



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพร

ในเขตโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

Investigation of anti-inflammatory activities of medicinal plants
from Ban Ang-Ed official community forest

(Chaipattana foundation), Chantaburi province

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

๐๑๖๐๕๐๗

งบประมาณปี 2556

- 7 ก.ค. 2558

354969

เริ่มบริการ

บทคัดย่อ

พืชสมุนไพรในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี ถูกใช้ในการแพทย์พื้นบ้านมาเป็นระยะเวลานาน ในการศึกษาทำการเลือกพืชสมุนไพรจำนวน 21 ชนิดตามการใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพร การประเมินฤทธิ์ด้านการอักเสบทำโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และพรอสตาแกลนดิน E_2 (prostaglandin E_2) ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชโดยวิธี MTT และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดของพืชสมุนไพรที่ศึกษามีฤทธิ์ต้านอักเสบ ส่วนสกัดเอทานอลของพืชทุกชนิดมีฤทธิ์ต้านอักเสบที่สูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ยกเว้นส่วนสกัดของใบมะฮิจากส่วนสกัดทั้งหมดพบว่าส่วนสกัดใบสาบแร้งสาบกา และส่วนสกัดของรากมะฮิมีฤทธิ์ในการลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่สูง โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการต้านอักเสบ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดมีความสัมพันธ์ที่ต่ำ ผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าใบสาบแร้งสาบกา และรากมะฮิเป็นแหล่งของสารต้านอักเสบตามธรรมชาติที่ดี ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาถูกนำไปศึกษาต่อ เนื่องจากมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองหลายโมเดล แต่ยังไม่มีการอธิบายถึงกลไกการต้านอักเสบของมัน ดังนั้นเราจึงศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและกลไกการต้านอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา (ACE) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ ACE สามารถยับยั้งการผลิตไนตริก ออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.69 ± 0.14 และ 25.92 ± 5.72 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ACE ที่ความเข้มข้น 3.125-50 $\mu\text{g/mL}$ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ และลดการแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ iNOS และ COX-2 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น นอกจากนี้ ACE ยังลดการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของหน่วยย่อย p65 ของ nuclear factor-KB (NF-KB) และลดการฟอสโฟริเลชันของเอนไซม์ extracellular receptor kinase (ERK) และ p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอักเสบของ ACE อย่างน้อยเกิดผ่านทางการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 และลดการส่งสัญญาณชีวภาพของวิถี NF-KB และ MAPKs การค้นพบนี้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ใบสาบแร้งสาบกาในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E_2 , iNOS, COX-2, พืชสมุนไพร,
สารเร่งสาบกา

ABSTRACT

Medicinal plants from Ban Ang-Ed official community forest, Chantaburi Province, have been used in traditional medicine for a long time. In this study, twenty one medicinal plants from Ban Ang-Ed official community forest were selected to extract with ethanol and hot water based on their ethnopharmacological uses to treat various inflammatory diseases. The water and ethanol extracts of the plants were evaluated their anti-inflammatory activity and total phenolic contents. The anti-inflammatory activities of the plant extracts were determined by measuring the inhibitory effect on inducible nitric oxide synthase (iNOS)-catalyzed nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2)-catalyzed prostaglandin E_2 (PGE₂) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cytotoxic activities against macrophages were determined by MTT assay. Total phenolic contents were estimated by Folin-Ciocalteu method. The results show that anti-inflammatory activity was observed in the studied plant extracts. The ethanol extracts showed more anti-inflammatory activity than the water extracts except the extract of *Clausena excavate* Burm F. leaves. Among all the extracts, the ethanol extracts of *Ageratum conyzoides* Linn leaves and *C. excavate* roots exhibited high inhibitory effects on NO and PGE₂ production with no significant cytotoxicity. The correlation of anti-inflammatory activity and total phenolic contents of the extracts was low. These obtained results indicated that leaves of *A. conyzoides* and the roots of *C. excavate* are good sources of natural anti-inflammatory agents. The ethanol extract of *A. conyzoides* leaves was selected to further study because the leaf extracts from *A. conyzoides* have been shown anti-inflammatory activity in several animal models. However, the mechanism of its action has not been described yet. Thus we determined the anti-inflammatory activity and the molecular mechanism of the ethanol extract of *A. conyzoides* leaves (ACE) in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage model. ACE exhibited an inhibitory effect on NO and PGE₂ production in a concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 22.69±0.14 and 25.92±5.72 µg/mL, respectively. ACE at concentrations of 3.125-50 µg/mL showed no significant cytotoxic effect. ACE attenuated the expression of iNOS and COX-2 at mRNA as well as protein levels in a concentration-dependent manner. Additionally, ACE suppressed the level of nuclear factor-κB (NF-κB) p65 subunit translocation and phosphorylation of extracellular

receptor kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These results indicate that ACE inhibits inflammatory response, at least in part, by inhibition of NO and PGE₂ production through suppression of iNOS and COX-2 expression via a signaling pathway of NF- κ B and MAPKs. These findings provide the scientific evidence to justify the anti-inflammatory therapeutic use of *A. conyzoides* leaves in traditional medicine.

Keywords: Anti-inflammatory activity, Nitric oxide, Prostaglandin E2, iNOS, COX-2, Medicinal plants, *Ageratum conyzoides*

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณคุณดุสิต วรสาท หัวหน้าโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี (มูลนิธิชัยพัฒนา) ในการให้เข้าเก็บพืชตัวอย่าง คุณคำรณ เลียดประถม ที่ปรึกษาโครงการฯ หมอสมชาย ใจสิทธิ์ (ปุยาร) และหมอประเทือง นิสัยเชื้อ (ปู่เทือง) หมอสมุนไพรแห่งบ้านอ่างเอ็ดในการให้ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรและคอยให้ความช่วยเหลือในการเก็บพืชตัวอย่าง ดร.เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยาที่ช่วยเหลือในเรื่องการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชสมุนไพร ขอขอบคุณภาควิชาเคมี และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนางสาววินัย สีมานันท์ นางสาวปรียาภา เกตุกุล นางสาวพรสุดา กันแก้ว และนางสุพัตรา ปุรินทวรกุล ให้ความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	4
กิตติกรรมประกาศ	6
บทนำ	8
วิธีการทดลอง	38
ผลการทดลอง	47
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	62
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก	71
ผลผลิตของโครงการวิจัย	102

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันยาจากสมุนไพร (Phytopharmaceuticals หรือ Herbal drugs) ซึ่งเป็นยาจากสมุนไพร รักษาโรค เตรียมได้จากสารสกัดจากพืชได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการรักษาสุขภาพภายใต้ แนวความคิดของการพัฒนาอย่างยั่งยืนและใช้ทรัพยากรอย่างระมัดระวัง หลายคนที่หันมาบริโภคยาสมุนไพรก็เพราะค้นพบว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ และไม่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมากนัก อีกทั้งราคาก็ถูกกว่ายาแผนปัจจุบันอย่างมาก แม้แต่หน่วยงานของรัฐฯ เช่น องค์การเภสัชกรรมก็ได้ริเริ่มผลิตยาจากสมุนไพรออกมาจำหน่ายเอง แต่อย่างไรก็ตามปัญหอย่างหนึ่งของการพัฒนายาสมุนไพรจากยาแผนโบราณหรือยาพื้นบ้าน คือการขาดข้อมูลที่เป็นผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในด้านการวินิจฉัยโรคและการแสดงฤทธิ์ที่จะทำให้ยาสมุนไพรเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรในแง่มุมต่างๆ อาทิ ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบสำคัญในสมุนไพร การแยกสกัด การหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ และการศึกษากลไกของสารในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาวิจัยสมุนไพร การพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรจะช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศได้เพิ่มความสนใจกับยาสมุนไพรไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพ และมีวัฒนธรรมทางสุขภาพและภูมิปัญญาประจำท้องถิ่น โดยเฉพาะพรรณพืชสมุนไพรและการแพทย์พื้นบ้าน เป็นการใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันโรคและบำบัดรักษาเมื่อเกิดโรค ซึ่งเป็นศาสตร์อันทรงคุณค่าที่บรรพบุรุษได้ค้นคว้าโดยใช้ประสบการณ์สั่งสมและสืบทอดต่อกันมาเป็นเวลาอันยาวนาน ดังนั้นการวิจัยพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรและตำรับยาพื้นบ้านของไทย จึงมีความจำเป็นสำหรับประเทศไทยในการพึ่งพาตนเองระยะยาว

โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกพรม อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง เป็นโครงการที่อยู่ในความดูแลของมูลนิธิชัยพัฒนา ถูกจัดตั้งขึ้นเพื่อการอนุรักษ์ และฟื้นฟูสภาพป่าไม้ สนับสนุนให้ชุมชนมีความเข้าใจและรู้จักใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้เกิดประโยชน์อย่างยั่งยืน ในป่าแห่งนี้มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกใช้ในตำรายาของหมอชาสมุนไพรพื้นบ้านในแถบนี้ ดังนั้นเพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรเหล่านี้ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำศูนย์การเรียนรู้ตามพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชเหล่านี้ ในโครงการวิจัยนี้มุ่งนำพืชสมุนไพรที่ถูกใช้แก้อาการอักเสบ ได้แก่วั้น แก้ว แก้ว และ แก้ว ตาม

คำบอกเล่าของหมอยาพื้นบ้านมาศึกษาฤทธิ์ด้านอักเสบในระดับหลอดทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการดำเนินกิจกรรมของโครงการพัฒนาป่าชุมชนฯ ทั้งยังให้เกิดจิตสำนึกในการอนุรักษ์พืชสมุนไพรต่างๆ ในท้องถิ่นอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อสกัดสารจากสมุนไพรพื้นบ้านบางชนิด ในป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของส่วนสกัดพืชสมุนไพรพื้นบ้านบางชนิด ในป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี ในระดับหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของส่วนสกัดของพืชบางชนิดในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำสมุนไพรในเขตป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรีที่หมอสมุนไพรพื้นบ้านใช้รักษาต้านด้านการอักเสบ ประมาณ 20 ชนิด นำมาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ให้ได้ส่วนสกัด จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กเคอไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเป็นการจำลองเหตุการณ์การอักเสบในหลอดทดลอง และนำตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงมาทดสอบการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ

1.4 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 ข้อมูลพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรที่ใช้ศึกษานี้เป็นสมุนไพรบางส่วนของโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลกุดชุม อำเภอลำลูกเกด จังหวัดจันทบุรี ที่ถูกใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาอาการแก้ไข้ แก้บวม และแก้ปวด ตามคำบอกเล่าของหมอสมชาย ใจสิทธิ์ และหมอประเทือง นิสัยชื่อ ดังนี้

1.4.1.1 สาบแร้งสาบกา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ageratum conyzoides* Linn. ชื่อวงศ์ : Compositae ชื่ออื่น : เบญจมาศแมว
เทียนแม่ฮ้าง (เลย) หญ้าสาบแฮ้ง (เชียงใหม่) หญ้าสาบแร้ง (ราชบุรี) ดับเสือเล็ก (สิงห์บุรี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นพรรณไม้ล้มลุกที่มีอายุเพียงหนึ่งปี ลำต้นจะตั้งตรงแตก
กิ่งก้านสาขา ทั้งต้นจะมีขนปกคลุมอยู่ และเมื่อเด็ดมาขัดดมจะมีกลิ่นเฉพาะตัว ลำต้นสูงประมาณ 1-2 ฟุต
เป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ แต่ตรงส่วนยอดใบจะเรียงสลับกัน ลักษณะของใบเป็นรูปมนรี
ปลายแหลม โคนใบเว้าคล้ายรูปหัวใจ ขอบใบเป็นจักฟันเลื่อย พื้นใบมีสีเขียว ก้านใบมีขนปกคลุมตลอด
ทั้งก้าน ออกดอกเป็นช่ออยู่ตรงส่วนยอดของต้น ดอกมีสีม่วงน้ำเงินหรือขาว ผลแห้งไม่แตก (ภาพที่ 1-1)

สรรพคุณ : ใบแก้คัน รักษาแผลเรื้อรัง ห้ามเลือด แก้ปวดบวม แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้ไข้ แก้เจ็บตา
รากยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนเนื้อ แก้ไข้ ทั้ง 5 แก้ไข้ ขับระดู แก้บิด และแก้ช่องทางทวารหนัก หย่อน
ยาน (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550 และ <http://www.samunpri.com/modules.php?name=Herbs&file=sor&func=sor25> [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-1 ลำต้น ใบ และดอกของต้นสาบแร้งสาบกา

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.2 เอื้องหมายนา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Costus speciosus* (Koen) Smith.

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่น : บันไดสวรรค์ เอื้องใหญ่ (ภาคใต้) เอื้องช้าง (นครศรีธรรมราช) เอื้องตัน (ยะลา) เอื้องเพ็ด
ม้า (ภาคกลาง) Crape ginger, Malay ginger, Spiral flage

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : พืชล้มลุก ลำต้นกลม อวบน้ำ เจริญเติบโตเป็นกอไม้แตกแขนง มี
เหง้าอยู่ใต้ดินแตกกอเจริญเป็นต้นใหม่ได้ ใบเป็นใบเดี่ยวออกจากลำต้นแบบเวียนรอบลำต้น ใบมีรูปร่าง
เรียวยาว ปลายใบแหลมฐานใบมน โคนใบมีขน ขอบใบเรียบ ผิวใบเรียบมีสีเขียว ดอกออกเป็นช่อตั้งตรงที่
ปลายยอดของลำต้น ดอกตูมจะมีใบประดับเป็นกาบสีแดงหรือสีน้ำตาลห่อหุ้ม ดอกย่อยแต่ละดอกในช่อ
ดอกจะติดกันแน่น กลีบดอกส่วนโคนจะหลอมรวมกันเป็นรูปกรวย ปลายกลีบดอกแผ่บานออกเป็นรูป
ปากแตร มีสีขาว กลางดอกมีสีเหลืองอ่อน ขอบกลีบดอกหยักเป็นคลื่น ผลมีรูปร่างกลมมีเนื้อแข็งสีแดง
เมล็ดมีสีดำเป็นมัน

สรรพคุณ : รากขับพยาธิ ขับเสมหะ แก้ไข้ และรักษาโรคผิวหนัง เหง้าขับปัสสาวะ แก้กวมฝี ตก
ขาว รักษาโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ รักษาแผล มีหนอง อักเสบวม ขับพยาธิ เป็นยาระบาย (พง
ศกดิ์ พลเสนา, 2550 และ http://www.rspg.or.th/plants_data/use/crop_d28.htm[21 มกราคม
2556])



ภาพที่ 1-2 ลำต้นเหนือดิน ใบ และดอกของต้นเอื้องหมายนา

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.3 โคลงเคลง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Melastoma saigonense* (Kuntze) Merr

ชื่อวงศ์ : Melastomataceae

ชื่ออื่น : โคลงเคลงช้าง (นารายวาส) เบิร์ช้าง มังเคร่ชน เมรีช้าง (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้พุ่ม กิ่งเป็นสี่เหลี่ยม มักมีขน เกสรเพศผู้เรียงเป็น 2 วง มีระยางค์ เป็นใบเดี่ยวเรียงเป็นคู่ตรงกันข้ามแบบสลับเล็กน้อย เส้นใบ 3-9 เส้น ออกจากจุดเดียวกันตรงฐานใบ แล้วเบนเข้าหาปลายใบ เส้นใบย่อยเรียงแบบ ขันบันได ไม่มีหูใบ ดอกเป็นช่อสมบูรณ์เพศ มีสมมาตรตามรัศมี กลีบเลี้ยง 3-6 กลีบดอก 5 กลีบเรียงเกยซ้อนกันในดอกอ่อน เกสรเพศผู้เรียงเป็น 2 วง มีระยางค์รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ ผลเมื่อแก่เปลือกจะแห้ง และแตกออก ภายในมีเมล็ดจำนวนมากหรือผลมีเนื้อนุ่มหลายเมล็ด

สรรพคุณ : รากใช้เป็นสมุนไพรในยารักษาตับ ในระยะที่เป็นโรคดีซ่าน เป็นยากระตุ้นและยาบำรุง ชงดื่มแก้อาการไม่สบายกายและอาการมึนงง ราก ใบ และช่อดอกเป็นยาฝาดสมาน ใบแก้ท้องร่วง โรคระดูขาว และโรคบิด (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550 และ http://www.rspg.or.th/plants_data/kp_bot_garden/kpb_17-1.htm [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-3 ลำต้น ใบ ดอก รากและเมล็ดของโคลงเคลง

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.4 ชงโคป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Bauhinia* sp.

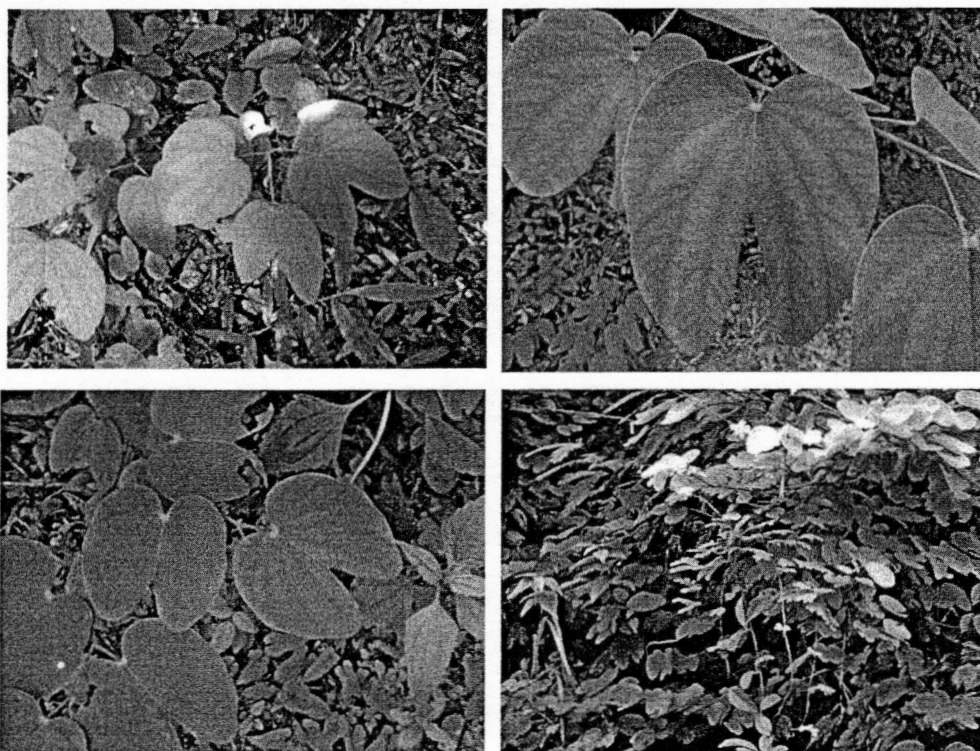
ชื่อวงศ์ : Leguminosae-Caesalpinioideae

ชื่ออื่น : เสี้ยวดอกแดง (ภาคเหนือ) เสี้ยวหวาน (มาฮ่องสอน) Orchid tree, Purple bauhinia

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้ต้นขนาดเล็กสูงได้ถึง 10 เมตร ใบเกือบกลม และปลายใบแฉกลึกเข้ามาจนดูเหมือนเป็นสองใบติดกันหรือใบแผด ออกดอกเป็นช่อตามส่วนยอดหรือปลายกิ่ง ลักษณะดอกคล้ายกล้วยไม้สี ชมพูม่วงถึงสีม่วงสด มี 5 กลีบ ดอกใหญ่ประมาณ 3 - 4 นิ้ว มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ขยายพันธุ์ด้วยการตอนหรือด้วยการเพาะเมล็ดที่เกิดจากฝัก ชงโคจะให้ดอกเป็นระยะๆ เกือบทั้งปี แต่จะมีดอกดกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์

สรรพคุณ : ใช้รากเป็นยาขับลม เปลือกเป็นยาแก้ท้องเสีย ใบแก้ไอ แก้ไข้ พอกฝี ดอกระบายพิษไข้(พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550 และ

<http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%8A%E0%B8%87%E0%B9%82%E0%B8%84> [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-4 ใบของต้นชงโคป่า

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.5 มะเดื่อหอม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ficus hirta* Vahl

ชื่อวงศ์ : Moraceae

ชื่ออื่น : มะเดื่อหอม เตื่อชน เตื่อหอมเล็ก เตื่อหอมใหญ่ นอดหอม มะเดื่อเตี้ย มะเดื่อชน เยื่อทง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มถึงไม้ต้นไม่ผลัดใบ สูงถึง 10 เมตร เรือนยอดโปร่ง มีขนหยาบ ยาวสีเหลืองทองหรือสีน้ำตาลแน่น เปลือกของลำต้นชั้นนอกเรียบสีน้ำตาล ใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับ ใบรูปขอบขนานหรือหยากรีก 3-5 แฉก ขอบใบเลียบหรือจักฟันเลื่อย ฐานใบสอบ มน หรือเว้าเล็กน้อยคล้ายรูปหัวใจ ปลายแหลมถึงรียาวแหลม ผิวใบมีขนสีเหลืองทอง มักหนาแน่นบริเวณแผ่นใบด้านท้องใบ ดอกและผลออกเดี่ยวหรือเป็นคู่ตามง่ามใบ และปลายกิ่ง ลักษณะทรงกลม เมื่อสุกมีสีแดง ผ่นภายในมีดอกเพศผู้ ดอกเพศเมีย และดอกเพศเมียที่เป็นหมัน

สรรพคุณ : ผลสุกรับประทานได้ ราก ลำต้น ต้มน้ำดื่มบำรุงหัวใจ ราก ฝนน้ำกิน แก้ผดผื่นแดง เป็นยาระบาย ขับลมในลำไส้ บำรุงหัวใจ (คำรณ เลียดประถม และ น้ำบุษย์ โคสารคุณ, 2553 และ http://www.pharmacy.msu.ac.th/exhibition_new/Thai%20Herb/55.html [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-5 ใบ ลำต้นและผลของต้นมะเดื่อหอม

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.6 ระย่อนน้อยดอกขาว

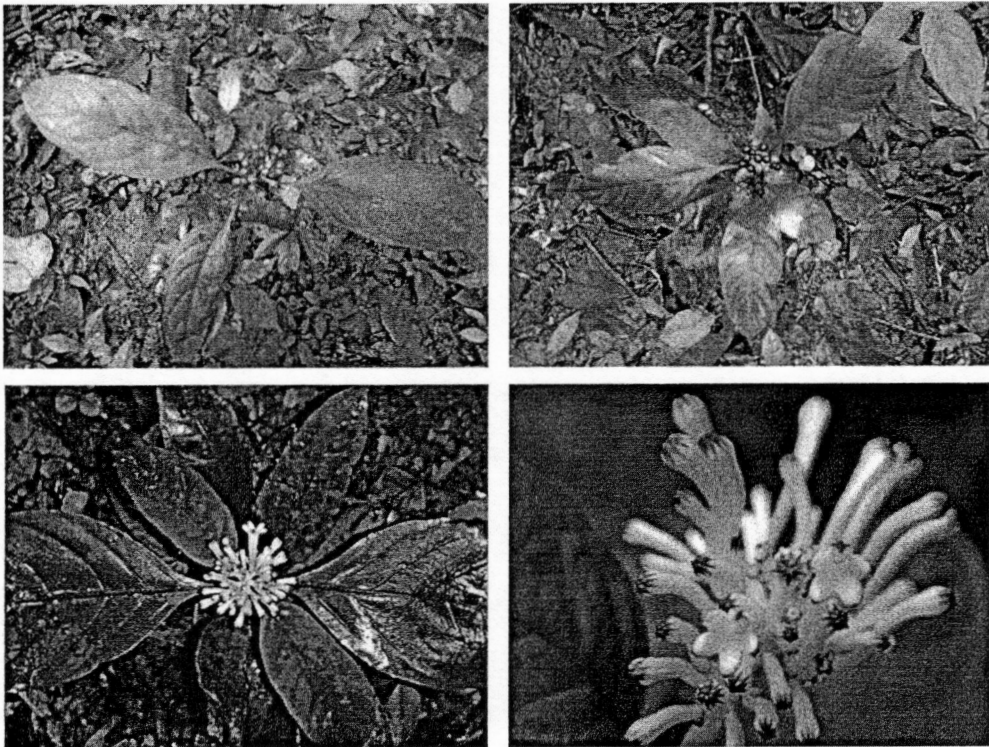
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Rauvolfia* sp.

ชื่อวงศ์ : Apocynaceae

ชื่ออื่น : กะย่อม (ภาคใต้) เข้มแดง (ภาคเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่ม มีน้ำยางขาว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามหรือรอบๆ ข้อละ 3 ใบ รูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 4-8 ซม. ยาว 7-20 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบเลี้ยงสีขาวแกมเขียว เมื่อกลีบดอกโรยจะเปลี่ยนเป็นสีแดง กลีบดอกสีขาวโคนกลีบเป็นหลอดสีแดง ผลเป็นผลสดรูปวงรีเมื่อสุก สีม่วง

สรรพคุณ : รากลดความดันโลหิต แก้ปวด แก้ไข้ ขับฤดู แก้บิด ขับพยาธิ เป็นยากล่อมประสาท ช่วยเจริญอาหาร ขับปัสสาวะ เปลือกแก้ไข้พิษ แก้สันนิบาต นำจากรักษาโรคแก้ตัวมั่ว ดอกแก้ตาแดง (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550 และ <http://wantanee11.blogspot.com/2008/07/rauvolfia-serpentina.html> [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-6 ต้นระย่อนน้อยดอกขาว (ก) ดอก (ข) ใบและผล

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

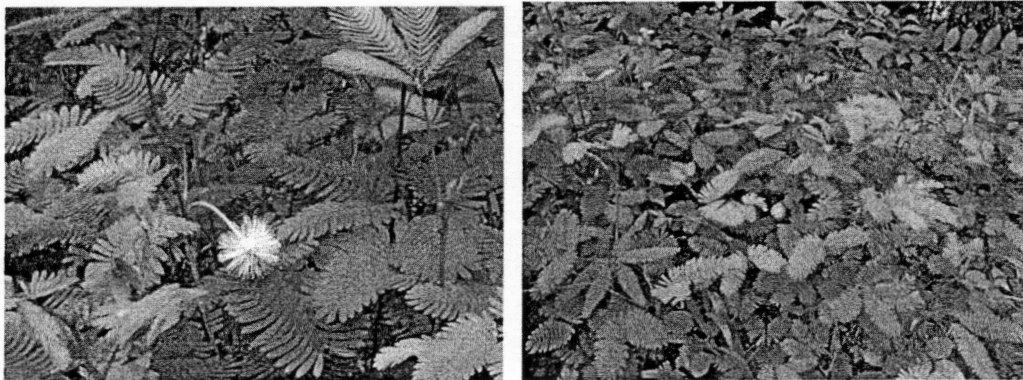
1.4.1.7 ไมยราบ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle

ชื่อวงศ์ : Mimosaceae

ชื่ออื่น : ไมยราบขาว ไมยราบเถา เขี้ยวงู

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ล้มลุกกึ่งทอดเลื้อยอายุหลายปี ลำต้นสีเหลี่ยมมีหนามแหลมเป็นแฉ่งและขนสาวกปกคลุม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก 2 ชั้น ยาวได้ถึง 22 ซม. ใบย่อยชั้นแรก 6-9 คู่ มีหนามแหลมตลอดแผงก้านใบ ใบย่อยชั้นรอง 15-30 คู่ ดอกสีม่วงแดงแกมชมพูออกเป็นช่อกลมที่ซอกใบ ขนาด 12-15 มม. มีดอกย่อยขนาดเล็กจำนวนมาก กลีบรองดอกรูปประฆังเชื่อมกันที่ฐานปลายแยก 4 กลีบ เกสรผู้ 8 อัน ก้านชูเกสร ยาว 6-7 มม. รังไข่รูปรีแบน ผลฝักแบนกว้าง 5 มม. ยาว 25-35 มม. เม็ดติดกันแน่น เป็นกระจุก ผลแก่สีน้ำตาลอ่อน (http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?Botanic_ID=1501 [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-7 ลำต้น ใบและดอกของต้นไมยราบ

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.8 ค้างคาวดำ

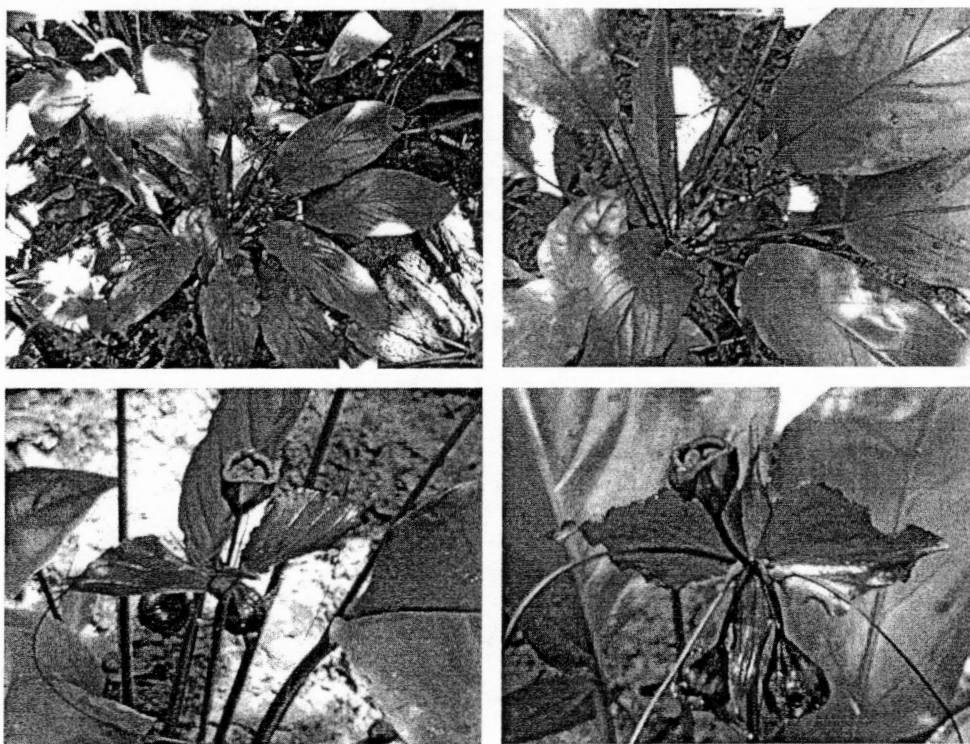
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tacca chantrieri* Andr.

ชื่อวงศ์ : Taccaceae

ชื่ออื่น : เนระพูสีไทย (ตะวันออก) คลุ้มเลีย ว่านหัวฟา (จันทบุรี) ดิงหัว (ภาคเหนือ) ตีปลากั้ง (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ตีปลาช่อน (ตราด) นิลพูสี (ตรัง) มังกรดำ (กรุงเทพฯ ฯ) ม้าถอนหลัก (ชุมพร) ว่านพังพอน (ยะลา) Bat flower

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน ใบรูปขอบขนานถึงรูปใบหอก กว้าง 6-18 ซม. ยาว 20-60 ซม. ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งแหลม โคนใบแหลมเบี้ยวเล็กน้อย ก้านใบยาว ประมาณ 15-30 ซม. ดอกออกเป็นช่อมี 1-3 ช่อ ยาวได้ถึง 70 ซม. แต่ละช่อมี 4-25 ดอก ลักษณะคล้าย ค้างคาวบิน กลีบประดับมี 2 คู่ ไร้ก้านสีม่วงแกมเขียวถึงสีม่วงดำ คู่นอกรูปไข่ รูปขอบขนานหรือรูปใบ หอก ยาวประมาณ 6 ซม. คู่ในรูปไข่หรือรูปไข่กลับยาว 7-14 ซม. กลีบประดับเป็นเส้นมี 5-25 เส้น สีอ่อน กว่าแผ่นกลีบประดับยาว 10-25 ซม. กลีบรวมติดเป็นหลอดสั้นๆปลายแยกเป็น 6 กลีบ ขยายพันธุ์โดยการแยกเหง้าหรือเพาะเมล็ด

สรรพคุณ : เหง้ารักษาโรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำหนด บำรุงกำลัง ช่วยเจริญอาหาร ดับพิษไข้ กล่อมพิษทั้งปวง ทั้ง 5 แก้มัดผื่นคันตามร่างกาย (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550 และ http://www.panmai.com/Warn/Warn_TACCAC_01.shtml [21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-8 ใบ ลำต้นและดอกของต้นค้างคาวดำ

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.9 ไม้ลาย

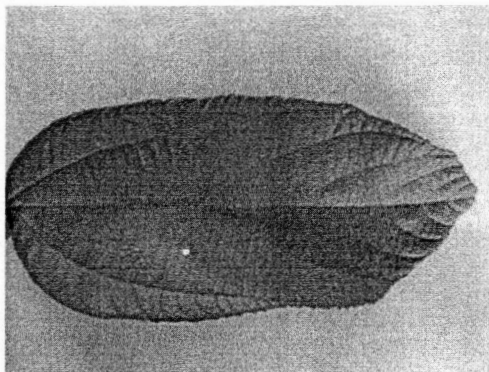
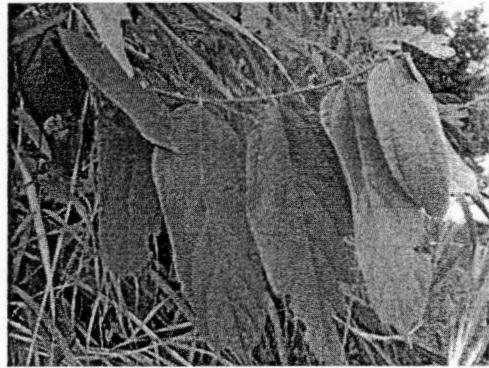
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Microcos tomentosa* Sm.

