



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพร

ในเขตโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา)

Investigation of anti-inflammatory activities of medicinal
plants from Ban Ang-Ed official community forest
(Chaipattana foundation), Chantaburi province

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ได้รับเงินอุดหนุนทุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)

งบประมาณปี 2557

บทคัดย่อ

สาบแร้งสาบกา (วงศ์ Asteraceae) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้ทั่วไปในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ จึงเป็นพืชที่อาจจะเป็นแหล่งของสารต้านการอักเสบที่ดี โดยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยได้รายงานว่าส่วนสกัดเอทานอลจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (NO) พรอสตาแกลนดิน E₂ (PGE₂) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดย่อยน้ำของส่วนสกัดเอทานอลจากใบสาบแร้งสาบกาในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคารไรด์ (LPS) ยิ่งไปกว่านั้นส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดียังถูกนำมาแยกส่วนสกัดย่อย หรือสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์โดยวิธีฤทธิ์ชีวภาพ นำการสกัด ค่า IC₅₀ ของการยับยั้งไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดย่อยน้ำ มีค่าเท่ากับ 39.00 ± 8.97, 8.27 ± 0.21 และ 107.68 ± 25.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเอทานอลจากใบสาบแร้งสาบกาถูกนำมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อย 10 ส่วนสกัด (F1-F910)

ส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำการแยกส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ 14 ส่วนสกัดย่อย (F8.1 ถึง F8.14) และแยกส่วนสกัดย่อย F9 ด้วยเทคนิค HPLC ได้ 4 ส่วนสกัดย่อย นำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และความมีชีวิตรอดในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS พบว่า ส่วนสกัดย่อย F8.4 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และส่วนสกัดย่อย F9.4 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีกว่าส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F9 นอกจากนี้ยังพบสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ในส่วนสกัดย่อย F8-F10 ในขณะที่สาร quercetin พบในส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 สาร quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside นี้มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นโดยไม่แสดงความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญ สาร quercetin ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ส่วนสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside (25-200 ไมโครโมลาร์) ลดการแสดงออกของโปรตีน เท่านั้นไม่ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ดังนั้น quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside อย่างน้อยเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบของส่วนสกัดย่อย F8-F10 ของใบสาบแร้งสาบกา ผลการศึกษาเหล่านี้อาจเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้สมุนไพรสาบแร้งสาบกาเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาตัวยาต้านอักเสบชนิดใหม่ต่อไป

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ไนตริกออกไซด์, iNOS, สาบแร้งสาบกา, เคอร์ซีติน

ABSTRACT

Ageratum conyzoides (Asteraceae) has been used in traditional medicine for treatment of various inflammatory diseases. It might be a good source of natural anti-inflammatory agents. In our previous study, the ethanol extracts of *A. conyzoides* leaves exhibited high inhibitory effects on NO and PGE₂ production. Thus, the aim of this study was to determine the anti-inflammatory activity of the hexane, ethylacetate and water fractions of ethanol extract of *A. conyzoides* leaves in a lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage model. Moreover, the active subfractions were isolated by anti-inflammatory activity-guided isolation. The IC₅₀ values for NO production of hexane, ethylacetate and water fractions were 39.00 ± 8.97, 8.27 ± 0.21, and 107.68 ± 25.32 µg/mL, respectively. Ethyl acetate fraction of ethanol extract from *A. conyzoides* leaves were chosen to isolate by silica gel column chromatography to afford 10 subfractions (F1-F910).

The subfractions F8 and F9 exhibited strong anti-inflammatory activity without cytotoxicity. Subfraction F8 was then fractionated by column chromatography to obtain 14 subfractions (F8.1-F8.14). Four subfractions (F9.1-F9.4) were obtained from fractionation of the F9 fraction by HPLC. The subfractions were evaluated their nitric oxide (NO) inhibitory effect and cell viability on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Subfraction F8.4 (10 µg/ml) showed the most potent inhibitory effect on NO production without cytotoxicity. And F9.4 subfraction (10 and 50 µg/ml) showed stronger inhibitory effect on NO production than other subfraction from F9 fraction. Moreover, quercetin-3-O-rhamnopyranoside was identified in F8-F10 while quercetin was found only in F8 and F9. Quercetin and quercetin-3-O-rhamnopyranoside inhibited LPS-induced NO production in a dose-dependent manner with no significant cytotoxicity. Quercetin suppressed the expression of iNOS and COX-2 protein. Quercetin-3-O-rhamnopyranoside (25-200 µM) down-regulated the expression of iNOS protein, but not COX-2. Therefore, quercetin and quercetin-3-O-rhamnopyranoside were, at least in part, compounds responsible for the anti-inflammatory activity of F8-F10 from *A. conyzoides* leaves. These findings may provide the scientific support to the use of *A. conyzoides* leaves in traditional medicine for the treatment of inflammatory-related diseases and also as the basis to develop a new anti-inflammatory agent.

Keywords: Anti-inflammatory activity, Nitric oxide, iNOS, *Ageratum conyzoides*, Quercetin

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณคุณดุสิต วรสวาท หัวหน้าโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี (มูลนิธิชัยพัฒนา) ในการให้เข้าเก็บพืชตัวอย่าง คุณคำณ เลียดประถม ที่ปรึกษาโครงการฯ หมอสมชาย ใจสิทธิ์ (ปุยาว) และหมอประเทือง นิสัยชื่อ (ปู่เทือง) หมอสมุนไพรแห่งบ้านอ่างเอ็ดในการให้ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรและคอยให้ความช่วยเหลือในการเก็บพืชตัวอย่าง ขอขอบคุณภาควิชาเคมี และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนางสาวสารินีย์ สีมานันท์ และนางสาวมยุรี ปุณาศรี ได้รับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	4
สารบัญรูป	5
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
วิธีการทดลอง	18
ผลการทดลอง	30
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	55
บรรณานุกรม	59
ผลผลิตของโครงการวิจัย	64
ภาคผนวก	65
ประวัตินักวิจัย	81

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1-1	ลำต้น ใบ และดอกของต้นสาบแร้งสาบกา	12
รูปที่ 2-1	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต ของใบสาบแร้งสาบกา	22
รูปที่ 2-2	คอลัมน์โครมาโตกราฟี และส่วนสกัดย่อยที่เก็บได้	23
รูปที่ 2-3	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 15 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต ของใบสาบแร้งสาบกา	23
รูปที่ 2-4	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 10 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต ของใบสาบแร้งสาบกา	24
รูปที่ 2-5	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา	25
รูปที่ 2-6	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา	27
รูปที่ 2-7	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัด ย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา	29
รูปที่ 3-1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6	43
รูปที่ 3-2	ผลของควมมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.8	44
รูปที่ 3-3	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 แมคโครฟาจหนู RAW 264.7	47

รูปที่ 3-4	ผลของควมมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ ส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4	47
รูปที่ 3-5	โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin-3-O- rhamnopyranoside (A) และส่วนสกัดย่อย F8 (B), F9 (C) and F10 (D) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา	48
รูปที่ 3-6	การผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS	53
รูปที่ 3-7	การผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วย สาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS	54
รูปที่ 3-8	ผลของสาร quercetin ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B)	55
รูปที่ 3-9	ผลของสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ต่อการแสดงออกของ โปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B)	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1	น้ำหนักและร้อยละส่วนสกัดน้ำและเอทานอล 33
ตารางที่ 3-2	การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจาก ใบสาบแร้งสาบกา 34
ตารางที่ 3-3	ร้อยละน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตทของใบสาบแร้งสาบกา 35
ตารางที่ 3-4	การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับ ส่วนสกัดย่อย SF1-SF10 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง 36
ตารางที่ 3-5	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสาบแร้งสาบกา 39
ตารางที่ 3-6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.1-F8.14 40
ตารางที่ 3-7	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.14 42
ตารางที่ 3-8	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสาบแร้งสาบกา 44
ตารางที่ 3-9	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทจากใบสาบแร้งสาบกา 46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันยาจากสมุนไพร (Phytopharmaceuticals หรือ Herbal drugs) ซึ่งเป็นยาจากสมุนไพรรักษาโรค เตรียมได้จากสารสกัดจากพืชได้กลายเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการรักษาสุขภาพภายใต้แนวความคิดของการพัฒนาอย่างยั่งยืนและใช้ทรัพยากรอย่างระมัดระวัง หลายคนที่หันมาบริโภคยาสมุนไพรเพราะค้นพบว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ และไม่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพมากนัก อีกทั้งราคาก็ถูกกว่ายาแผนปัจจุบันอย่างมาก แม้แต่หน่วยงานของรัฐฯ เช่น องค์การเภสัชกรรมก็ได้ริเริ่มผลิตยาจากสมุนไพรออกมาจำหน่ายเอง แต่อย่างไรก็ตามปัญหาอย่างหนึ่งของการพัฒนาสมุนไพรจากยาแผนโบราณหรือยาพื้นบ้าน คือการขาดข้อมูลที่เป็นผลวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในด้านการวินิจฉัยโรคและการแสดงฤทธิ์ที่จะทำให้ยาสมุนไพรเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นความรู้เกี่ยวกับสมุนไพรในแง่มุมต่างๆ อาทิ ความรู้เกี่ยวกับองค์ประกอบสำคัญในสมุนไพร การแยกสกัด การหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ และการศึกษากลไกของสารในระดับโมเลกุล จึงมีความสำคัญยิ่งในการศึกษาวิจัยสมุนไพร การพัฒนาการผลิตยาสมุนไพรจะช่วยลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศเป็นการประหยัดงบประมาณและอาจนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศได้เพิ่มความสนใจกับยาสมุนไพรไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพ และมีวัฒนธรรมทางสุขภาพและภูมิปัญญาประจำท้องถิ่น โดยเฉพาะพรรณพืชสมุนไพรและการแพทย์พื้นบ้าน เป็นการใช้สมุนไพรเพื่อป้องกันโรคและบำบัดรักษาเมื่อเกิดโรค ซึ่งเป็นศาสตร์อันทรงคุณค่าที่บรรพบุรุษได้ค้นคว้าโดยใช้ประสบการณ์สั่งสมและสืบทอดต่อกันมาเป็นเวลาอันยาวนาน ดังนั้นการวิจัยพัฒนาการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรและตำรับยาพื้นบ้านของไทย จึงมีความจำเป็นสำหรับประเทศไทยในการพึ่งพาตนเองระยะยาว

จากการสำรวจเก็บข้อมูลเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยในป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอชลบุรี จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ของมูลนิธิชัยพัฒนา โดยมีหน่วยงานต่างๆ เข้ามาดูแล และการสำรวจนี้ทำร่วมกับหมอยาสมุนไพรพื้นบ้านในเขตบ้านอ่างเอ็ด อำเภอชลบุรี จังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีประสบการณ์ในการใช้สมุนไพรรักษาโรคมานาน พบว่าพืชสมุนไพรในป่าชุมชนนี้ที่มีคุณสมบัติในการลดไข้ แก้ไข้และแก้ไอเสบ ที่อยู่ในตำรายาของหมอยาพื้นบ้านแถบนี้ มีตัวอย่างเช่น ต้นสลัด ต้นปลาไหลเผือก ต้นโคลงเคลง ต้นระย่มน้อย ต้นมะฮึก ต้นพระยาตาบหัก ต้นขนแสนห้า เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้ได้หลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านเหล่านี้ และเป็นข้อมูลที่ถ่ายทอดให้กับโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด เพื่อจัดให้เป็นศูนย์การเรียนรู้ตามพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี นอกจากนี้อาจได้สารที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษา

โรคต่างๆจากการอักเสบเหล่านี้ต่อไป จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบที่อยู่ในใบของพืชสมุนไพรมะนาวานี้ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำ ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำ คณณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะการศึกษาผลของส่วนสกัดหยาบและสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบที่ได้จากพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดหรือสารออกฤทธิ์ด้านอักเสบจากพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำ

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อแยกสกัดสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากส่วนสกัดจากพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำบางชนิด ในป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอชลุง จังหวัดจันทบุรี ที่มีฤทธิ์ด้านอักเสบที่ดี
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์ในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

