ Acacetin/ Anti-inflammatory/ Nitric oxide

บทนำ

การอักเสบ (inflammation) เป็นปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนของเนื้อเยื่อต่างๆ ต่อสิ่งที่ก่ออันตราย เช่น จุลชีพ และเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เสียหายหรือตายลง (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548) การอักเสบก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในร่างกาย ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในเซลล์แมคโครฟาจ ไนตริกออกไซด์นี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลชีพ (Goldsby, et al., 2002) อย่างไรก็ตาม ไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตออกมามากโดยการทำงานของเอนไซม์ iNOS มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคการอักเสบต่างๆ เช่น โรคไขข้อรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) และภาวะช็อกที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อในกระแสโลหิต (Septic shock) (Byeon, et al., 2003) ดังนั้นการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งในการลดการอักเสบ การค้นพบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์จึงอาจเป็นทางหนึ่งในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ สามเั่ว (*Clerodendrum inerme* (Linn.) Gaertn) เป็นพืชในวงศ์ Verbenaceae ถูกใช้เป็นสมุนไพรในทางการแพทย์พื้นบ้านในแถบ จังหวัดจันทบุรี โดยใบใช้รักษาอาการไข้ แก้ผลพริกขี้หนู บวมอักเสบ (พันธุ์พืชสมุนไพรในป่าชายเลน, ม.ป.ป.) จากการศึกษาพบสารที่แยกได้จากพืชชนิดนี้คือ flavones (Vendenthalm, et al., 1997; Shrivastava and Patel, 2007) clerodane

*Corresponding author. E-mail: klaokwan@buu.ac.th



diterpene (Achari, et al., 1990) neolignan (Spencer, et al., 1981) iridoid glycosides (Calis, et al., 1994; Kanchanapoom, et al., 2001) megastigmane glucosides (Chaudhuri, et al., 1980) การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดจากใบส้มมะงาฝรั่งมีฤทธิ์ต้านการสลายเม็ดเลือดแดง (Somasundaram and Sadique, 1986) การต้านเชื้อรา (Anitha and Kannan, 2006) การต้านอนุมูลอิสระ (Gunadeeban, et al., 2010)ฤทธิ์การต้านการอักเสบและแก้ปวด ในสัตว์ทดลอง (Yankanchi, et al., 2010) นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2553 จิตราทองใบ และกาญจนา ภาวงศ์อยู่ พบฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดจากใบส้มมะงาฝรั่งโดยมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มี การรายงานถึงสารที่เป็นตัวแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของใบส้มมะงาฝรั่ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการแยกสารประกอบจากส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตทของส่วนสกัดเอทานอลจากใบส้มมะงาฝรั่งซึ่งเป็นส่วนสกัดที่มีประสิทธิภาพ การต้านการอักเสบดีที่สุด โดยวิธีทางชีวภาพนำการ สกัด (bioassay guided isolation) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สารประกอบที่แยกได้จากใบส้มมะงาฝรั่งในการ ผลิตและพัฒนายาตัวใหม่ที่สามารถต้านการอักเสบ และเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรส้มมะงาฝรั่งต่อไป

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืช

ใบส้มมะงาฝรั่งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เก็บมาจากศูนย์การเรียนรู้และการท่องเที่ยวเชิงนิเวศป่าชายเลนลุ่มน้ำเวฬุ สถานีพัฒนา ทรัพยากรป่าชายเลนที่ 2 (บ้านท่าสอน อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี) และพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จากนั้นนำใบสดมาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดและอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 3 วัน การเตรียมส่วนสกัด ของใบส้มมะงาฝรั่งและแยกสารประกอบบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำใบส้มมะงาฝรั่ง (1,200 กรัม) สกัดด้วยสารละลายเอทานอล (12 L) เป็นเวลา 5 วัน ได้เป็นส่วนสกัดเอทานอล จากนั้นทำการ สกัดแยกส่วน ส่วนสกัดเอทานอลของใบส้มมะงาฝรั่งด้วยเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มมะงา ฝรั่งแยกสารประกอบบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี ระบบ gradient elution ของ เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน (1:99 - 20:80) ได้ 4 ส่วน, เอทิลอะซิเตท:เอทิลอะซิเตท (20:80 - 80:20) ได้ 4 ส่วน, เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน (3:97 - 8:92) ได้ 3 ส่วน จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์ด้วย HPLC ระบบ Isocratic elution ของอะซิโตนในไตรคลอโรเอทิลีน (10:90)