ชื่อวงศ์ : Tiliaceae

ชื่ออื่น : พลับพลา ชี้เถ้า กะปุกกะปู ค่อม ลาย สากกะเบือตง สากกะเบือละว้า หมากหอม ก้อม ส้ม คอมส้ม คอมเกลี้ยง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลางสูงได้ถึง 20 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลมทึบ เปลือกสีน้ำตาลปนเทาแตกลอนเป็นสะเก็ดบางๆ เปลือกใบสีชมพูมีเส้นใยเรียงชั้น ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับรูปไข่กลับ ขอบใบจักฟันเลื่อยถึงเรียบ ฐานใบมน ปลายใบเป็นติ่งแหลมสั้น ๆ ผิวใบด้านหลังใบและท้องใบมีขนสีน้ำตาลปกคลุม เส้นแขนงใบออกจากโคนใบ 3 เส้น ก้านใบยาว 5-10 มม. ดอกสีเหลืองแบบช่อกระจุกซ้อนที่ซอกใบและปลายกิ่ง ช่อดอกยาว 3-15 ซม. กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปสามเหลี่ยม ดอกบานเต็มที่กว้าง 1-1.5 ซม. ผลสดทรงกลมแกมไข่กลับ ผลสุกสีม่วงดำ ผิวมีขนรูปดาวหรือเกลี้ยง เมล็ดเดี่ยวรูปไข่

สรรพคุณ : เปลือกแก้หืด ผลสุกมีรสหวานอมเปรี้ยวรับประทานได้ (คำรณ เลียดประถม และ น้ำบุษย์ โคสารคุณ, 2553 และ <http://www.magnoliathailand.com/webboard/index.php?topic=6240.0;wap2>[21 มกราคม 2556])



ภาพที่ 1-9 ลำต้น และใบของต้นไม้ลาย

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.10 เข็มไฉเตีย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aidia wallichiana* sensu Tirveng

ชื่อวงศ์ : Rubiaceae

ชื่ออื่น : -

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ต้นผลัดใบ เรือนยอดทรงพุ่มรูปกรวย เปลือกนอกเรียบหรือแตกเป็นแผ่นเล็กๆ คล้ายรูปสี่เหลี่ยม สีน้ำตาลอมเทา เปลือกในสีเหลือง กิ่งอ่อนกลม พบรูหายใจประปราย ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉากกัน แต่มักจะเห็นว่าใบเรียงสลับกับใบเดี่ยวเพราะคู่ใบนั้นเจริญไม่เต็มที่ และหลุดร่วงไป มีหูใบร่วมรูปสามเหลี่ยม ที่ปลายหูใบเรียวยาวแหลม และยาว ผิวใบเกลี้ยงเป็นมัน หลังใบสีเขียวเข้ม ท้องใบสีเขียวอ่อน ใบรูปรีถึงรูปหอก ขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ปลายเรียวยาวแหลม ฐานใบกลม เป็นร่องมาจากขอบใบจนถึงเกือบโคนก้านใบ ช่อดอกเป็นแบบช่อเชิงหลั่นประกอบ ผลสดมีหลายเมล็ด ก่อนเจริญเต็มที่มิสีเขียว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีแดงและเมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีดำ รูปร่างกลมรี เมล็ดเป็นเหลี่ยม มีขนสั้นสีขาวขึ้นประปราย (คำรณ เลียดประถม และน้ำบุษย์ โคสารคุณ, 2553)



ภาพที่ 1-10 ลำต้น เมล็ด และใบของต้นเข็มไฉเตีย

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.11 พนมสวรรค์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Clerodendrum paniculatum* L.

ชื่อวงศ์ : Verbenaceae

ชื่ออื่น : ฉัตรฟ้า สาวสวรรค์ (นครราชสีมา) พวงพีเหลือง (เลย) หังลิง (สระบุรี) Pagoda flower

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่ม ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก ดอกช่อออกที่ปลายกิ่งสีแดง
ผลสุกสีดำ

สรรพคุณ : ดอกแก้ตกเลือด แก้กษัยสัตว์กัดต่อย แก้กษัยฝีกาฬ ใบแก้พิษฝีดาษ ลำต้นแก้พิษตะขาบ
รากแก้ไขมาลาเรีย ขับลม แก้วณโรค (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550)



ภาพที่ 1-11 ดอก ใบและลำต้นต้นพนมสวรรค์

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.12 หัวเดียว

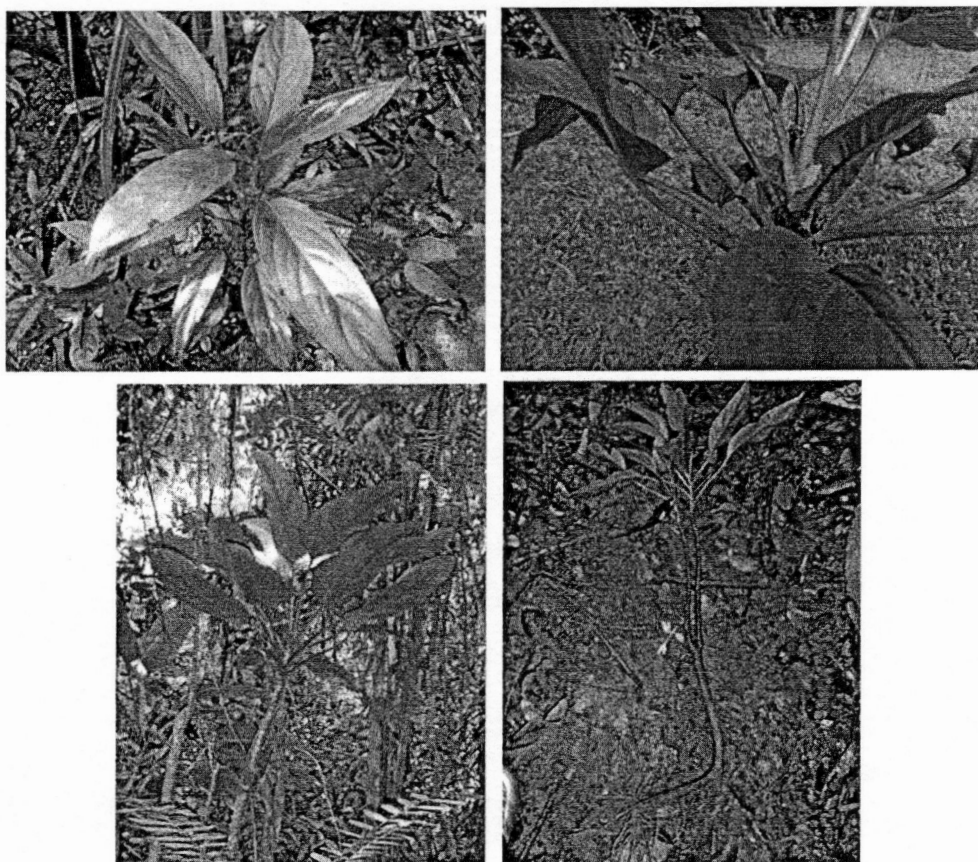
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Aglaonema nitidum* (Jack) Kunth

ชื่อวงศ์ : Araceae

ชื่ออื่น : ลั่นกระทิง ชะงดเขา โหรา (ชุมพร) บอนลั่นทิง หัวกลัก (ตรัง) หัดดง (กระบี่) อ้อพน (นครศรีธรรมราช) รัชมีเงิน ริวเงิน (กลาง นราธิวาส)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นใต้ดิน ใบเดี่ยว รูปขอบขนาน กว้าง 8.5-10.5 ซม. ยาว 27-32 ซม. ก้านใบอวบน้ำ ก้านใบยาว 15-16 ซม. ผิวใบเป็นมัน แผ่นใบหนา ขอบใบเรียบ ใบอ่อนสีเหลืองอ่อน ใบแก่สีเขียวเข้ม ปลายใบแหลม เส้นกลางใบเป็นร่องตื้น เส้นใบแตกแบบขนนก โคนใบเรียวลู่ไปทางก้านใบ ดอกออกตามซอกใบ ช่อดอกแยกเพศ อาจอยู่ด้านเดียวกับเกสรตัวเมีย ดอกสีเหลืองอ่อน ผลกลมค่อนข้างรี ผลอ่อนสีขาว เมื่อแก่เป็นสีแดง เมล็ดรูปรี

สรรพคุณ : ลำต้น ใช้บำรุงกำลัง ผล กินแก้ผมหงอก ยาอายุวัฒนะ เหงือกบวม ปวดฟัน ขับพยาธิ ในลำไส้ (http://lumphaya.stkc.go.th/gallery_view.php?gallery_id=219 [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-12 ใบ ลำต้นและรากของต้นหัวเดียว

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.13 ราชดัด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Brucea javanica* (L.) Merr

ชื่อวงศ์ : Siamaroubaceae

ชื่ออื่น : พญาดาบหัก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่ม หรือไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 0.3-10 เมตร ใบประกอบยาว 20-50 ซม. ใบย่อยจำนวน 3-15 ใบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่ มีขนปกคลุมด้านล่าง บางครั้งไม่มีขนปกคลุม ขนาด 1.5-5 x 3.5-11 ซม. ใบอ่อนมีขนปกคลุม ขอบใบหยัก เส้นแขนงใบ 6-15 คู่ ก้านใบหลักยาว 5-10 ซม. ก้านใบย่อยยาว 2-9 มม. ก้านใบปลายสุดยาว 3-40 มม. ใบแกนหลักยาว 7-60 ซม. ใบประดับคล้ายสามเหลี่ยมเล็กๆ ดอกแยกเพศ สีเขียวอมขาวถึงสีเขียวอมแดง หรือสีม่วง ดอกเพศผู้ ฐานรองดอกเรียว ยาว 3 มม. กลีบเลี้ยงมีขนสั้น กลีบดอกมีขนสั้นถึงเกือบเกลี้ยง บางครั้งหยาบ ก้านชูเกสรเพศผู้รูปลิ้นแฉบ ดอกเพศเมีย ฐานรองดอกเรียวยาว 2.5 มม. กลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหมือนดอกเพศผู้ ผลสดเมล็ดเดี่ยว ขนาด 4-7 มม. เมื่อแก่แห้ง รวมกันกลุ่มละ 1-4 ผล ฐานรองดอกยาว 2-6 มม.



ภาพที่ 1-13 .ใบ ลำต้น และผลของต้นราชดัด

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

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

1.4.1.14 เข็มป่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ixora lobbii* King & Gamble

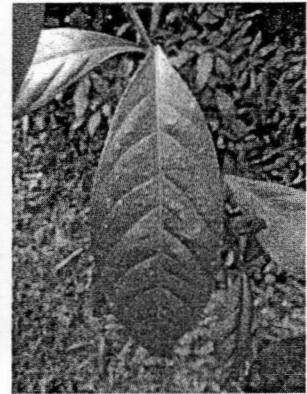
ชื่อวงศ์ : Rubiaceae

ชื่ออื่น : -

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นพรรณไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลักษณะต้นนั้นจะคล้ายเข็มขาว ใบจะหนายาวและแข็งมีสีเขียวสด ตรงปลายใบของมันจะแหลม ดอกจะออกรวมกันเป็นช่อใหญ่แบน มีสีแดง

สรรพคุณ : ราก ใช้ปรุงเป็นยาบำรุงไฟธาตุ บรรเทาอาการบวม รักษาตาพิการ รักษากำเฒ่า รักษาเสมหะ ทั้งต้นใช้แก้ไข้

(<http://www.bedo.or.th/lcdb/biodiversity/view.aspx?id=4590> [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-14 ลำต้น ดอกและใบของเข็มป่า

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

615.329

ก 38 ก ก

ด. 4

354969

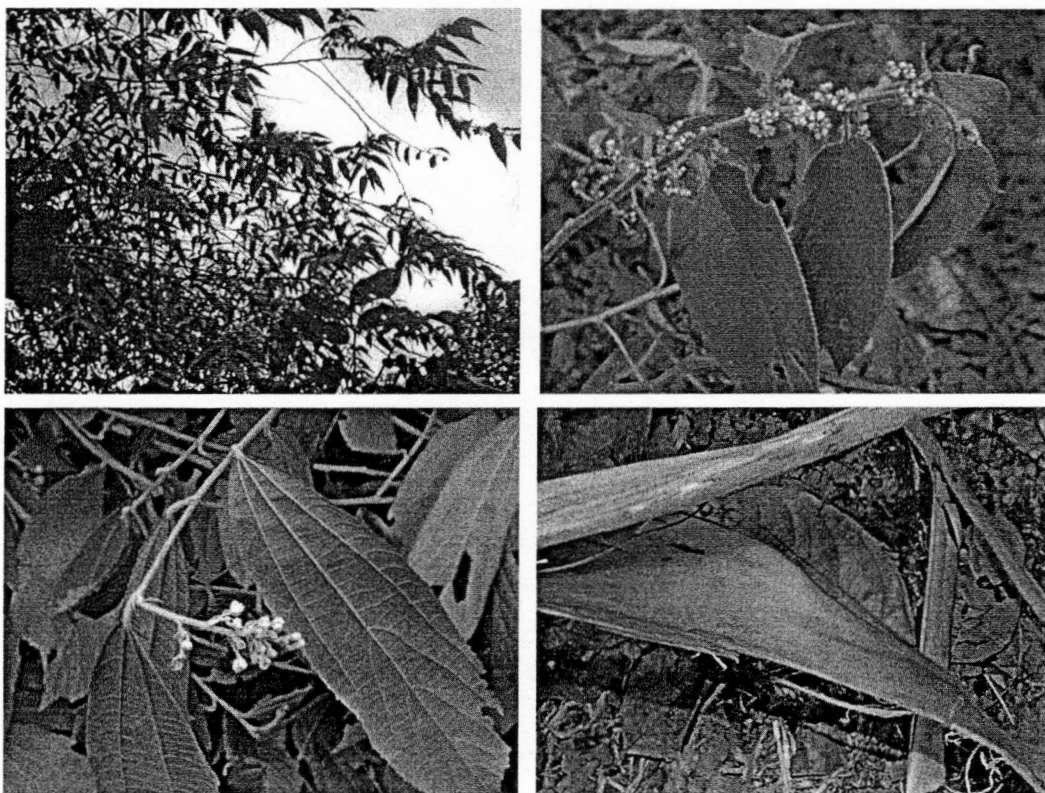
1.4.1.15 พังแหรใหญ่

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Trema orientalis* (L.) Yala

ชื่อวงศ์ : Ulmaceae

ชื่ออื่น : พังอีแร้ พังอีแหร พังแหร

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้ต้น สูง 4-10 เมตร ใบ เดี่ยว รูปไข่แกมรูปใบหอก กว้าง 3-5 ซม. ยาว 7-12 ซม. ขอบใบจักฟันเลื่อย ดอก สีเขียว ขนาดเล็ก ออกเป็นช่อสั้นๆ ที่ซอกใบ ดอกเพศผู้แลดอกเพศเมียอยู่กิ่งเดียวกันหรือต่างกิ่ง ดอกเพศผู้มีจำนวนมากกว่า 20 ดอก ช่อดอกเพศเมียมีดอกประมาณ 15-20 ดอก กลีบรวม 5 กลีบ มีขน ผล เมล็ดเดี่ยว แข็งกลม ขนาด 3-4 มม. เมื่อสุกสีดำ (http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1806 [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-15 ลำต้น ดอกและเปลือกของต้นพังกาญจน์

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

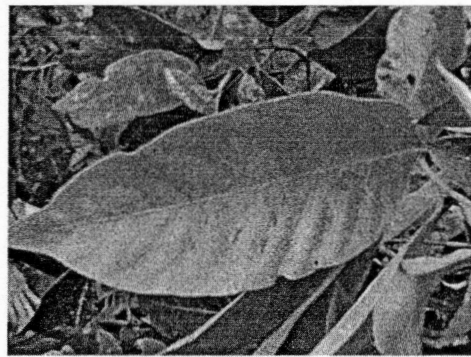
1.4.1.16 ฟันปลา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Litsea umbellata* Merr

ชื่อวงศ์ : Lauraceae

ชื่ออื่น : สลด(จันทบุรี), เมนตริอ(เขมร จันทบุรี), เตื่อ(ตราด)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่มหรือไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 1-13 ม. มีขนสีน้ำตาลแดง ใบเดี่ยว เรียงแบบสลับ รูปรี รีแกมขอบขนาน รูปหอก รูปหอกแกมขอบขนาน หรือรูปไข่กลับ ยาว 3-14.5 ซม. กว้าง 1.2-7.5 ซม. ปลายแหลม เรียวแหลมหรือเป็นติ่งแหลม ฐานรูปลิ้น ขอบเรียบ ใบบางคล้ายกระดาษ ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ด้านล่างมีขน ดอกแบบช่อคล้ายซี่ร่ม ออกที่กิ่งถึงปลายยอด บริเวณซอกใบ แยกเพศ อยู่ต่างต้น ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกัน ดอกเพศผู้ มีกลีบรวม 6 กลีบ รูปรี รีแกมขอบขนาน มีขน เกสรเพศผู้มี 8-9 อัน ที่ฐานของก้านเกสรมีต่อม 2 ต่อม ดอกเพศเมีย คล้ายกับดอกเพศผู้ มีรังไข่อยู่เหนือวงกลีบ (http://biodiversity.forest.go.th/index.php?option=com_dofplant&view=showone&id=727 [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-16 ต้น และใบของต้นฟันปลา

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.17 สะค้านใบพลู

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Piper ribesoides* Wall

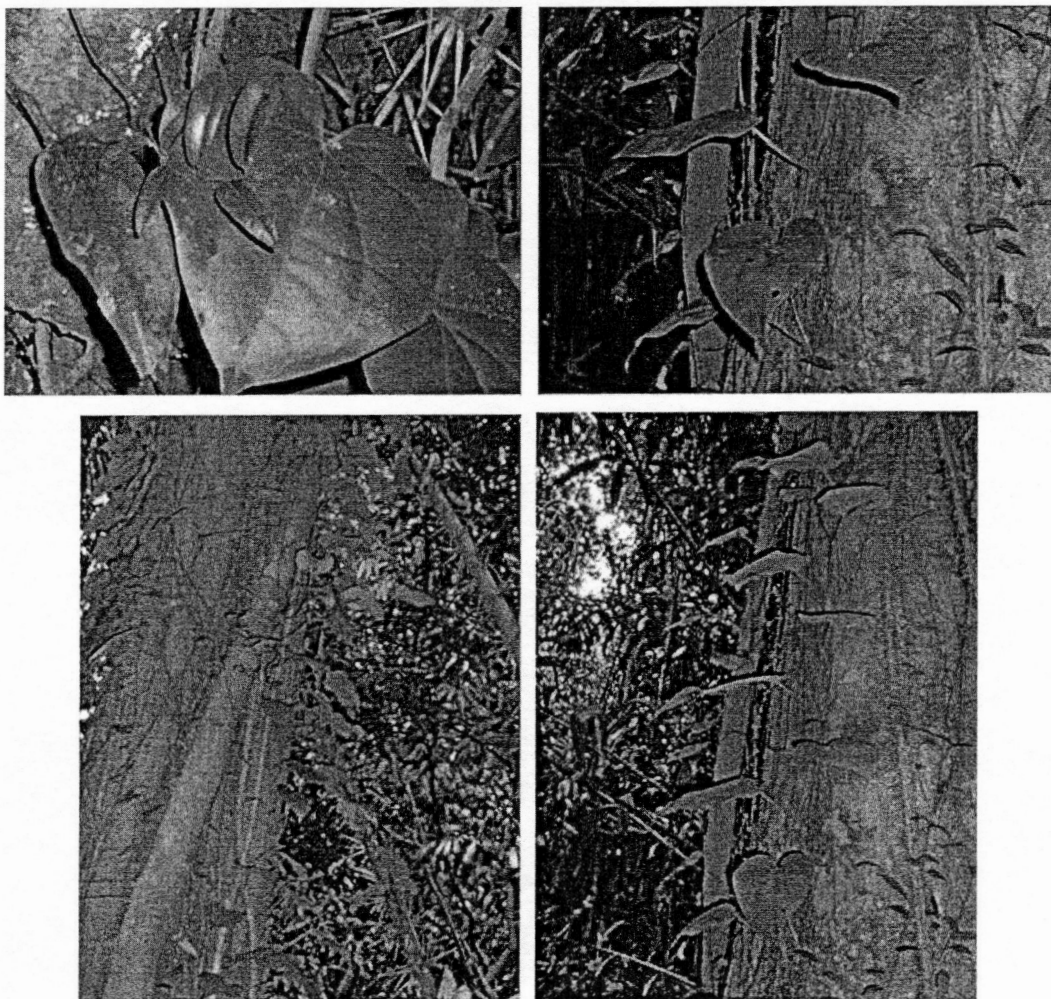
ชื่อวงศ์ : Piperaceae

ชื่ออื่น : ตะค้านใบพลู ตะค้านเล็ก ตะค้านหยวก จะค้าน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นไม้เถาขนาดกลาง มีข้อปล้อง เนื้อไม้เป็นเส้นยาว หน้าตัดขวางมีลายเป็นเส้นรัศมี เปลือกค่อนข้างอ่อน เนื้อไม้สีขาว ใบเดี่ยวรูปใบหอกกว้างคล้ายใบพริกไทย แต่แคบกว่า ปลายใบแหลม ใบสีเขียวเข้ม

สรรพคุณ : เถาสะค้านมีรสเผ็ด แก้ลมอันบังเกิดในกองธาตุ กองสมุฏฐาน ขับลมในลำไส้ แก้จุดเสียด

(<http://webwewin.com/index.php?pid=3505> [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-17 ใบ และต้นของตะค้านใบพลู

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.18 ตีงตัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Helicteres hisuta* Lour

ชื่อวงศ์ : Sterculiaceae



ภาพที่ 1-18 ลำต้น ดอก ใบและรากของตีงตัน

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.19 มะฮึก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Clausena excavate* Burm F.

ชื่อวงศ์ : Rutaceae

ชื่ออื่น : สันโศก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรง แตกกิ่งก้านมาก สูง 1.5-4 ม. ไม้พุ่มมีขนสั้นๆ ที่บริเวณปลายกิ่ง ใบ ประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อย 15-30 ใบ รูปขอบขนานหรือรูปเคียว กว้าง 1.5-4 ซม. ยาว 3-8 ซม. ท้องใบมีขนบางๆ โคนใบเบี้ยว ดอกช่อแยกแขนง ออกที่ปลายกิ่ง ดอกย่อยจำนวนมาก กลีบดอกสีขาวแกมเหลือง ผล สด รูปกระสวยสีแดง

(http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2477 [29 กรกฎาคม 2557])



ภาพที่ 1-19 ใบ ลำต้น และรากของมะฮึก

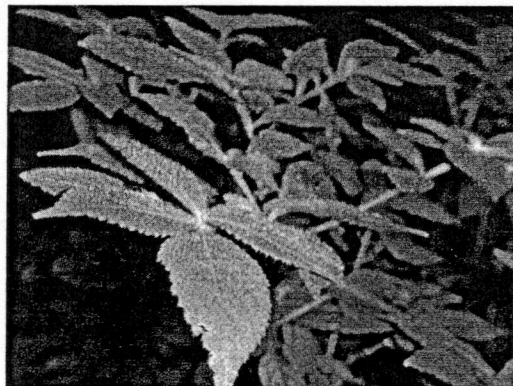
(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.20 ลายกนก

ชื่อวิทยาศาสตร์ :-

ชื่อวงศ์ :-

ชื่ออื่น :-



ภาพที่ 1-20 ใบ และลำต้นของต้นลายกนก

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.1.21 ฝนแสนห่า

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Argyreia capitiformis* (Poiret) Ooststr.

ชื่อวงศ์ : Convolvulaceae

ชื่ออื่น : ย่านขน (สงขลา) ฝนแสนห่า (จันทบุรี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ไม้เถาเลื้อย ใบเดี่ยวเรียงเวียน (spiral) มีก้านใบยาว 1.5-3 ซม. แผ่นใบรูปไข่ (ovate) ปลายใบแหลม โคนใบเว้าเล็กน้อย ขอบใบเรียบ ใบอ่อนมีขนปกคลุม ใบแก่ผิวค่อนข้างเรียบ ด้านล่างของใบเห็นเส้นใบนูนชัดเจน (ที่มาข้อมูล: ดร. เบญจวรรณ ชิวปรีชา)



ภาพที่ 1-21 ใบฝนแสนห่า

(ภาพโดย ผศ.ดร.กล่าวขวัญ ศรีสุข)

1.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายหลังจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อจากการรุกรานของเชื้อจุลชีพ จากสารเคมี และความร้อน เป็นต้น ลักษณะทางคลินิกของการอักเสบจะทำให้เกิดอาการต่างๆ เกิดขึ้น ได้แก่ การเจ็บปวด บวม แดง และร้อน ซึ่งเกิดจากขั้นตอนของกระบวนการอักเสบอันประกอบไปด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) เกิดจากฤทธิ์ของสารสื่อกลาง (mediator) หลายชนิด ซึ่งออกฤทธิ์ที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ หลังจากการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อจะเกิดการขยายตัวของหลอดเลือด เกิดการไหลของเลือดเข้าสู่ร่างแหของหลอดเลือดฝอย เกิดการคั่งของเลือดบริเวณนั้น ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณที่บาดเจ็บมีสีแดง บวม และอุณหภูมิสูงขึ้น

2) การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของหลอดเลือด ทำให้เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (increased vascular permeability) การเพิ่มการไหลของของเหลวออกนอกหลอดเลือดฝอย ทำให้สารน้ำ โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาว รั่วออกมาภายนอกหลอดเลือด ก่อให้เกิดอาการบวม และมีการเกาะของเม็ดเลือดขาวเข้ามาใกล้บริเวณผนังหลอดเลือด จนสามารถยึดเกาะติดเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์, 2547)

3) การเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และได้รับการกระตุ้นเพื่อให้สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้ การตอบสนองต่อการอักเสบ เริ่มต้นจากปฏิกิริยาของสารเคมี ตัวกลางต่างๆมากมาย ซึ่งปฏิกิริยาหลายประการยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ตัวกลางที่เริ่มต้นปฏิกิริยาอาจมาจากจุลินทรีย์ที่รุกราน บางชนิดเนื่องจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย บางชนิดเกิดจากระบบเอนไซม์ต่างๆในพลาสมา บางชนิดเป็นผลิตภัณฑ์เกิดมาจากเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

การอักเสบเกิดขึ้นเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของสิ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายไม่ให้ลุกลามไปยังบริเวณอื่นนอกจากนี้ เพื่อเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากการเข้ามาของสิ่งแปลกปลอมต่างๆ เพื่อนำไปสู่กระบวนการซ่อมแซมต่อไป หากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ เนื้อเยื่อจะเกิดการบาดเจ็บโดยที่ไม่มีการซ่อมแซม ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้นๆผิดปกติไป อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบมีผลเสียเกิดขึ้นได้ด้วยเช่นกัน หากเกิดการอักเสบมากเกินไป หรือเกิดการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นเวลานาน จะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อทำให้เกิดการทำงานของเนื้อเยื่อนั้นผิดปกติได้เช่นกัน (พิริยทุธ สิทธิไชยากุล, 2552)

สารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ถูกหลั่งออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมคโครฟาจ 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) และฮีม (Alderton, 2001) transcription factor ที่สำคัญและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ iNOS เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS ในเซลล์ คือ NF- κ B ในสภาวะปกติที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะถูกจับโดย I κ B และอยู่ในไซโตซอล เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นจะมีการส่งสัญญาณทางชีวภาพให้มีการสลาย I κ B ส่งผลให้ NF- κ B 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 ถูกพบว่ามีส่วนร่วมในการเกิดการอักเสบและนำไปสู่อาการของโรคต่างๆ เช่น ภาวะช็อกจากการติดเชื้ออย่างรุนแรง (septic shock) การปฏิเสธของเนื้อเยื่อในการปลูกถ่ายอวัยวะ โรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) โรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และ ischemia/reperfusion injury (Wright, 1992; Dorheim, 1994; Grisham, 1999; Coleman, 2001; Cross และ Wilson, 2003; Guzik, 2003; Latham, 2005) โดยไนตริกออกไซด์ทำหน้าที่เป็น inflammatory mediator ที่สำคัญซึ่งถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์แมคโครฟาจ

พรอสตาแกลนดิน เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อหลอดเลือด ระบบประสาท และเซลล์ ในการตอบสนองต่อการอักเสบ ในการสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินจาก arachidonic acid ถูกควบคุมโดยเอนไซม์หลักคือ cyclooxygenase (COX) เอนไซม์นี้มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ COX-1 ซึ่งมีการแสดงออกเป็นประจำเพื่อผลิตโพรสตาแกลนดินเพื่อควบคุมระบบหลอดเลือดและป้องกันเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร และอีกไอโซฟอร์มคือ COX-2 เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้ากลุ่มเดียวกับ iNOS ทำให้เกิดการหลั่งของพรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ในปริมาณมากและเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Katzung, 2001) มียาที่ให้ผลยับยั้งต่อ COX-2 อย่างเฉพาะเจาะจงถูกพัฒนาขึ้น และใช้ในการรักษาอาการอักเสบ (Dhikav, 2002) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่ชัดต่อการตอบสนองต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ (Tuncat, 2003)

การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 ที่มากเกินไปนี้จะช่วยรักษาโรคต่างๆ นี้ได้ วิธีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 มีหลายวิธี เช่น การใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ การยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ iNOS หรือยีนสำหรับสร้างโคแฟกเตอร์ รวมทั้งการกระตุ้นเอนไซม์ anti-inflammatory เช่น heme oxygenase-1 (HO-1) ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E2 เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบต่อไป

มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของส่วนสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชที่สามารถต้านการอักเสบโดยการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์และ PGE₂ ในเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง อาทิ ปี ค.ศ. 2004, Shin และคณะ รายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดเมทานอลของผล *Kochia scoparia* ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยส่วนสกัดสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์, PGE₂ และ TNF- α ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS โดยผ่านกลไกที่ทำให้ปริมาณ mRNA และโปรตีนของ iNOS และ COX-2 ลดลง เนื่องจากสารสกัดไปมีผลยับยั้งการสลายตัวของ IKB ที่เป็นตัวยับยั้งของ NF-KB โดย NF-KB เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ทำให้การจับของ NF-KB ต่อ DNA ลดน้อยลง

Raghav และคณะ (2006) ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลของต้น *Ruta graveolens* L. ต่อเซลล์แมคโครฟาจของหนู (J-774) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS พบว่าส่วนสกัดสามารถยับยั้งการหลั่งของไนตริกออกไซด์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด และทำให้การแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

Park และคณะ (2006) ทำการทดสอบผลของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของผลดิบและผลสุกของ *Robus coreanus* ต่อปริมาณไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของผลดิบสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ เนื่องจากการลดการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเอทานอลของผลดิบสามารถเพิ่มปริมาณ mRNA และโปรตีนของเอนไซม์ heme oxygenase-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม antioxidative enzyme การเพิ่มของ heme oxygenase-1 มีผลให้การแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ลดลง เมื่อเร็วๆ นี้มีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดจาก *Scutellaria baicalensis* โดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 และ TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS (Kim, 2009) และส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรพื้นบ้านของจีน ได้แก่ *Drynaria baronii*, *Angelica sinensis* และ *Cornus officinalis* สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ได้เช่นกัน (Chu และคณะ, 2009)

นอกจากส่วนสกัดของพืชแล้วแล้วสารบริสุทธิ์ที่ได้จากพืชยังคงแสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบ เช่น สาร taiwaniaflavone ที่ได้จากใบของ *Selaginella tamariscina* ซึ่งเป็นพืชที่ใช้ในยาพื้นบ้านของ

เอเซียตะวันออก พบว่า taiwaniaflavone ลดการปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 รวมทั้งผลผลิตของ เอนไซม์ทั้งสองคือ ไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ตามลำดับ (Pokharel และ คณะ, 2006)

Guerra และคณะ (2006) รายงานฤทธิ์ต้านอักเสบของ flavonoids ที่สกัดจากต้น *Tanacetum microphyllum* ได้แก่ santin, ermanin, centaureidin และ 5,3'-dihydroxy-4'-methoxy-7-methoxycarbonylflavonol พบว่าสารทุกตัวสามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์ และ PGE₂ ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ LPS เนื่องจากการลดการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2

4-methoxyhonokiol ที่สกัดจากเปลือกของราก *Magnolia obovata* ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และลดการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 โดยยับยั้งการ phosphorylation บน I-KB ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น NF-KB ลดลง และยับยั้งการกระตุ้นวิถี p38 MAPK และ JNK (Zhou และคณะ, 2008)

Cho และคณะ (2009) ได้แยกสาร zedoarondiol ที่สกัดจากลำต้นใต้ดินของต้น *Curcuma heyneana* พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์, PGE₂, IL-1 β , IL-6 และ TNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 และเซลล์จากช่องท้องที่สัมผัสกับ LPS ทั้งยังลดการแสดงออกของยีนเหล่านี้ นอกจากนี้ zedoarondiol ยับยั้งการ phosphorylation บน IKK และ MAPKs

พืชสมุนไพรของโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลดงพยอม อำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี เป็นพืชสมุนไพรในท้องถิ่นที่ใช้รักษาโรคในทางการแพทย์พื้นบ้าน ซึ่งเป็นภูมิปัญญาของสังคมไทยที่สืบทอดกันมานาน แต่พืชบางชนิดยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เช่น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารที่ออกฤทธิ์ หรือพืชวิทยา ดังนั้นการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรเหล่านี้ จะมีความสำคัญในการเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ รองรับการใช้ประโยชน์ของพืชเหล่านี้ เพื่อการพึ่งพาตนเองในระยะยาว โดยปัจจุบันมีความพยายามศึกษาหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านอักเสบจากพืชสมุนไพรในท้องถิ่นต่างๆ เช่น