นำสมุนไพรมะนาวาน้ำในเขตป่าบริเวณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด อำเภอชลุง จังหวัดจันทบุรี ที่มีฤทธิ์ด้านอักเสบที่ดี มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 95 % จากนั้นสกัดแยกส่วนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยไปแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในลักษณะ activity-guided isolation และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์บางชนิดในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide

1.4 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.4.1 ข้อมูลพืชสมุนไพรมะนาวาน้ำที่ใช้ในการศึกษา

สมุนไพรมะนาวาน้ำที่ใช้ศึกษานี้เป็นสมุนไพรมะนาวาน้ำบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) ตำบลตกรวม อำเภอชลุง จังหวัดจันทบุรี ที่ถูกใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาอาการแก้ไข้ แก้ปวด และแก้ฝี ตามคำบอกเล่าของหมอสมชาย ใจสิทธิ์ และหมอประเทือง นิสัยชื่อ ดังนี้

1.4.1.1 สาบแร้งสาบกา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ageratum conyzoides* Linn. ชื่อวงศ์ : Compositae ชื่ออื่น : สาบแร้งสาบกา เทียนแม่ฮาง (เลย) หญ้าสาบแฮ้ง (เชียงใหม่) หญ้าสาบแร้ง (ราชบุรี) ตับเสือเล็ก (สิงห์บุรี)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : เป็นพรรณไม้ล้มลุกที่มีอายุเพียงหนึ่งปี ลำต้นจะตั้งตรงแตกกิ่งก้านสาขา ทั้งต้นจะมีขนปกคลุมอยู่ และเมื่อเด็ดมาขยี้ดมจะมีกลิ่นเฉพาะตัว ลำต้นสูงประมาณ 1-2 ฟุต เป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ แต่ตรงส่วนยอดใบจะเรียงสลับกัน ลักษณะของใบเป็นรูปมนรีปลายแหลม โคนใบเว้าคล้ายรูปหัวใจ ขอบใบเป็นจักฟันเลื่อย พื้นใบมีสีเขียว ก้านใบมีขนปกคลุมตลอดทั้งก้าน ออกดอกเป็นช่ออยู่ตรงส่วนยอดของต้น ดอกมีสีม่วงน้ำเงินหรือขาว ผลแห้งไม่แตก (รูปที่ 1-1)

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



รูปที่ 1-1 ลำต้น ใบ และดอกของต้นสาบแร้งสาบกา

(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 สิริธิกรกุล, 2548)

การอักเสบเกิดขึ้นเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของสิ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายไม่ให้ลุกลามไปยังบริเวณอื่นนอกจากนี้ เพื่อเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมและเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหรือตายจากการเข้ามาของสิ่งแปลกปลอมต่างๆ เพื่อนำไปสู่กระบวนการซ่อมแซมต่อไป หากไม่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น ร่างกายจะไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกไปได้ เนื้อเยื่อจะเกิดการบาดเจ็บโดยที่ไม่มีการซ่อมแซม ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อนั้นๆผิดปกติไป อย่างไรก็ตามกระบวนการอักเสบมีผลเสียเกิดขึ้นได้ด้วยเช่นกัน หากเกิดการอักเสบมากเกินไป หรือเกิดการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นเวลานาน จะเกิดการทำลายเนื้อเยื่อทำให้เกิดการทำงานของเนื้อเยื่อนั้นผิดปกติได้เช่นกัน (พิริยุทธ สิริธิไชยากุล, 2552)

สารสื่อกลางในการอักเสบ (inflammatory mediators) ชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลดิน E2 ถูกหลั่งออกจากเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์แมโครฟาจ 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) และอีมีม (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 (Tunctan, 2003)

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

มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของส่วนสกัดจากส่วนต่างๆของพืชที่สามารถต้านการอักเสบโดยการลดปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์และ 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 ลดลงเนื่องจากสารสกัดไปมีผลยับยั้งการสลายตัวของ I κ B ที่เป็นตัวยับยั้งของ NF- κ B โดย NF- κ B เป็น transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ทำให้การจับของ NF- κ B 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* ซึ่งเป็นพืชที่ใช้น้ำในยาพื้นบ้านของ

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- κ B ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น NF- κ B 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) ตำบลตกรม อำเภอลุง จังหวัดจันทบุรี เป็นพืชสมุนไพรในท้องถิ่นที่ใช้รักษาโรคในทางการแพทย์พื้นบ้าน ซึ่งเป็นภูมิปัญญาของสังคมไทยที่สืบทอดกันมานาน แต่พืชบางชนิดยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เช่น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา สารที่ออกฤทธิ์ หรือพิษวิทยา ดังนั้นการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรเหล่านี้ จะมีความสำคัญในการเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ รองรับการใช้ประโยชน์ของพืชเหล่านี้ เพื่อการพึ่งพาตนเองในระยะยาว โดยปัจจุบันมีความพยายามศึกษาหาแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านอักเสบจากพืชสมุนไพรในท้องถิ่นต่างๆ เช่น

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ (2549) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Retz.) Swartz), ผักต้ว (*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 ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดจากผักต้วแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด 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 อมรเลิศพิศานต์ (2553) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารโดยกลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลอง โดยทำการสกัดเหง้าของเนระพูสีไทย (*Tacca chantrieri* Andre) หรือค้ำควาดำ ด้วยเอทานอล นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบในหนูขาวที่ชักนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วย อินโดเมธาซิน (indomethacin) เอทานอล และความเครียด นอกจากนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวในการยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารต่อปริมาณสารเมือก และเฮกโซซามีน (hexosamine) ในกระเพาะอาหาร ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดเอทานอลของเนระพูสีไทยขนาด 125 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารในทุกการทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และสามารถยับยั้งการหลั่งกรดได้บางส่วน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวยังช่วยรักษาปริมาณเมือก และเฮกโซซามีนในกระเพาะอาหารไม่ให้ถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์อีกด้วย ผลการศึกษาครั้งนี้ให้หลักฐานที่สนับสนุนการใช้เนระพูสีไทยบรรเทาอาการปวดท้องเนื่องจากแผลในกระเพาะอาหารตามที่ระบุไว้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน 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 (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 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด 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 เควอซิติน (quercetin) และเคมเพอรอล (kaempferol) ในปริมาณตั้งแต่ 0.3 ถึง 143 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักสด โดยพืชที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด คือ ผักหวานบ้าน (*Sauropus androgynus* (L) Merr.) และพืชที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด 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) ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านการอักเสบและความเป็นพิษของสารสกัดน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพรจีน 14 ชนิด รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การทดสอบใน (*Saccharomyces cerevisiae*)

ในขณะที่ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลใช้วิธี DPPH ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดจากพืชถูกประเมินโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ 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*) แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบที่สูง โดยการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และTNF- α ด้วยค่าการค้นพบนี้ชี้ให้เห็นพืชสมุนไพรบางชนิดที่ถูกศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นแหล่งที่ดีของสารต้านอนุมูลอิสระ

Ravipati และคณะ (2012) ทำการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำและเอทานอลของพืชสมุนไพรจีน 44 ชนิด รวมทั้งตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวม ผลจากการศึกษาพบว่า *Ligustrum lucidum*, *Paeonia suffruticosa*, *Salvia miltiorrhiza*, *Sanguisorba officinalis*, *Spatholobus suberectus*, *Tussilago farfara* และ *Uncaria rhyncophylla* มีสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์รวมที่สูง ซึ่งมีเป็นความสัมพันธ์ที่ดับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชเหล่านี้ ผลการทดลองพบว่าปริมาณสารฟีนอลและฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร พืชที่ถูกศึกษาบางชนิดน่าจะแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ได้

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมพืชสมุนไพร

ทำการเก็บพืชสมุนไพรต้นสบรั่งสบากาจากบริเวณป่าโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี ซึ่งที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ดี นำพืชมาตัดใบ และชั่งน้ำหนักใบสดได้ประมาณ 10 กิโลกรัม ล้างน้ำทำความสะอาด นำใบสดมาอบแห้งก่อนนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยได้ใบแห้งประมาณ 1 กิโลกรัม จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

2.2 การเตรียมส่วนสกัดเอทานอลของใบสบรั่งสบากา

นำใบสบรั่งสบากาที่บดละเอียดทั้งหมด (985.2 กรัม) แบ่งเป็น 5 ส่วนใส่ถุงผ้า จำนวน 5 ถุง ใส่ลงในโหลแก้วที่มีสารละลายเอทานอล 95 % ในอัตราส่วน 1 : 10 แช่ผงพืชในสารละลายเอทานอล 95 % เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการเขย่าขวดโหลที่ใส่ถุงผ้าของของพืช วันละ 3 เวลา เมื่อครบเวลากรองสารละลายเอทานอลที่ได้ด้วยเครื่องดูดความดันที่อุณหภูมิห้องโดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จากนั้นนำส่วนผงพืช ใส่ในถุงกรองเพื่อสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้งๆ ละ 5 วัน ในอัตราส่วนเดิม แล้วนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศ ชูดเก็บส่วนสกัดและจัดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด ได้ส่วนสกัดเอทานอลของใบสบรั่งสบากา จำนวน 193.7 กรัม และนำส่วนสกัดเอทานอลของใบสบรั่งสบากาไปวิเคราะห์ NMR

ทำการสกัดแยกส่วนสกัดเอทานอลของใบสบรั่งสบากา โดยนำส่วนสกัดเอทานอลของใบสบรั่งสบากามา 193.7 กรัม ละลายด้วยเอทานอล จากนั้นทำการสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต จะได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ตามลำดับ (ดังแผนภาพในรูปที่ 1) ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C โดยไม่ให้โดยแสง เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบต่อไป

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านต้านอักเสบของส่วนสกัด

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมคโครฟาจ สายพันธุ์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี 10% FBS (ปริมาตร/ปริมาตร) และนำไปบ่มในตู้อบลมเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂)

ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่มี CO₂ 5 % (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อเซลล์เจริญเติบโตจนเกือบเต็มพื้นผิวของภาชนะ ทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ โดยการขูดเก็บเซลล์ (cell scraping)

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess

ปฏิกิริยา Griess เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของปริมาณไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไนโตรที่เป็นผลผลิตที่เกิดจากการออกซิเดชันของไนตริกออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเอนไซม์ iNOS โดยในขั้นตอนแรก ไนโตรที่จะทำปฏิกิริยากับ sulfanilamide ในสารละลายที่เป็นกรดได้เป็นสารตัวกลางที่เป็นเกลือ diazonium ซึ่งสารตัวกลางนี้จะทำปฏิกิริยากับ N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride (NED) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น azo compound เป็นสารสีชมพูที่มีความเสถียร ดังนั้นปริมาณไนโตรที่จึงเป็นดัชนีที่บ่งบอกกิจกรรมของเอนไซม์ iNOS ทำการทดลองโดยการแบ่งเซลล์ลงจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10⁵ 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 ทำปฏิกิริยากับ สารละลาย Griess [1% N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 µL และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 nm ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนโตรที่ (NaNO₂) ที่ความเข้มข้น 0-50 µM

2.4 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay

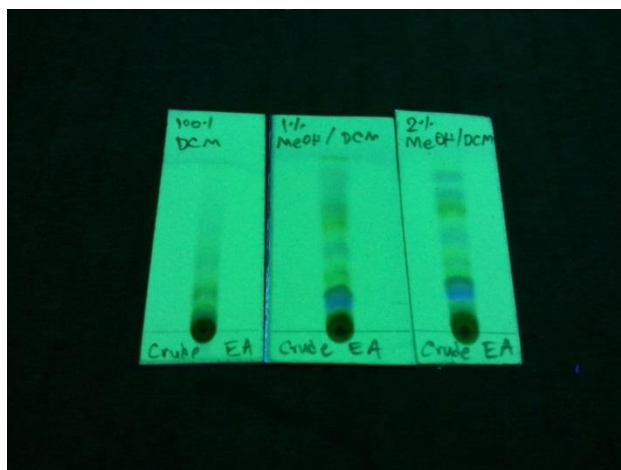
ทำการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์กันแบนแบบ 24 หลุม จำนวน 1.5×10⁵ เซลล์ต่อหลุม และบ่มเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเซลล์ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) นานประมาณ 18-24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์เกาะผิวภาชนะ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนสกัดย่อยต่างๆของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งที่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และไม่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หลุมละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดย MTT จะสามารถผ่านเข้าเซลล์ไปเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ซัคซิเนตดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต และเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็นผลึกฟอร์มazan (Formazan) ที่มีสีม่วง (รูปที่ 3-1) จากนั้นเมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตรหลุมละ 500 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan นำไปบ่มพร้อมเขย่านาน 5 นาที จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ปิเปตต์สารละลายฟอร์มazanจากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในไม

โครเพลทแบบ 96 หลุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ซึ่งปริมาณฟอร์มาแซนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด

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

2.5 การแยกสารของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เริ่มจากการทำ TLC เพื่อวิเคราะห์หาสถานะของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้แยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ทำการตัดแผ่น TLC (silica gel aluminium plate P254) ให้มีขนาด 4x4 เซนติเมตร จุดสารสกัดที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีลงบนแผ่น TLC (ควรจุดให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1.5 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางของจุดไม่ควรเกินกว่า 2 มิลลิเมตร) รอให้ระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ที่จุดสารเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายต่างๆ โดยให้ตำแหน่งของจุดอยู่เหนือตัวทำละลาย ภายในภาชนะแก้วควรใส่กระดาษกรองและปิดฝาภาชนะให้สนิท เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนถึงขอบบนให้แผ่น TLC ออก แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มืดเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารและวิเคราะห์แยกสารต่อไป แสดงดังในรูปที่ 2-1



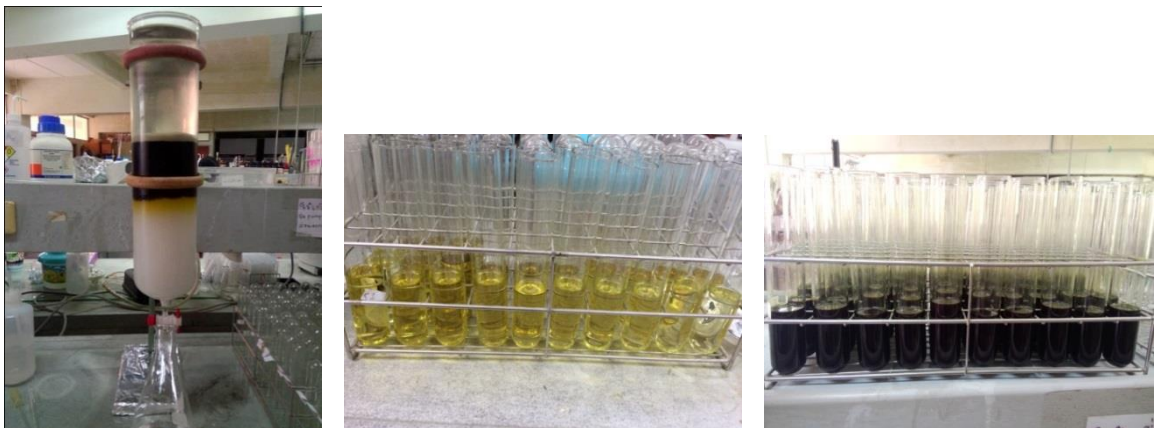
รูปที่ 2-1 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel 60 (0.063-0.200 mm) 1.07734.2500 (MERCK) และใช้ตัวทำละลายดังนี้ต่อเนื่องกัน

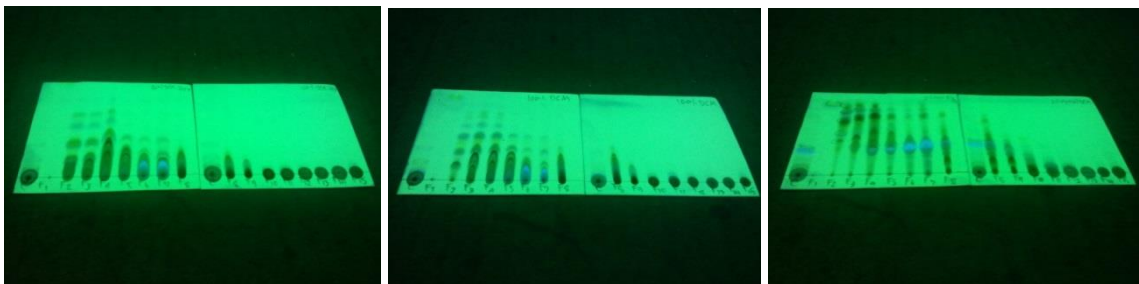
50% Dichloromethane:Hexane	จำนวน	1	ลิตร
80% Dichloromethane:Hexane	จำนวน	1	ลิตร
100% Dichloromethane	จำนวน	3	ลิตร
1% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	2	ลิตร

2% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	5	ลิตร
5% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	2	ลิตร
10% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	2	ลิตร
20% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	2	ลิตร
50% Methanol: Dichloromethane	จำนวน	4	ลิตร

จากนั้นนำเก็บส่วนสกัดย่อยหลอดละ 30 ml ตามรูปที่ 2-2 ก่อนนำมารวมกันเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 15 ส่วนและนำไปทำ TLC ในระบบตัวทำละลายต่างๆ ดังแสดงผลในรูปที่ 2-3



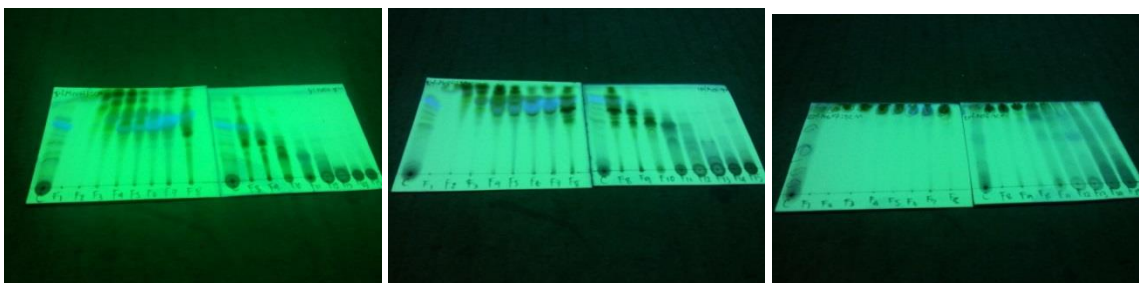
รูปที่ 2-2 คอลัมน์โครมาโตกราฟี และส่วนสกัดย่อยที่เก็บได้



80%DCM:Hex

100%DCM

2%MeOH:DCM



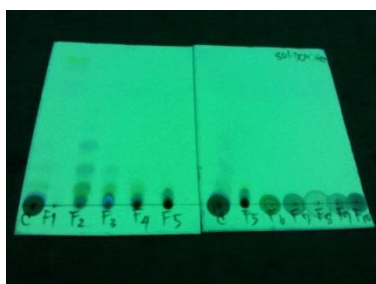
5%MeOH:DCM

10%MeOH:DCM

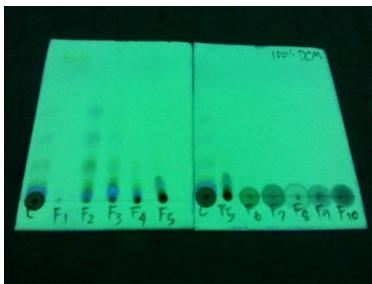
20%MeOH:DCM

รูปที่ 2-3 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 15 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

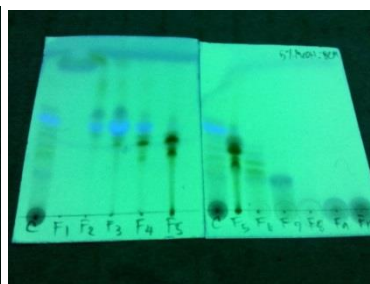
จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยทั้ง 15 ส่วนไปวิเคราะห์ NMR และรวมส่วนสกัดได้ 10 ส่วน ทำการวิเคราะห์ TLC ในระบบตัวทำละลายต่างๆ ดังแสดงผลในรูปที่ 2-4 และทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องดูดสุญญากาศ และวิเคราะห์ NMR ของส่วนสกัดย่อยทั้ง 10 แสดงผลในภาคผนวก ก



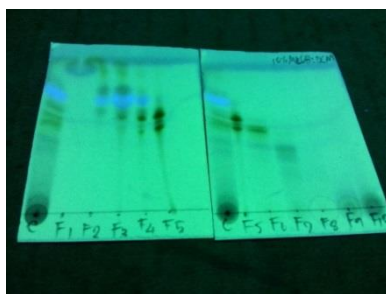
80%DCM:Hex



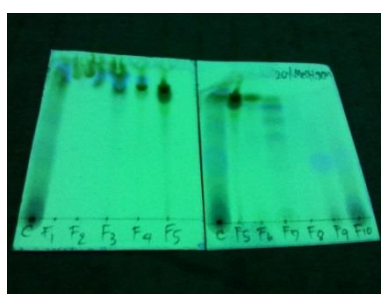
100%DCM



5%MeOH:DCM



10%MeOH:DCM

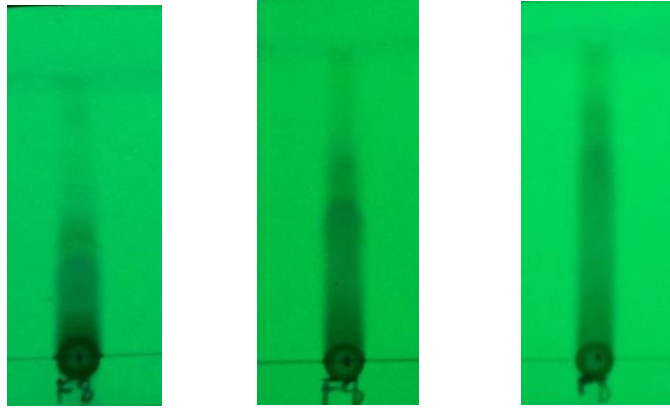


20%MeOH:DCM

รูปที่ 2-4 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 10 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

2.6 การแยกสารของส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

การวิเคราะห์หาสถานะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เฟสเคลื่อนที่ที่จะใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 70:30, 60:40 และ 50:50 และระบบตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:99, 5:95 และ 10:90 (รูปที่ 2-5) พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่แยกสารได้ดี คือระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนที่อัตราส่วน 50:50 ดังนั้นในการแยกส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ เอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 50:50

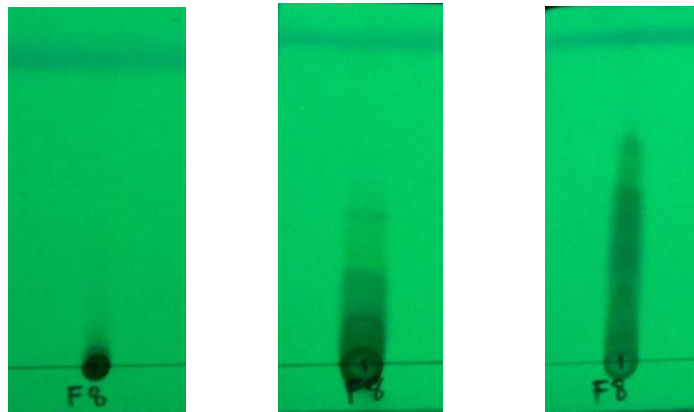


เอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน

50:50

60:40

70:30



เมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน

1:99

5:95

10:90

รูปที่ 2-5 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบ
สาบแร้งสาบกา

นำส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา แยกในแฟลชคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร) ใช้ซิลิกา (Silica gel) ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตรเป็นเฟสคงที่ โดยแช่ซิลิกาเจลในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 50:50 จนกระทั่งซิลิกาเจลอิมัตว จากนั้นบรรจุซิลิกาเจลในแฟลชคอลัมน์โดยบรรจุซิลิกาให้มีความสูงประมาณ 14 ถึง 15 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่

นำส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา น้ำหนัก 8.5 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนประมาณ 10 มิลลิลิตรและตัวทำละลายเมทานอลประมาณ 30 มิลลิลิตรจนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจล 12.75 กรัม (ใช้ซิลิกาเจลประมาณ 1.5 ถึง 2 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและตัวทำละลายเมทานอลที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้ว

บรรจุลงแฟลชคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 50:50 และปรับผิวหน้าให้เรียบ