โครงสร้างของสารประกอบ *p*-anisic acid (a) แสดงข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR คือ ¹H NMR (CDCl₃+MeOD, 400 MHz) δ 7.98 (2H, d, J=8.1 Hz, H-2,6), 6.89 (2H, d, J=8.2 Hz, H-3,5), 3.83 (3H, s, 4-OCH₃), ¹³C NMR (CDCl₃+MeOD, 100 MHz) δ 163.8, 163.4, 131.9, 122.5, 113.5, 55.3 สารประกอบนี้ได้พิสูจน์เอกลักษณ์ ¹H NMR และ ¹³C NMR โดยฐานข้อมูลสาธารณะ (Tachai, et al., 2011)

โครงสร้างของสารประกอบ acacetin (b) แสดงข้อมูล ¹H NMR และ ¹³C NMR คือ ¹H NMR (CDCl₃+MeOD, 400 MHz) δ 7.76 (2H, d, J=8.2 Hz, H-2',6'), 6.93 (2H, d, J=8.2 Hz, H-3',5'), 6.47 (1H, s, H-3), 6.36 (1H, s, H-5), 6.18 (1H, s, H-8), 3.80 (3H, s, 4'-OCH₃), ¹³C NMR (CDCl₃+MeOD, 100 MHz) δ 182.3, 164.1, 164.0, 162.4, 161.4, 157.8, 127.9, 123.3, 114.3, 104.4, 103.5, 99.1, 94.1, 55.2 สารประกอบนี้ได้ พิสูจน์เอกลักษณ์ ¹H NMR และ ¹³C NMR โดยฐานข้อมูลสาธารณะ (Xu, et al., 2009)

การวิเคราะห์ปริมาณในไตรคลอโรเอทิลีนและความมีชีวิตรอดของเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของหนูสายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เสริมซีรัมเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ 37 องศา เซลเซียส ในตู้บ่มเซลล์ที่มีอากาศผสมคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุมๆ ละ 1.5x10⁵ เซลล์ จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL เป็นเวลา 22 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย Griess ตามวิธีรายงานโดย Srisook, et al., (2012) การทดสอบความมีชีวิตเซลล์ตรวจสอบโดย ใช้วิธี MTT วิธีที่รายงานโดย Srisook, et al., (2012)

ผลและอภิปราย

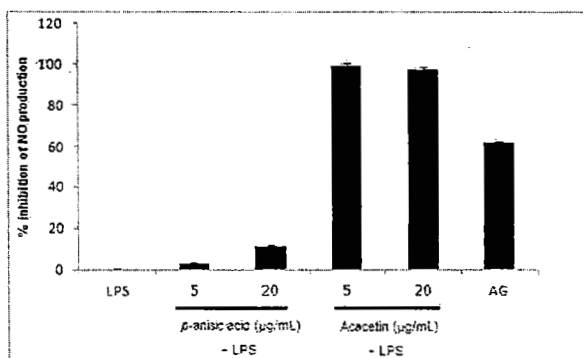
ทำการแยกสารจากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบส้มมะงาฝรั่งโดยวิธีทางชีวภาพนำการสกัด ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบ สารประกอบบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ *p*-anisic acid และ acacetin แสดงโครงสร้างดังรูปที่ 1 ซึ่งมวลโมเลกุลของ *p*-anisic acid และ acacetin เท่ากับ 152.15, 284.26 g/mol ตามลำดับ



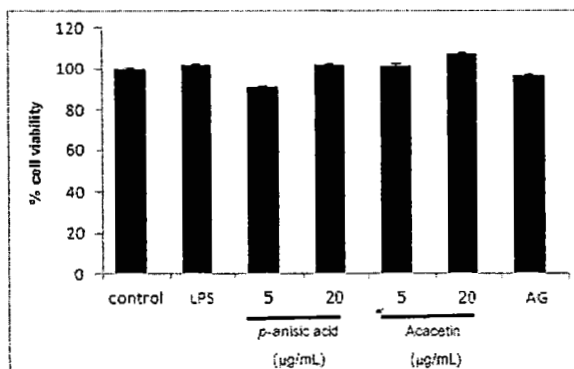
รูปที่ 1 โครงสร้างของ *p*-anisic (a) และ acacetin (b)

ปริมาณไนโตรของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS จะมีค่าเท่ากับ $53.60 \pm 0.13 \mu\text{M}$ ในขณะที่เซลล์แมคโครฟาจที่ไม่ถูกกระตุ้น หรือเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ $0.07 \pm 0.00 \mu\text{M}$ เมื่อเซลล์สัมผัสกับ acacetin ที่ความเข้มข้น 5 และ $20 \mu\text{g/mL}$ (17.5 และ $70.4 \mu\text{M}$ ตามลำดับ) พบว่ามีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ 99.06 ± 0.04 และ $97.50 \pm 0.05\%$ ในขณะที่ *p*-anisic acid ที่ความเข้มข้น 5 และ $20 \mu\text{g/mL}$ (32.86 และ $131.45 \mu\text{M}$ ตามลำดับ) สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้เท่ากับ 2.96 ± 0.1 และ $11.21 \pm 0.13\%$ (รูปที่ 2) ส่วน aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ ยับยั้งได้ $61.75 \pm 0.05\%$

ผลการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับ *p*-anisic acid และ acacetin ที่มีความเข้มข้น 5 และ $20 \mu\text{g/mL}$ พบว่า ทั้ง *p*-anisic acid และ acacetin ไม่แสดงความเป็นพิษกับเซลล์ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ *p*-anisic acid หรือ acacetin ในขณะที่มี LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) เป็นเวลา 22 ชั่วโมง โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



รูปที่ 3 การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ *p*-anisic acid และ acacetin ที่ความเข้มข้น 5 และ $20 \mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 22 ชั่วโมง โดยให้ control = เซลล์ควบคุม LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

ในการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารประกอบที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบส้มเงาะ โดยเทคนิคฤทธิ์ทางชีวภาพผ่านการสกัด พบสาร 2 ชนิด คือ *p*-anisic acid และ acacetin ซึ่งสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 3) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์พบว่า acacetin ที่ความเข้มข้น $5 \mu\text{g/mL}$ ($17.5 \mu\text{M}$) มีฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่า *p*-anisic acid ที่ความเข้มข้น $20 \mu\text{g/mL}$ ($131.45 \mu\text{M}$) สาร acacetin นี้ ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงกว่า aminoguanidine ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ iNOS ที่รู้จักกันดี และใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวกในการทดลองครั้งนี้ โดย acacetin ที่ความเข้มข้น $17.5 \mu\text{M}$ ยับยั้งได้ถึง $99.06 \pm 0.04\%$ ในขณะที่ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{M}$ ยับยั้งได้เพียง $61.75 \pm 0.05\%$



การศึกษานี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบ *p*-anisic acid ในใบสามเงา ในขณะที่การแยกสาร acacetin ได้จากใบสามเงา สอดคล้องกับการรายงานโดย Shrivastava, et al., 2007 ที่พบ acacetin ในใบสามเงา Pan, et al., 2006 รายงานว่า acacetin สามารถลด การแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน ตามลำดับ ซึ่งรายงานนี้สนับสนุน ผลการทดลองของเราที่ค้นพบ acacetin จากใบสามเงาว่าสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เหนี่ยวนำด้วย LPS