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ (2549) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz), ผักติ้ว (*Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer ssp. *Pruniflorum* (Kurz.) Gogelin), ผักปลังขาว (*Basella alba* L.), ย่านาง (*Tiliacora triandra* Diels), ผักเหมียง (*Gnetum gnemon* L.) และผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* Merr.) สกัดสารสำคัญจากผักแต่ละชนิดโดยการหมักด้วย methanol นาน 3 วัน และนำสารสกัดที่ได้มาแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักทั้ง 6 ชนิดด้วยวิธี DPPH assay ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากผักติ้วแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยส่วนสกัดส่วนที่ละลายในน้ำและส่วนที่ไม่ละลายในน้ำให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 205.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 101.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือ

ส่วนสกัดจากย่านางให้ค่า IC_{50} 499.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ส่วนที่ละลายในน้ำ) และ 772.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ส่วนที่ไม่ละลายในน้ำ) สำหรับวิตามินซี และวิตามินอี ให้ค่า IC_{50} 9.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 15.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากผักอีก 4 ชนิดมีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นพบว่าสารสกัดผักตัวมี hydrolysable tannin ส่วนสารสกัดย่านางมี phenolic compounds,

ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และ ทรงพร จึงมั่นคง (2551) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพืชสมุนไพรที่พบทั่วไปในจังหวัดอุบลราชธานี 8 ชนิดได้แก่เหียง (*Dipterocarpus intricatus* Dyer), กระบก (*Irvingia malayana* Oliver ex Bennett), แมงลักคา (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit), หูเสือ (*Coleus amboinicus* (Lour.) Spreng), เอนอ้า (*Melastoma sanguineum* Sims), มะพอก (*Parinari anamense* Hance), มะสัง (*Feroniella lucida* Swing), และตุ้มกาขาว (*Strychnos nux-blanda* A.W.) ด้วยการนำส่วนต่างๆของพืชมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate และ ethanol ได้สารสกัดชั้น ethyl acetate และ ethanol ทั้งหมด 36 สารสกัด จากนั้นทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH พบว่าสารสกัดชั้น ethanol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารสกัดในชั้น ethyl acetate โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 19.8+2.3 ถึง 51.4+1.3 เมื่อใช้สารสกัดเข้มข้นเดียวกัน (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่า vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) อยู่ในช่วง 4.4+7.2 ถึง 105.9+4.3 มิลลิกรัมวิตามินซีต่อ 100 กรัมสารสกัด ส่วนการหาปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดชั้น ethanol โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu พบว่าปริมาณสารฟีนอลรวมในสารสกัดนี้จะอยู่ในช่วง 5.4+0.1 ถึง 41.5+0.3 มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารฟีนอลรวมกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.6

ไชยยง รุจจนเวท และดวงพร อมรเลิศพิสานต์ (2553) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารโดยกลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลอง โดยทำการสกัดเหง้าของเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri* Andre) หรือค่างควาดำ ด้วยเอทานอล นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบในหนูขาวที่ชักนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย อินโดเมธาซิน (indomethacin) เอทานอล และความเครียด นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวในการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารต่อปริมาณสารเมือก และเฮกโซซามีน (hexosamine) ในกระเพาะอาหาร ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดเอทานอลของเนระพูสีไทยขนาด 125 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในทุกการทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) และสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้บางส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวยังช่วยรักษาปริมาณเมือก และเฮกโซซามีนในกระเพาะอาหารไม่ให้ถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์อีกด้วย ผลการศึกษานี้ให้หลักฐานที่สนับสนุนการใช้เนระพูสีไทยบรรเทาอาการปวดท้องเนื่องจากแผลในกระเพาะอาหารตามทีระบุไว้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน โดยกลไกการออกฤทธิ์น่าจะมาจากการป้องกันเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหารเป็นหลัก

อรพินท์ เทพสิงห์แก้ว เบญจลักษณ์ ทองช่วย และสาคร พรประเสริฐ (2554) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.) และสาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* Linn.) โดยสกัดสารจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกาที่อบแห้งด้วยน้ำกลั่น และเอทานอลความเข้มข้น 95% จากนั้นวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลเอบีทีเอส (ABTS) ดีพีพีเอช (DPPH) ไฮดรอกซิล ($\text{OH}^\cdot$) และซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($\text{O}_2^{\cdot-}$) และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงชนิด U937 โดยวิธี MTT ผลการศึกษาพบว่าใบสาบเสือที่สกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 23.01 ± 0.04 มิลลิกรัม แกลลิกแอซิดต่อกรัมสารสกัด สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยน้ำสามารถกำจัดอนุมูลเอบีทีเอส และดีพีพีเอชได้ดีที่สุดโดยมีค่าความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลดีพีพีเอชได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1.998 ± 0.002 มิลลิกรัม/หลอดต่อกรัมสารสกัด และ 3.25 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบสาบเสือที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิลได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.076 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.50 ± 2.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกาที่สกัดด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดใบสาบเสือ

Andarwulan และคณะ (2010) การศึกษานี้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ตลอดจนระบุและหาปริมาณฟลาโวนอยด์ของส่วนสกัดเอทานอลของพืชผักทั้ง 11 ชนิดจากประเทศอินโดนีเซีย พบว่าพืชผักที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่พบฟลาโวนอยด์ชนิด เควอซีติน (quercetin) และเคมเฟอร์อล (kaempferol) ในปริมาณตั้งแต่ 0.3 ถึง 143 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด โดยพืชที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด คือ ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* (L) Merr.) และพืชที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด คือ ดาวกระจาย (*Cosmos caudatus* H.B.K.) ส่วนขลุ่ย (*Pluchea indica* Less.) และ ดาวกระจาย (*Cosmos caudatus* H.B.K.) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยการวิเคราะห์จากปฏิกิริยาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไซยาไนด์ ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS (2,20-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) และการยับยั้งการออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิก ดังนั้นจึงระบุได้ว่า *S. androgynus*, *C. caudatus* และ *P. indica* มีศักยภาพในการเป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร

Zhang และคณะ (2011) ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพรจีน 14 ชนิด รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การทดสอบใน (*Saccharomyces cerevisiae*)

ในขณะที่ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากพืชถูกประเมินโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และTNF- α ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และIFN- γ พืชทั้ง 4 ชนิด คือ *Scutellaria baicalensis*, *Taxillus chinensis*, *Rheum officinale* และ *Sophora japonica* แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทั้งในรูปแบบจำลองยีสต์และวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ สารสกัดเอทานอลของ *S. japonica* มีปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์ มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงในเชิงบวกบ่งชี้ว่าสารเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหลักที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจากพืช 5 ชนิด (*S. baicalensis*, *T. chinensis*, *S. japonica*, *Mahonia fortunei* และ *Sophora flavescens*) แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบที่สูง โดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และTNF- α ด้วยค่าการค้นพบนี้ชี้ให้เห็นพืชสมุนไพรบางชนิดที่ถูกศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ

Ravipati และคณะ (2012) ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพรจีน 44 ชนิด รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม ผลจากการศึกษาพบว่า *Ligustrum lucidum*, *Paeonia suffruticosa*, *Salvia miltiorrhiza*, *Sanguisorba officinalis*, *Spatholobus suberectus*, *Tussilago farfara* และ *Uncaria rhynchophylla* มีสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมที่สูง ซึ่งมีเป็นความสัมพันธ์ที่ดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชเหล่านี้ ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร พืชที่ถูกศึกษาบางชนิดน่าจะเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ได้

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

เก็บพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด ดังตารางที่ 2-1 พิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นำพืชมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วหั่นแต่ละส่วนของพืชสมุนไพรที่ซัดทดสอบ นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าพืชสมุนไพรแต่ละส่วนจะแห้ง จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

2.2 การสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยน้ำ

นำส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพร 21 ชนิด จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่บดละเอียดจำนวนหนึ่ง สกัดด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:10 ทำการสกัดโดยการต้มส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรในน้ำเดือดนาน 30 นาที จากนั้นกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดความดันที่อุณหภูมิห้อง นำกากพืชมาต้มซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง ชูดเก็บส่วนสกัดและจัดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบทำการละลายส่วนสกัดด้วยน้ำ

2.3 การสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยเอทานอล

นำส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่บดละเอียดจำนวนหนึ่ง ใส่ลงในสารละลายเอทานอล 95 % ในอัตราส่วน 1 : 10 เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าขวดโหลที่ใส่ลงผ้าของส่วนต่างๆ ของพืช วันละ 3 เวลา กรองสารละลายเอทานอลที่ได้ด้วยเครื่องดูดความดันที่อุณหภูมิห้องโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จากนั้นนำส่วนผงพืชทั้ง 15 ชนิด ใส่ในถุงกรองเพื่อสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ชูดเก็บส่วนสกัดและจัดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทดสอบทำการละลายส่วนสกัดด้วยเอทานอล 95 %

นำส่วนสกัดเอทานอลทั้งหมด 30 ส่วนสกัดไปวิเคราะห์ NMR (แสดงผลในภาคผนวก 1)

ตารางที่ 2-1 รายชื่อพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบ

รายชื่อพืชสมุนไพร	วงศ์	ส่วนที่ใช้ทดสอบ
1. สาบแร้งสาบกา (<i>Ageratum conyzoides</i> Linn.)	Composutae	ใบ
2. เอื้องหมายนา (<i>Costus speciosus</i> (Koen) Smith)	Zingiberaceae	ใบ, ต้น, เหง้า
3. ชงโคป่า (<i>Bauhinia</i> sp.)	Leguminosae-Caesalpinioideae	ใบ
4. มะเดื่อหอม (<i>Ficus hirta</i> Vahl)	Moraceae	ใบ
5. ลายนก	-	ใบ
6. ระย่มน้อยดอกขาว (<i>Rauvolfia</i> sp.)	Apocynaceae	ใบ, ราก
7. ไมยราบ (<i>Mimosa diplotricha</i> C. Wright ex Sauvalle)	Mimosaceae	ทุกส่วนของต้น
8. โคลงเคลง (<i>Melastoma saigonense</i> (Kuntze) Merr)	Melastomataceae	ใบ, ราก
9. ค้างคาวดำ (<i>Tacca chantrieri</i> Andr.)	Taccaceae	ใบ, เหง้า
10. ติงตัน (<i>Helicteres hisuta</i> Lour)	Sterculiaceae	ใบ, ราก
11. มะฮึก (<i>Clausena excavate</i> Burm F.)	Rutaceae	ใบ, ราก
12. หัวเดียว (<i>Aglaonema nitidum</i> (Jack) Kunth)	Araceae	ใบ, เหง้า
13. ไม้ลาย (<i>Microcos tomentosa</i> Sm.)	Tiliaceae	ใบ
14. เข็มไฉเตีย (<i>Aidia wallichiana sensu</i> Tirveng)	Rubiaceae	ใบ, ราก
15. พนมสวรรค์ (<i>Clerodendrum paniculatum</i> L.)	Verbenaceae	ราก
16. สะค้านใบพลู (<i>Piper ribesoides</i> Wall)	Piperaceae	เถา
17. ฝนแสนห่า (<i>Argyrea capitiformis</i> (Poiret) Ooststr)	Convulvulaceae	ใบ
18. เข็มป่า (<i>Ixora lobbii</i> King & Gamble)	Rubiaceae	ทุกส่วนของต้น
19. พินปลา (<i>Litsea umbellata</i> Merr)	Lauraceae	ใบ
20. ราชดัด (<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr)	Siamaroubaceae	ใบ
21. พังแหรใหญ่ (<i>Trema orientalis</i> (L.) Yala)	Ulmaceae	เปลือกลำต้น

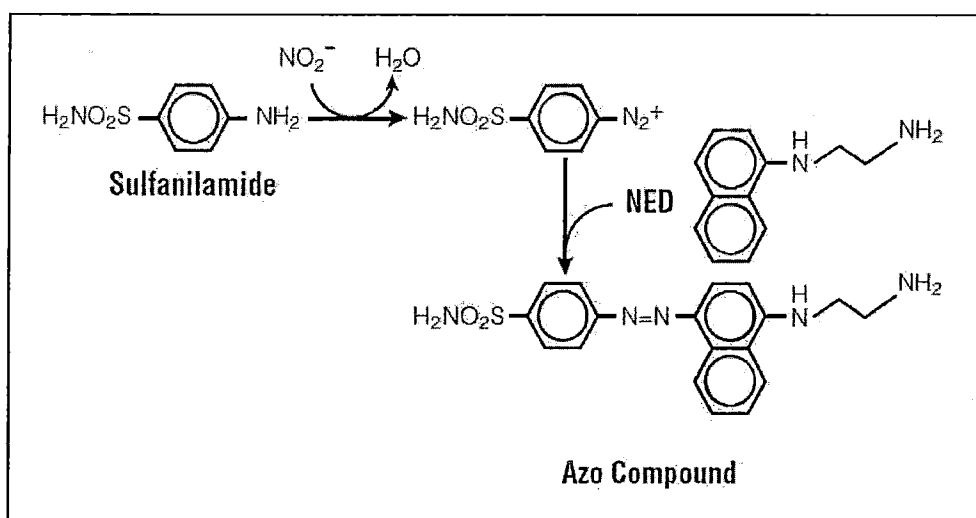
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านต้านอักเสบของส่วนสกัด

2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO₂ 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนโตรที่เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนโตรที่จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrocholoride (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร (รูปที่ 2-1) ดังนั้นปริมาณไนโตรที่จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ 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 dihydrocholoride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนโตรที่ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM



รูปที่ 2-1 ปฏิกิริยา Griess

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

2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน (PGE_2)

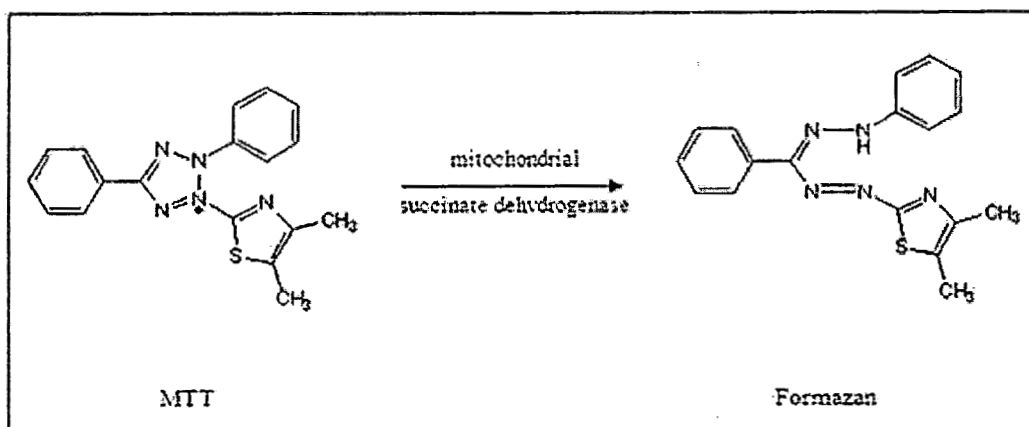
แบ่งเซลล์ RAW 264.7 ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์/หลุม) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12-16 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ในสภาวะที่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์มา

วิเคราะห์ปริมาณ PGE₂ โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป PGE₂ competitive enzyme immune assay kit ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำดังนี้ เจือจางอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาตร 150 µl ด้วย Calibrator diluents RD5-56 ปริมาตร 300 µl จากนั้นบีบเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 150 µl ลงใน ไมโครเพลทที่เคลือบกันหลุมด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody (secondary antibody) และเติมสารละลาย mouse anti-PGE₂ monoclonal antibody (primary antibody) ปริมาตรหลุมละ 50 µl และบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย PGE₂ conjugated to horseradish peroxidase ซึ่งคือ PGE₂ ที่ติดด้วยเอนไซม์ HRP ปริมาตร 50 µl ในไมโครเพลท จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างหลุมในไมโครเพลทด้วย washing buffer ปริมาตร 250 µl จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นเติมซับสเตรท (สารละลายระหว่าง hydrogen peroxide และ tetramethylbenzidine ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตรหลุมละ 100 µl ผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 540 nm คำนวณความเข้มข้นของ PGE₂ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลาย PGE₂ ที่ทราบความเข้มข้น (0-2,500 pg/ml)

2.5 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์กันแบนแบบ 24 หลุม โดยให้จำนวนเซลล์ต่อหลุมเป็น 1.5×10^5 เซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ลงเกาะผิวภาชนะ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดความเข้มข้นต่างๆ ทั้งที่มี LPS และไม่มี LPS รวมทั้ง 0.4% (v/v) DMSO และ 50 µM aminoguanidine (AG) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ใส่หลุมละ 500 µl ที่มี MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย MTT สามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซน (formazan) ที่มีสีม่วง (ภาพที่ 2-2) แล้วจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาแซนที่ได้ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) หลุมละ 500 µl ดูดสารละลายฟอร์มาแซนจากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 µl ลงในไมโครเพลทกันแบนแบบ 96 หลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 nm โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่งปริมาณฟอร์มาแซนจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด และคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ดังสมการ

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



รูปที่ 2-2 ปฏิกริยาการรีดักชันของ MTT

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

2.6 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมเป็นการทดสอบตามวิธีของ กล้าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2553) และเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยเตรียมสารละลายกรดแกลลิกในเมทานอล และนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.0078125, 0.015625, 0.03125, 0.0625 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปฏิกริยาจะเริ่มจากเติมสารละลายกรดแกลลิก หรือส่วนสกัดที่ละลายในน้ำกลั่นหรือ 70% DMSO ของเหง้าและใบเร่วหอมที่ความเข้มข้น 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 70% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที จากนั้นทำการปิเปตสารผสม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมไมโครเพลทก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครึ่งทำ 3 ซ้ำ

2.7 การสกัด RNA

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. (1×10^6 เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ก่อนดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการชุดเก็บเซลล์ด้วยสารละลาย Tri reagent จำนวน 1 mL ก่อนทำการสกัด RNA ทั้งหมดของเซลล์ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ (MRC) โดยมี

วิธีดังนี้ เติมคลอโรฟอร์มจำนวน 0.2 mL และผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพา-นอลจำนวน 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

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

นำ RNA ที่ได้ จำนวน 1 µg ทำปฏิกิริยากับ 5X iScript™ Reverse Transcription Supermix ปริมาตร 4 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจาก RNase ให้ได้ปริมาตรเป็น 20 µl ใส่ลงในหลอด PCR จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR ในสภาวะ Priming ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, Reverse transcription 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ RT inactivation ที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว นำ cDNA ที่ได้มาตรวจสอบด้วยการแยกโดย 1% agarose gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบโดยเครื่องฉายแสง UV 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	ขนาดของผลผลิต คู่เบส (bp)	เลข accession
iNOS	5'-GCACAGCACAGGAAATGTTTCAGCAC-3' (F)	156	NM_010927.3
	5'-AGCCAGCGTACCGGATGAGC-3' (R)		
COX-2	5'-TGATCGAAGACTACGTGCAACACC-3' (F)	164	NM_011198.3
	5'-TTCAATGTTGAAGGTGTCGGGCAG-3' (R)		
EF-2	5'-CTGAAGCGGCTGGCTAAGTCTGA-3' (F)	156	NM_007907.2
	5'-GGGTCAGATTTCTTGATGGGGATG-3' (R)		

ปฏิกิริยาการวิเคราะห์ PCR ประกอบด้วย 2X iTaqTM Universal SYBR[®] Green supermix ปริมาตร 10 μ L, 10 μ M forward primer ปริมาตร 0.5 μ L, 10 μ M reverse primer ปริมาตร 0.5 μ L และ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ ปริมาตร 2 μ L ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ให้ได้ปริมาตรเป็น 20 μ L จากนั้นนำเข้าเครื่อง Real-time PCR โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของยีนคือ pre-heat 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำ Melting curve โดยทำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส หาค่า cycle of threshold (C_t) ของแต่ละปฏิกิริยา แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหา copy number ของ mRNA สำหรับยีน iNOS และ EF-2 จากกราฟมาตรฐานของพลาสมิดที่มีชิ้น cDNA เป้าหมายของยีน iNOS, COX-2 และ EF-2 ซึ่งแสดงผลในรูปแบบของอัตราส่วนของ copy number ของ iNOS, COX-2 และ EF-2

2.9 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot

ทำการแบ่งเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm.(1x10⁶ เซลล์/จาน) บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดใบสับแรงสับกาที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มี 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 μg 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 แขนในสารละลาย 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 แขนในสารละลาย 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 บ่มในสารละลายซับสเตรตสำหรับ enhanced chemiluminescence (ECL) นาน 5 นาที ก่อนนำไปประกอบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับมวลโมเลกุลของ iNOS และ β -actin กับโปรตีนมาตรฐาน

2.12 การทดสอบผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของ NF- κ B เข้าสู่นิวเคลียส

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm จานละ 5×10^6 เซลล์ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม LPS ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และบ่มเซลล์ต่อที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่อากาศผสมกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการสกัดนิวเคลียสตามวิธีที่รายงานโดย Srisook et al. (2011) เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย PBS ที่เย็น 2 ครั้ง และเติม PBS ปริมาตร 500 μl เพื่อทำการชุดเซลล์ ใส่หลอดไมโครทิวบ์ จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนที่เป็นตะกอน เติสารละลายส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโดยการเติมบัฟเฟอร์ 1 (25 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 5 mM KCl, 0.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM DTT, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) PH 7.9) และ 1X PI ปริมาตร 200 μl บ่มที่น้ำแข็ง 20 นาที โดยที่นำมาเขย่าทุกๆ 5 นาที

จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 2 (บัฟเฟอร์ 1, 5% NP-40) ปริมาตร 200 μ l เขย่าบนน้ำแข็ง 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 6 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนตะกอนมาเติมบัฟเฟอร์ 3 (บัฟเฟอร์ 1 และบัฟเฟอร์ 2 ในอัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 200 μ l เขย่าเบาๆ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายออกด้วยปิเปต และละลายตะกอนนิวเคลียสโดยเติมบัฟเฟอร์ 4 (25 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM $MgCl_2$, 20% glycerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) และ 1X PI ปริมาตร 70 μ l บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 40 นาที พร้อมเขย่าทุกๆ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ และนำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี Bradford ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm และตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่ได้ด้วยวิธี Western blot

2.13 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 Prism 5

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 น้ำหนักของส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร

การสกัดพืชสมุนไพรทั้งหมด 21 ชนิด ด้วยน้ำร้อน และ 95% เอทานอล ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 60 ส่วนสกัด พบว่าส่วนสกัดน้ำของสมุนไพรทุกชนิดมีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดเอทานอล ยกเว้นลำต้นสะค้านใบพลู และเปลือกพังกาใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 3-1 โดยมีร้อยละของน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.45-37.58 % ส่วนสกัดน้ำที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด ได้แก่ เหง้าหัวเดียว และร้อยละของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดเอทานอลเท่ากับ 2.1-25.52 % ส่วนสกัดเอทานอลที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ ลำต้นสะค้านใบพลู

ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำมีค่าเท่ากับ 4.09 ± 0.20 ถึง 325.74 ± 13.62 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด และของส่วนสกัดเอทานอลมีค่าเท่ากับ 1.55 ± 0.20 ถึง 515.27 ± 14.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด คือ เปลือกพังกาใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของสมุนไพรเกือบทุกชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ยกเว้น เหง้าเอื้องหมายนา ใบมะเดื่อหอม ใบระย่อนน้อยดอกขาว ใบตึงตัน ใบมะฮึก ใบผ่นแสนห้า และใบราชดัด (ตารางที่ 3-1)

ตารางที่ 3-1 ร้อยละของน้ำหนักแห้ง และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพร

สมุนไพร	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง		ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด)	
	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล
ใบสาบแร้งสาบกา	25.7	13.93	46.99 ± 1.79	65.19 ± 4.16
เหง้าเอื้องหมายนา	14.65	4.53	7.98 ± 0.19	1.55 ± 0.20
ใบเอื้องหมายนา	8.5	4.37	15.81 ± 0.81	24.26 ± 0.74
ต้นเอื้องหมายนา	11.65	2.50	14.28 ± 0.50	17.25 ± 0.12
ใบขมิ้น	13.2	7.85	74.20 ± 1.62	95.69 ± 1.41
ใบมะเดื่อหอม	9.7	6.67	44.60 ± 0.64	28.32 ± 1.74
ใบลายนก	10.1	3.93	13.92 ± 0.60	21.83 ± 0.11

ใบระย้อมน้อยดอกขาว	10.3	7.00	46.06 ± 0.72	24.27 ± 0.28
รากระย้อมน้อยดอกขาว	15.0	2.10	4.09 ± 0.20	21.36 ± 0.45
ไมยราบ	5.80	3.46	24.93 ± 0.85	24.58 ± 2.81
ใบโคลงเคลง	6.9	5.20	41.69 ± 1.15	52.69 ± 2.34
รากโคลงเคลง	12.68	2.91	72.92 ± 0.80	307.77 ± 2.97
ใบค้ำคาวดำ	18.95	10.48	19.02 ± 1.38	27.23 ± 8.80
เหง้าค้ำคาวดำ	23.50	14.85	33.96 ± 0.59	61.96 ± 0.48
ใบตึงตัน	10.08	5.33	103.26 ± 1.72	36.72 ± 1.57
รากตึงตัน	16.25	2.31	81.40 ± 1.87	106.04 ± 9.82
ใบมะฮิก	20.65	12.26	70.07 ± 1.01	51.55 ± 7.94
รากมะฮิก	10.92	2.55	7.12 ± 1.63	58.73 ± 1.60
ใบหัวเดียว	17.25	8.21	15.14 ± 1.33	22.38 ± 0.54
เหง้าหัวเดียว	37.58	10.90	17.79 ± 0.73	123.02 ± 2.11
ใบไม้ลาย	15.36	5.97	96.56 ± 1.22	221.98 ± 4.94
ใบเข็มไอดี	18.80	12.06	197.89 ± 2.44	239.52 ± 7.57
รากเข็มไอดี	14.16	4.95	133.86 ± 1.40	206.86 ± 1.75
รากพนมสวรรค์	6.28	2.94	18.74 ± 0.32	58.22 ± 0.79
ลำต้นสะค้านใบพลู	5.2	25.52	27.61 ± 1.04	57.23 ± 1.28
ใบฝนแสนห่า	16.35	10.53	112.04 ± 2.45	72.17 ± 3.81
เข็มป่า	9.65	7.76	132.85 ± 3.16	232.49 ± 3.95
ใบฟันปลา	7.4	6.64	206.58 ± 5.69	213.52 ± 6.38
ใบราชดัด	29.95	18.23	77.62 ± 4.40	58.45 ± 3.72
เปลือกพังแหร์ใหญ่	3.45	11.13	325.74 ± 13.62	515.27 ± 14.70

3.2 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์

การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชสมุนไพร ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT พบว่าทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลพืชส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 % ยกเว้นส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา รากตึงตัน ลำต้นสะค้านใบพลู และใบราชดัด ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เท่ากับ 94.37 ± 1.42 % ส่วน DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2 % ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายส่วนสกัดเอทานอลของพืช มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดเท่ากับ 99.20 ± 5.49 % ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพร

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์	
	ส่วนสกัดน้ำ (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสบประเสก	104.47±2.47	105.25±4.25
เหง้าเอื้องหมายนา	104.36±4.36	2.62±0.30
ใบเอื้องหมายนา	100.50±4.10	97.73±1.99
ต้นเอื้องหมายนา	88.61±5.54	95.46±7.96
ใบขิงโคป่า	97.47±13.48	97.54±3.40
ใบมะเดื่อหอม	84.76±3.94	94.57±5.59
ใบลายนก	102.12±1.06	98.21±2.36
ใบระย่มน้อยดอกขาว	94.93±2.65	92.88±4.21
รากระย่มน้อยดอกขาว	101.23±3.40	99.81±3.85
ไมยราบ	90.27±7.34	100.88±3.23
ใบโคลงเคลง	95.08±4.57	96.10±3.64
รากโคลงเคลง	96.43±6.32	93.01±4.70
ใบค้ำควดดำ	104.60±1.97	105.81±6.32
เหง้าค้ำควดดำ	103.15±3.03	104.75±5.42
ใบตุงตัน	102.31±2.59	102.26±4.67
รากตุงตัน	96.19±0.96	57.32±3.77
ใบมะฮึก	100.27±1.51	103.55±2.14
รากมะฮึก	97.78±1.92	83.57±14.30
ใบหัวเดียว	96.32±2.66	107.35±13.99
เหง้าหัวเดียว	101.69±2.17	110.35±12.60
ใบไม้ลาย	93.87±3.72	105.29±8.31
ใบเข็มไฉเดียว	101.27±1.02	108.68±9.97
รากเข็มไฉเดียว	96.14±4.04	108.47±11.51
รากพนมสวรรค์	96.16±2.91	105.94±12.80
ลำต้นสะค้านใบพลู	101.17±3.93	32.74±17.71
ใบฝนแสนห่า	91.09±2.20	100.31±3.38
เข็มป่า	101.99±23.18	108.46±5.50
ใบฟันปลา	99.15±7.07	106.07±4.02
ใบราชดัด	95.33±7.37	4.07±0.98
เปลือกพังแหรใหญ่	99.69±24.90	99.68±12.40
Aminoguanidine (50 µM)	91.7±7.8	
Indomethacin (10 µM)	94.2±9.4	

3.3 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ของพืชสมุนไพร

จากการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีการผลิตไนตริกออกไซด์มากขึ้นอย่างชัดเจน (47.53 ± 8.93 ไมโครโมลาร์) เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม (3.01 ± 2.66 ไมโครโมลาร์) ส่วนสกัดน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบมะขี้ และ ใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 54.21 ± 8.70 และ 52.04 ± 5.61 ตามลำดับ และส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ รากตึงตัน ใบราชดัด ใบสาบแร้งสาบกา รากมะขี้ เหง้าเอื้องหมายนา และลำต้นสะค้านใบพลู ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 99.87 ± 2.92 , 97.59 ± 6.75 , 85.31 ± 2.91 , 85.31 ± 9.95 , 82.18 ± 5.79 และ 80.90 ± 7.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 3-3) ในขณะที่ aminoguanidine (AG) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ iNOS ถูกใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า AG ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 64.70 ± 9.29 %

การทดสอบการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพร พบว่าเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียวมีปริมาณพรอสตาแกลนดิน E₂ เท่ากับ 4967.89 ± 1787.17 pg/mL ในขณะที่เซลล์ควบคุมมีปริมาณพรอสตาแกลนดิน E₂ เท่ากับ 146.48 ± 95.31 pg/mL ส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา รากมะขี้ รากตึงตัน ใบราชดัด ใบฝนแสนห่า เหง้าเอื้องหมายนา ใบเอื้องหมายนา เปลือกพังกาใหญ่ ใบมะเดื่อหอม และเข็มป่า ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E₂ มากกว่า 80% (ตารางที่ 3-4) ในขณะที่ indomethacin (IMC) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ถูกใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า IMC ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 97.2 ± 0.2 %

นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดพืชสมุนไพรบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดสมุนไพรเพียงอย่างเดียว โดยไม่ได้สัมผัสกับ LPS คือ ส่วนสกัดน้ำและเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนาและต้นเอื้องหมายนา ส่วนสกัดน้ำของไมยราบ ใบค่างควดดำ เหง้าค่างควดดำ รากตึงตัน รากมะขี้ รากพนมสวรรค์ และเปลือกพังกาใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 3-5

ตารางที่ 3-3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคารไรด์

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์			
	ส่วนสกัดน้ำ		ส่วนสกัดเอทานอล	
	10 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL
ใบสาบแร้งสาบกา	20.06±2.25	52.04±5.61	27.83±1.83	85.31±2.91
เหง้าเอื้องหมายนา	-12.79±13.53	-44.41±8.65	80.41±5.87	82.18±5.79
ใบเอื้องหมายนา	6.59±2.93	9.23±2.38]	12.02±6.27	41.32±11.14
ต้นเอื้องหมายนา	-10.95±7.16	-27.29±7.37	-7.42 ± 2.48	-29.55±9.31
ใบขิงโคป่า	0.19±1.49	-1.34±5.00	4.80±1.26	16.07±4.02
ใบมะเดื่อหอม	19.27±5.81	26.31±7.56	17.14±5.25	42.62±7.93
ใบลายกนก	2.64±6.76	0.15±4.24	4.36±8.18	14.09±5.41
ใบระย่อนน้อยดอกขาว	8.15±2.13	14.09±3.24	4.62±3.89	18.86±3.13
รากระย่อนน้อยดอกขาว	10.51±4.74	8.53±6.43	19.03±5.41	29.82±3.32
ไมยราบ	10.06±7.26	6.97±2.06	22.11±3.65	46.15±10.92
ใบโคลงเคลง	10.92±3.93	10.27±4.08	14.34±8.17	45.73±12.40
รากโคลงเคลง	8.82±3.00	15.35±2.96	19.91±4.73	30.19±10.70
ใบค้ำควดดำ	-4.02±8.20	-1.13±4.13	4.86±0.96	21.59±11.84
เหง้าค้ำควดดำ	15.10±6.13	17.09±5.64	5.80±6.22	23.45±12.97
ใบตึงตัน	14.45±8.82	16.34±10.42	12.96±8.17	39.42±13.73
รากตึงตัน	10.95±8.77	19.87±5.90	99.20±4.34	99.87±2.92
ใบมะฮิก	25.96±6.35	54.21±8.70	-0.16±1.83	38.75±14.51
รากมะฮิก	12.95±8.96	12.07±4.51	20.84±6.65	85.31±9.95
ใบหัวเดียว	8.22±7.69	13.24±5.34	12.40±1.64	30.77±2.93
เหง้าหัวเดียว	12.17±1.00	21.83±4.58	5.90±2.52	17.50±3.74
ใบไม้ลาย	21.68±5.01	21.01±5.21	13.12±0.37	18.61±3.66
ใบเข็มไอดี	8.76±7.35	13.82±6.24	9.57±2.38	33.16±1.66
รากเข็มไอดี	7.16±5.72	-1.02±6.43	5.35±2.89	13.12±5.08
รากพนมสวรรค์	11.70±2.27	10.88±3.33	3.61±0.24	26.56±1.17
ลำต้นสะค้านใบพลู	-1.54±12.71	-8.56±17.18	22.21±2.63	80.90±7.50
ใบฝนแสนห่า	4.41±11.56	12.77±5.90	14.54±21.11	69.68±3.67
เข็มป่า	1.45±8.78	7.39±9.36	9.26±11.77	29.60±14.77
ใบพินปลา	13.39±6.83	17.88±7.16	8.45±12.89	21.10±7.93
ใบราชดัด	-2.80±4.49	14.83±6.07	98.37±4.06	97.59±6.75
เปลือกพังแหรใหญ่	3.55±7.78	-13.43±35.57	10.54±6.03	19.03±11.62