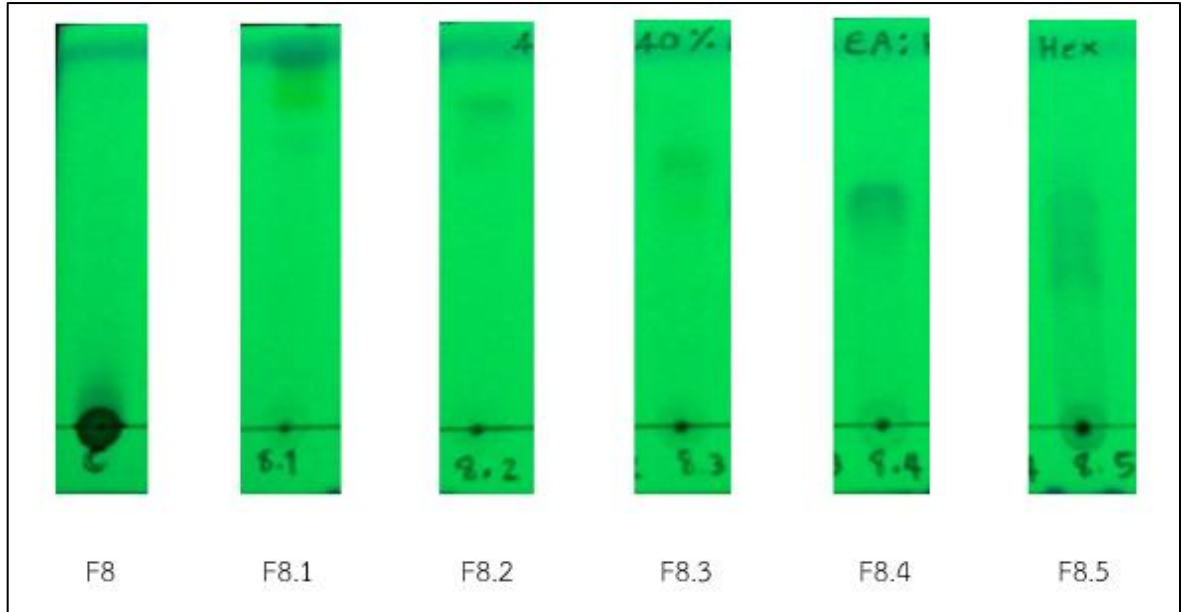
ทำการแยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ ใช้น้ำด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 50:50 ปริมาตร 9,000 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 40 มิลลิลิตร จำนวน 204 หลอด ใช้น้ำด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 100:0 ปริมาตร 7,000 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 100 มิลลิลิตร จำนวน 69 ขวด ใช้น้ำด้วยสารละลายเมทานอล : เอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 20:80 ปริมาตร 4,000 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 125 มิลลิลิตร จำนวน 30 ขวด และใช้น้ำด้วยสารละลายเมทานอล : เอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 50:50 ปริมาตร 5,000 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 125 มิลลิลิตร จำนวน 39 ขวด ตามลำดับ โดยส่วนสกัดย่อยที่ได้จะนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แล้วทำการรวมสารสกัดย่อยที่คาดว่าจะเป็นส่วนชนิดเดียวกัน ได้สารทั้งหมด 14 ส่วนสกัดย่อย (F8.1 ถึง F8.14) ดังแสดงในรูปที่ 2-6 นำส่วนสกัดย่อยที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเครื่อง NMR ดังแสดงผลในภาคผนวก ก และทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่อไป

ขั้นต่อไปทำการแยกสารเคมีจากส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาเริ่มด้วยการวิเคราะห์หาสถานะของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี เฟสเคลื่อนที่ที่จะใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 40:60, 60:40 และ 80:20 และระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน : เฮกเซนในอัตราส่วน 100:0, 90:10 และ 80:20 และระบบตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 5:95 (รูปที่ 2-7) พบว่า ที่ระบบตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 5:95 สามารถแยกสารได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากค่า R_f ค่อนข้างสูง จึงต้องลดความเข้มข้นของระบบตัวทำละลาย ดังนั้นในการแยกส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ เมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98

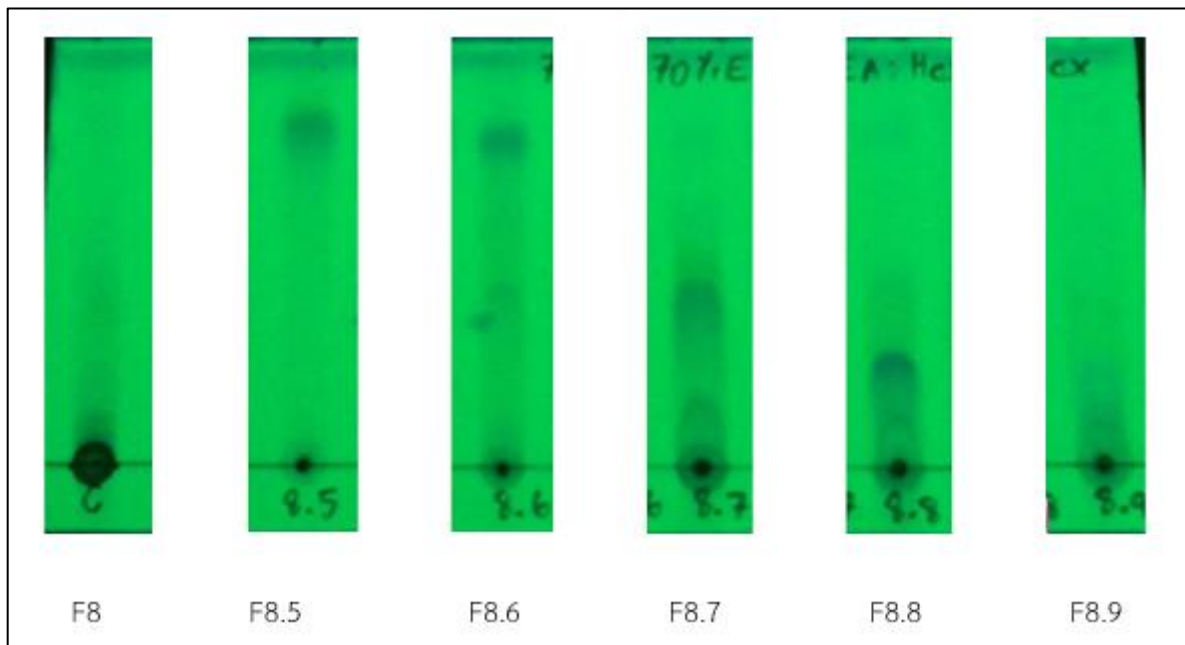
นำส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา แยกในแฟลชคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 125 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร) ใช้ซิลิกา (Silica gel) ขนาด 0.0400-0.0630 มิลลิเมตรเป็นเฟสคงที่ โดยแช่ซิลิกาเจลในตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98 จนกระทั่งซิลิกาเจลอิมัว จากนั้นบรรจุซิลิกาเจลในแฟลชคอลัมน์โดยบรรจุซิลิกาให้มีความสูงประมาณ 14 ถึง 15 เซนติเมตร และใช้ความดันช่วยในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่

นำส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา น้ำหนัก 234 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนประมาณ 1 มิลลิลิตร ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตประมาณ 4 มิลลิลิตร และตัวทำละลายเมทานอลประมาณ 3 มิลลิลิตรจนกระทั่งส่วนสกัดละลายหมด แล้วนำไป

ผสมกับซิลิกาเจล 351.2 มิลลิกรัม (ใช้ซิลิกาเจลประมาณ 1.5 ถึง 2 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และตัวทำละลายเมทานอลที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้วบรรจุลงแฟลชคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98 และปรับผิวหน้าให้เรียบ

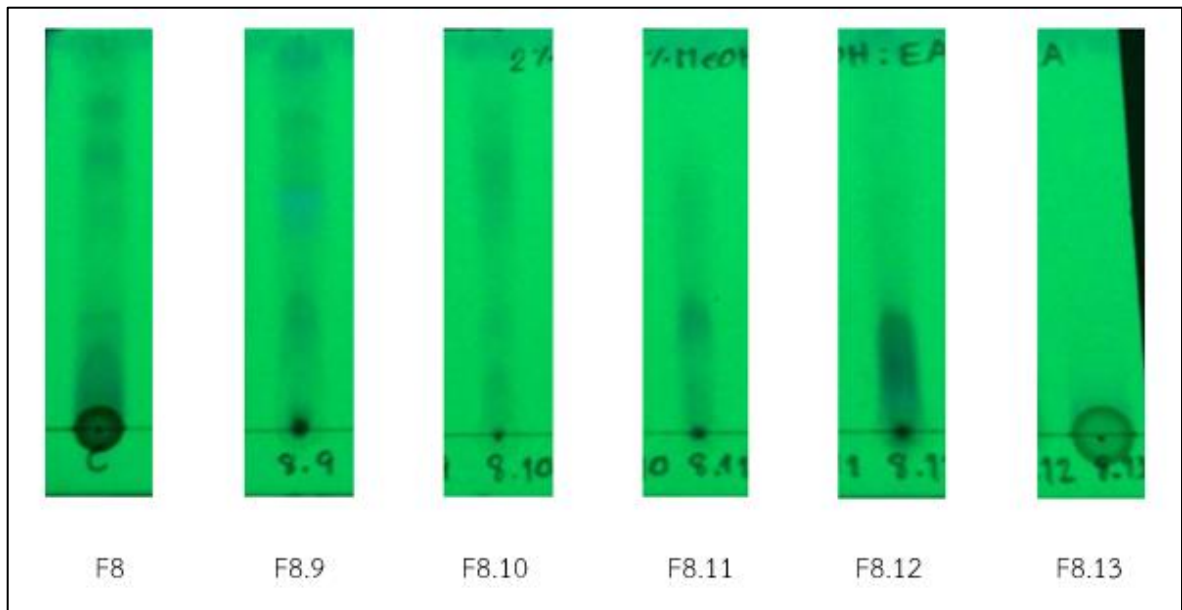


สภาวะเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 40:60

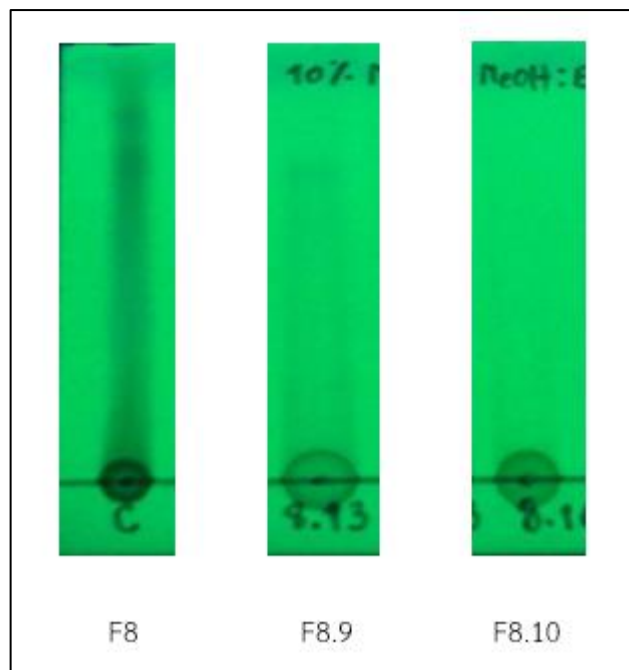


สภาวะเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน 70:30

รูปที่ 2-6 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบ
สาบแร้งสาบกา



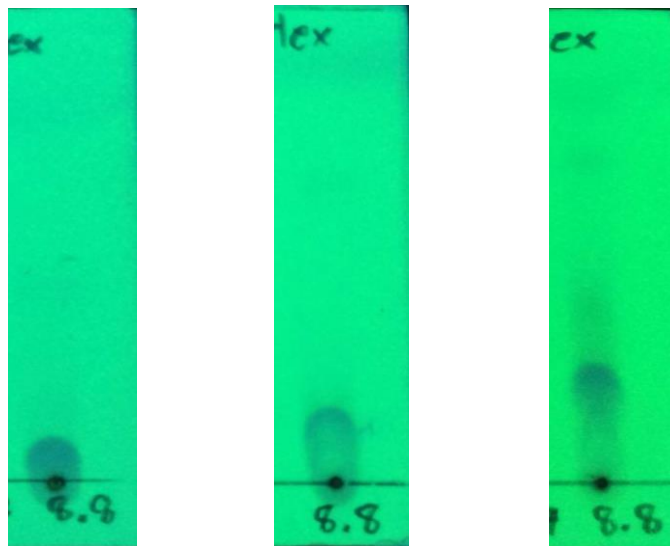
ที่สภาวะเมทานอล : เอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 2:98