บทสรุป

สารประกอบที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสามเงา คือ *p*-anisic acid และ acacetin สามารถยับยั้งการผลิต ไนตริกออกไซด์ได้และไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ ดังนั้นการแสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบของใบสามเงาอาจเป็นผลมาจากสารประกอบ acacetin และ *p*-anisic acid อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้นี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะมาเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรสามเงาเป็นยารักษาโรค ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย บูรพา ที่ช่วยสนับสนุนเงินทุนในการงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิตรา ทองใบ และกาญจนาภา วงศ์อยู่. (2553).ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบสามเงาและใบเบญจมาศ น้ำเค็ม. ปรินญาณินพนธ์ วท.บ., มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- พันธุ์พืชสมุนไพรในปายายเลน. (ม.ป.ป.). สถานีพัฒนาทรัพยากรป่าชายเลนที่ 3 (ชลบุรี) จังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนบริหารจัดการทรัพยากร ป่าชายเลนที่ 1 กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษารวบรวมสารประกอบและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรสามเงา. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- Achari, B., Chaudhuri, C., Saha, C.R., Dutta, P.K. and Pakrashi, S.C. (1990). A clerodane diterpene and other constituents of *Clerodendron inerme*. **Phytochemistry**, 29, 3671–3673.
- Anitha, R. and Kannan, P. (2006). Antifungal Activity of *Clerodendron inerme* (L.) and *Clerodendrum phlomidis* (L). **Turk J Biol**, 30, 139-142
- Byeon S.E., Chung J.Y., Lee Y.G., Kim B.H., Kim K.H. and Cho J.Y. (2008). In vitro and in vivo anti inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia allemaniae*. **Journal of Ethnopharmacol**, 119, 145-152.
- Calis, I., Hosny, M., Yuruker, A., Wright, A.D. and Sticher, O. (1994). Inermisides A and B, two novel complex iridoid glycosides from *Clerodendron inerme*. **Journal of Natural Products**, 57, 494–500.
- Chaudhuri, R.K. and Sticher, O. (1980). Globularifolin, a new acyl iridoidglucoside from *Globularia corifolia*. **Helvetica Chimica Acta**, 63, 117–120.
- Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A. and Kuby J. (2002). **Immunology** (5th ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Gurudeeban, S., Satyavani, K., Ramanathan, T., Umaamaheswari, G. and Shanmugapriy, R. (2010). Antioxidant and Radical Scavenging Effect of *Clerodendron inerme* (L.). **World Journal of Fish and Marine Science**, 2(1), 66-69
- Shrivastava, N. and Patel, T. (2007). *Clerodendron* and Healthcare: An Overview-Part II. **Phytochemistry and Biotechnology**, 1(2), 209-223
- Kanchanapoom, T., Kasai, R., Chumsri, P., Hiraga, Y. and Yamasaki, K. (2001). Megastigmane and iridoid glucosides from *Clerodendron inerme*. **Phytochemistry**, 58(2), 333–336
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J. and Ho, C.T. (2006). Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. **Biochemical Pharmacology**, 72(10), 1293–1303.
- Rehman, A.U., Begum, S., Saied, S., Choudhary, M.I. and Akhtar, F. (1997). A steroidal glycoside from *Clerodendron inerme*. **Phytochemistry**, 45, 1721-1722.
- Somasundaram, S. and Sadique, J. (1986). Antihemolytic effect of flavonoidal glycosides of *C. inerme*. **Fitoterapia**, 57, 103-110



- Spencer, G.F. and Flippen-Anderson, J.L. (1981). Isolation and X-ray structure determination of a neolignan from *Clerodendron inerme* seeds. **Phytochemistry**, 20, 2757–2759.
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Panadda Simmasut, P., Charoensuk, Y. and Srisook, E. (2012). Anti Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea, **Journal of Medicinal Plants Research**, 6(23), 4077-4081
- Tachai, S. and Nuntawong, N. (2011). Chemical constituents from the rhizomes of *Etlingera pavievana*. 1st International Congress on natural products, 160-163
- Takeda, Y., Zhang, H., Matsumoto, T., Otsuka, Fujita, T, Sun, H., Sezik, E, Yesilada, E., et al. (1997). Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*. **Phytochemistry**, 44, 117–120.
- Vendantham, T.N.C., Subramanian, S.S. and Harborne, J.B. (1977). 40-Methylscutellarein and pectolinarigenin from *Clerodendron inerme*. **Phytochemistry**, 16, 294.
- Xu, D., Huang, Z., Cen, Y.J., Chen, Y., Freed, S. and Hu, X.G. (2009). Antifeedant activities of secondary metabolites from *Ajuga nipponensis* against adult of striped flea beetles, *Phyllotreta striolata*. **Journal of Pest Science**, 82, 195–202.
- Yankanchi, S.R. and Koli, S.A. (2010). Anti-inflammatory and Analgesic activity of mature leaves methanol extract of *Clerodendrum inerme* L.(Gaertn). **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2(11), 782-785.