ตารางที่ 3-4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพอสตาغلนดิน E₂ ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคารไรด์

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพอสตาغلนดิน E ₂
	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสาบแร้งสาบกา	98.03±1.47
เหง้าเอื้องหมายนา	88.42±11.24
ใบเอื้องหมายนา	88.42±11.24
ต้นเอื้องหมายนา	55.42±27.15
ใบขิงโคป่า	69.94±32.10
ใบมะเดื่อหอม	84.50±24.32
ใบลายกนก	22.46±12.50
ใบระย่อมน้อยดอกขาว	21.55±5.36
รากระย่อมน้อยดอกขาว	30.42±11.24
ไมยราบ	36.31±5.16
ใบโคลงเคลง	72.37±14.32
รากโคลงเคลง	57.26±17.76
ใบค้ำควดดำ	44.97±8.37
เหง้าค้ำควดดำ	67.72±10.86
ใบตึงตัน	57.81±9.94
รากตึงตัน	97.18±1.85
ใบมะฮิก	-12.17±4.39
รากมะฮิก	21.55±5.36
ใบหัวเดียว	-23.62±13.09
เหง้าหัวเดียว	53.34±27.75
ใบไม้ลาย	23.42±1.66
ใบเข็มไฉเดีย	66.07±28.64
รากเข็มไฉเดีย	44.97±8.37
รากพนมสวรรค์	47.70±11.41
ลำต้นสะค้านใบพลู	46.06±7.76
ใบฝนแสนห่า	92.86±7.45
เข็มป่า	80.01±9.89
ใบพันปลา	58.28±22.51
ใบราชดัด	92.86±7.45
เปลือกพังแหรใหญ่	44.97±8.37

ตารางที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์การการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดพืชสมุนไพร

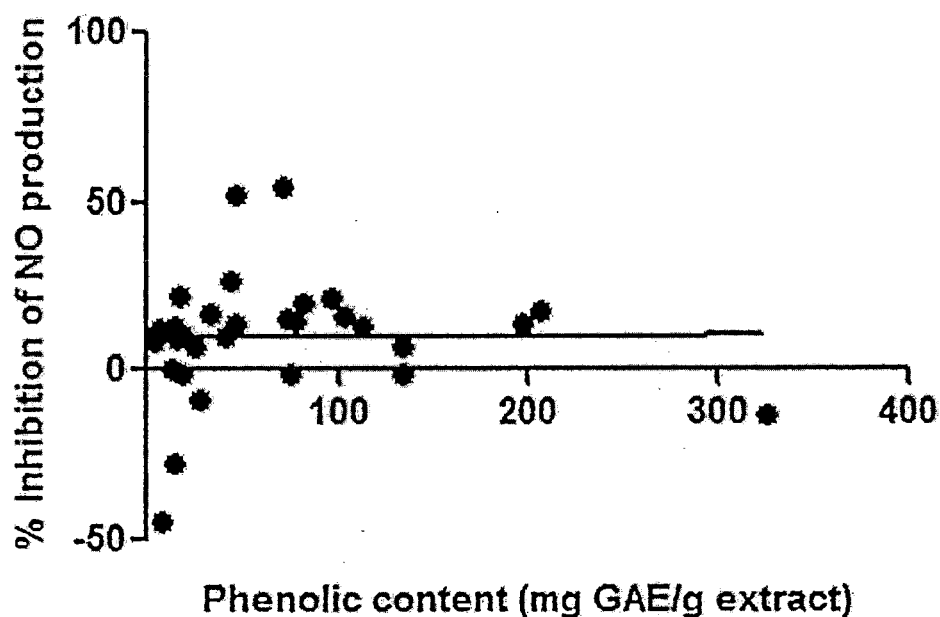
สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การการผลิตไนตริกออกไซด์		เปอร์เซ็นต์การการผลิตพรอสตาแกลนดิน E ₂
	ส่วนสกัดน้ำ (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)	ส่วนสกัดเอทานอล (50 µg/mL)
ใบสบางร้างสบากา	1.98±0.25	3.57±0.61	0.55±0.47
เหง้าเอื้องหมายนา	47.42±12.03	16.07±3.33	10.51±9.63
ใบเอื้องหมายนา	1.12±2.05	3.18±0.38	6.55±9.23
ต้นเอื้องหมายนา	75.21±7.31	76.42±6.86	8.41±8.01
ใบขงโคป่า	-0.76±3.40	2.41±0.27	1.23±1.71
ใบมะเดื่อหอม	1.29±4.42	3.70±0.67	0.64±0.56
ใบลายกนก	0.53±2.61	4.79±0.63	1.03±1.03
ใบระย่อนน้อยดอกขาว	10.37±6.36	4.79±0.57	1.57±1.66
รากระย่อนน้อยดอกขาว	0.35±2.71	2.30±1.13	7.53±2.65
ไมยราบ	75.80±7.08	3.89±0.61	4.82±0.89
ใบโคลงเคลง	-0.96±3.71	3.70±0.13	2.34±1.40
รากโคลงเคลง	-0.51±3.79	2.44±0.46	4.28±3.41
ใบค้ำควดดำ	27.36±2.91	4.38±2.55	1.24±1.24
เหง้าค้ำควดดำ	41.67±8.52	-0.29±1.54	3.70±2.64
ใบตึงตัน	0.17±2.22	2.75±1.54	3.07±2.06
รากตึงตัน	54.20±4.14	1.28±1.88	2.37±1.53
ใบมะฮิก	-0.46±1.83	0.00±1.55	2.53±2.17
รากมะฮิก	69.77±9.17	0.26±2.01	1.73±1.04
ใบหัวเดียว	-0.14±2.61	2.37±1.32	2.95±4.61
เหง้าหัวเดียว	9.79±13.25	0.67±1.43	3.89±3.52
ใบไม้ลาย	-0.61±1.88	2.89±0.43	2.65±1.10
ใบเข็มไอดี	0.63±1.76	2.04±1.63	4.05±2.73
รากเข็มไอดี	5.84±4.33	0.56±1.08	4.44±3.07
รากพนมสวรรค์	40.12±7.72	-1.05±3.96	2.29±1.98
ลำต้นสะค้านใบพลู	-0.49±2.42	5.32±4.78	1.89±1.69
ใบฝนแสนห่า	-3.66±4.67	4.43±7.33	4.64±2.01
เข็มป่า	-6.65±6.79	7.90±7.94	2.66±2.33
ใบพินปลา	-4.99±4.65	-1.35±5.60	1.87±1.70
ใบราชดัด	0.61±4.78	4.11±2.76	5.05±1.19
เปลือกพังแหรใหญ่	26.99±38.64	-0.35±2.54	1.54±1.25

3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสาร

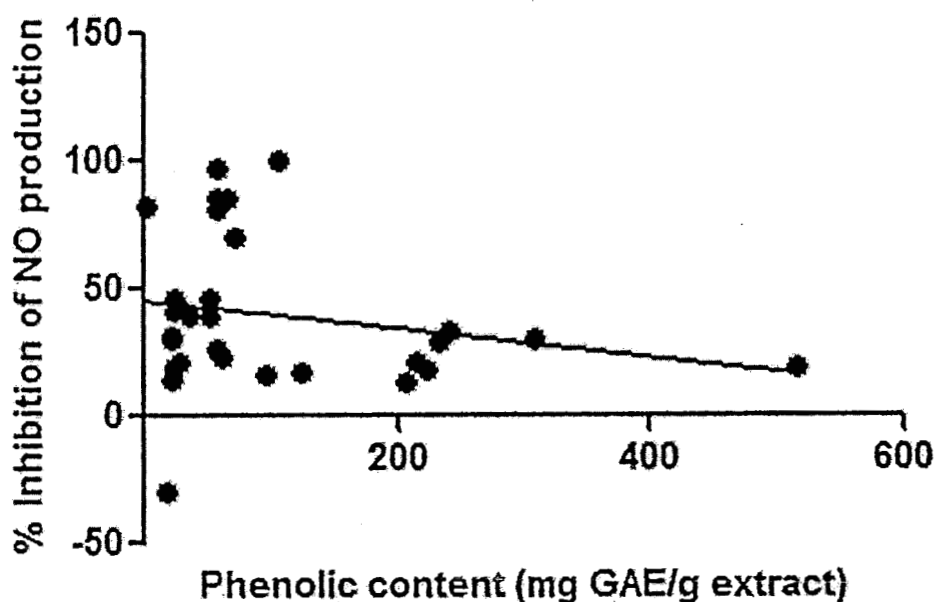
ฟีนอลรวม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์กันต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.000084 และ 0.0451 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3-1 และรูปที่ 3-

2



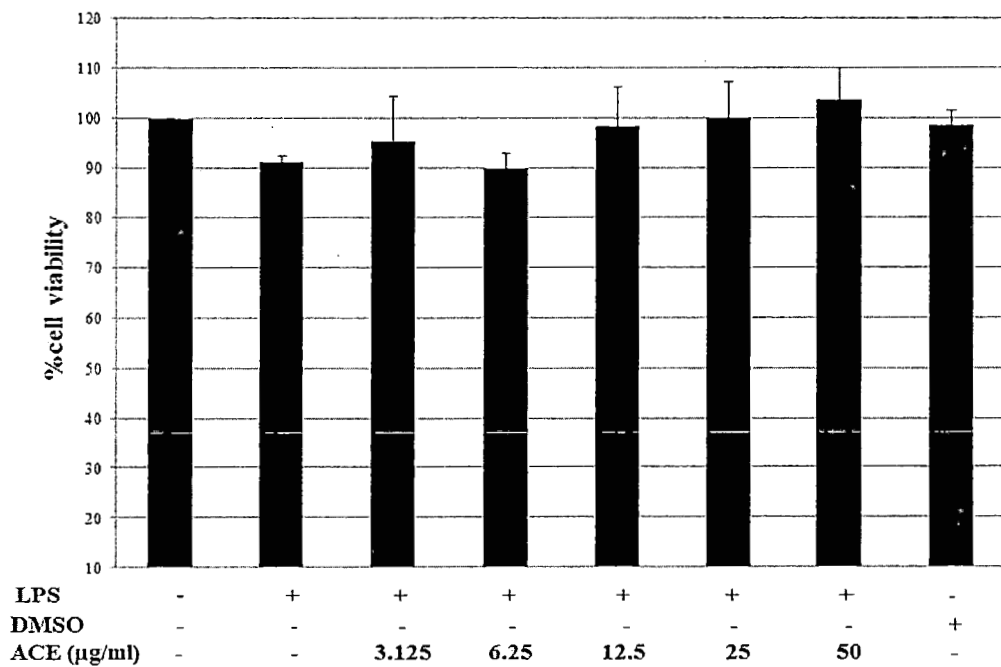
รูปที่ 3-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำ



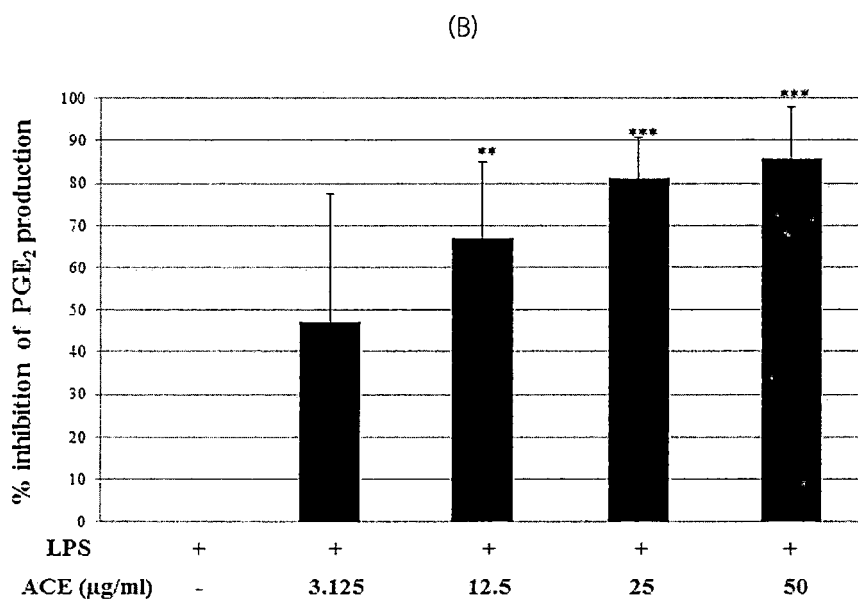
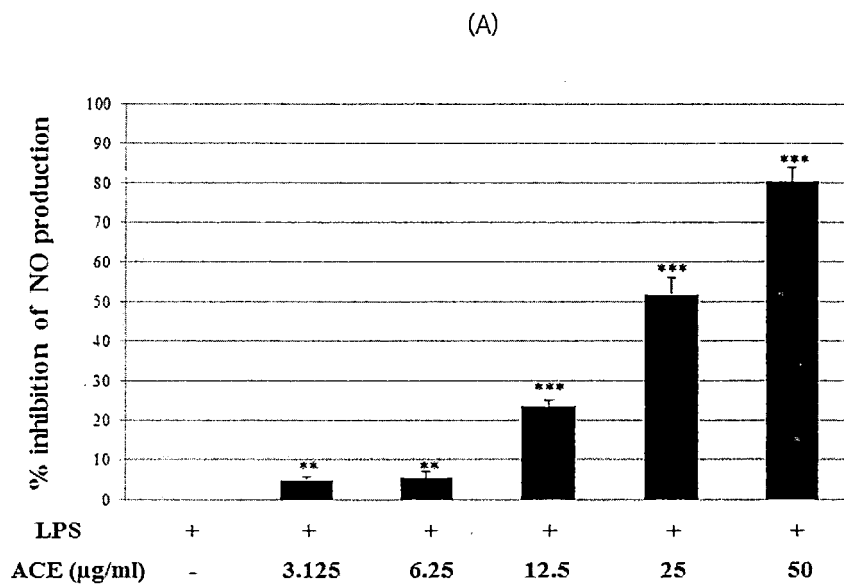
รูปที่ 3-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอล

3.5 กลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา

เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 3.125-50 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าการมีชีวิตรอดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO (0.2%, v/v) ดังแสดงในรูปที่ 3-3 ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา สามารถยับยั้งได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า IC_{50} เท่ากับ 22.69 ± 0.14 และ 25.92 ± 5.72 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 3-4)

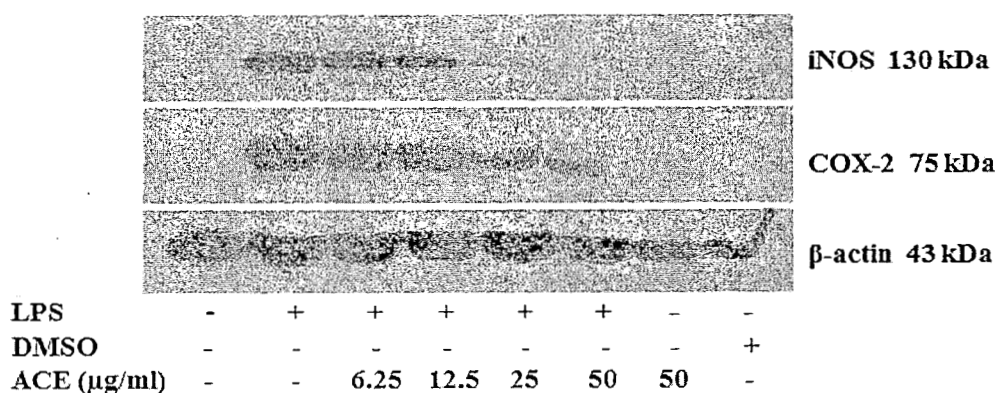


รูปที่ 3-3 ค่าการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 3.125-50 µg/mL เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ



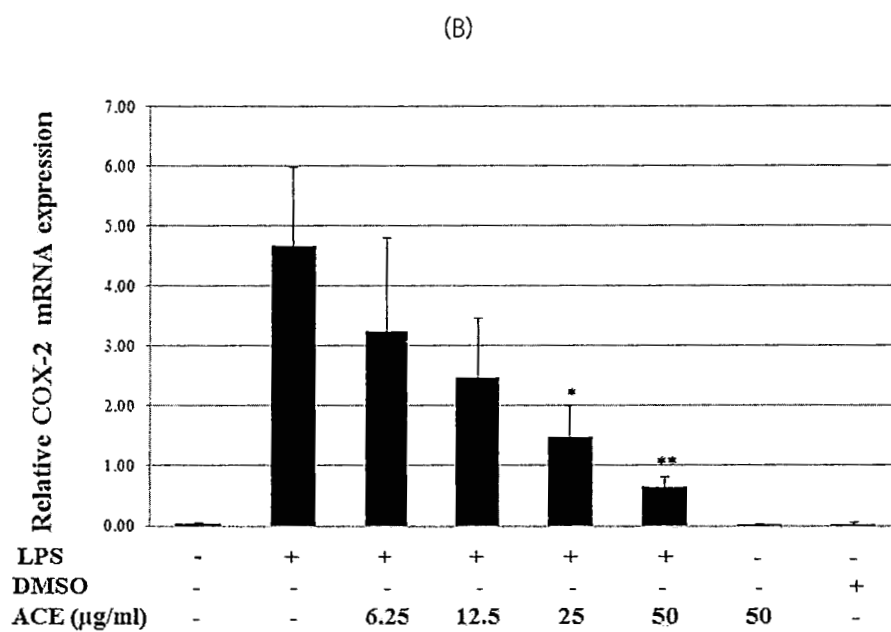
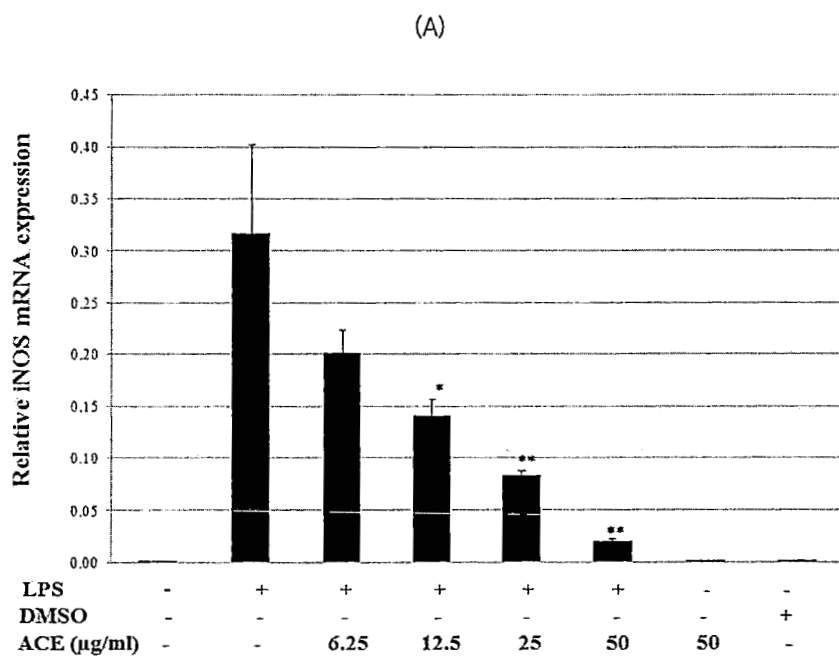
รูปที่ 3-4 ผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (A) และพรอสตาแกลนดิน E₂ (B) ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา เซลล์แมโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับสารทดสอบที่ความเข้มข้น 3.125-50 μg/mL และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทดสอบปริมาณไนโตรท์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ผลิตในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ **p<0.01, *** p<0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

จากผลการศึกษาปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ของเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่บ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25 และ 50 µg/mL ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับ LPS และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา พบว่าปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 ลดลง เมื่อความเข้มข้นของส่วนสกัดเพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 3-5) ส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ไม่ทำให้ปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว



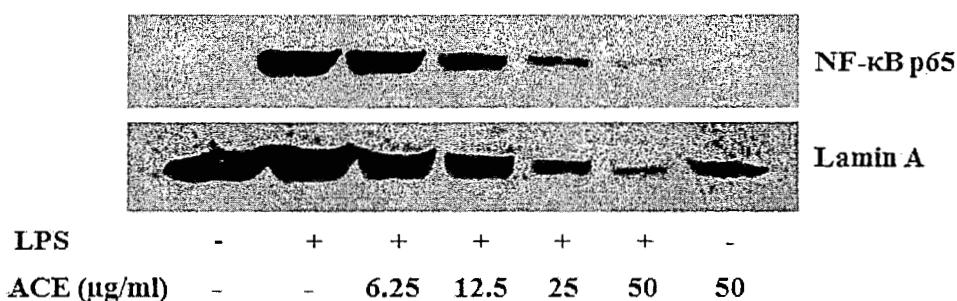
รูปที่ 3-5 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อปริมาณโปรตีน iNOS และ COX-2 เซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/ml) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับโปรตีน iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค Western blot analysis และภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่ย้ำซ้ำกัน

จากผลการศึกษาการข้างต้นพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถลดโปรตีน iNOS และ COX-2 ได้ ดังนั้นจึงศึกษาผลของเลือกส่วนสกัดต่อปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 พบว่า LPS สามารถกระตุ้นให้มีปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่การแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ในระดับ mRNA ของเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ในสภาวะที่มี LPS พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาสามารถลดปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 ได้ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของส่วนสกัด นอกจากนี้ส่วนสกัดเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 50 µg/mL ไม่สามารถทำให้ปริมาณ mRNA ของ iNOS และ COX-2 เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัด หรือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.2% (ปริมาตร/ปริมาตร) เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในรูปที่ 3-6



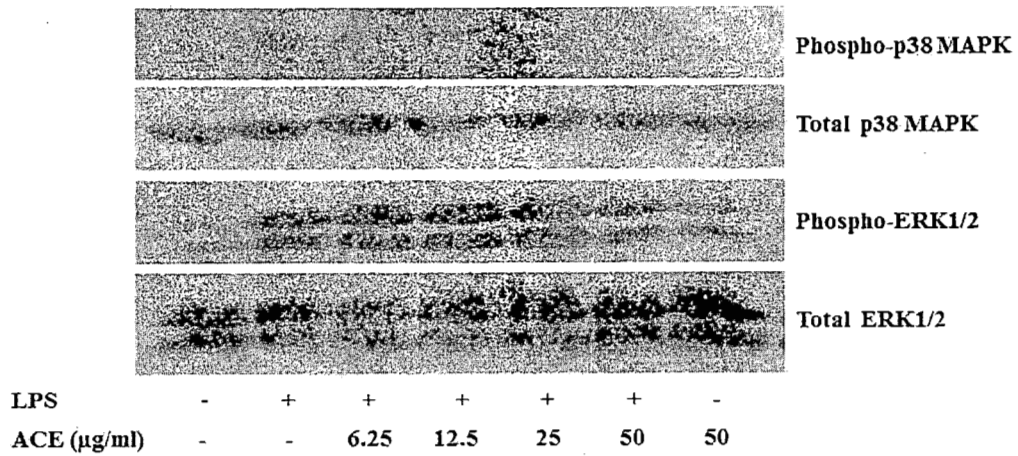
รูปที่ 3-6 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ระดับ mRNA เซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา ทั้งที่มีและไม่มี LPS (1 µg/ml) เป็นเวลา 9 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับ mRNA ของ iNOS และ COX-2 โดยเทคนิค real time-RT-PCR ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อ transcription factor NF- κ B ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ซึ่งในสภาวะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะจับอยู่กับโปรตีน I- κ B ทำให้อยู่ในไซโทซอล แต่เมื่อมีการกระตุ้นโดย LPS จะทำให้ I- κ B ถูกสลายตัว และ NF- κ B เคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีน NF- κ B p65 subunit จากนิวเคลียส โดยเทคนิค Western blotting ด้วย antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน p65 ที่เป็นหน่วยย่อยของ NF- κ B เนื่องจาก NF- κ B มักจะปรากฏอยู่ในรูป heterodimer ระหว่าง p65 และ p50 จากการทดลองพบว่า LPS ทำให้มีการเคลื่อนที่ของ NF- κ B p65 subunit เข้าสู่นิวเคลียส และส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา สามารถลดปริมาณโปรตีน p65 NF- κ B ในนิวเคลียสในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของส่วนสกัด (รูปที่ 3-7)



รูปที่ 3-7 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อการเคลื่อนที่สู่นิวเคลียสของโปรตีน p65 NF- κ B เซลล์แมคโครฟาจหนู (RAW 264.7) ถูกบ่มด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา เป็นเวลา 30 นาที ก่อนสัมผัสกับ LPS (1 μ g/mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดโปรตีนจากนิวเคลียสมาวิเคราะห์โปรตีน p65 NF- κ B โดยเทคนิค Western blot analysis และภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่ย่อสร่ต่อกัน

เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย LPS ปริมาณโปรตีน ERK และ p38 MAPK ที่ถูกฟอสโฟรีเลชัน (p-ERK และ p-p38 MAPK ตามลำดับ) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม แต่เมื่อเซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้น 6.25-50 μ g/mL ในสภาวะที่มี LPS พบว่า ปริมาณโปรตีน p-ERK และ p-p38 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้น 50 μ g/mL เพียงอย่างเดียวมีปริมาณโปรตีน p-ERK และ p-p38 ไม่แตกต่างกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (รูปที่ 3-8)



รูปที่ 3-8 ผลของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาต่อ MAPKs เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาเป็นเวลา 30 นาที ก่อนถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1 µg/ml เป็นเวลา 30 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ERK, p38 และ JNK โดยวิธี Western blot ภาพ immunoblot นี้เป็นตัวแทนของการทดลอง 3 ครั้งที่มีอิสระต่อกัน

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้ทำการเก็บพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด ที่ถูกใช้แก้อาการอักเสบ แก้ไข้ แก้ปวด และแก้พิษ เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพร ทั้งในส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอล และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม จากคำบอกเล่าของหมอชาวบ้านถึงวิธีการนำพืชสมุนไพรไปใช้ในการรักษาตามตำรายาพื้นบ้านคือ การต้มด้วยน้ำและดองกับสุรา ในการศึกษาจึงเลือกวิธีการสกัดพืชสมุนไพรโดย การสกัดด้วยน้ำร้อน และเอทานอล

ร้อยละของน้ำหนักแห้ง (% yield) ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด แสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าส่วนสกัดน้ำของสมุนไพรทุกชนิด (3.45-37.58 %) มีน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดเอทานอล (2.1-25.52 %) ยกเว้นส่วนสกัดลำต้นสะค้านใบพลู และเปลือกพังกาญจน์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Diaz et al. (2012) ที่รายงานว่า การสกัดพืชสมุนไพรจีนบางชนิดด้วยน้ำร้อนให้น้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลาย 95 % เอทานอล ในการศึกษาทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 60 ส่วนสกัด เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลหลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบได้ (Huang et al., 2006; Himaya et al., 2010) จากผลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 3-1 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดเอทานอลมีค่าระหว่าง 1.55 ± 0.20 ถึง 515.27 ± 14.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด และปริมาณที่พบในส่วนสกัดน้ำคือ 4.09 ± 0.20 ถึง 325.74 ± 13.62 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดของสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด พบว่าส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของเปลือกพังกาญจน์มีปริมาณฟีนอลรวมสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลในพืชสมุนไพรชนิดเดียวกัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากส่วนสกัดเอทานอล มีปริมาณสูงกว่าในส่วนสกัดน้ำ ยกเว้น เหง้าเอื้องหมายน้ำ ใบมะเดื่อหอม ใบระย่อนน้อยดอกขาว ใบดิงตัน ใบมะฮึก ใบผ่นแสนห้า และใบราชดัด ในขณะการศึกษาของ Zhang et al. (2011) Diaz et al. (2012) และ Ravipati et al. (2012) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพรจีนชนิดต่างๆ ด้วยน้ำและเอทานอลให้ปริมาณที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ศึกษา การสกัดพืชด้วยเอทานอล หรือเมทานอล จะได้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารประกอบฟีนอล และพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนการสกัดด้วยน้ำนั้นจะได้สารกลุ่มที่เป็นไกลโคไซด์ และสารกลุ่มที่มีขี้สูงกว่า (Misan et al., 2011; Jayaprakasha et al., 2008)

แมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในขณะที่มีการอักเสบ จากการศึกษาในเซลล์ไลน์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้มีการ

หลังสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 (Huang et al., 2009) ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ซึ่งเป็นดัชนีที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ โมเดลจำลองการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Srisook et al., 2011; Zhang et al., 2011 และ Ravipati et al., 2012) รวมทั้งในการศึกษานี้ ผลการทดลองพบว่าพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้แตกต่างกัน โดยส่วนสกัดเอทานอลของพืชทุกชนิด ยกเว้นใบมะฮึก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูง และไม่มีพิษต่อเซลล์ นั่นคือ มีความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80% ได้แก่ ใบมะฮึก (54.21 ± 8.70 %) และใบสบาบร้างสาบกา (52.04 ± 5.61 %) ส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูง และไม่มีผลต่อความมีชีวิตรอดของเซลล์ ได้แก่ ใบสบาบร้างสาบกา (85.31 ± 2.91 %) และรากมะฮึก (85.31 ± 9.95 %) แสดงถึงการลดลงของปริมาณไนตริกออกไซด์ไม่ได้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดพืชเหล่านี้ ในขณะที่ส่วนสกัดเอทานอลของรากตึงตัน ใบราชดัด เหง้าเอื้องหมายนา และลำต้นสะค้านใบพลู ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูง (99.87 ± 2.92 , 97.59 ± 6.75 , 82.18 ± 5.79 และ 80.90 ± 7.50 % ตามลำดับ) แต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์เพียง 57.32 ± 3.77 , 4.07 ± 0.98 , 2.62 ± 0.30 และ 32.74 ± 17.71 % ตามลำดับ ดังนั้นการที่มีปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง อาจเนื่องมาจากการตายของเซลล์เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัด ไม่ใช่เกิดจากฤทธิ์ของส่วนสกัดในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

จากการทดสอบข้างต้นพบว่าส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรเกือบทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงกว่าส่วนสกัดน้ำ ดังนั้นจึงนำเฉพาะส่วนสกัดเอทานอลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ส่วนสกัดเอทานอลที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 สูง และไม่มีพิษต่อเซลล์ คือ ใบสบาบร้างสาบกา รากมะฮึก ใบฝนแสนห้า ใบเอื้องหมายนา เปลือกพังกาใหญ่ ใบมะเดื่อหอม และเข็มป่า ที่ความเข้มข้น $50 \mu\text{g/mL}$ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 มากกว่า 80% แสดงถึงการลดลงของปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 ไม่ได้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัด แต่เป็นผลจากส่วนสกัดของพืชที่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และปริมาณสารประกอบฟีนอลของส่วนสกัดน้ำ และส่วนสกัดเอทานอลของพืชทั้ง 21 ชนิด เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลเป็นสารหลักของพืชที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Zhang et al., 2011; Ravipati et al., 2012) ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของพืชทั้ง 21 ชนิด ทั้งในส่วนของสารสกัดน้ำ และสารสกัดเอทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์ต่ำ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.000084 และ 0.0451 ตามลำดับ แสดงว่าสารที่

ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในส่วนสักดน้ำ และส่วนสักดเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 21 ชนิด อาจเป็นสารประกอบฟีนอลบางชนิดเป็นตัวออกฤทธิ์ หรือเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล ที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ไม่ได้แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสักดของ *Sophora flavescens*, *Eucommia ulmoides*, *Baccharis genistelloides*, *Tinospora capilipes*, *Actinidia arguta* และ *Paris polyphylla* (Zhang et al., 2011; Diaz et al., 2012 และ Ravipati et al., 2012)

ต่อมาได้เลือกส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกมาสอบหาลกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ เนื่องจากส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้สูง โดยไม่มีพิษต่อเซลล์ มีรายงานหลายฉบับที่รายงานว่าใบสบประเสกมีฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองหลายโมเดล Moura et al. (2005) รายงานว่าใบสบประเสกสามารถลดการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลัน (cotton pellet-induced granuloma) และแบบเรื้อรัง (formaldehyde-induced arthritis) ในปี ค.ศ. 2011 Biradar และคณะ พบว่าส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกสามารถยับยั้งการอักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดอาการของโรคลำไส้อักเสบอักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease) ในโมเดล acetic acid-induced colitis และ indomethacin-induced enterocolitis นอกจากนี้ยังมีการรายงานฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันของส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกในหนูโมเดล carrageenan-induced paw edema แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของใบสบประเสกในการศึกษารุ่นนี้พบว่าส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกยังลดการเคลื่อนที่ของ NF- κ B p65 subunit เข้าสู่นิวเคลียส และลดการฟอสโฟริเลชันของ p-ERK และ p-p38 MAPK ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบโดยลดการกระตุ้น NF- κ B และ MAPKs ทำให้มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนสำหรับเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ส่งผลให้มีการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้น้อยที่สุด การที่ส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในหนูทดลอง ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ส่วนสักดเอทานอลของใบสบประเสกสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ เพราะในขณะที่มีการอักเสบในสัตว์ทดลองจะมีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ออกมา (Buapool et al., 2013) ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ทำให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการนำใบสบประเสกไปใช้ในการแพทย์พื้นบ้าน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในใบสบประเสก ที่อาจนำไปใช้พัฒนาเป็นยาด้านอักเสบชนิดใหม่ในอนาคต