ที่สภาวะเมทานอล : เอทิลอะซิเตตในอัตราส่วน 10:90

รูปที่ 2-6 (ต่อ) โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของ ใบสาบแร้งสาบกา

ทำการแยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution คือ ใช้น้ำมันระเหยง่ายละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 2:98 ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 62 หลอด ใช้น้ำมันระเหยง่ายละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 5:95 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 45 หลอด ใช้น้ำมันระเหยง่ายละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 20:80 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร จำนวน 18 หลอด และใช้น้ำมันระเหยง่ายละลายเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 50:50 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บส่วนสกัดย่อยที่เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ในขวดแก้วประมาณ 180 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยส่วนสกัดย่อยที่ได้จะนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แล้วทำการรวมสารสกัดย่อยที่คาดว่าจะเป็นส่วนชนิดเดียวกัน ได้สารทั้งหมด 6 ส่วนสกัดย่อย (F8.8-1 ถึง F8.8-6) นำส่วนสกัดย่อยที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเครื่อง NMR ดังแสดงผลในภาคผนวก ก



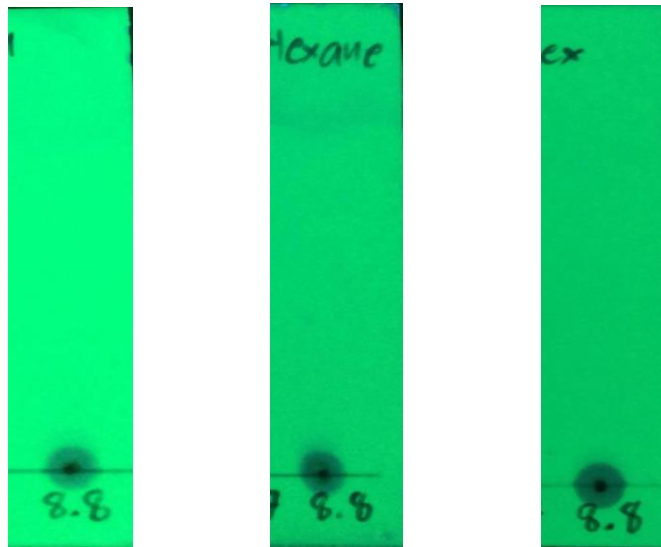
ที่สภาวะเอทิลอะซิเตต : เฮกเซนในอัตราส่วน

40:60

60:40

80:20

รูปที่ 2-7 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบ
สาบแร้งสาบกา



ที่สภาวะไดคลอโรมีเทน : เฮกเซนในอัตราส่วน

100:0

90:10

80:20



ที่สภาวะเมทานอล : ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 5:95

รูปที่ 2-7 (ต่อ) โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของ ใบสบงร้างสบงกา

2.7 การแยกสารของส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสบงร้างสบงกามาละลายในเมทานอล (HPLC grade) จากนั้นนำมาแยกโดยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Purospher STAR, RP-18 endcapped (5 ไมโครเมตร) วิเคราะห์หาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมโดยใช้ระบบ isocratic elution เฟส

เคลื่อนที่ที่ใช้ คือ สารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 และ 100:0 พบว่าที่สารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 90:10 เป็นช่วงที่แยกสารได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ สารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 90:10 โดยใช้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ คือ 1.5 มิลลิลิตร ต่อนาที ตรวจวัดการแยกสารที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร โดยทำการล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 100:0 เป็นเวลา 30 นาที และใช้สารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 90:10 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย F9 ที่ละลายด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร มาฉีดเข้าอินเจคเตอร์ (injector) และชะด้วยสารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 90:10 เป็นเวลา 20 นาที ทำการเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วนสกัดย่อย จากนั้นล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายเมทานอล : น้ำในอัตราส่วน 100:0 และทำการเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วนสกัดย่อย ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย (F9.1 ถึง F9.4) นำส่วนสกัดย่อยที่ได้ไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วยเครื่อง NMR และทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบและความมีชีวิตรอดของเซลล์ต่อไป

2.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลเป็นข้อมูลที่เป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ครั้งทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธีวิเคราะห์ Student's t-test และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 น้ำหนักของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา

น้ำหนักและร้อยละของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่ได้แสดงในตารางที่ 3-1 โดย ส่วนสกัดย่อยน้ำที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งสูงสุด มีค่าเท่ากับ 8.61 ส่วนสกัดย่อยเฮกเซนที่มีร้อยละของน้ำหนักแห้งต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 5.02

ตารางที่ 3-1 น้ำหนักและร้อยละส่วนสกัดน้ำและเอทานอล

ส่วนสกัด	น้ำหนักของส่วนสกัด (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
ส่วนสกัดเอทานอล	193.7	19.66
ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน	49.5	5.02
ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต	60.8	6.17
ส่วนสกัดย่อยน้ำ	84.8	8.61

3.2 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดจากใบสาบแร้งสาบกา

นำส่วนสกัดของพืชทั้งหมด มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT และฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่เพาะเลี้ยงที่สัมผัสกับ LPS พบว่าส่วนสกัดทุกส่วนมีความสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น (ตารางที่ 3-2) แต่มีประสิทธิรูปที่แตกต่างกัน โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.00 ± 8.97 , 8.27 ± 0.21 , และ 107.68 ± 25.32 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และน้ำ ตามลำดับ โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ aminoguanidine (สารยับยั้งเอนไซม์ iNOS) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 50 μM สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 58.22 %

ตารางที่ 3-2 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนจากใบสบาบร้างสาบกา

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)	% ความมีชีวิต รอดของเซลล์	% การยับยั้งการ ผลิตไนตริก ออกไซด์	IC ₅₀ ของการยับยั้ง การผลิตไนตริกออก ไซด์ (ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร)
ส่วนสกัดย่อย เฮกเซน	3.125	97.60±1.05	(-)11.68±12.75	49.41 ± 20.14
	6.25	99.22±1.57	(-)21.34±18.32	
	12.5	98.73±0.34	(-)16.90±15.01	
	25	99.67±0.35	25.84±15.45	
	50	100.46±0.54	71.03±10.57	
ส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตต	3.125	96.90±1.40	16.14±3.55	8.52 ± 0.48
	6.25	98.25±0.86	29.85±4.70	
	12.5	100.06±1.45	73.55±2.37	
	25	100.60±1.31	95.86±1.35	
	50	99.56±1.93	98.56±1.24	
ส่วนสกัดย่อย น้ำ	3.125	96.47±1.99	0.25±7.77	103.54 ± 26.32
	6.25	96.41±1.93	(-)6.14±11.83	
	12.5	95.72±2.15	9.01±2.56	
	25	95.39±1.93	28.69±4.94	
	50	95.91±1.97	41.72±3.04	
เซลล์ควบคุม		100±0.00		
LPS		95.70±1.99	0.00±0.00	
AG (50 µM)			58.22±2.08	

จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสาบกาซึ่งเป็นส่วนสกัดที่สามารถยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุดโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อย 10 ส่วน (F1-F10) ดังแสดงร้อยละน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยในตารางที่ 3-3 จากนั้นนำส่วนสกัดทั้ง 10 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT เพื่อแยกสารตามเทคนิค bioassay-guided isolation และแสดงผลในตารางที่ 3-4

ตารางที่ 3-3 ร้อยละน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของใบสบาดั้ง
 สาบกา

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (กรัม)	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง
F1	0.23	0.38
F2	4.65	7.75
F3	2.94	4.9
F4	1.69	2.81
F5	0.54	0.9
F6	5.58	9.3
F7	3.28	5.46
F8	8.62	14.36
F9	15.0	25.0
F10	15.58	25.96

ตารางที่ 3-4 การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย SF1-SF10 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

ส่วนสกัดย่อย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ ผลิตไนตริกออกไซด์	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด
Control	-	-	100.00
LPS	1	0.00	77.87
F1	10+LPS	4.26	91.13
	50+LPS	2.58	95.39
	50	-	103.05
F2	10+LPS	75.88	96.05
	50+LPS	98.81	9.13
	50	-	3.92
F3	10+LPS	77.89	68.79
	50+LPS	97.64	12.64
	50	-	4.10
F4	10+LPS	89.77	94.62
	50+LPS	99.09	63.61
	50	-	35.30
F5	10+LPS	94.33	91.66
	50+LPS	98.48	6.18
	50	-	6.67
F6	10+LPS	97.10	94.36
	50+LPS	95.76	12.42
	50	-	10.91

ส่วนสกัดย่อย	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ ผลิตไนตริกออกไซด์	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด
F7	10+LPS	93.74	80.26
	50+LPS	96.21	9.69
	50	-	9.46
F8	10+LPS	34.91	79.40
	50+LPS	90.99	94.88
	50	-	100.91
F9	10+LPS	43.12	86.37
	50+LPS	86.89	100.84
	50	-	99.91
F10	10+LPS	28.05	76.60
	50+LPS	52.35	90.67
	50	-	100.50

3.3ฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา

ทำการแยกสารจากส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิคฟลอคคัลมันโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์การแยกสารด้วยเทคนิค TLC ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 14 ส่วนสกัด (F8.1 ถึง F8.14) พบว่า ส่วนสกัดย่อย F8.13 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และส่วนสกัดย่อย F8.5 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด (ตารางที่ 3-5)

เมื่อให้เซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.14 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS พบว่า ส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.8 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ซึ่งส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 มีการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3-6) โดยส่วนสกัดย่อย F8.4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร เท่ากับ 95.45 ± 0.82 และ 86.35 ± 1.86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสกัดย่อย F8.5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 95.94 ± 1.87 และ 89.70 ± 1.65 เปอร์เซ็นต์ และส่วนสกัดย่อย F8.6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 88.88 ± 0.92 และ 96.44 ± 0.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนส่วนสกัดย่อย F8.9 ถึง F8.14 สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 3-6) ส่วน aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 41.59 ± 5.42 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.14 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ aminoguanidine ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS พบว่า เซลล์มีความมีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นส่วนสกัดย่อย F8.3, F8.4, F8.5, F8.6, F8.8 และ F8.11 ส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มี LPS เซลล์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดอยู่ที่ 69.43 ± 19.39 , 6.38 ± 0.35 , 7.09 ± 0.09 , 6.27 ± 0.25 , 40.00 ± 2.31 และ 76.42 ± 3.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีส่วนสกัดย่อย ไม่มี LPS เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์อยู่ที่ 49.07 ± 3.44 , 6.19 ± 0.60 , 7.65 ± 0.71 , 6.94 ± 0.34 , 70.40 ± 5.52 และ 40.01 ± 2.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3-7)

เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ จะเห็นว่าส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.8 เป็นส่วนสกัดย่อยที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูง แม้ว่าส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดที่ต่ำ จึงได้นำส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.8 มาทำการทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์และการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย F8.3, F8.7 และ F8.8 ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นเดิม คือ 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ F8.3, F8.7 และ F8.8 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ LPS พบว่า F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว แต่ไม่สามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยส่วนสกัดย่อย F8.4 สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 41.29 ± 16.03 และ 95.91 ± 1.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน F8.3, F8.7 และ F8.8 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยส่วนสกัด F8.3, F8.7 และ F8.8 มี

ความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีไม่แตกต่างจากผลในรูปที่ 3-1 ส่วน aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 39.53 ± 5.86 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3-5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตตจากใบสบาบแห้งสบากา

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
F8.1	20.5	0.24
F8.2	9.1	0.11
F8.3	11.4	0.13
F8.4	58.3	0.68
F8.5	6.0	0.07
F8.6	205.1	2.41
F8.7	345.4	4.06
F8.8	248.6	2.92
F8.9	261.6	3.08
F8.10	55.9	0.66
F8.11	305.6	3.60
F8.12	1,347.8	15.86
F8.13	1,935.3	22.77
F8.14	795.8	9.36
รวม	5,606.4	65.95

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.14 เทียบกับส่วนสกัดย่อย F8 เริ่มต้น 8,500 มิลลิกรัม

ตารางที่ 3-6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับ ส่วนสกัดย่อย F8.1-F8.14