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. ส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด มีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพร
2. ส่วนสกัดของพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีได้แก่ ส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา และรากมะฮิ
3. กลไกระดับโมเลกุลในการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบของใบสาบแร้งสาบกาในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS วิธีทางหนึ่งเกิดผ่านการลดการกระตุ้น NF- κ B และ p-ERK และ p-p38 MAPK ทำให้มีการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 และลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ได้ในที่สุด

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ. (2553).ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. (ฉบับพิเศษ) : 143-150
- คำรณ เลียดประถม และ น้ำบุษย์ โคสารคุณ. (2553). พรรณไม้ ในพื้นที่โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกรพรม อำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี. โปรออฟเซท: จันทบุรี. 110 น.
- ไชยยง รุจจนเวท และดวงพร อมรเลิศพิศานต์. 2553. ฤทธิ์ระงับการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของเนระพูสีไทย ปริญญาณีพนธ์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. 2549. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. ปริญญาณีพนธ์. ภาควิชาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พงศ์ศักดิ์ พลเสนา. (2550). พิษสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน(ฉบับสมบูรณ์). ห้างหุ้นส่วนจำกัดเจตนารมณ์ภัณฑ์: ปราจีนบุรี. 301 น.
- พิรุณ สิริธัยกุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 499303 หลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ไพศาล สิริธัยกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษารวบรวมสมุนไพรพื้นบ้านสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. ศูนย์สื่อเสริม. กรุงเทพฯ 242 น.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จิ่งมันคง. 2551. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสาร ฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. ปริญญาณีพนธ์. ภาควิชาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- อรพินท์ เทพสิงห์แก้ว เบญจลักษณ์ ทองช่วย และสาคร พรประเสริฐ. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบสบเสื่อ และสบเสื่อเสื่อ. ปริญญาณีพนธ์. สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., & Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, 357,593-615.
- Andarwulan N, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 121 : 1231-1235.
- Biradar SM, Aswathanaryana BJ, Kulkarni VH, Kulkarni PV, Smita DM, Tarak KC. 2011. Protective effects of ethanolic extract of *Ageratum conyzoides* on experimental induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol*. 6, 664-678.
- Buapool, D.,Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. (2013).Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in

- macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 4, 495-504
- Chu, Q. et.al. (2009). Effect of three herbal extracts on NO and PGE2 production by activated mouse macrophage-like cells. *In Vivo*. 23: 537-544.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Inter Immunopharm.* 1: 1397-1406.
- Cross, R. K, Wilson, K. T. (2003). Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 9: 179-189.
- Diaz, P., Jeong, S.C., Lee, S., Khoo, C., Koyyalamudi, S.R. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7, 26.
- Dhikav, V., Singh, S., Anand, K.S., (2002). Newer non-steroidal anti-inflammatory drugs—a review of their therapeutic potential and adverse drug reactions. *J. Ind. Acad. Chem. Med.* 3, 332–338.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 659-665.
- Grisham, M. B, Jourdain, D., Wink, D. A. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol.* 276: G315-321.
- Guerra, J.A., Molina, M.F., Abad, M.J., Villar, A.M., Paulina, B. (2006). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum microphyllum*. *Int Immunopharmacol.* 6: 1723-1728.
- 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.
- Huang N, Hauck C, Yum MY, Rizshsky L, Widrlechner MP, McCoy JA, Murphy PA, Dixon PM, Nikolau BJ, Birt DF. (2009). Rosmarinic Acid in *Prunella vulgaris* Ethanol Extract

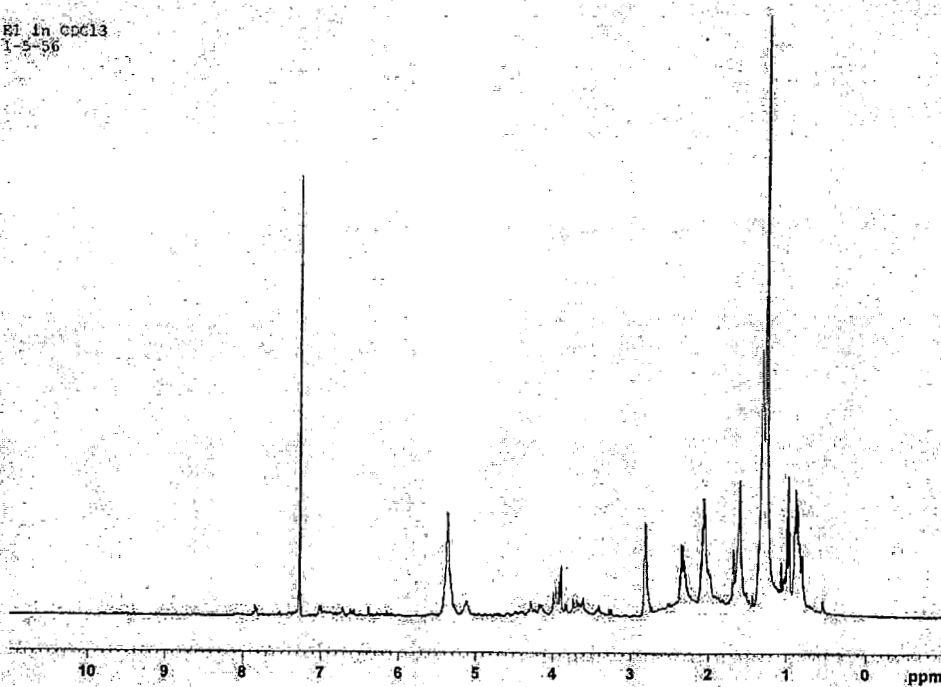
- Inhibits LPS-induced Prostaglandin E2 and Nitric Oxide in RAW264.7 Mouse Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 : 10579-10589.
- Huang, W. H.; Lee, A. R.; Yang, C. H.(2006). Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 70, 2371–2380
- Himaya, S.W.A., Ryu, B., Qian, Z.J., Kim, S.K. (2010). Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, 68-75.
- Jayaprakasha GK, Girenavar B and Patil BS. (2008). Radical scavenging activities of Red grapefruits and sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*. 99 : 4484 – 4494.
- 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.
- Misan A, Mimica DN, Sakac M, Mandic A, Sedej I, Simurina O, Tumbas V. (2011). Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts in Cookies. *Journal of Food Science and Technology*. 76 : 1239-1244.
- Moura ACA, Silva ELF, Fraga MCA, Wanderley AG, Afshar P, Maia MBS. 2005. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. *Phytomedicine*. 12, 138-142.
- Park J.H., Oh S.M., Lim S.S., et al. (2006). Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351: 146-152.
- Pokharel, Y.R., Yang, J.W., Kim, J.Y., et al. (2006). Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwanian flavone. *Nitric Oxide*. 15:217-225

- Rahman A, Akter N, Rashid H, Ahmed NU, Uddin N, Islam S. 2012. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole *Ageratum conyzoides* and *Emilia sonchifolia* alcoholic extracts in animal models. *African J Pharm Pharmacol.* 6, 1469-1476.
- Raghav, S.K. , Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells *J Ethanopharm* 104 : 234-239
- Ravipati AS, Zhang Lin, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, J Bartlett, PT Smith, Shanmugam K, Munch G, Wu MJ, Satyanarayanan M, Vysetti B. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BioMed Central.* 10 : 1472-6882.
- Shin, KM., Kim, Y.H., Park, W.S, and et.al. (2004). Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostaglandin E2, and tumor necrosis factor-alpha production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm..Bull.* 27: 538-543.
- Srisook K, Palachot M, Mongkol N, Srisook E, Sarapusit S. (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- κ B 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.
- Wright, C. E., Rees, D.D., Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26, 48-57.
- Zhang L, Anjaneya SR, Sundar RK, Sang CJ, Narsimha TS, John B, Kirubakaran S, Gerald M. Ming JW. (2011). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 59 : 12361 – 12367.
- Zhou, H.Y., Shin, E.M., Guo, L.Y., et al. (2008). Anti-inflammatory of 4-methoxyhonokiol is a function of the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF- κ B, JNK and p38 MAPK inactivation. *European Journal of Pharmacology*, 586, 340-349.

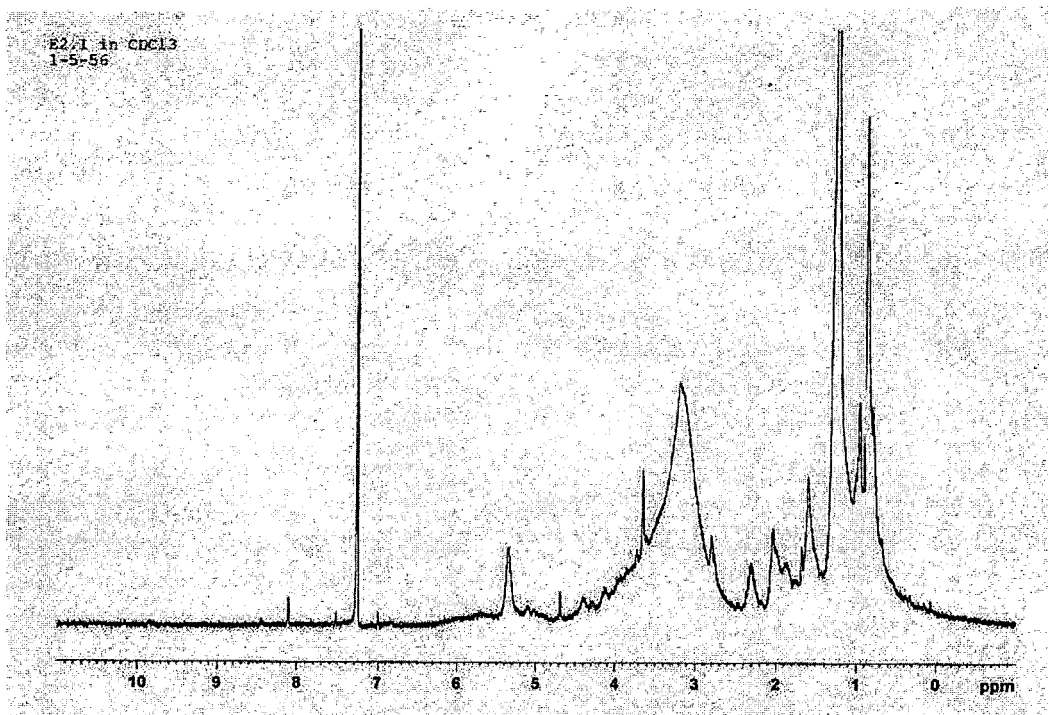
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.rspg.or.th/plants_data/use/crop_d28.htm/สืบค้นเมื่อ [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%8A%E0%B8%87%E0%B9%82%E0%B8%84> [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.pharmacy.msu.ac.th/exhibition_new/Thai%20Herb/55.html [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://wantanee11.blogspot.com/2008/07/rauolfia-serpentina.html> [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?Botanic_ID=1501 [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://www.panmai.com/Warn/Warn_TACCAC_01.shtml [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://www.magnoliathailand.com/webboard/index.php?topic=6240.0;wap2> [21 มกราคม 2556]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://lumphaya.stkc.go.th/gallery_view.php?gallery_id=219 [29 กรกฎาคม 2557]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://www.bedo.or.th/lcdb/biodiversity/view.aspx?id=4590> [29 กรกฎาคม 2557]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง http://biodiversity.forest.go.th/index.php?option=com_dofplant&view=showone&id=727 [29 กรกฎาคม 2557]
- [Online]. แหล่งเข้าถึง <http://webwewin.com/index.php?pid=3505> [29 กรกฎาคม 2557]

ภาคผนวก

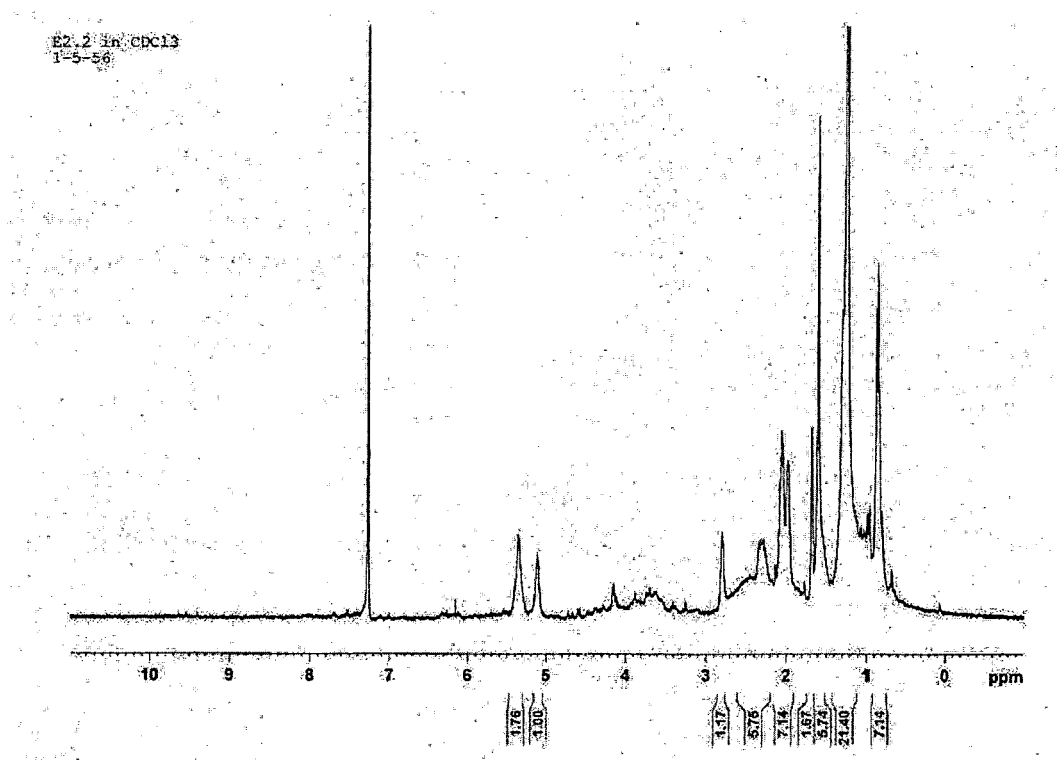
E1 in CDCl3
1-5-56



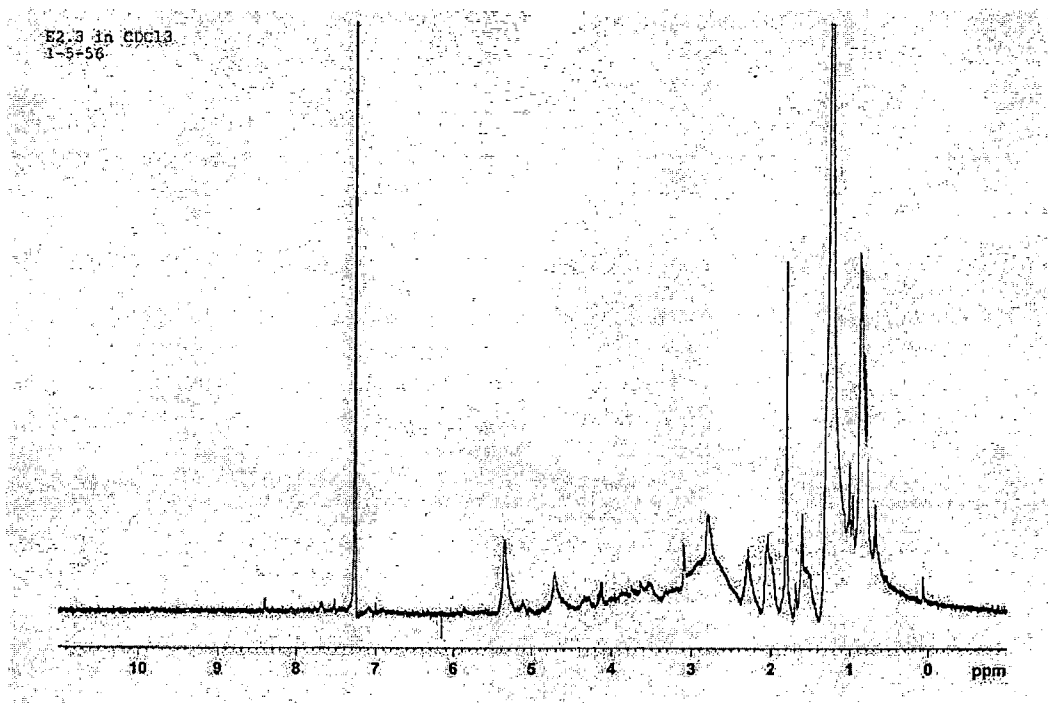
รูปที่ ผ 1-1 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา



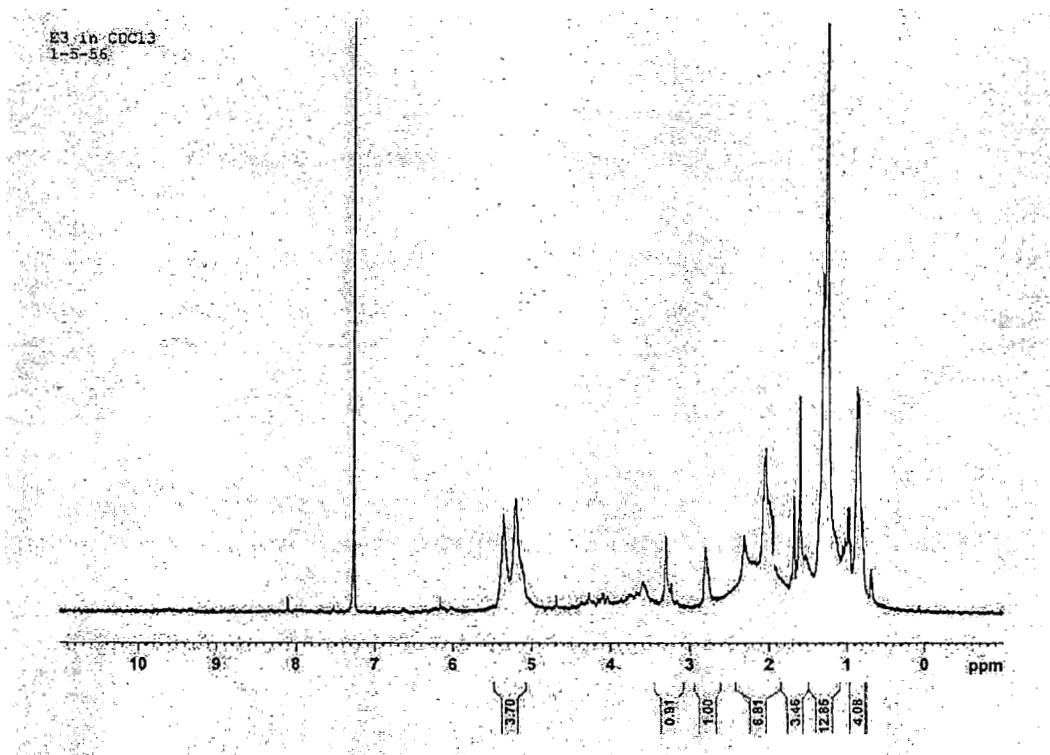
รูปที่ ผ 1-2 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา



รูปที่ ผ 1-3 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบเอื้องหมายนา

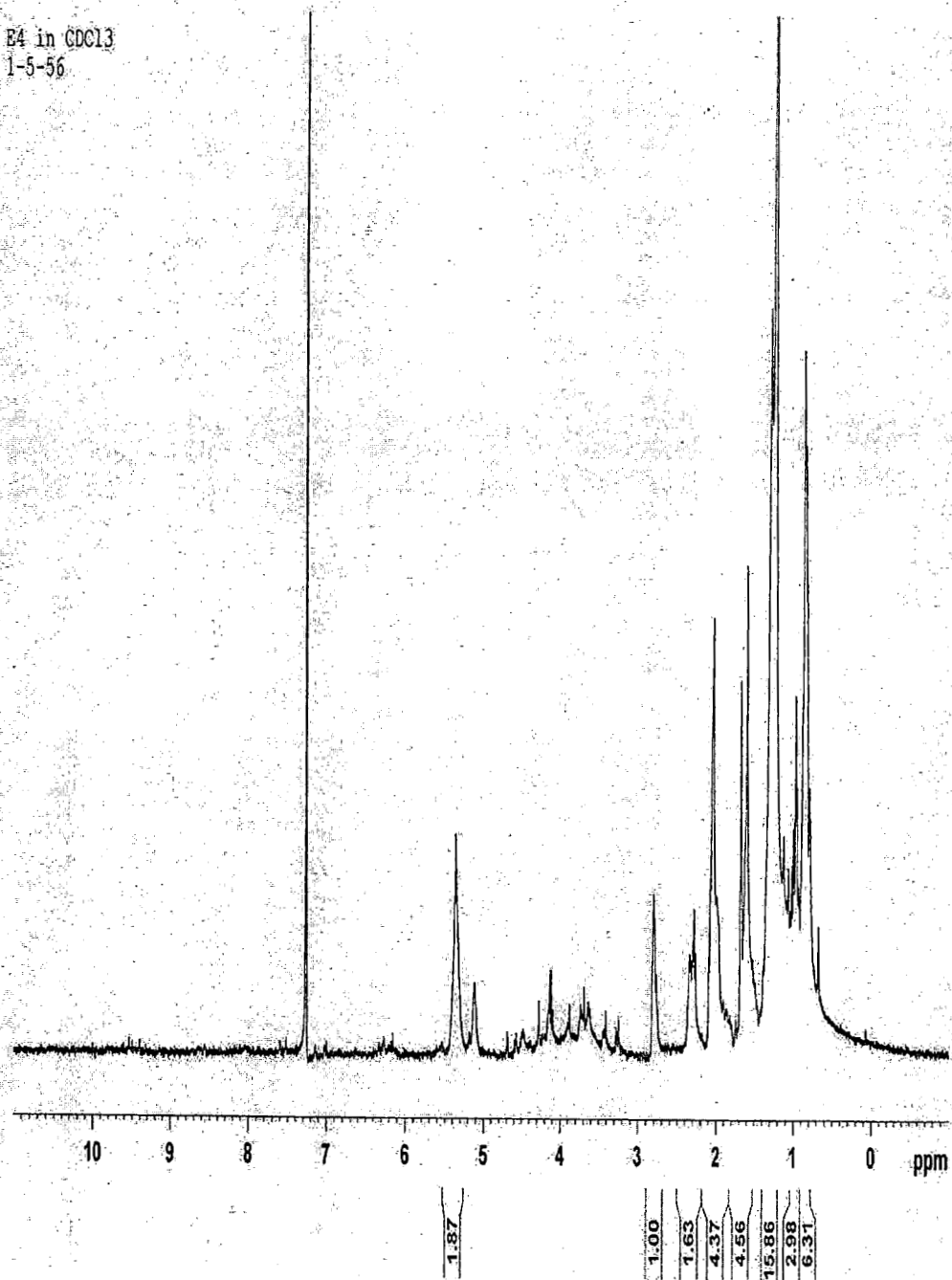


รูปที่ ผ 1-4 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของต้นเอื้องหมายนา



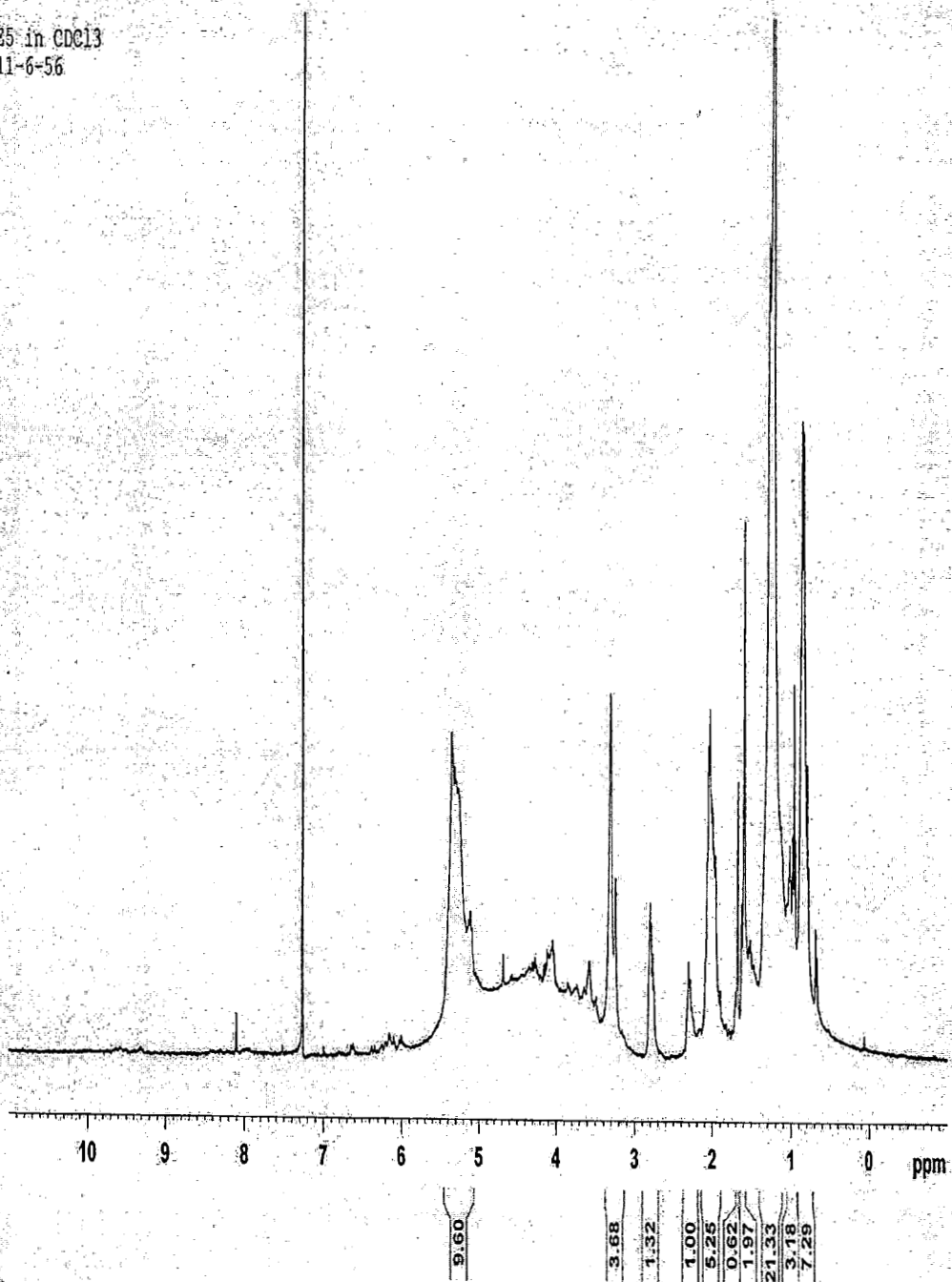
รูปที่ ผ 1-5 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบขงโคป่า

E4 in CDCl₃
1-5-56



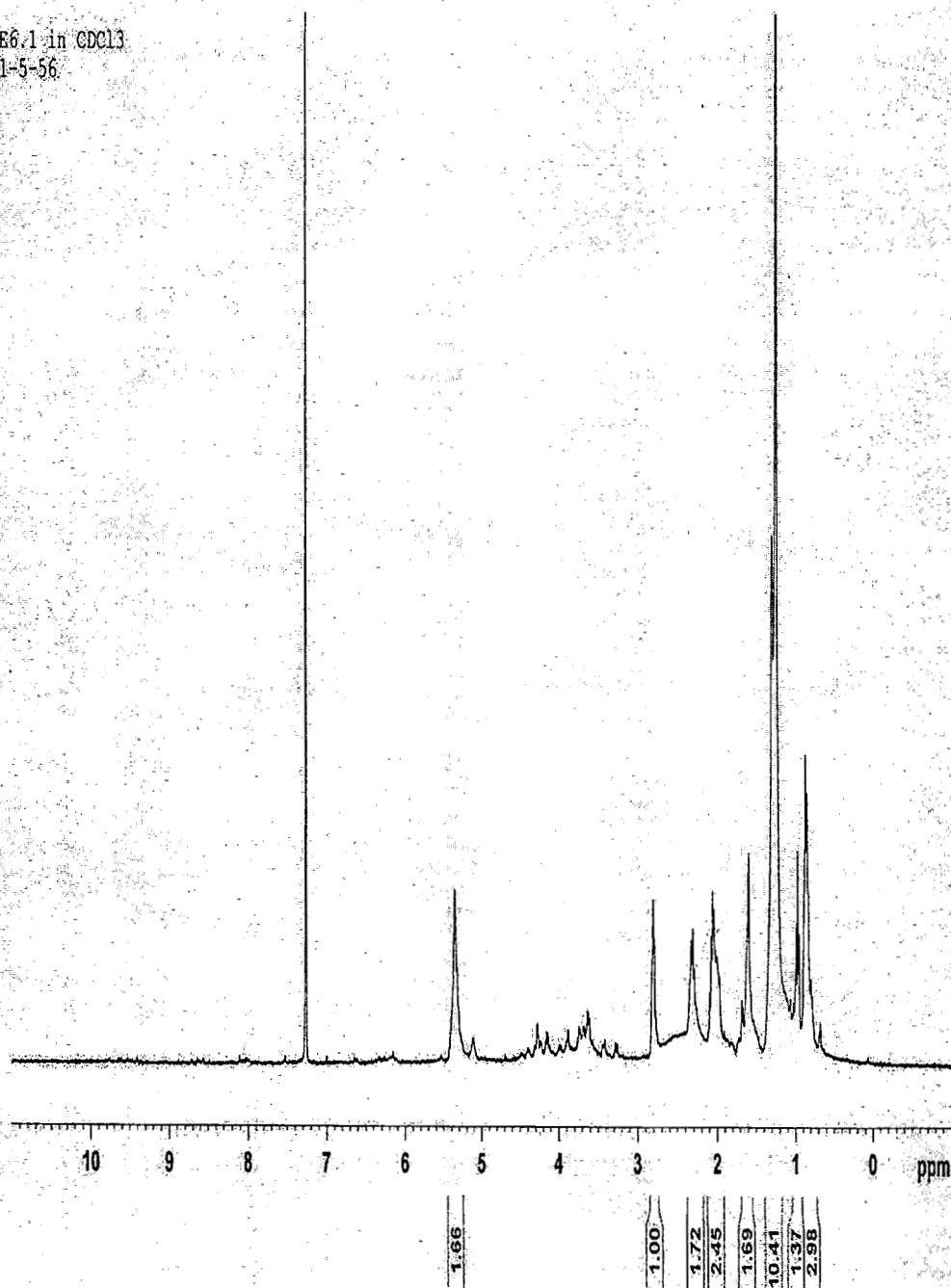
รูปที่ ผ 1-6 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบมะเดื่อหอม

B5 in CDCl₃
11-6-56



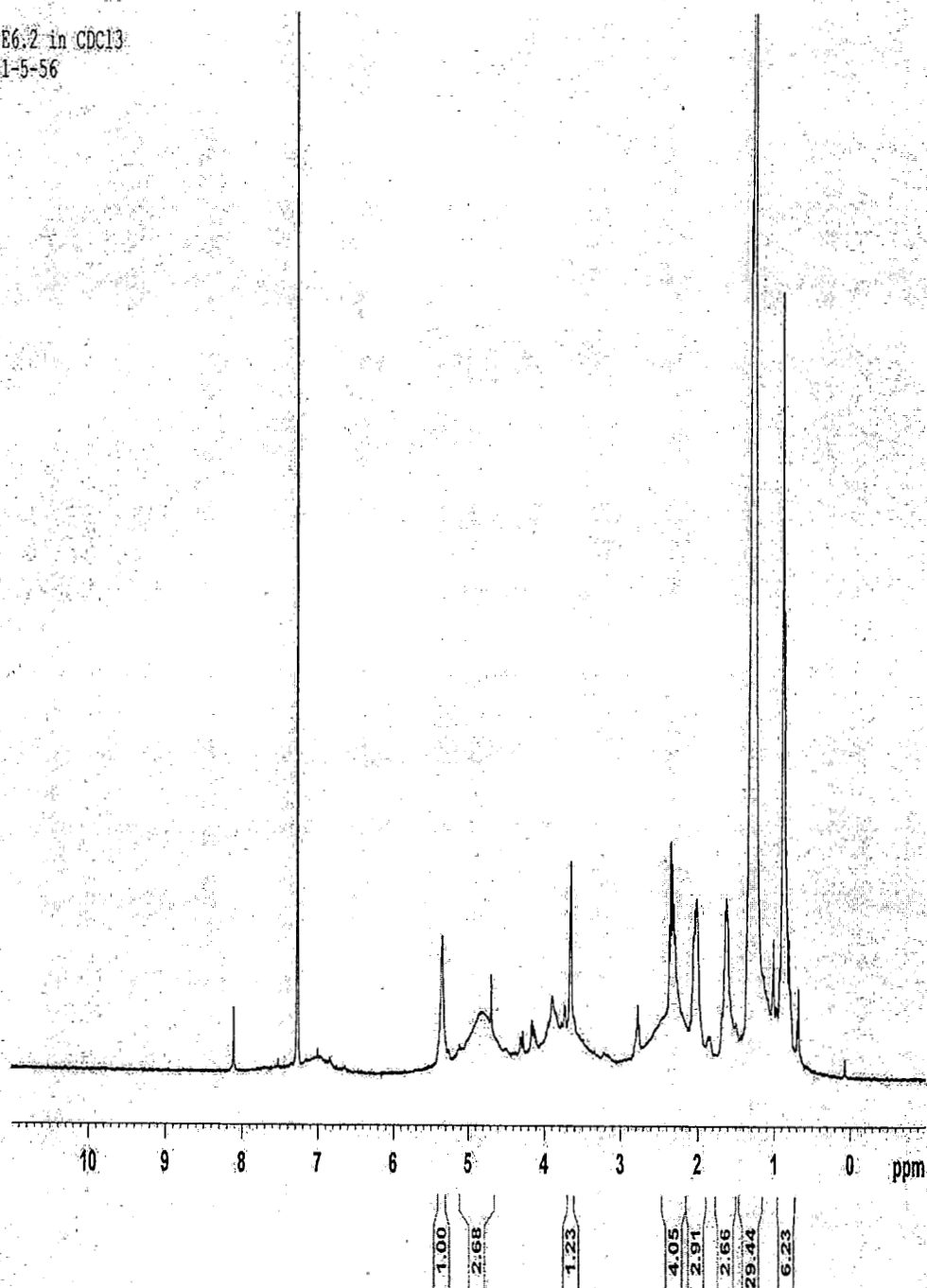
รูปที่ ๗ 1-7 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบลายนก

E6.1 in CDCl₃
1-5-56



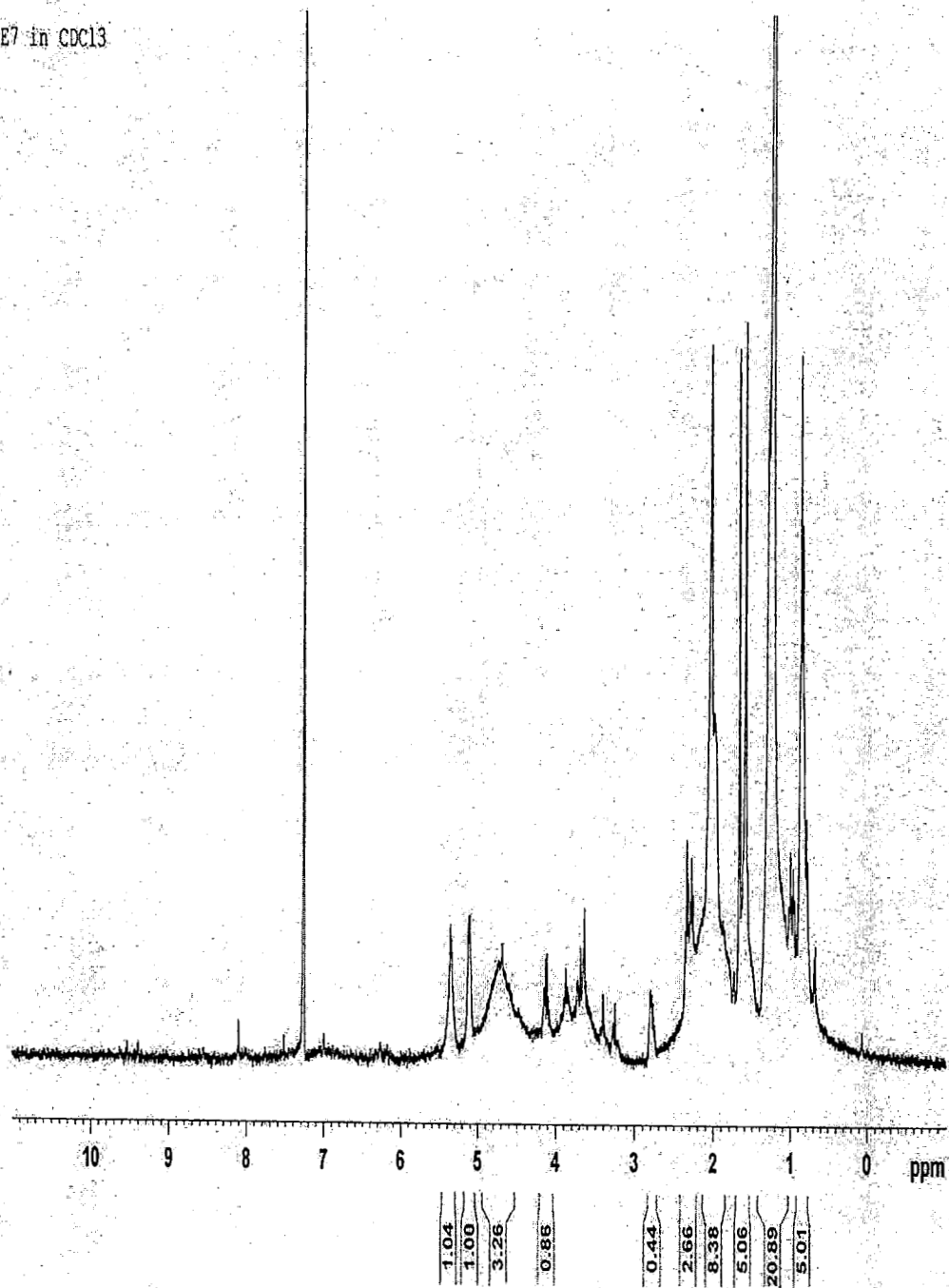
รูปที่ ผ 1-8 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบระย่อน้อยดอกขาว

B6.2 in CDCl₃
1-5-56



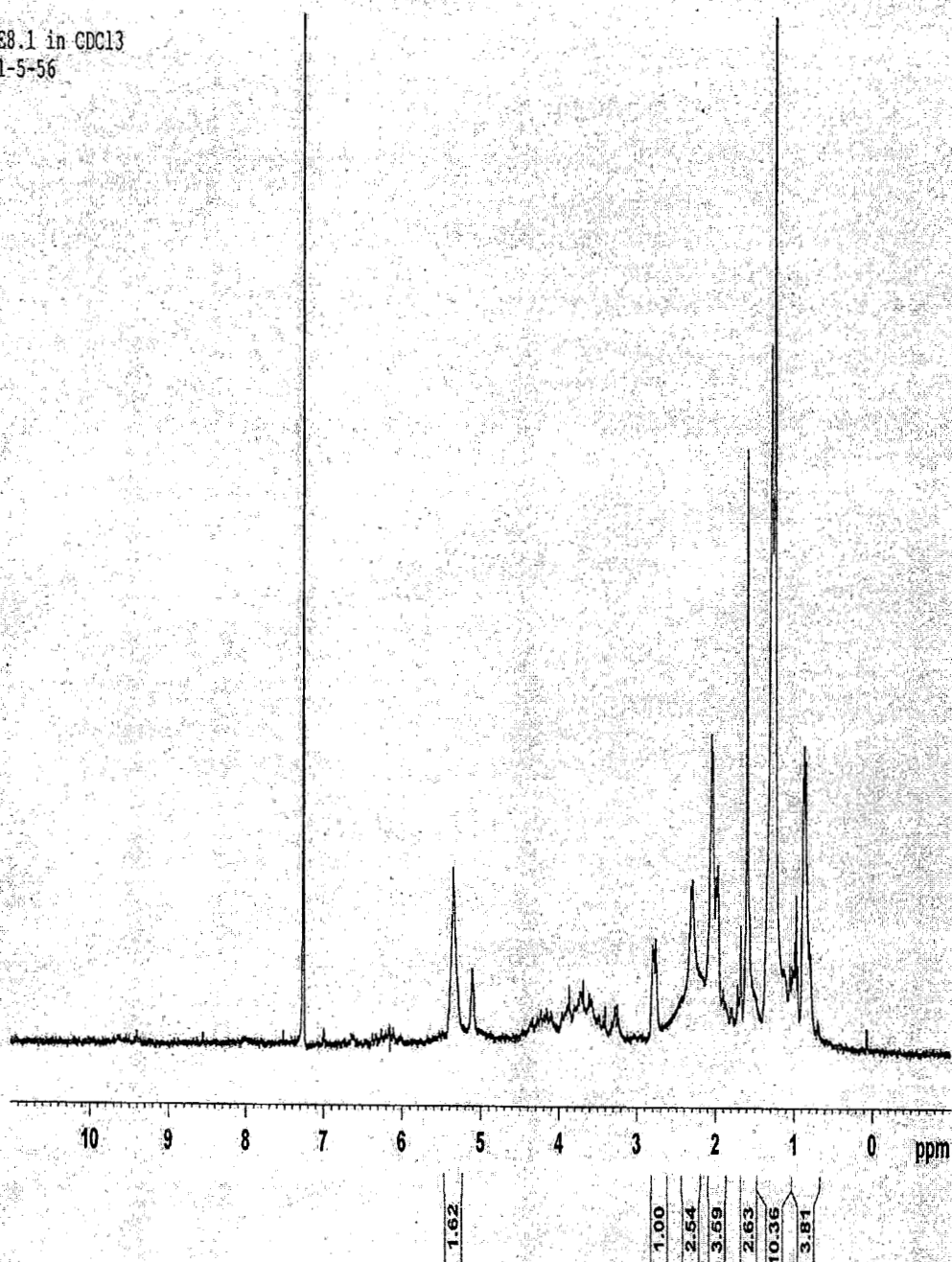
รูปที่ ผ 1-9 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากระย่อน้อยดอกขาว

E7 in CDCl₃

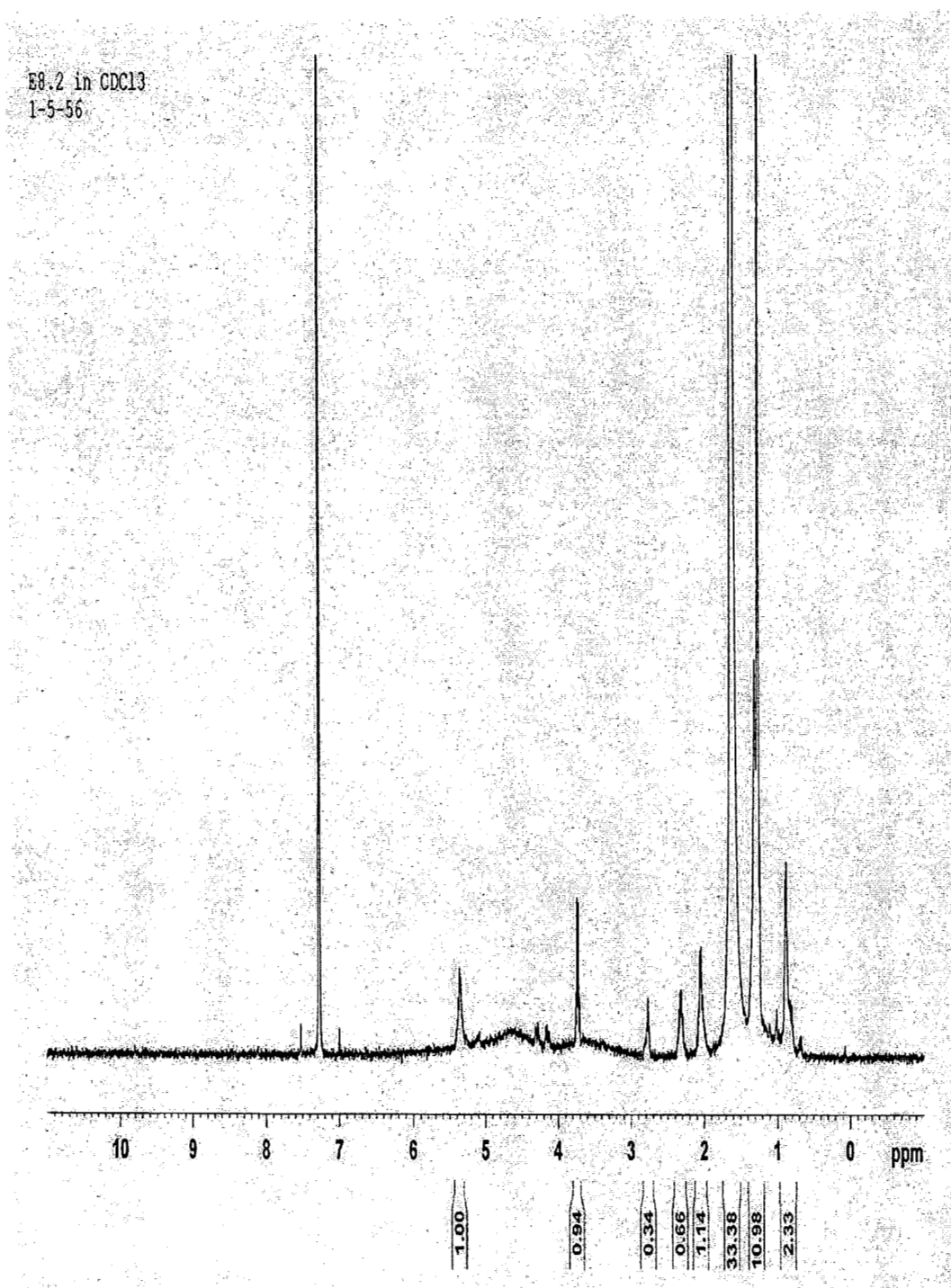


รูปที่ ๗ 1-10 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของไมยราบ

E8.1 in CDCl₃
1-5-56

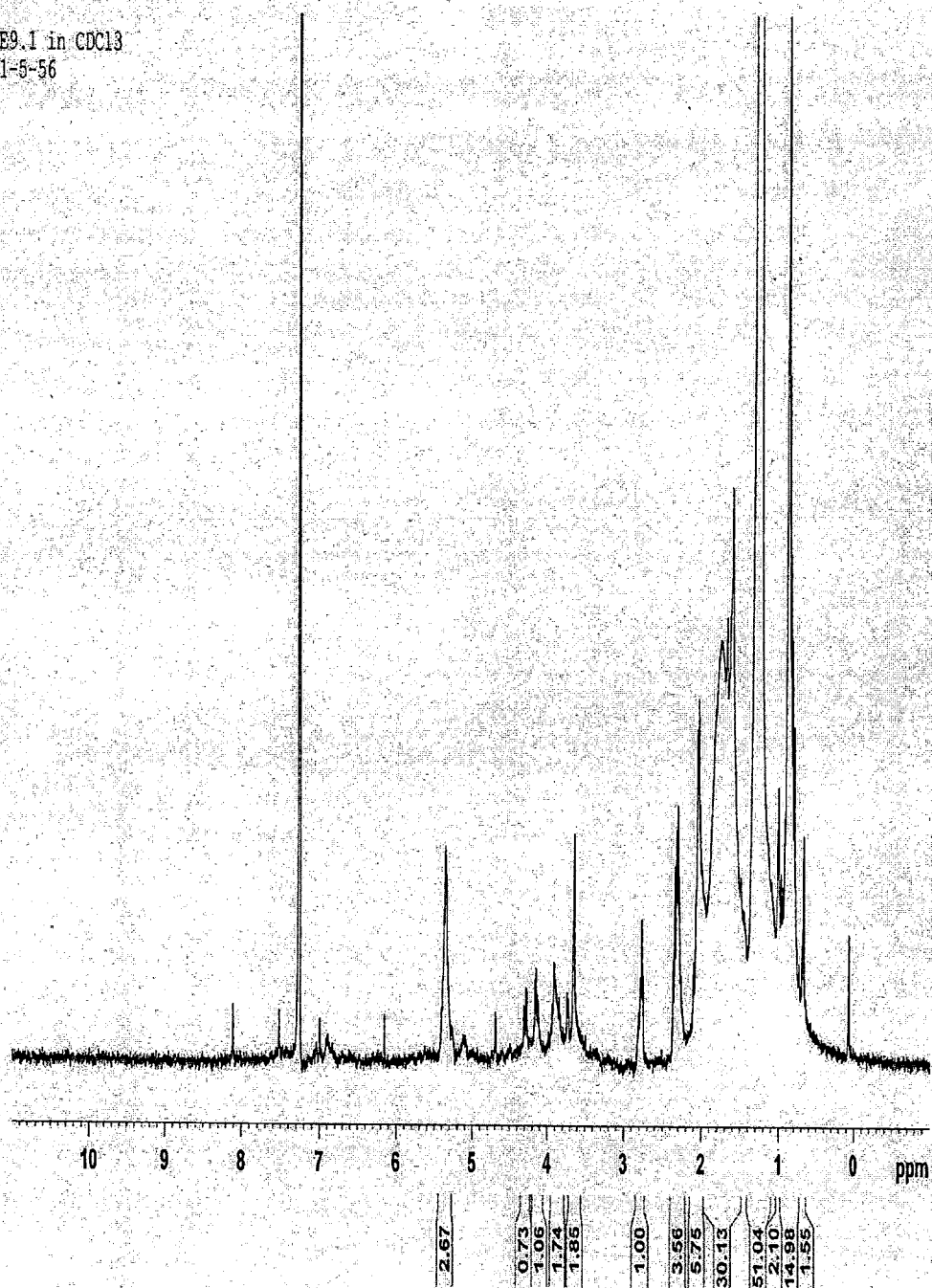


รูปที่ ๑ 1-11 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบโคลงเคลง



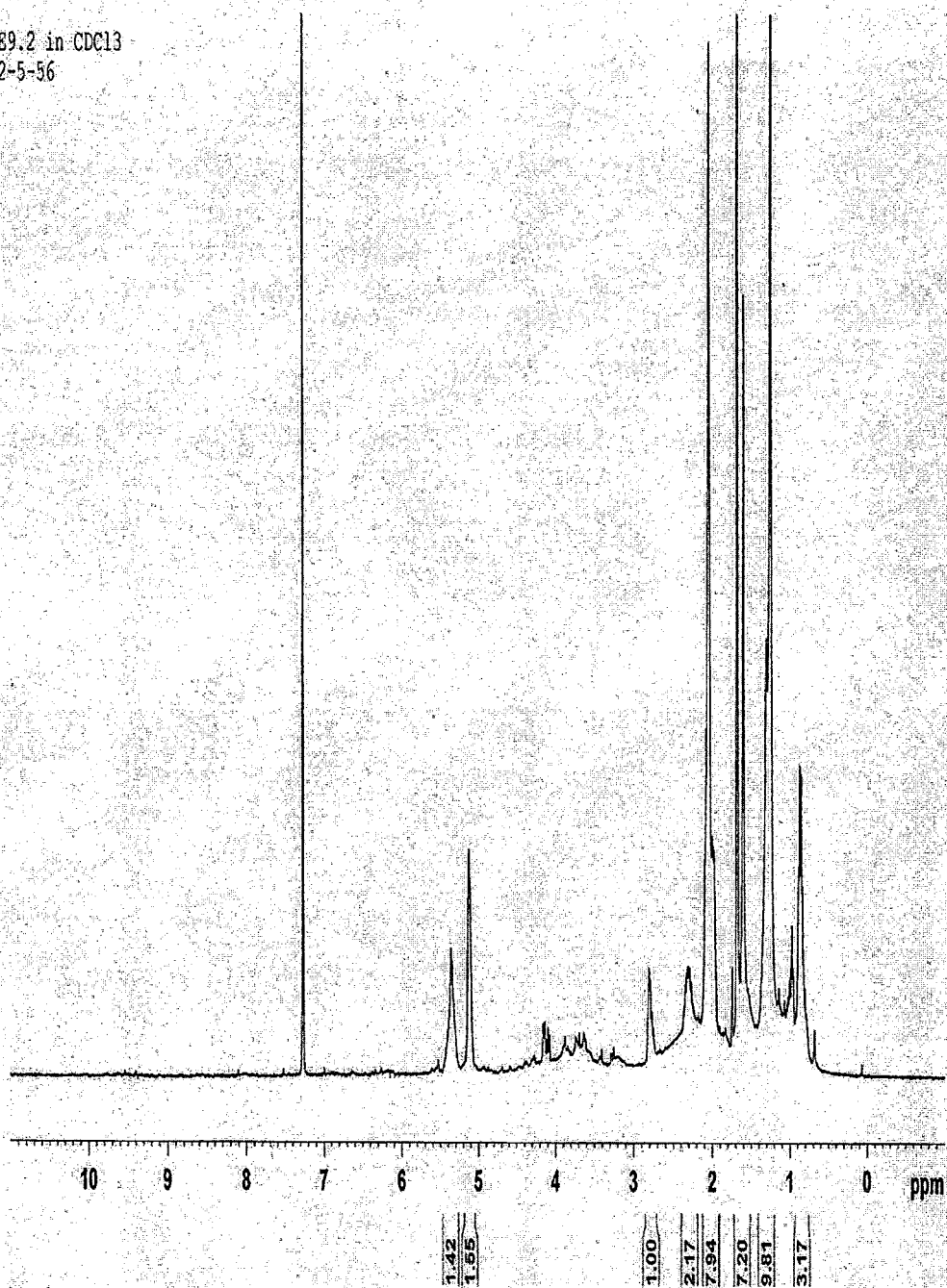
รูปที่ ๑-12 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากโคลงเคลง

E9.1 in CDCl₃
1-5-56



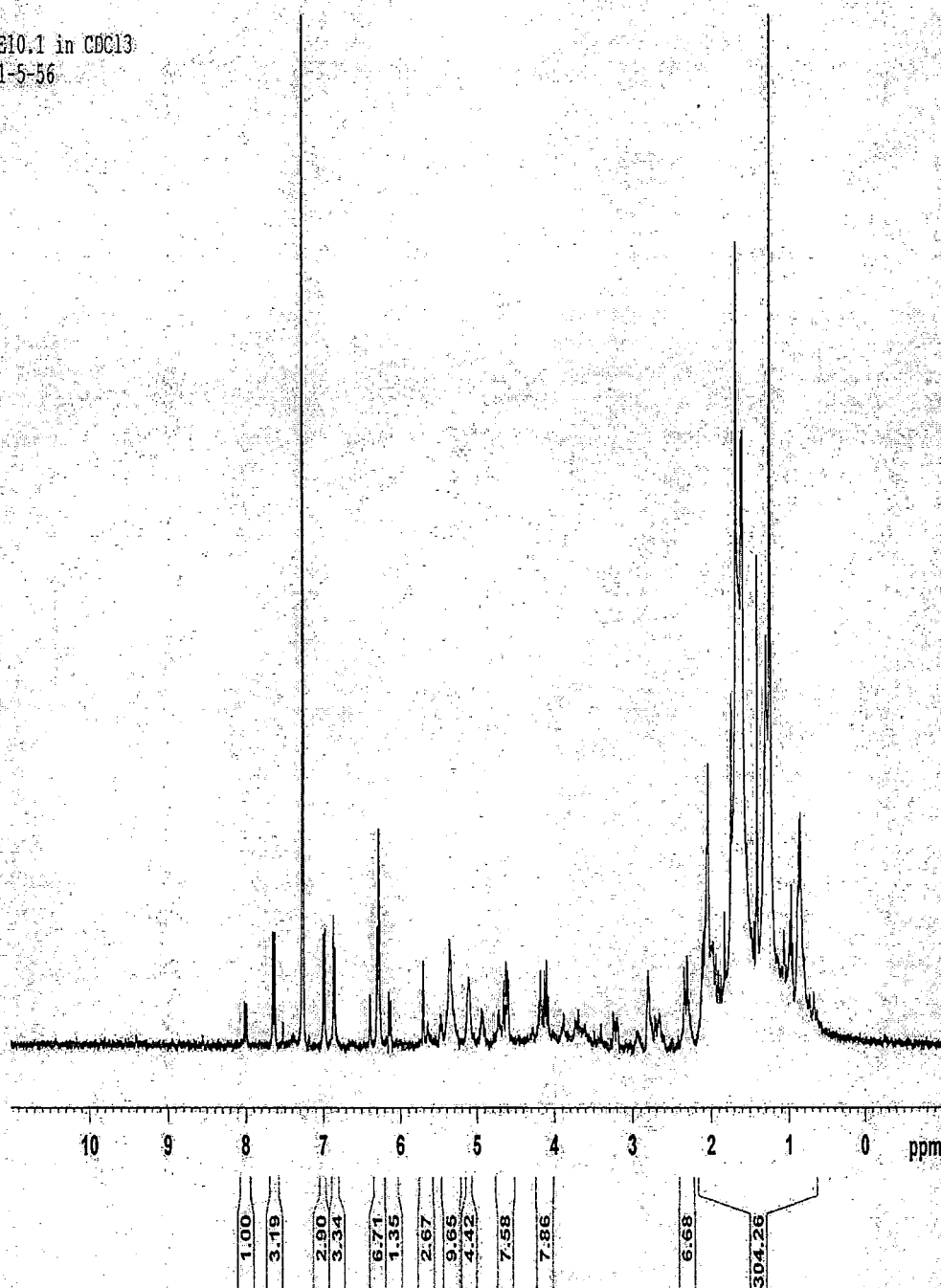
รูปที่ ผ 1-13 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบค้างคาวดำ

B9.2 in CDCl₃
2-5-56



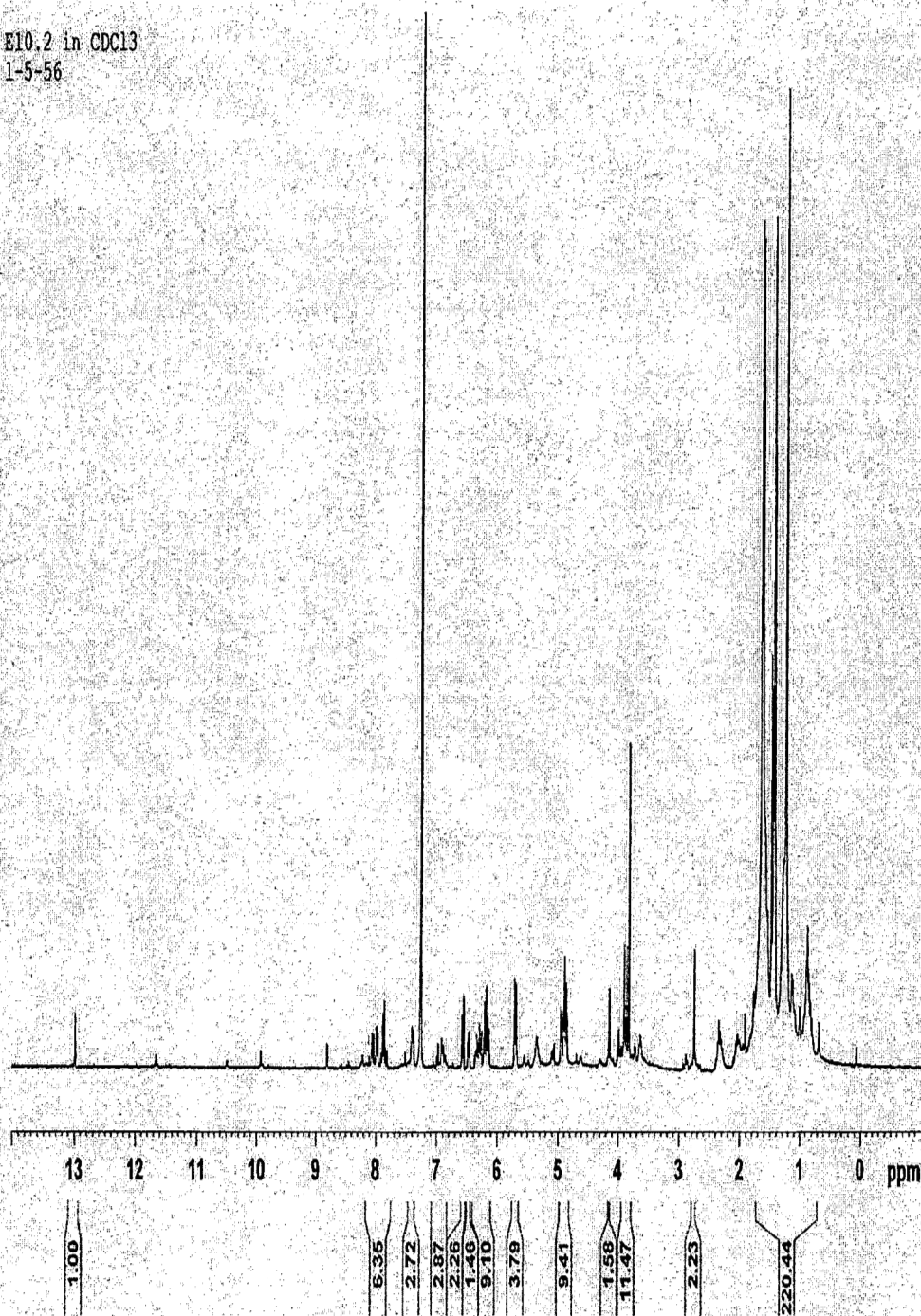
รูปที่ ผ 1-14 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเห็ดค้ำควดดำ

E10.1 in CDCl₃
1-5-56



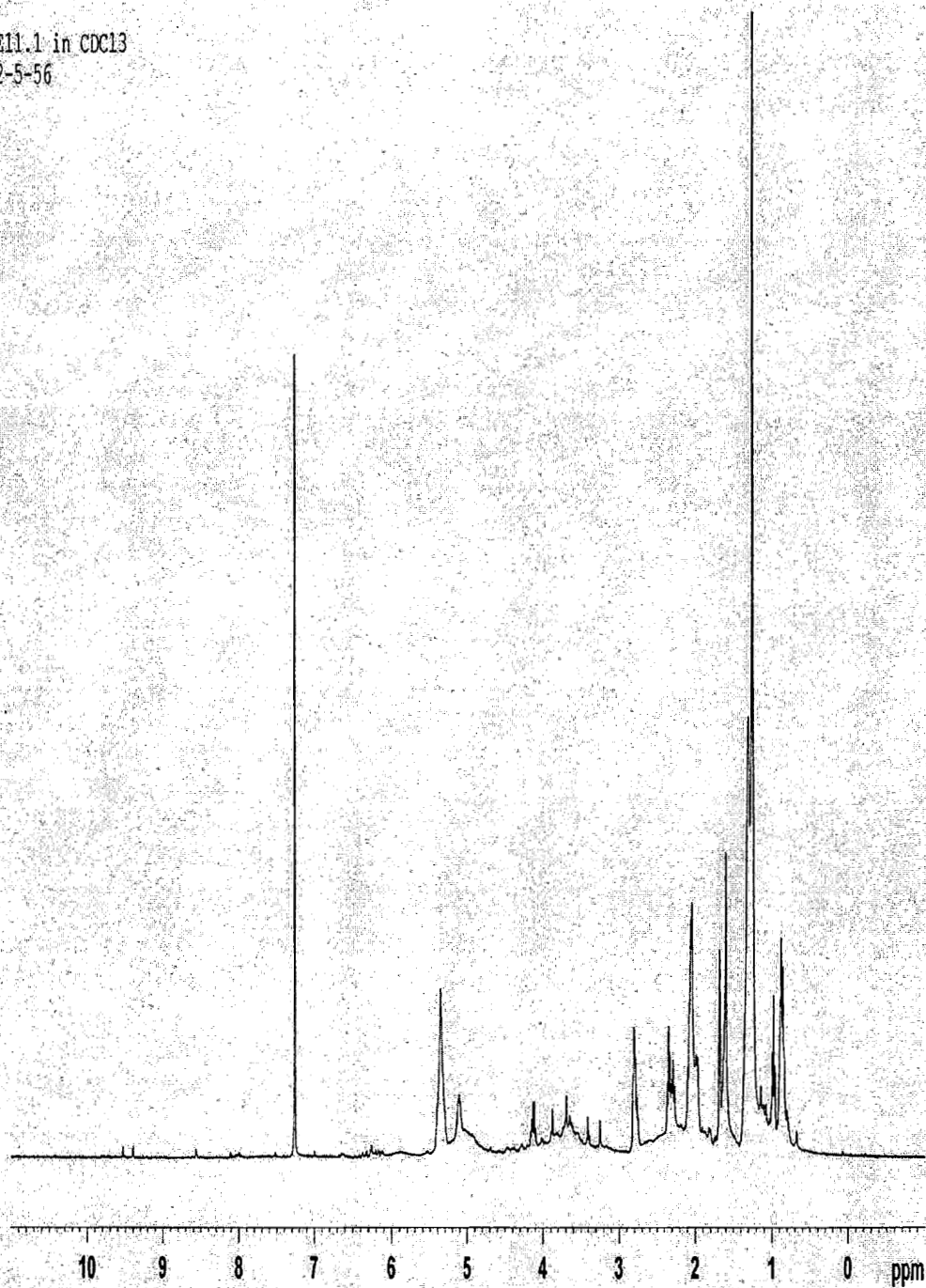
รูปที่ ผ 1-15 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบตึงต้น

E10.2 in CDCl₃
1-5-56



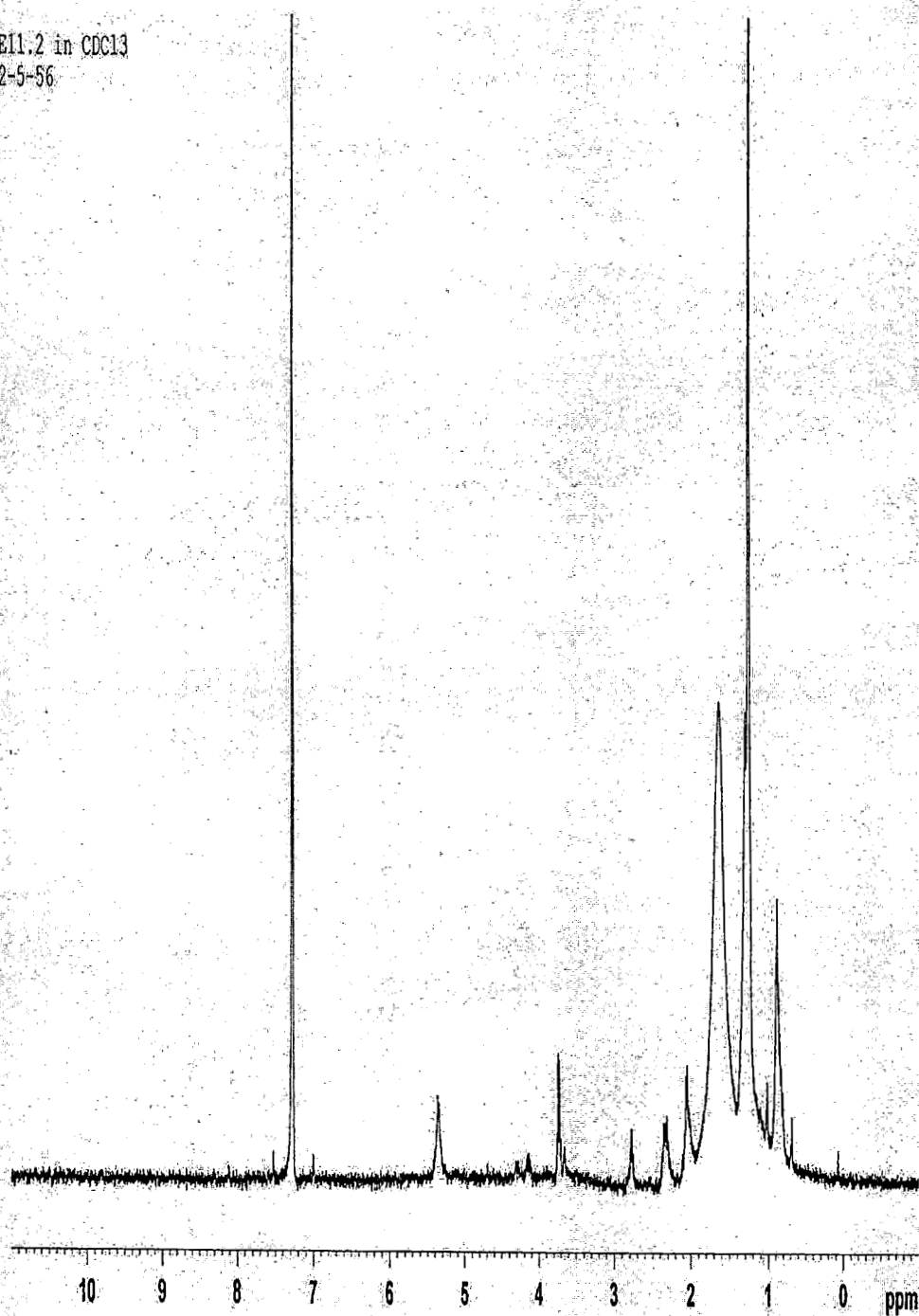
รูปที่ ๘ 1-16 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากตังกูน

E11.1 in CDCl₃
2-5-56



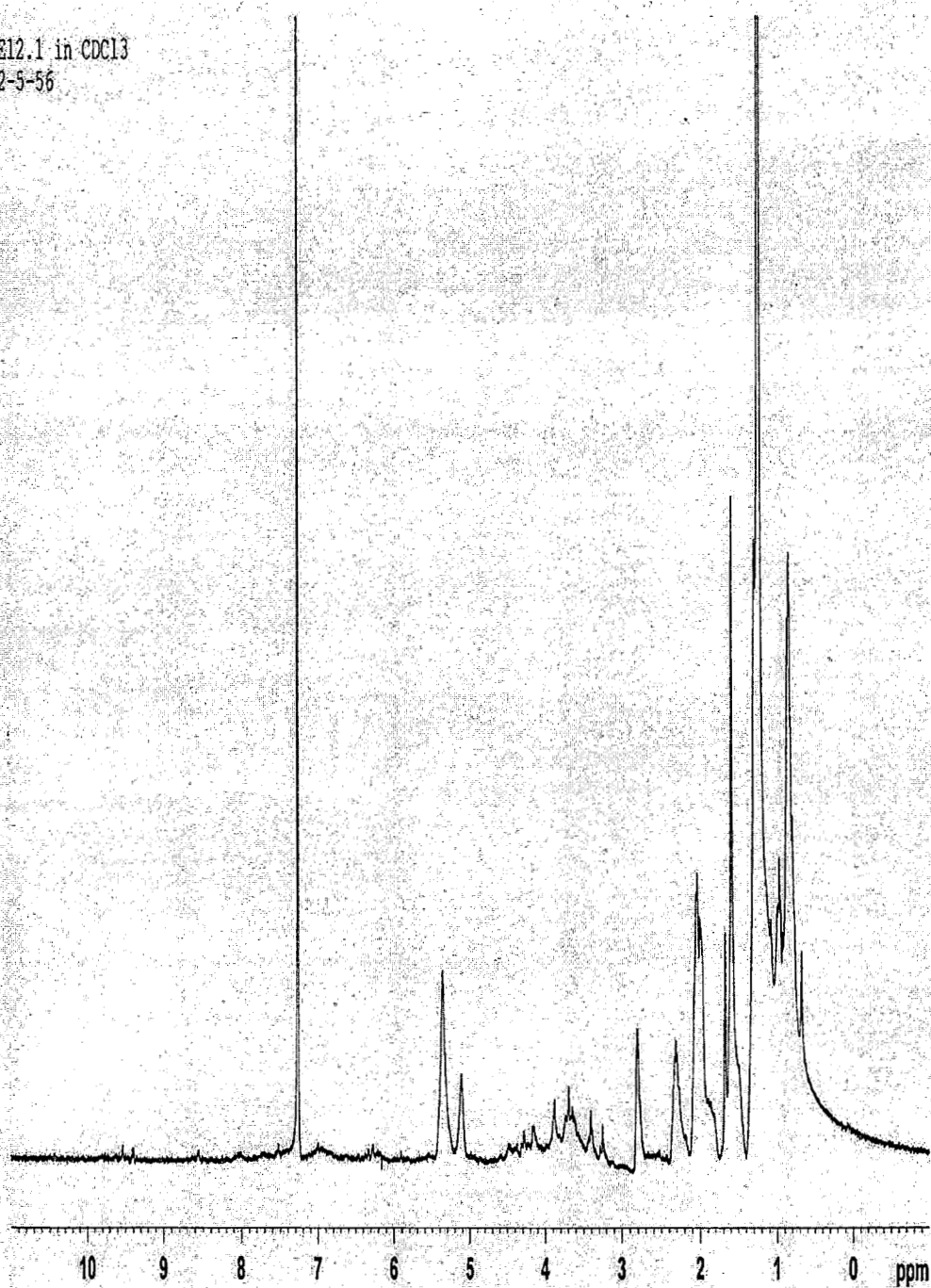
รูปที่ ผ 1-17 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบมะฮิเก

E11.2 in CDCl₃
2-5-56



รูปที่ ๑ 1-18 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากมะฮึก

E12.1 in CDCl₃
2-5-56



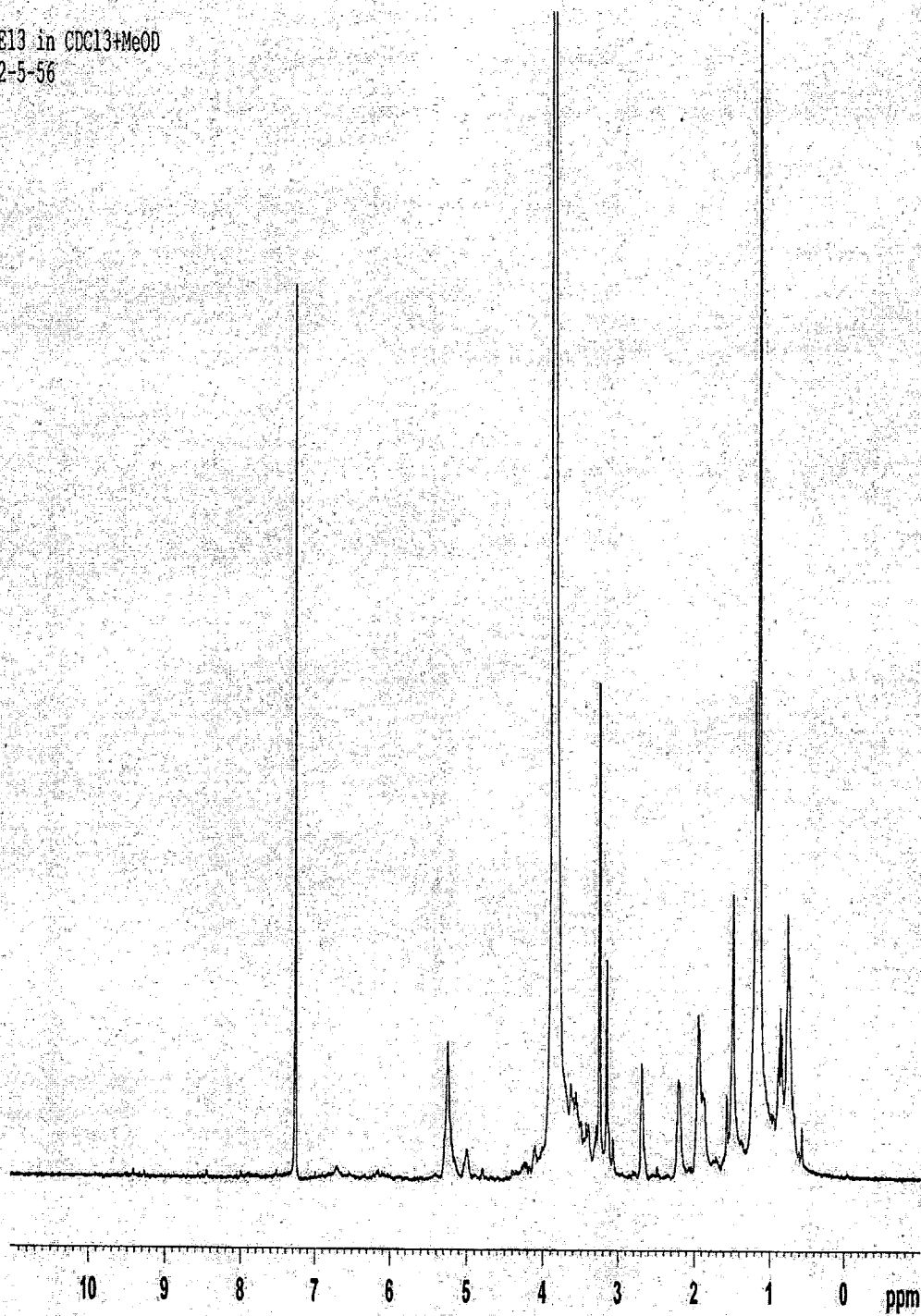
รูปที่ ๗ 1-19 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบหัวเดียว

E12.2 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



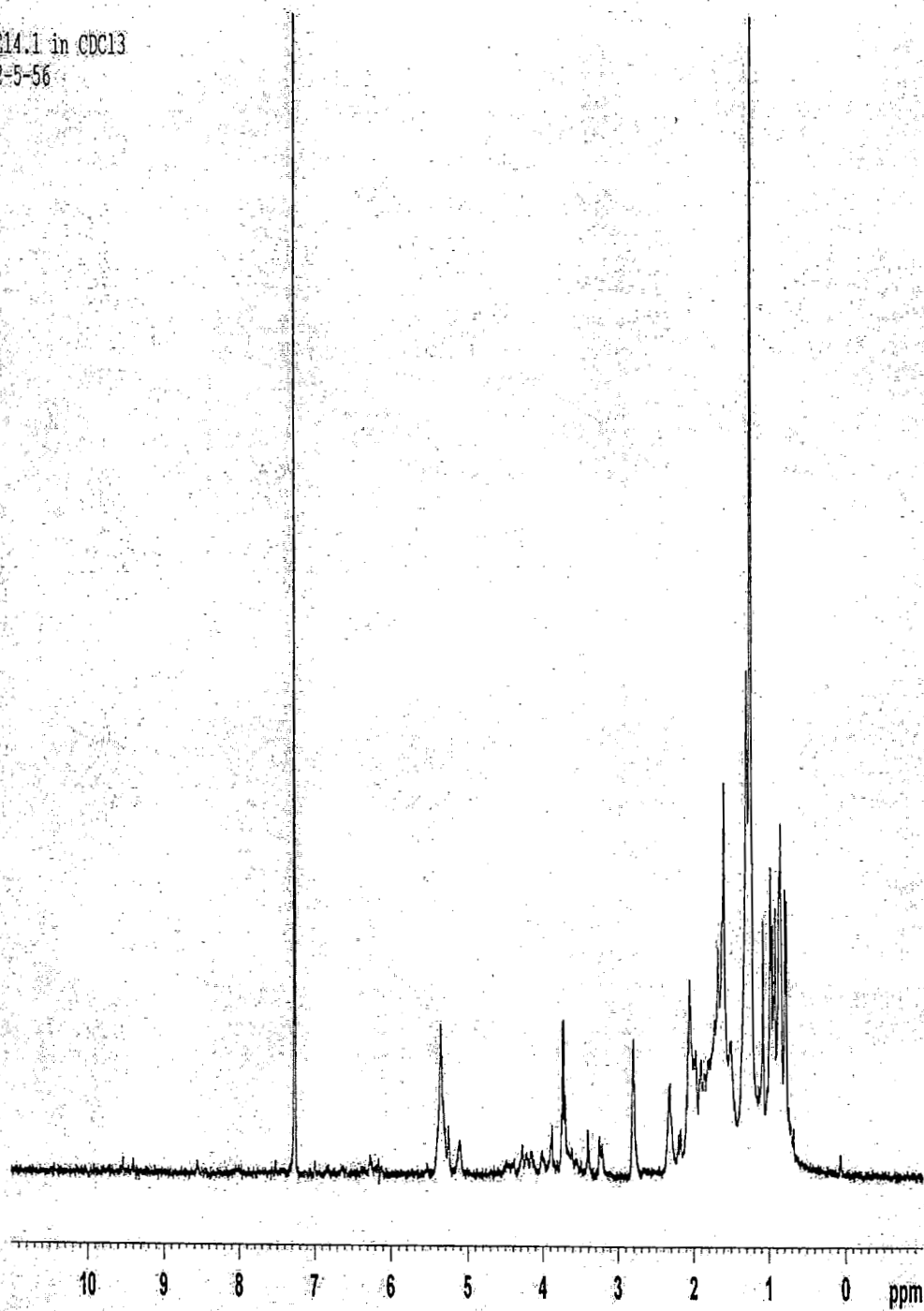
รูปที่ ๘ 1-20 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าหัวเดียว

E13 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



รูปที่ ๑ 1-21 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบไม้ลาย

E14.1 in CDCl₃
2-5-56



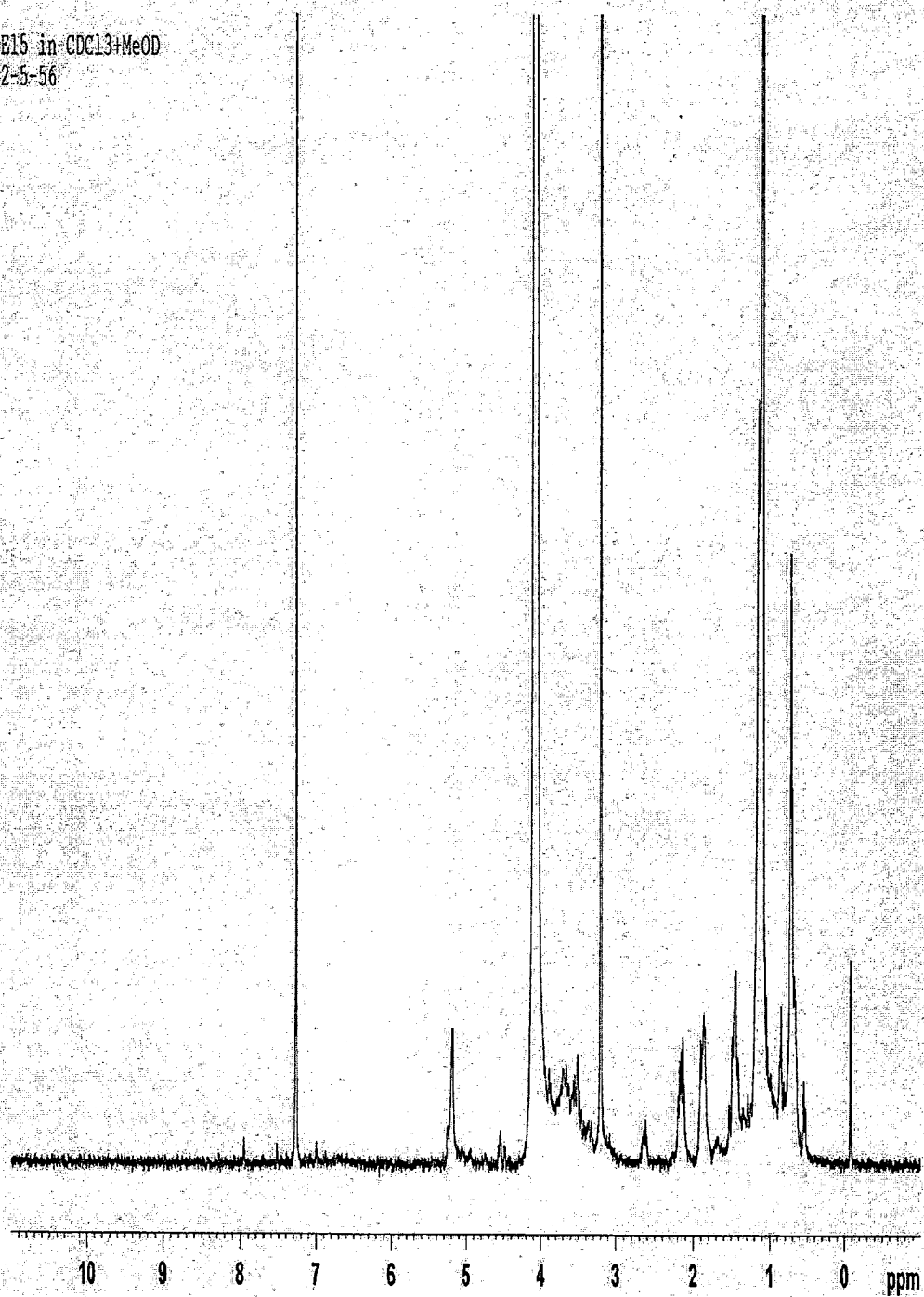
รูปที่ ๑ 1-22 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบเข็มไผ่

E14.2 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



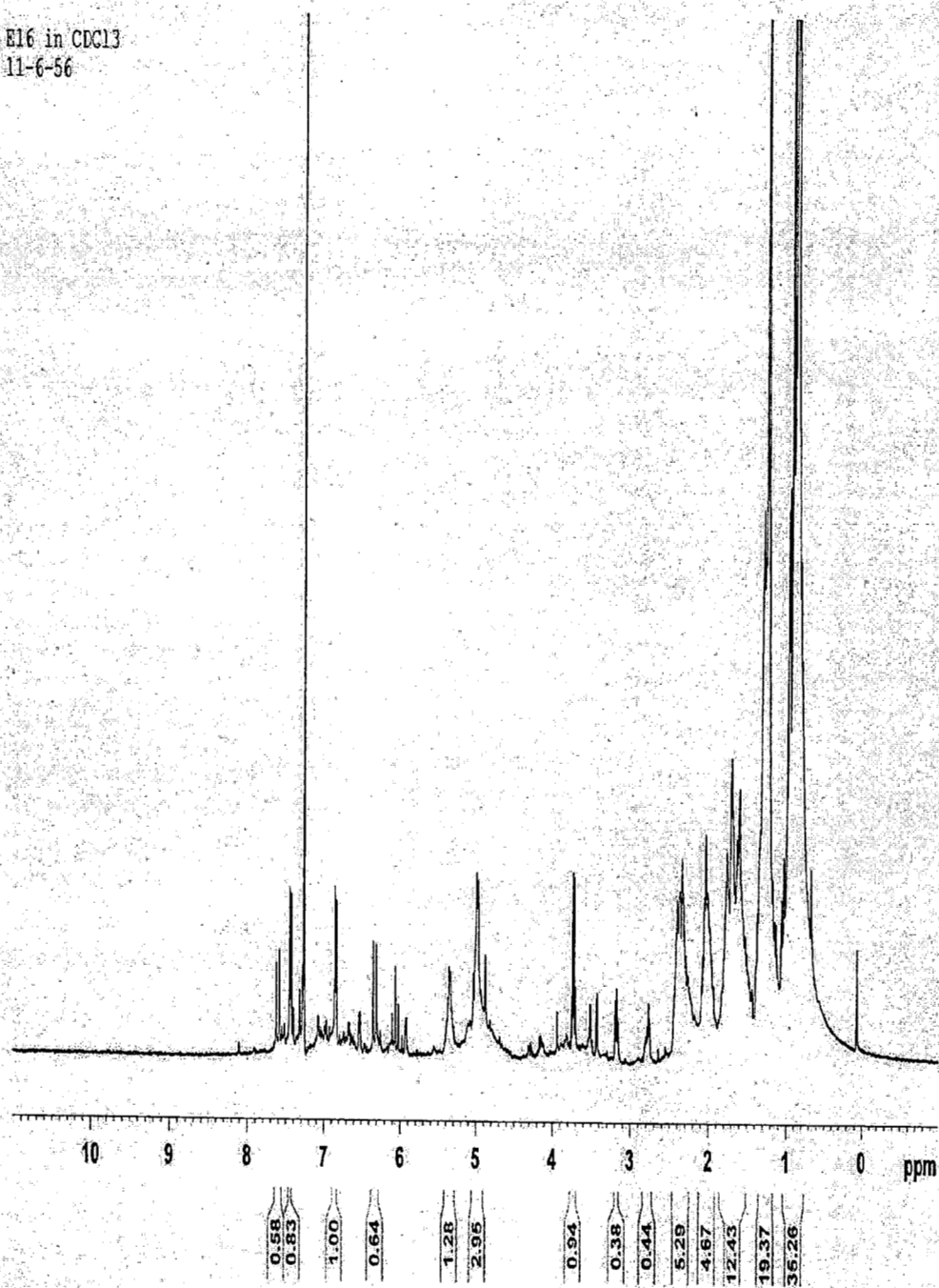
รูปที่ ๑ 1-23 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากเข็มไอดี

E15 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



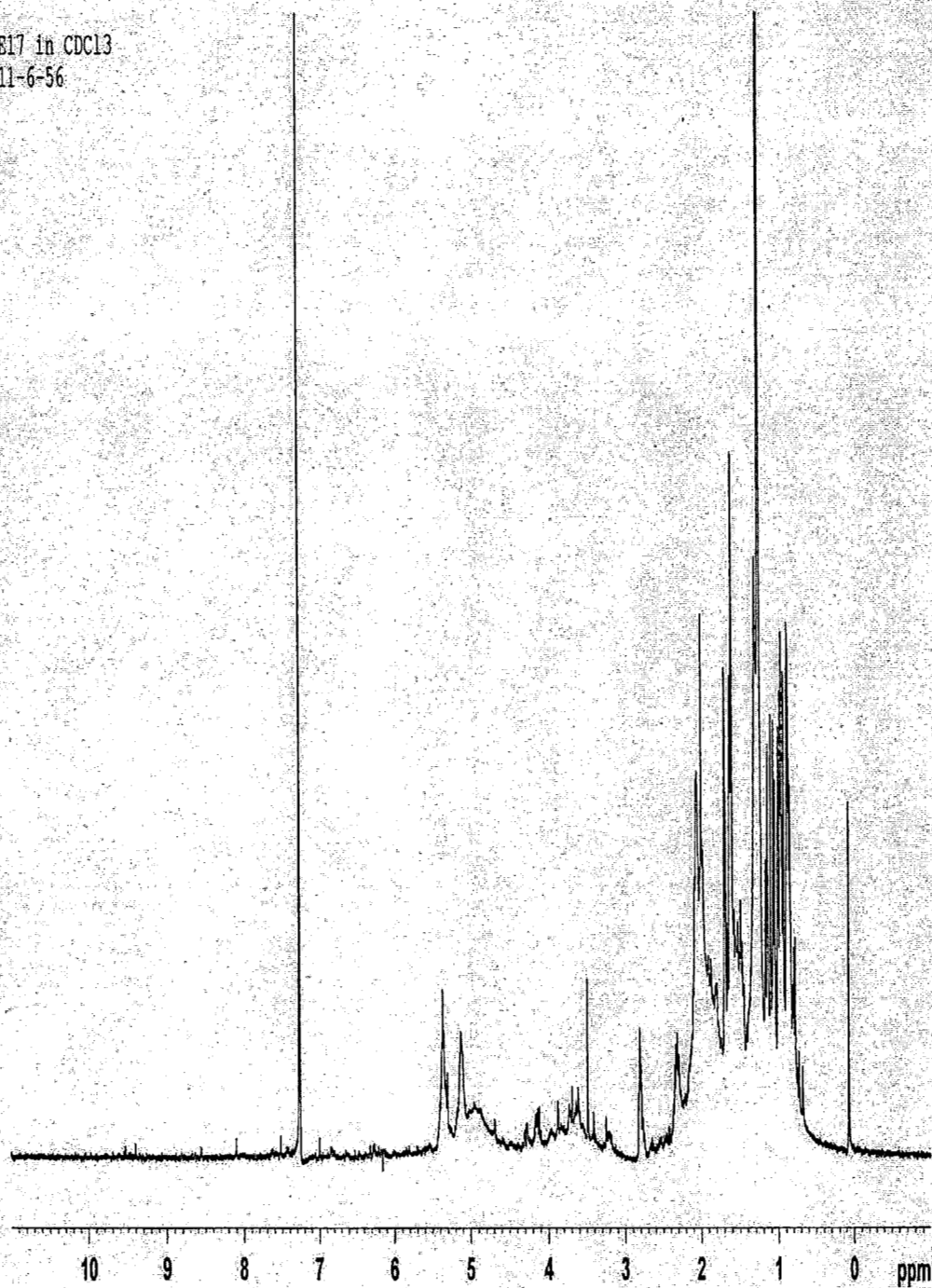
รูปที่ ๑ 1-24 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากพนมสวรรค์

E16 in CDCl₃
11-6-56



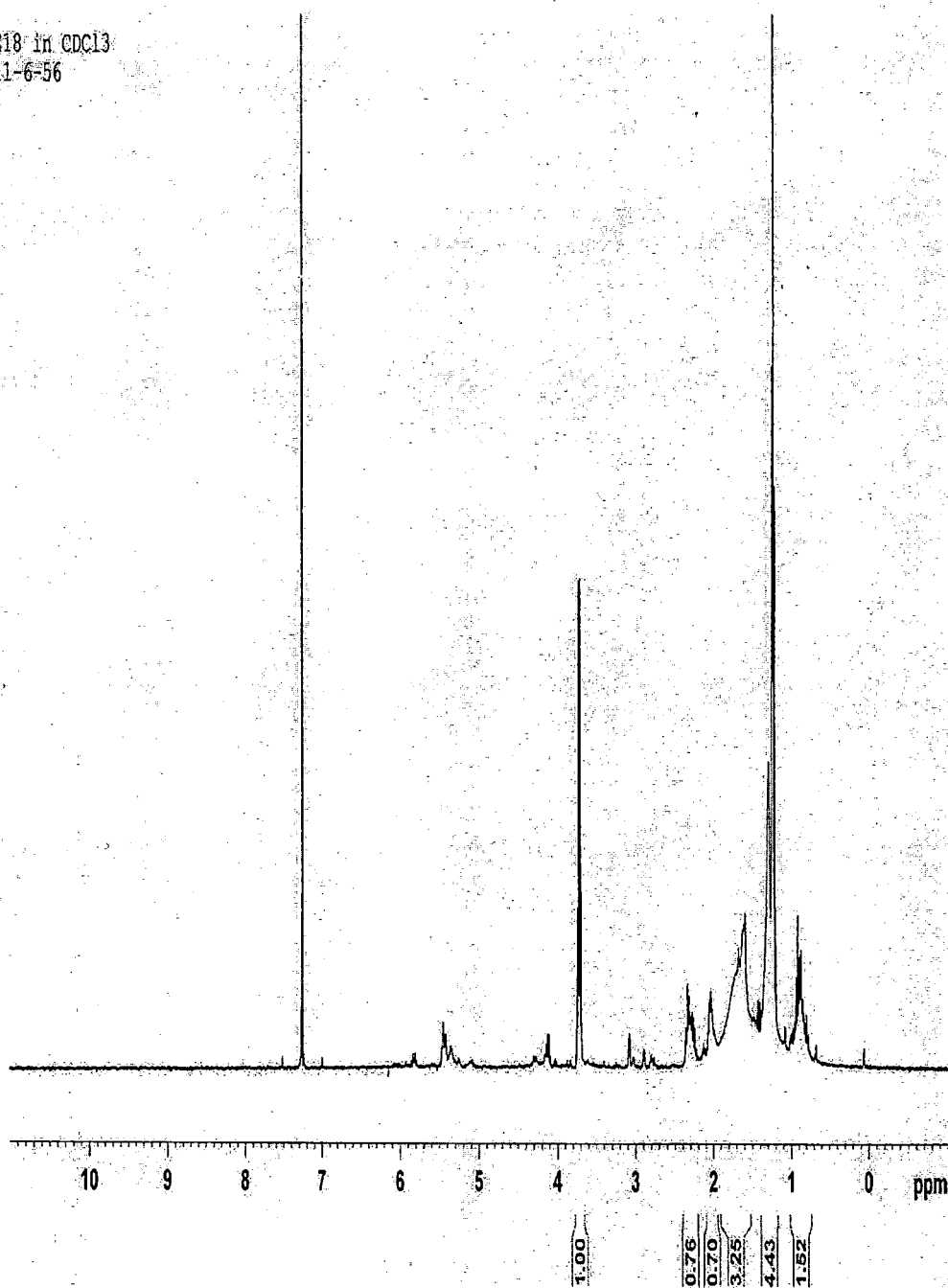
รูปที่ ผ 1-25 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของลำต้นสะค้านใบพลู

B17 in CDCl₃
11-6-56



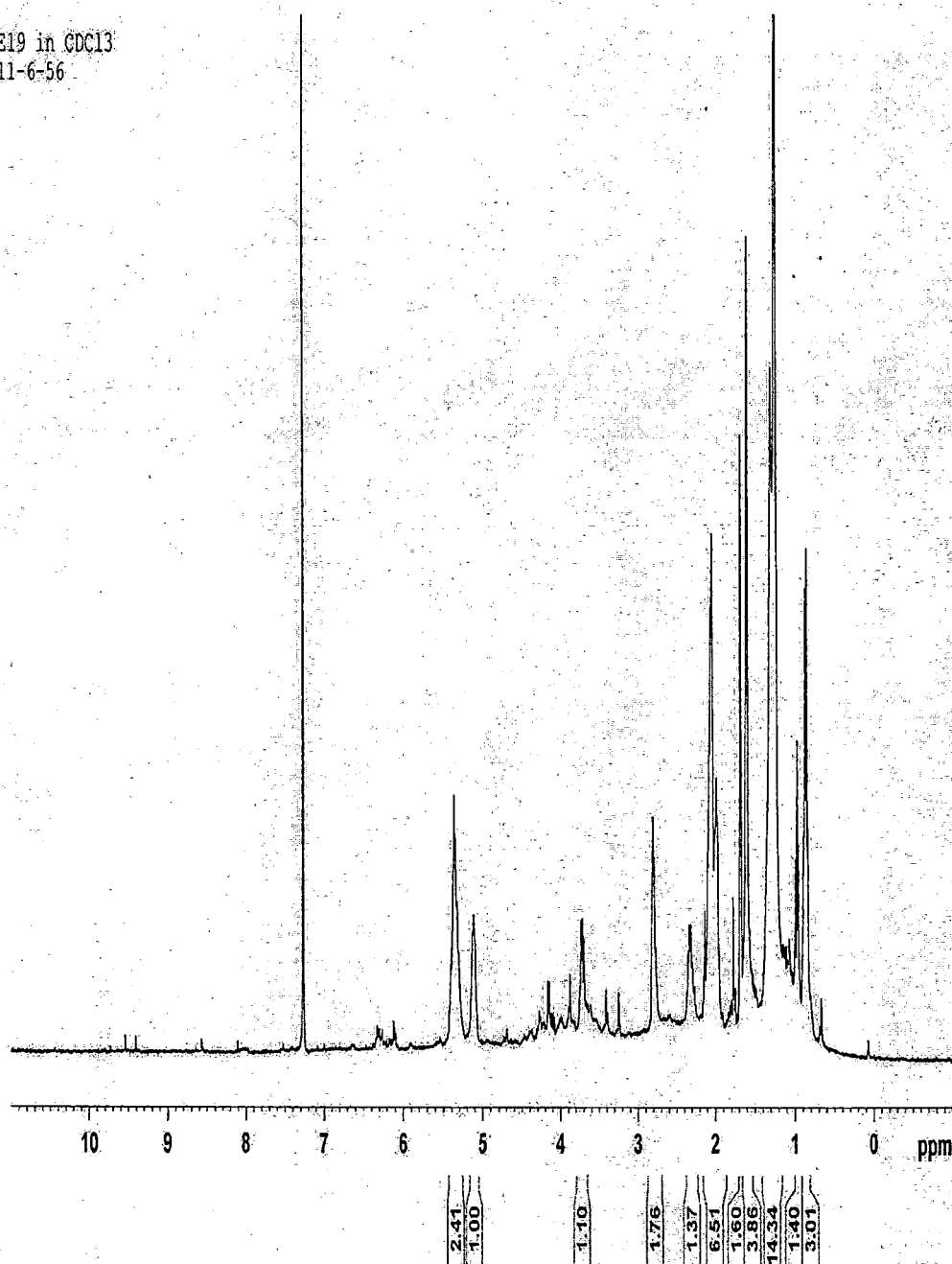
รูปที่ ๑ 1-26 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบฝิ่นแสนห้า