สารทดสอบ		LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การผลิตไนตริกออก ไซด์
control		-	-
LPS		+	0.00 ± 0.00
F8.1	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	10.39 ± 3.91
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	95.86 ± 2.11
F8.2	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	26.02 ± 8.36
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	97.21 ± 0.62
F8.3	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	47.19 ± 4.84
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	96.96 ± 0.42
F8.4	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	95.45 ± 0.82
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	86.35 ± 1.86
F8.5	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	95.94 ± 1.87
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	89.70 ± 1.65
F8.6	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	88.88 ± 0.92
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	96.44 ± 0.92
F8.7	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	39.74 ± 12.79
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	97.66 ± 0.90
F8.8	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	70.86 ± 19.01
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	97.29 ± 1.96

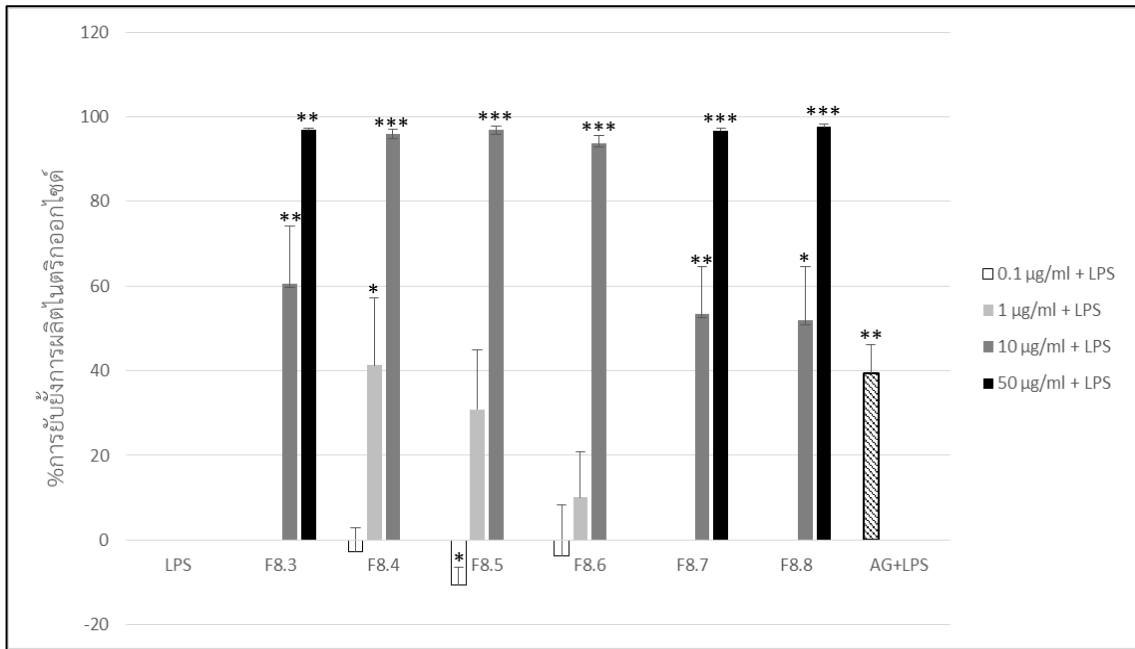
สารทดสอบ		LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การผลิตไนตริกออกไซด์
F8.9	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	28.84 ± 25.78
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	89.11 ± 4.84
F8.10	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	26.47 ± 21.74
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	86.39 ± 5.82
F8.11	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	9.90 ± 9.00
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	75.89 ± 10.47
F8.12	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	19.63 ± 14.85
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	82.03 ± 9.87
F8.13	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	22.45 ± 15.71
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	78.17 ± 10.62
F8.14	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	13.91 ± 15.91
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	+	82.58 ± 9.50
AG		+	41.59 ± 5.42

ตารางที่ 3-7 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.1 ถึง F8.14

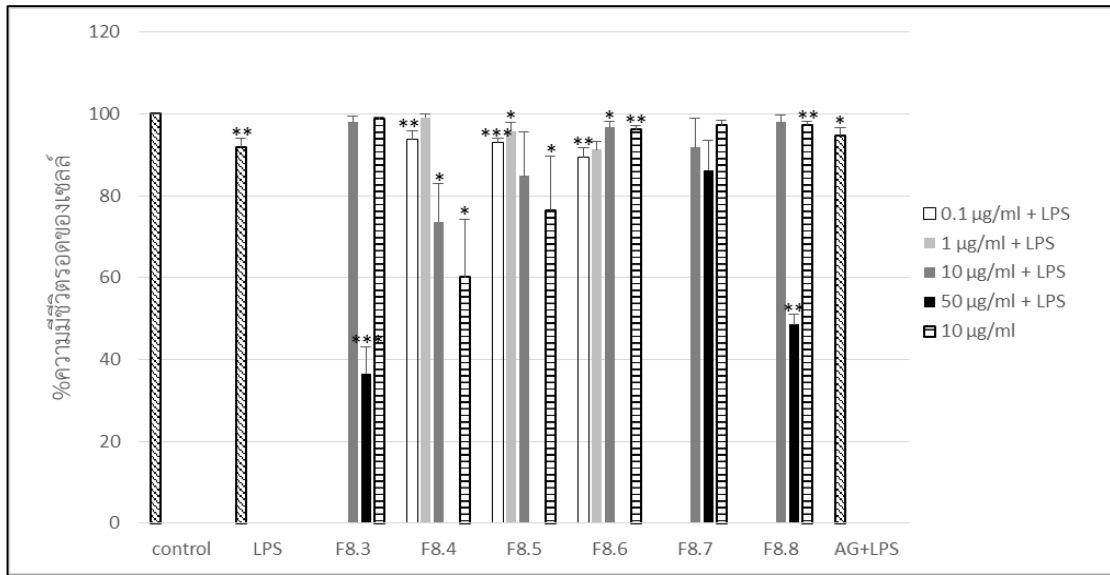
สารทดสอบ		เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์	
		มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไม่มี LPS
control		-	100.00 ± 0.00
LPS		89.97 ± 3.09	-
F8.1	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	95.61 ± 1.30	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	98.56 ± 2.08	97.15 ± 2.05
F8.2	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	97.03 ± 1.54	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	99.02 ± 2.09	86.41 ± 2.75
F8.3	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	97.90 ± 0.61	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	69.43 ± 19.39	49.07 ± 3.44
F8.4	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	89.69 ± 7.21	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	6.38 ± 0.35	6.19 ± 0.60
F8.5	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	97.28 ± 0.95	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	7.09 ± 0.09	7.65 ± 0.71
F8.6	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	96.27 ± 0.54	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	6.27 ± 0.25	6.94 ± 0.34
F8.7	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	94.24 ± 2.82	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	84.71 ± 10.11	70.40 ± 5.52
F8.8	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	97.09 ± 6.70	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	40.00 ± 2.31	40.01 ± 2.59

สารทดสอบ		เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์	
		มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ไม่มี LPS
F8.9	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	100.21 ± 2.86	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	99.63 ± 4.43	95.62 ± 4.88
F8.10	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	94.72 ± 6.34	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	100.57 ± 2.52	94.70 ± 4.71
F8.11	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	92.71 ± 6.00	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	76.42 ± 3.14	87.94 ± 2.16
F8.12	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	95.89 ± 4.50	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	100.93 ± 2.30	88.74 ± 16.56
F8.13	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	95.21 ± 4.72	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	102.12 ± 0.99	97.31 ± 2.38
F8.14	10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	96.35 ± 3.43	-
	50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	101.24 ± 1.77	101.11 ± 2.27
AG		98.24 ± 0.55	-

การศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และส่วนสกัดย่อย F8.3, F8.7 และ F8.8 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ aminoguanidine ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS พบว่า เซลล์มีความมีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นส่วนสกัดย่อย F8.3 และ F8.8 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดอยู่ที่ 36.53 ± 6.61 และ 48.57 ± 2.46 ตามลำดับ ในสภาวะที่มี LPS ส่วนสกัดย่อย F8.4 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดอยู่ที่ 73.61 ± 9.27 ในสภาวะที่มี LPS และส่วนสกัดย่อย F8.4 และ F8.5 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดอยู่ที่ 60.11 ± 14.10 และ 76.54 ± 13.21 ตามลำดับในสภาวะที่ไม่มี LPS เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย (รูปที่ 3-2)



รูปที่ 3-1 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ F8.3, F8.7 และ F8.8 ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์



รูปที่ 3-2 ผลของความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.8 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ครั้งทำ 3 ซ้ำ, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ โดยให้ control = เซลล์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

ขั้นต่อไปทำการแยกสารเคมีจากส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา โดยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารทั้งหมด 6 ส่วนสกัดย่อย (F8.8-1 ถึง F8.8-6) ดังแสดงเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้ในตารางที่ 3-8

ตารางที่ 3-8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
F8.8-1	5.6	2.39
F8.8-2	15.3	6.54
F8.8-3	94.6	40.43
F8.8-4	8.3	3.55
F8.8-5	31.4	13.42
F8.8-6	20.7	8.85
รวม	175.9	75.17

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อย F8.8-1 ถึง F8.8-6 เทียบกับส่วนสกัดย่อย F8.8 เริ่มต้น 234 มิลลิกรัม

3.4 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา

ทำการแยกสารจากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิค HPLC ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 4 ส่วนสกัด (F9.1 ถึง F9.4) พบว่า ส่วนสกัดย่อย F9.1 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงสุด และ F9.2 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3-9

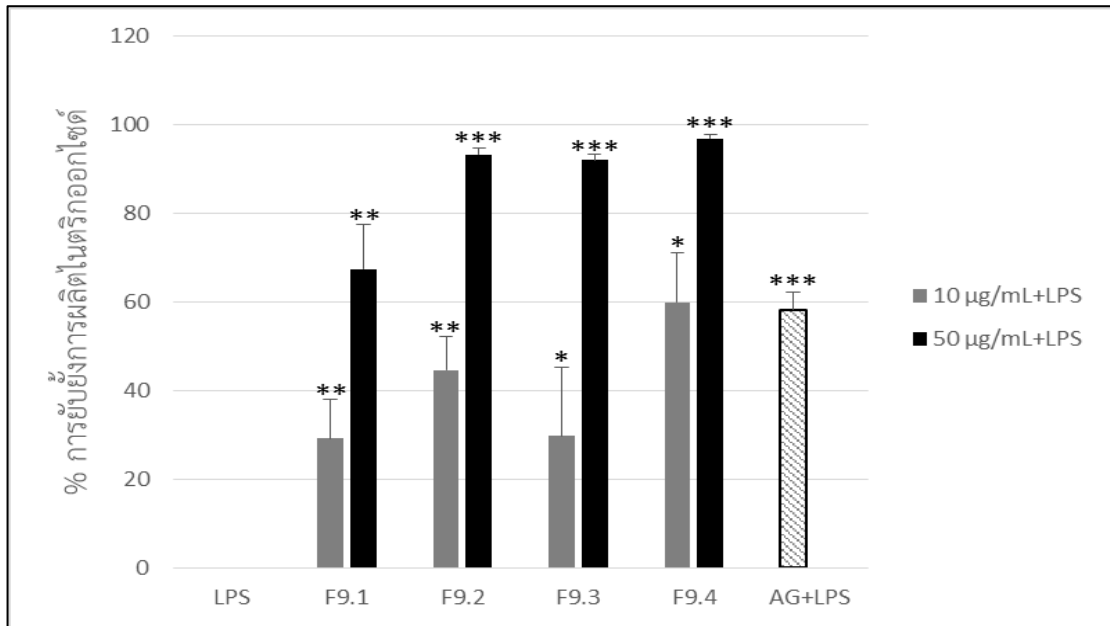
เมื่อให้เซลล์สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ LPS พบว่า ส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยส่วนสกัดย่อย F9.4 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 59.87 ± 11.32 เปอร์เซ็นต์ และ 96.88 ± 0.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย F9.1 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 29.18 ± 8.73 เปอร์เซ็นต์ และ 67.42 ± 9.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 3-3) ส่วน aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 58.17 ± 4.06 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ aminoguanidine ในสถานะที่มีหรือไม่มี LPS พบว่า เซลล์มีความมีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ (รูปที่ 3-4)