E18 in CDCl₃
11-6-56



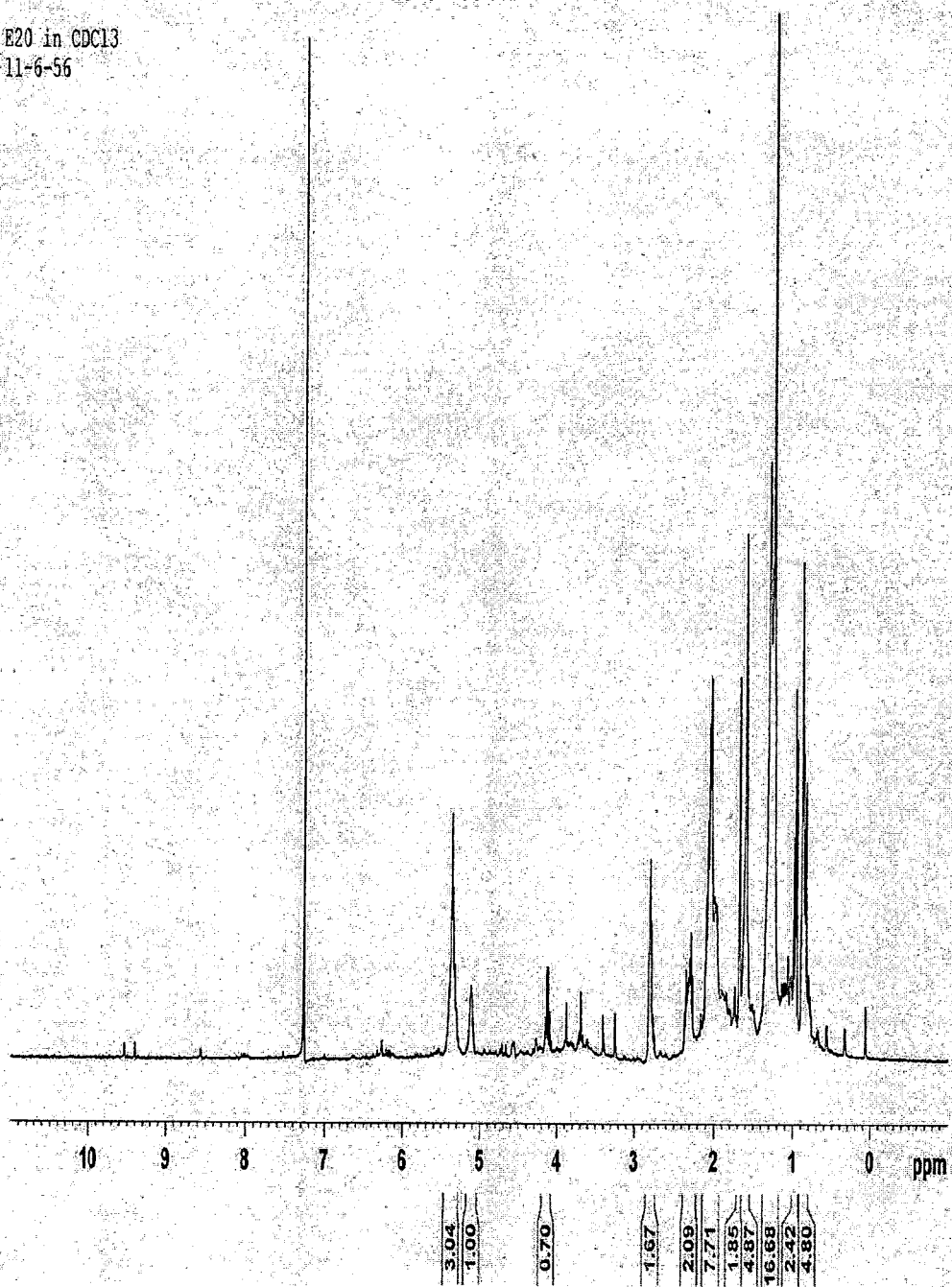
รูปที่ ผ 1-27 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเข็มป่า

E19 in CDCl₃
11-6-56



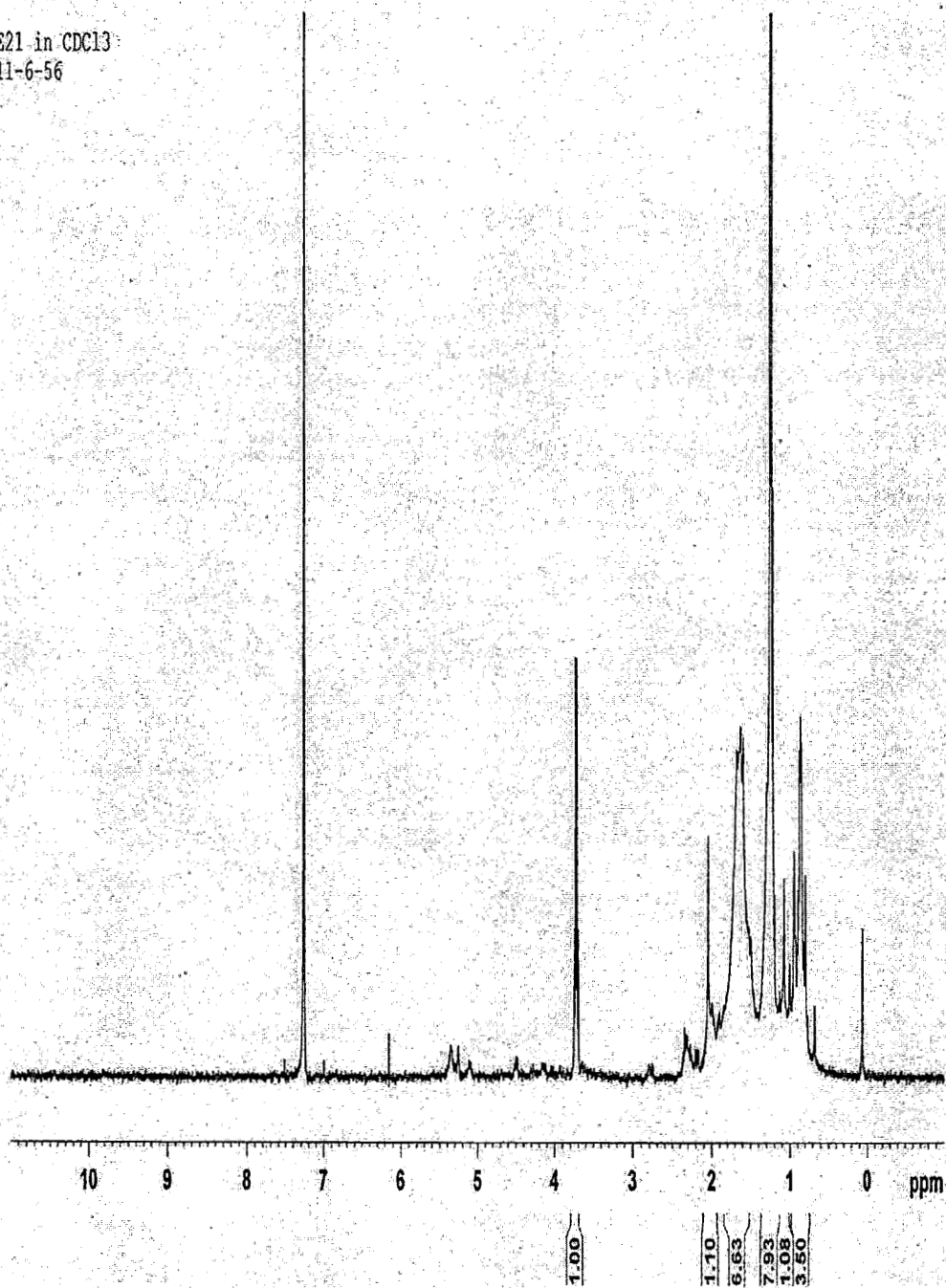
รูปที่ ๑ 1-28 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบพินปลา

E20 in CDCl₃
11-6-56



รูปที่ 1-29 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด

E21 in CDCl₃
11-6-56

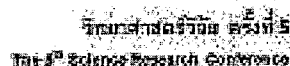


รูปที่ ผ 1-30 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเปลือกพังกาใหญ่

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ปรียาภา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เบญจวรรณ ชิวปรีชา และกล่าวขวัญ ศรีสุข.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. Proceeding of the 5th Science Research Conference, University of Phayao, Thailand, 2013, pp. 95-100.
2. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปรียาภา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง, เบญจวรรณ ชิวปรีชา, และคารณ เลียดประถม. (2557). ฤทธิ์ด้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19 (ฉบับพิเศษ), 304-311.
3. Sawinee Seemakhan, Klaokwan Srisook. *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. Proceeding of the 5th international conference on natural products for health and beauty, Phuket, Thailand, 2014, pp. 158-163.
4. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือ นางสาวปรียาภา เกตุกุล และ นางสาวพรสุดา กันแก้ว และระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จำนวน 1 คน คือ นางสาว สาวินีย์ สีมาพันธ์





75075

[illegible]

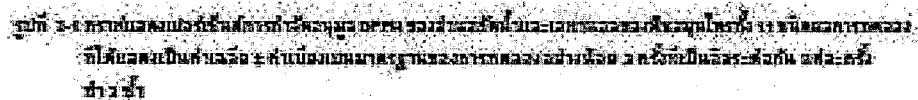
พันธุ์ไม้/สกุลไม้	วงศ์	จำนวนพืชในครอบครัว
ใบลาน/ใบตอง (Agave composita Lam.)	Compositae	๒
ใบสาหร่าย (Cordia speciosa (Roxb.) Smith)	Engelmaceae	๓๗, ๓๗๓
ใบกล้วย (Banana sp.)	Lepidocarpus-Carexoidaceae	๒, ๓๗
ใบกล้วย (Banana sp.)	Moraceae	๒
ใบกล้วย (Banana sp.)	Podocarpaceae	๒
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Melastomataceae	๒, ๓๗
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Tenacaceae	๒, ๓๗
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Araceae	๒, ๓๗
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Tenacaceae	๒
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Podocarpaceae	๒, ๓๗
ใบกล้วย (Banana speciosa (Roxb.) Smith)	Podocarpaceae	๓๗

สำหรับข้อ ๓๔ ของรัฐธรรมนูญฉบับนี้ มีเนื้อหามุ่งเน้นให้บุคคลที่มีถิ่นที่อยู่ในประเทศไทยและมีคุณสมบัติตามที่กำหนดไว้แล้ว สามารถไปขอรับสัญชาติไทยได้โดยไม่ต้องเสียค่าตอบแทนเป็นเงิน ๖๐,๐๐๐ บาท ซึ่งเป็นการกระทำที่ขัดกับเจตนารมณ์ของบทบัญญัติมาตรา ๖๖ ของรัฐธรรมนูญฉบับเดิมที่บัญญัติไว้ว่า บุคคลที่มีถิ่นที่อยู่ในประเทศไทยและมีความประพฤติดีสามารถขอรับสัญชาติไทยได้โดยไม่ต้องเสียค่าตอบแทนเป็นเงิน ๖๐,๐๐๐ บาท

[illegible][illegible]



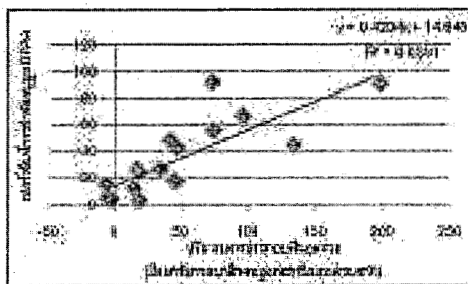
เป็นการดำเนินการตามมติของสมัชชาแห่งชาติครั้งที่ 13: การสร้าง ฟื้นฟู และ/หรือเสริมสร้างกฎระเบียบและกลไกการบังคับใช้กฎหมายที่เข้มแข็ง, 2.4.4.4. และเป็นการเพิ่มขีดความสามารถให้แก่ องค์กร และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการพัฒนาระบบการบังคับใช้กฎหมายและกลไกการบังคับใช้กฎหมายให้มีความเข้มแข็งและสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและประสิทธิผล

[illegible][illegible]

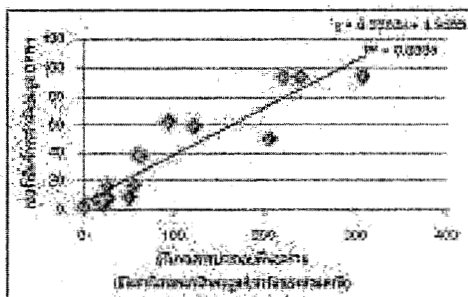


2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการใส่ปุ๋ยคอกมูล โคขุน และปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวม

จากผลการทดลองการใส่ปุ๋ยคอกมูล โคขุน และปุ๋ยคอกมูลโคขุนในอัตรา 0-200 กก/ไร่ และปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดิน 0-100 กก/ไร่ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดินมีความสัมพันธ์กันเป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ดังแสดงในรูปที่ 3-3 และ 3-4



รูปที่ 3-3 ความสัมพันธ์การใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดิน

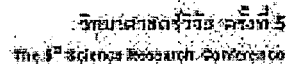


รูปที่ 3-4 ความสัมพันธ์การใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดิน

บทสรุป

จากการศึกษาการใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปุ๋ยคอกมูลโคขุนในอัตรา 0-200 กก/ไร่ และปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดิน 0-100 กก/ไร่ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดินมีความสัมพันธ์กันเป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ดังแสดงในรูปที่ 3-3 และ 3-4

จากการศึกษาการใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปุ๋ยคอกมูลโคขุนในอัตรา 0-200 กก/ไร่ และปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดิน 0-100 กก/ไร่ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการใส่ปุ๋ยคอกมูลโคขุนและปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสรวมในดินมีความสัมพันธ์กันเป็นบวกอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ดังแสดงในรูปที่ 3-3 และ 3-4



กระทรวงมหาดไทยได้พิจารณาเห็นว่ากรมการปกครองมีหน้าที่รับผิดชอบในการบริหารราชการแผ่นดินและส่งเสริมการพัฒนาท้องถิ่นของประเทศไทย การดำเนินงานของกรมการปกครองจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลข่าวสารที่ทันสมัยและเชื่อถือได้ เพื่อให้การดำเนินงานมีประสิทธิภาพและประสิทธิผล กรมการปกครองจึงได้จัดทำโครงการพัฒนาระบบงานคอมพิวเตอร์ขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงและพัฒนาการทำงานของกรมการปกครองให้มีความทันสมัยและมีความมีประสิทธิภาพ โดยโครงการพัฒนาระบบงานคอมพิวเตอร์ของกรมการปกครองมีลักษณะสำคัญดังนี้

107



- Han, C. Y., Chen, Y. P. and Chang, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuscutatum*. *Ecol Res*, 40(1), 12–21.
- Jayaraman, G. V., Ghemawat, S. and Paul SS. (2009). Radical scavenging activities of the Red grapefruit and sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. *ElectronJChem*, 50, 4454–4462.
- Kim, G. O., Jeong, S. W. and Lee, C. Y. (2002). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of persim. *Food Chem*, 81(2), 221–228.
- Kim, J. M. and Yun-Choi, H. S. (2006). Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from *Euphorbia japonica*. *Arch Pharm Res*, 31(7), 885–891.
- Zhang, L., Arjunan, S. M., Suresh, K. K., Gang, C. H., Narasimha, R., Paul, T. S., John, S., Krishnakumar, S., Ganes, M. and Wang, J. W. (2011). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Seeded Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *J Agric Food Chem*, 59, 12361–12367.

Abstract

The present study was performed to evaluate anti-inflammatory activity and total phenolic contents of ethanolic and water extracts of 15 medicinal plants from Ban Ang-Ed official community forest, Chantabun Province. The anti-inflammatory activity was determined by measuring an inhibitory effect on nitric oxide and prostaglandin E_2 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cell viability of macrophages exposed to the plant extracts was determined by MTT assay. Total phenolic contents were estimated by Folin-Ciocalteu method. The results show that anti-inflammatory activity was observed in the studied plant extracts. The extract from *Agaveatum conyzoides* Linn leaves exhibited the highest anti-inflammatory activity without significant cytotoxicity. Additionally, the correlation of anti-inflammatory activity and total phenolic contents of the extracts was low. These obtained results indicated that leaves of *A. conyzoides* are good sources of natural anti-inflammatory agents.

Keywords: Anti-inflammatory activity, Nitric oxide, Prostaglandin E_2 , Phenolic compounds, Medicinal plants

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในพืชสมุนไพรพื้นบ้านจากป่าชุมชนบ้านอังเอ็ด จังหวัดจันทบุรี และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านการอักเสบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ โดยใช้วิธีวัดการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์และโปรสตาแกลนดิน E_2 ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยลิพอลิแซ็กคาไรด์ การวัดการมีชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดจากพืชสมุนไพรถูกวัดโดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยวิธี MTT assay ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในพืชสมุนไพรถูกวัดโดยใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยลิพอลิแซ็กคาไรด์ สารสกัดจากใบของ *Agaveatum conyzoides* Linn. แสดงให้เห็นว่ามีความต้านการอักเสบสูงที่สุดโดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยลิพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านการอักเสบกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในพืชสมุนไพรบางชนิดมีความสัมพันธ์กันต่ำ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าใบของ *Agaveatum conyzoides* Linn. เป็นแหล่งที่ดีของสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบตามธรรมชาติ

Keywords: Anti-inflammatory activity, Nitric oxide, Prostaglandin E_2 , Phenolic compounds, Medicinal plants

ตารางที่ 1 ปริมาณการปลูกและปริมาณการบริโภคของพืชสวนครัวในครัวเรือน

พืช	ชื่อ	ชนิดพืช	% ของพื้นที่ปลูก		ปริมาณการบริโภคต่อครัวเรือน	
			พื้นที่ปลูก (ไร่)	พื้นที่ปลูก (%)	ปริมาณการบริโภค (กิโลกรัม/ครัวเรือน/ปี)	พื้นที่ปลูก (%)
ใบยี่หร่า (Coriandrum King & Gamble)	Rubiacaceae	ไม้ล้มลุก	7.8	3.7	132.9 ± 3.0	132.9 ± 3.7
โหระพา (Mentha piperita (Hornem) Merr)	Mentha piperita	ไม้ล้มลุก	3.8	12.7	307.5 ± 2.9	72.9 ± 0.5
ขมิ้น (Curcuma sp.)	Leguminosae Cucurbitaceae	ไม้ล้มลุก	7.8	12.2	35.7 ± 1.4	74.2 ± 1.6
ขมิ้น (Curcuma pinnatifida)	Rubiacaceae	ไม้ล้มลุก	12.1	12.3	106.8 ± 3.8	81.4 ± 1.3
ผักชีฝรั่ง (Foeniculum vulgare (Andr.)	Umbelliferae	ไม้ล้มลุก	14.8	25.5	61.3 ± 0.5	33.9 ± 0.6
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	2.8	6.3	35.7 ± 0.8	33.7 ± 0.3
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	6.8	12.4	221.5 ± 4.3	36.6 ± 1.2
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	17.1	3.3	313.2 ± 14.7	223.7 ± 13.6
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	6.8	7.4	213.5 ± 5.4	226.5 ± 3.7
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	6.7	2.7	25.3 ± 1.7	44.6 ± 0.6
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	3.5	3.3	24.6 ± 2.8	24.9 ± 0.9
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	2.4	17.2	21.4 ± 0.5	4.1 ± 0.2
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	18.2	23.8	35.3 ± 3.7	77.5 ± 3.4
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	13.8	23.7	23.7 ± 2.2	47.0 ± 1.3
พริกขี้หนู (Capsicum frutescens (L.)	Verbenaceae	ไม้ล้มลุก	10.5	37.6	123.0 ± 2.1	17.4 ± 0.7

ตารางที่ 3-4: การเปลี่ยนแปลงปริมาณการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มต่อหัวต่อวัน (กก./คน/วัน)

พืช	ปี พ.ศ. 2558 (ปีฐาน)		ปี พ.ศ. 2562 (ปีฐาน)		ปี พ.ศ. 2565 (ปีฐาน)	
	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน	ปริมาณบริโภคต่อหัวต่อวัน
ข้าว	23.5±3.1	7.4±7.4	23.0±7.2	10.0±3.6	30.2±3.4	30.2±3.4
ผลไม้สด	30.2±3.7	15.0±2.4	41.3±3.7	23.0±2.4	73.3±0.7	73.3±0.7
ข้าวโพด	15.1±3.3	-4.2±4.1	35.2±3.2	38.1±3.3	33.8±2.2	33.8±2.2
ถั่วเหลือง	23.3±2.4	13.3±1.5	23.7±1.4	23.3±2.3	24.2±2.4	24.2±2.4
พืชสวนผลไม้	23.3±10.6	17.4±4.5	70.8±3.4	31.2±4.7	23.9±4.3	23.9±4.3
พืชมงคล	23.6±1.4	10.3±2.7	73.3±3.3	33.3±10.3	30.0±3.4	30.0±3.4
พืชสวนผลไม้	15.0±3.0	21.0±4.3	62.0±10.6	37.0±6.3	34.3±2.3	34.3±2.3
พืชสวนผลไม้	15.0±3.3	-11.0±3.0	34.2±3.5	100.2±2.7	23.6±19.3	23.6±19.3
พืชสวนผลไม้	21.1±6.3	17.3±3.3	30.3±7.3	100.3±2.3	37.3±3.3	37.3±3.3
พืชสวนผลไม้	40.0±6.3	26.2±3.2	43.0±11.1	23.1±4.3	63.3±1.3	63.3±1.3
พืชสวนผลไม้	45.2±3.3	7.0±1.7	33.7±3.3	32.3±1.3	23.3±2.3	23.3±2.3
พืชสวนผลไม้	23.0±2.7	3.3±3.3	42.4±11.2	22.3±4.3	30.3±2.7	30.3±2.7
พืชสวนผลไม้	37.0±3.3	14.2±3.0	31.2±3.3	4.3±3.3	36.3±3.3	36.3±3.3
พืชสวนผลไม้	23.3±2.4	32.0±4.3	30.1±2.7	102.3±1.0	34.3±2.3	34.3±2.3
พืชสวนผลไม้	17.3±1.1	24.2±3.7	72.3±10.2	103.2±1.7	37.3±6.3	37.3±6.3
พืชสวนผลไม้ (10 ปี)	64.7±3.3		-	31.7±7.3		
พืชสวนผลไม้ (10 ปี)	-		37.2±6.3	34.2±3.4		

4. บทสรุป

จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มต่อหัวต่อวัน (กก./คน/วัน) ของคนไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการบริโภคผลไม้สด ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการบริโภคผลไม้สด ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการบริโภคผลไม้สด ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

5. ข้อสังเกต

งานวิจัยนี้มีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ระหว่างการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มต่อหัวต่อวัน (กก./คน/วัน) กับสุขภาพที่ดีขึ้นหรือไม่

6. ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวาง (Cross-sectional study) ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ระหว่างการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มต่อหัวต่อวัน (กก./คน/วัน) กับสุขภาพที่ดีขึ้นหรือไม่

- Suppak, D., Mingshi, H., Chansinsri, J., Royston, S., Srisook, E., Srisook, R. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* extract in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 4, 422-424.
- Colman, J.W. (2004). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1, 1437-1456.
- Dick, R., Jeong, S.C., Lee, S., Khoo, C., Koyyalamudi, S.R. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and terpenoid compounds. *Chinese Medicine*, 7, 26.
- Guzik, T.J., Nabel, E., Adenot-Quek, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 453-457.
- Hwang, S.W.A., Ryu, S., Goh, E.J., Kim, S.H. (2010). Sea cucumber, *Stichopus japonicus* (city) acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, 65-72.
- Maeng, W.H., Lee, A. S., Yang, C. H. (2005). Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyphenolic flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georg. *Biochemical Biophysics Research* (Biochemistry), 33, 2371-2380.
- Jung, H.W., Seo, M.K., Kim, J.H., Lee, K.H., Park, Y.K. (2005). Flower extract of *Pentstemon heterophyllus* lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- κ B signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 313-318.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fouts, H., Mitchell, R.M. (2007). *Anatomy Basic Pathology* (5th ed.). United States of America, Elsevier Saunders.
- Misraquid, W., Mahomran, S., Ung, H. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Centropomus* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 33-35.
- Sangpak, A.S., Zhang, L., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, J., Sankar, J., et al. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 171.
- Rodasant, P., Suroth, R., Srichan, R., Kongsakulwong, S. (2012). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of some Thai medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 21, 4053-4055.
- Srisook, R., Polchoet, M., Mingshi, H., Srisook, E., Srisook, S. (2014). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Chrysanthemum indicum* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 152, 1003-1014.
- Srisook, R., Suppak, D., Soontha, R., Srimasut, P., Chantachak, V., Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Linn. herbaceous. *Journal of Medicinal Plants Research*, 21, 4057-4061.
- Van der Vliet, A., Siesch, J.P., Cross, C.E. (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease? *Respiratory Research*, 1, 57-72.
- Zhang, L., Aranyas, S.R., Sankar, R.K., Sang, C.J., Nangicha, T.S., John, E., et al. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and terpenoid compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 12361-12367.

1. INTRODUCTION

Inflammation is a critically important aspect of host responses to infection and injury. In response to inflammatory stimuli such as LPS, macrophages secrete various pro-inflammatory mediators including inducible nitric oxide synthase (iNOS)-catalyzed nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2)-catalyzed prostaglandin E₂ (PGE₂) which are involved in eradication of infection and injury. However, excessive or prolonged secretion of these mediators is implicated in the pathogenesis of a variety of diseases, including asthma, atherosclerosis, cancer, diabetes, inflammatory bowel diseases, and rheumatoid arthritis [1, 2]. Therefore, inhibition of NO and PGE₂ production is a promising target in the development of anti-inflammatory agents. Expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated macrophages is mainly regulated by nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPKs) pathways [3-5].

Azadirachta indica L. (Anacardiaceae) is a natural herb used in traditional medicine in many countries in the world. The leaves of *A. indica* have been used in the treatment of chronic pain and various inflammatory diseases [6]. *A. indica* leaf extracts have been shown to exert anti-inflammatory activity in several *in vivo* models [7-9]. However, the molecular mechanisms of its action have not been described. The purpose of this study was to investigate underlying anti-inflammatory mechanisms of *A. indica* leaf extract in LPS-induced RAW 264.7 macrophages.

2. MATERIALS AND METHODS

Preparation of extract

Leaves of *A. indica* were collected from Ban Ang-Eil official community forest, Chantaburi Province. The plants were cleaned with tap water, dried and finally powdered. The powder was soaked in 95% ethanol in a ratio 1:10 for 5 days with occasional shaking, after that ethanol extract was filtered through filter paper. Plant residues were re-extracted with 95% ethanol 2 times. The filtrates were pooled and evaporated by rotary evaporation until dryness before storage at -20°C.

Cell viability assay

Cell viability of RAW 264.7 macrophage were assessed by a modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as determined by Banpool et al, 2013 [5].

Measurement of nitric oxide production

Nitrite, as oxidation product of NO, is the colored media as an index of NO production determined by Griess reaction according to the method reported by Banpool et al, 2013 [5].

Determination of PGE₂

PGE₂ produced from LPS-stimulated RAW 264.7 cells was quantified using PGE₂ competitive enzyme immunoassay kit (R&D Systems, USA).

Western blotting analysis

Levels of iNOS, COX-2 and β -actin proteins in macrophages were determined by Western blotting analysis as described by Banpool et al, 2013 [5].

Real time-reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) analysis

Total RNA was reverse transcribed into cDNA using 5x ScriptTM Reverse Transcription Supermix. The cDNA was used for real-time quantitative PCR which conducted in a CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad) using 2x iQTM Universal SYBR[®] Green Supermix. The fold increase or decrease of iNOS and COX-2 were determined relative to a control after normalized to a housekeeping gene (EF-2) using formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Nuclear protein extraction

For analyses of NF- κ B p65 subunit level, nuclear protein extracts were isolated according to the method reported by Srirach et al, 2011 [10].

3. RESULTS AND DISCUSSION

This study was performed to investigate the mechanism of anti-inflammatory effect of *A. conyzoides* leaves in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. The ethanol leaf extract of *A. conyzoides* (ACE) inhibited the production of NO and PGE₂ in a dose-dependent manner with IC₅₀ values of 22.69 ± 0.14 and 25.92 ± 5.72 μ g/ml, respectively (Figure 1). ACE at concentrations 3.125 to 50 μ g/ml did not significantly affect cell viability when compared to nonstimulated control cell, indicating that the reduction of NO and PGE₂ production was not attributed to cell cytotoxicity. As shown in Figure 2, iNOS and COX-2 proteins were increased dramatically in cells treated with LPS and ACE attenuated the expression of protein iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. In accord, we found that ACE attenuated the level mRNA of iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner (Figure 3). The results show that inhibition of NO and PGE₂ by ACE as a result of the suppression of iNOS and COX-2 mRNA and protein synthesis.

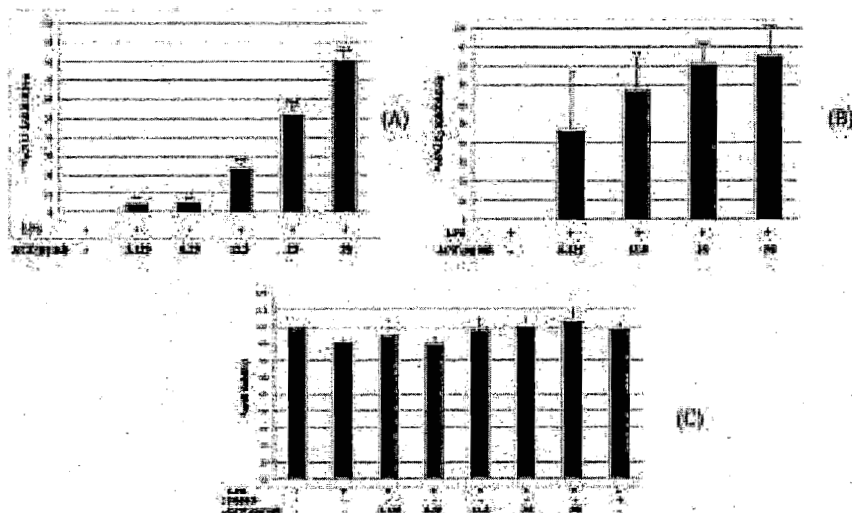


Figure 1. Inhibitory effects of ACE on NO (A) and PGE₂ (B) production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with ACE and LPS for 24 h. Accumulated nitrite and PGE₂ concentrations present in the medium were determined. (C) Viability of cells was determined using the MTT assay. Each column represents the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments with triplicate samples. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. LPS alone.



Figure 2. Effect of ACE on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Cells were stimulated with ACE and LPS for 24 h. iNOS and COX-2 proteins were detected by Western blot analysis.

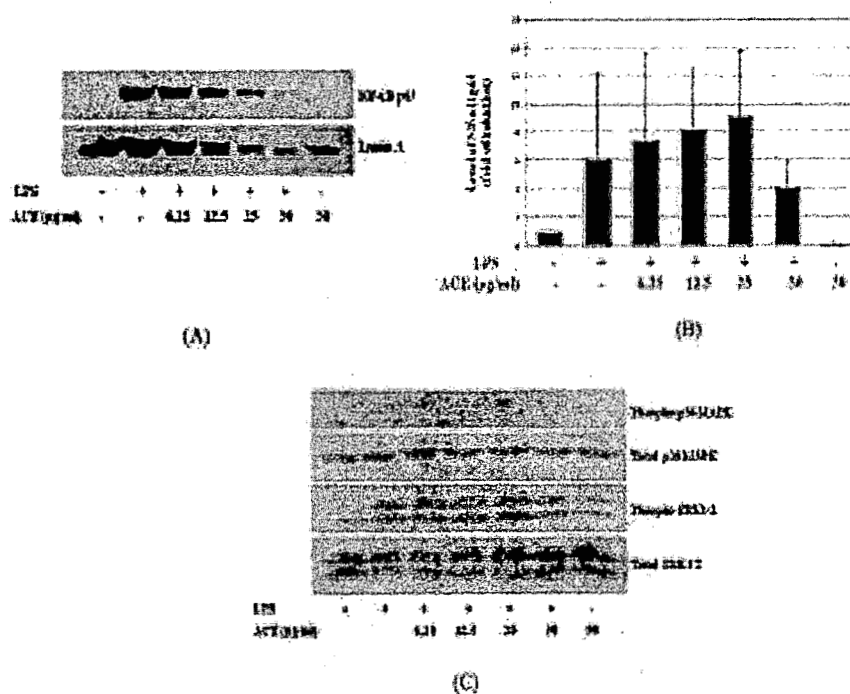


Figure 4. Effect of ACE on the nuclear translocation of subunit p65 of NF- κ B and phosphorylation of MAPKs in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of ACE for 30 min, and stimulated with LPS for 1 h for NF- κ B and 30 min for MAPKs. The nuclear extracts were analyzed the levels of NF- κ B p65 subunit (A). Graph shows the mean $\pm$ SD of results of densitometric analyses of NF- κ B p65 subunit which were normalized to Lane A densitometric values ($n = 3$) (B). Whole cell extracts were determined the phosphorylated ERK1/2 and p38 MAPK level by Western blot analysis (C).

4. CONCLUSIONS

These obtained results demonstrate that the mechanism of anti-inflammatory activity of ACE is, at least in part, the inhibition of NO and PGE₂ production by inhibition of iNOS and COX-2 expression, via NF- κ B and MAPKs signaling pathway. These findings support the uses of *Agave vera* leaves in traditional medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by Bangkai University and also by the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERC-CIC), Commission on Higher Education, Thailand.

REFERENCES

1. Gazik TJ, Kozak R, Adamczak-Gazik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54: 429-437.
2. Rankin JA. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues* 15: 3-17.
3. Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Carcinogenesis* 20: 6853-6866.
4. Guba M, Mackenzie N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13: 83-94.

5. Busipool D, Mingshol N, Chenthami J, Rhytrahai S, Srisook E, Srisook K. 2012. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Paichan-macha* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol.* 146: 493-504.
6. Okunade AL. 2002. *Agave americana* L. (Asteraceae). *Economic* 75: 1-16.
7. Moora ACA, Silva ELP, Foga MCA, Wanderley AG, Affrigo P, Melo MBS. 2003. Anti-inflammatory and chemokine synthesis study of the leaves of *Agave americana* L. in rats. *Phytotherapy* 17: 133-142.
8. Bhandar SM, Aswathnarayana BL, Kulkarni VH, Kulkarni PV, Smita DM, Tarak KC. 2011. Protective effects of ethanolic extract of *Agave americana* on experimental induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol.* 6: 664-678.
9. Rahmani A, Akter N, Rashid H, Ahmed NU, Ullah N, Islam S. 2012. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole *Agave americana* and *Eleocharis acicularis* extracts in animal models. *African J Pharm Pharmacol.* 6: 1469-1476.
10. Srisook K, Palachet M, Mingshol N, Srisook E, Sarpasit S. 2011. Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Chenopodium quinoa* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *J Ethnopharmacol.* 133: 1008-1014.
11. Boyon Y, Ortiz MA, Lopez-hernandez PJ, Gao P, Karin M, Páblu M, Piedrafita FJ. 2003. Inhibition of Ikappa B kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis. *Mol Cell Biol.* 23: 1061-1074.
12. Garcia-Medina V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tufán R, González-Gallardo J. 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and isomertol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol.* 557: 721-729.