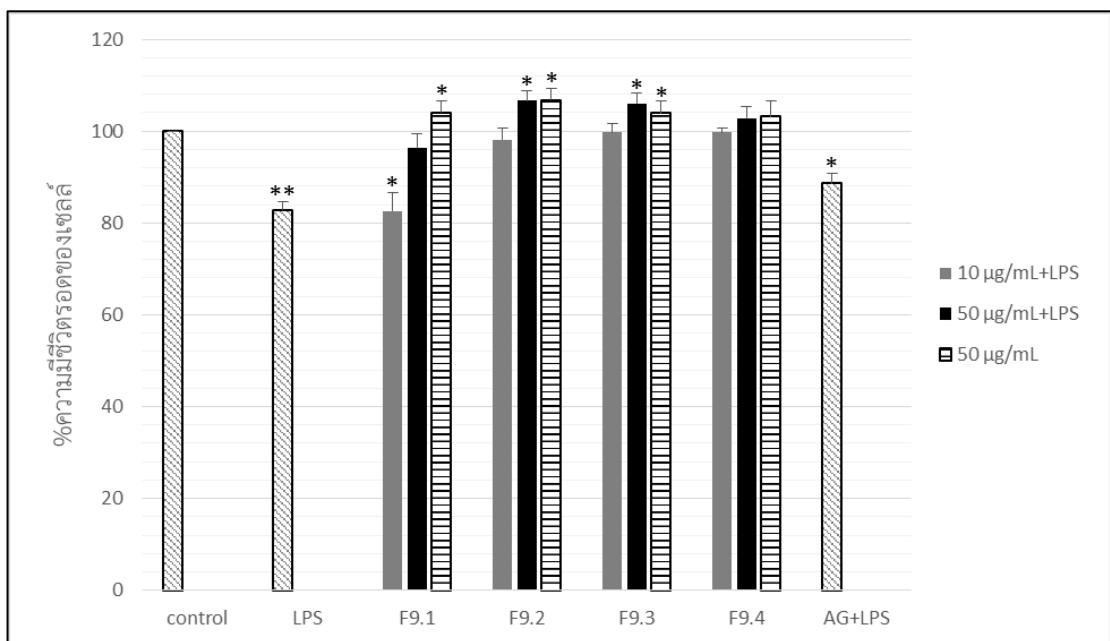
ตารางที่ 3-9 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อย เอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา

ส่วนสกัดย่อย	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)	เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง
F9.1	132.8	55.33
F9.2	7.3	3.04
F9.3	9.3	3.88
F9.4	8.0	3.33
รวม	157.4	65.58

หมายเหตุ : เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 เทียบกับส่วนสกัดย่อย F9 เริ่มต้น 240 มิลลิกรัม



รูปที่-3-3 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสภาวะที่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยให้ LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์



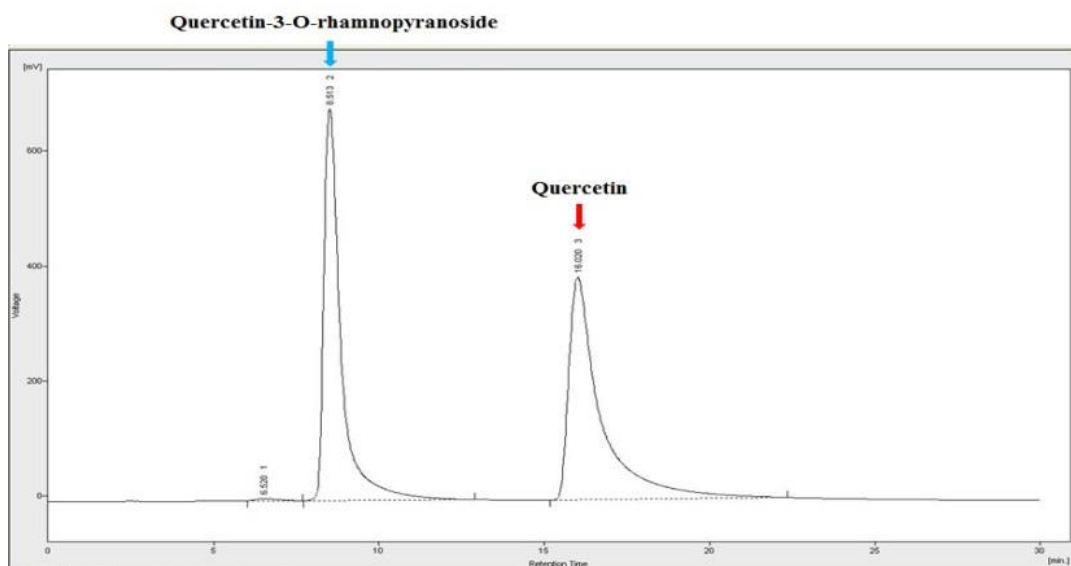
รูปที่ 3-4 ผลของความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ของการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบ โดยให้ control = เซลล์ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น, LPS = เซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว, AG = เซลล์ที่สัมผัสกับ aminoguanidine ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์

3.5 การวิเคราะห์สาร quercetin-3-o-rhamnopyranoside และ quercetin ในส่วนสกัดย่อยที่แยกได้จากใบสาบแร้งสาบกา

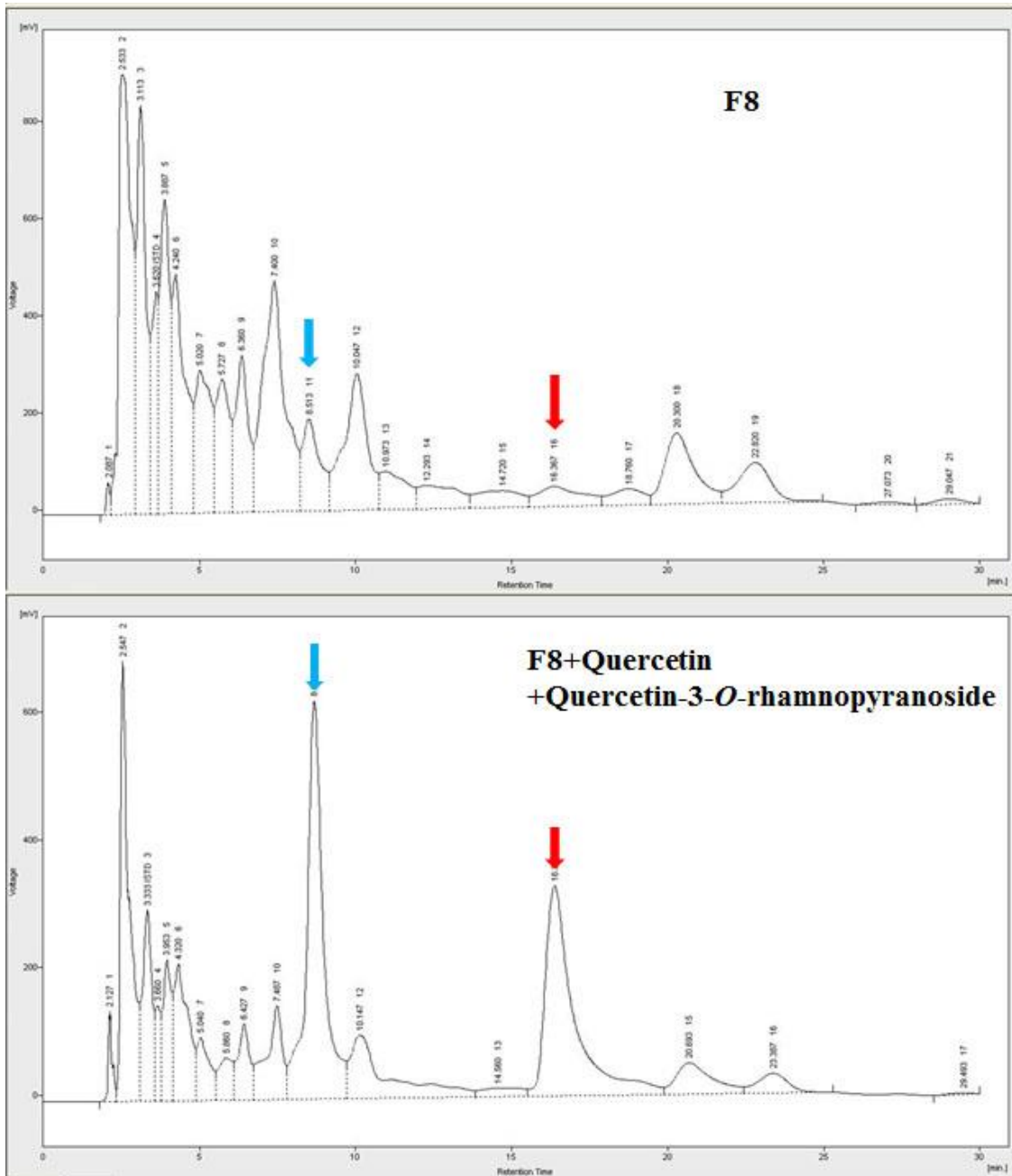
ทำการวิเคราะห์หลายพิมพ์ของส่วนสกัดย่อย F8-F10 ที่แยกได้จากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิค HPLC ที่ความยาวคลื่น 370 nm พบว่ามีโครมาโทแกรมของ HPLC ดังแสดงในรูปที่ 3-5 นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดย่อย F8-F10 มีสาร quercetin-3-o-rhamnopyranoside เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่มีเพียงส่วนสกัดย่อย F8-F9 ที่มีสาร quercetin เป็นองค์ประกอบ

(A)



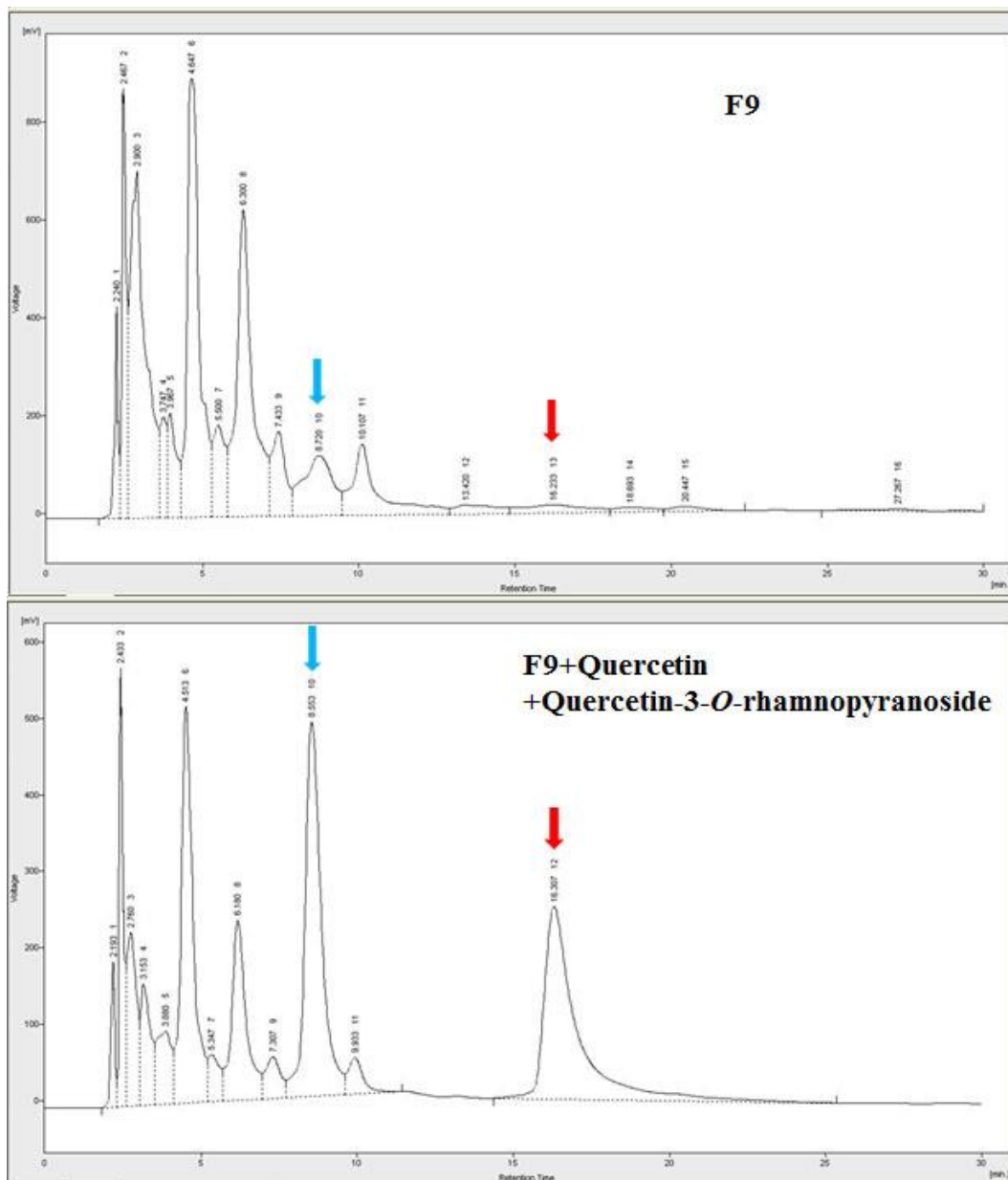
รูปที่-3-5 โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside (A) และส่วนสกัดย่อย F8 (B), F9 (C) and F10 (D) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

(B)



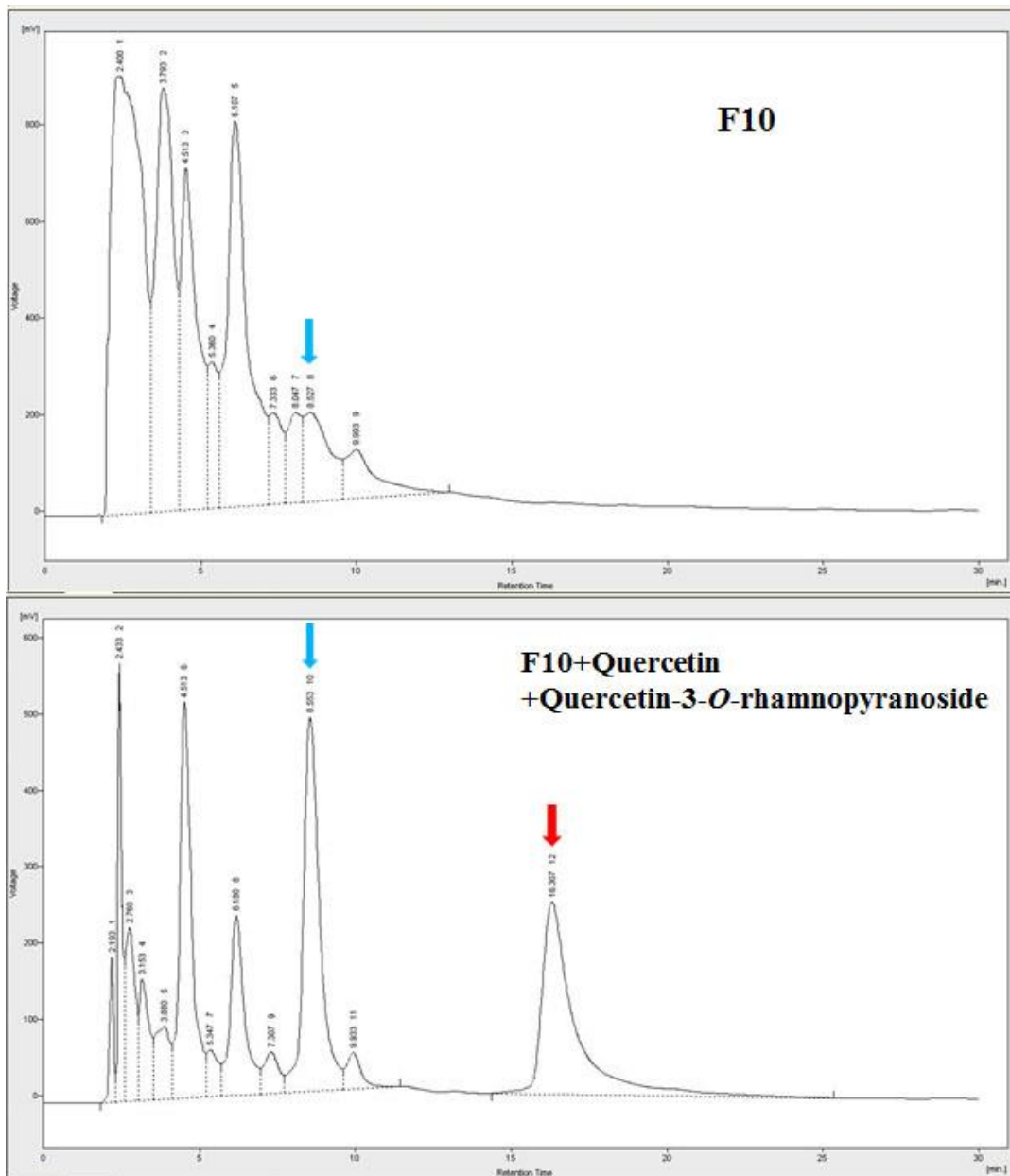
รูปที่-3-5 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside (A) และส่วนสกัดย่อย F8 (B), F9 (C) and F10 (D) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

(C)



รูปที่-3-5 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside (A) และส่วนสกัดย่อย F8 (B), F9 (C) and F10 (D) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

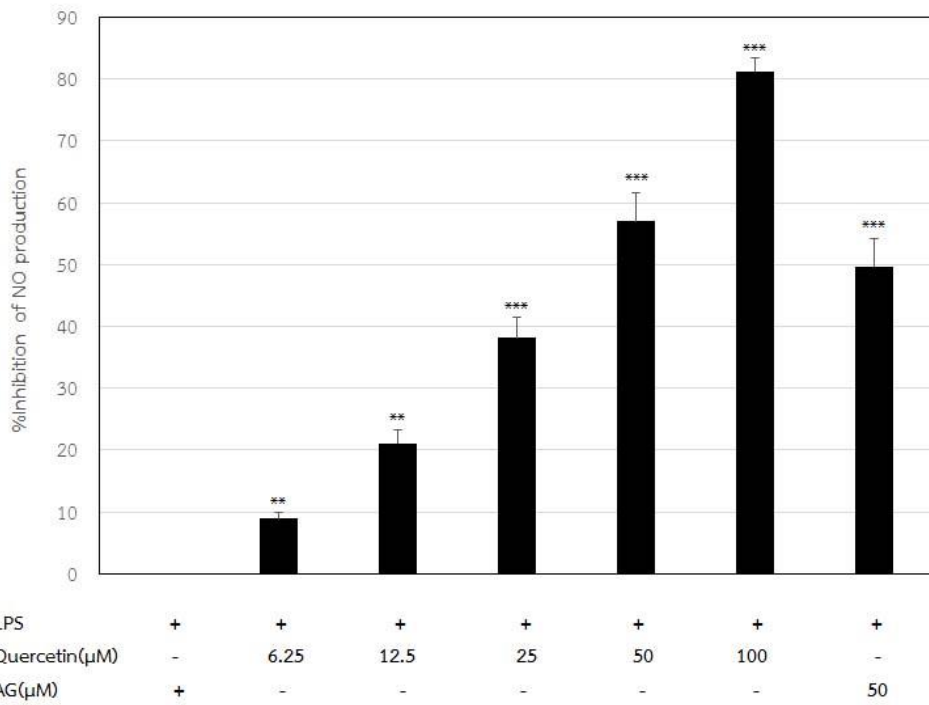
(D)



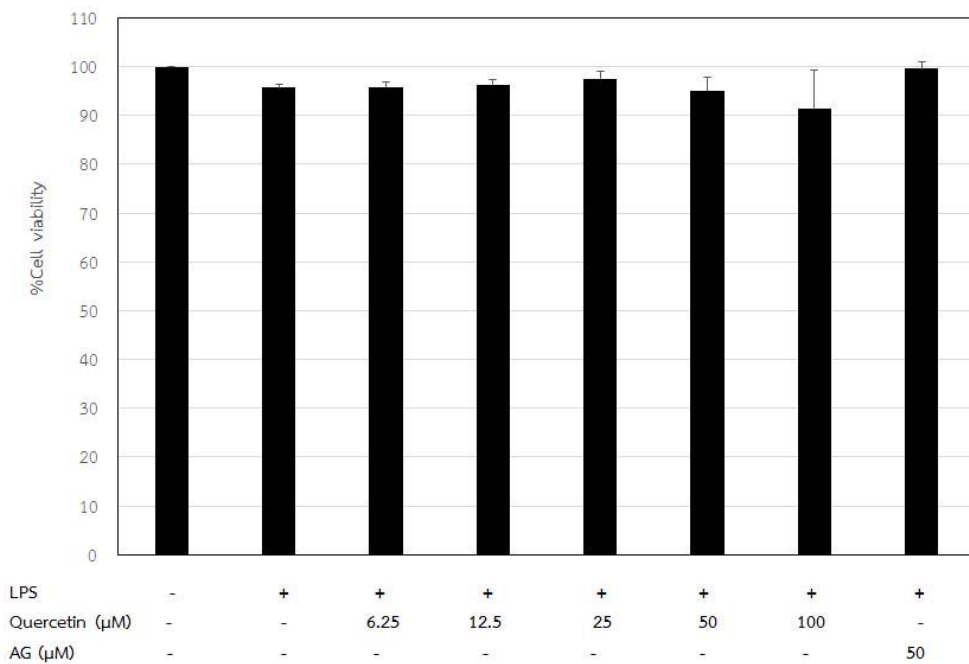
รูปที่-3-5 (ต่อ) โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside (A) และส่วนสกัดย่อย F8 (B), F9 (C) and F10 (D) ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

สาร quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside ที่เป็นองค์ประกอบในใบสาบแร้งสาบกา มาทดสอบฤทธิ์การต้านอักเสบพบว่า quercetin ที่ความเข้มข้น 6.25-100 ไมโครโมลาร์สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น โดยไม่มีพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3-6) อีกสารหนึ่งคือ quercetin-3-O-rhamnopyranoside ที่ความเข้มข้น 100--200 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และควมมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสกับสารที่ความเข้มข้นสูงถึง 200 ไมโครโมลาร์มีค่ามากกว่า 90 % (รูปที่ 3-7) จากนั้นทำการศึกษากลไกการต้านอักเสบของสาร quercetin และ quercetin-3-O-rhamnopyranoside พบว่าสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 12.5-100 ไมโครโมลาร์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 (รูปที่ 3-8) ในขณะที่สาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ที่ความเข้มข้น 100--200 ไมโครโมลาร์ยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS แต่ทุกความเข้มข้น (25--200 ไมโครโมลาร์) ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ได้ (รูปที่ 3-9)

(A)

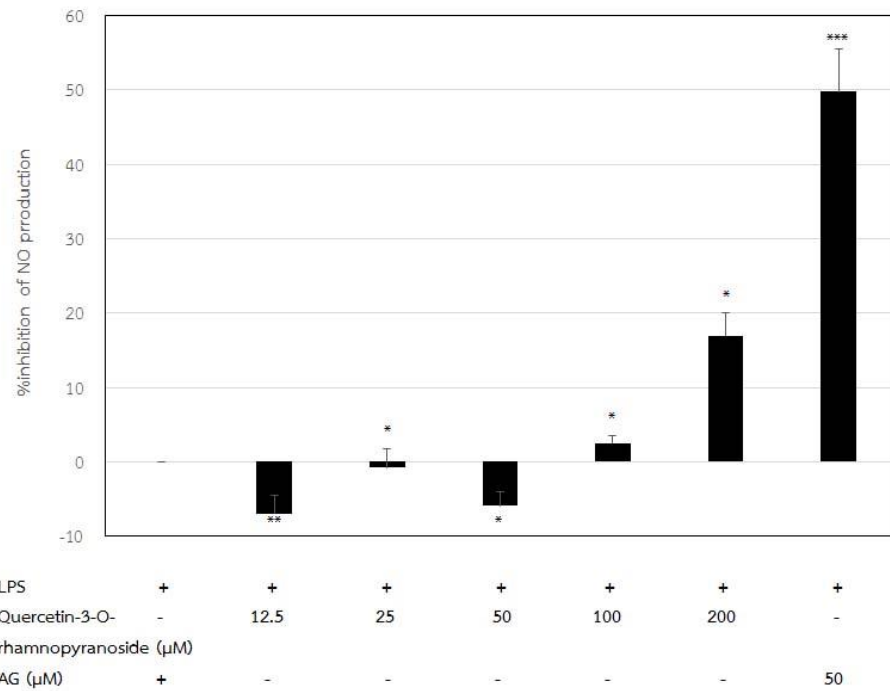


(B)

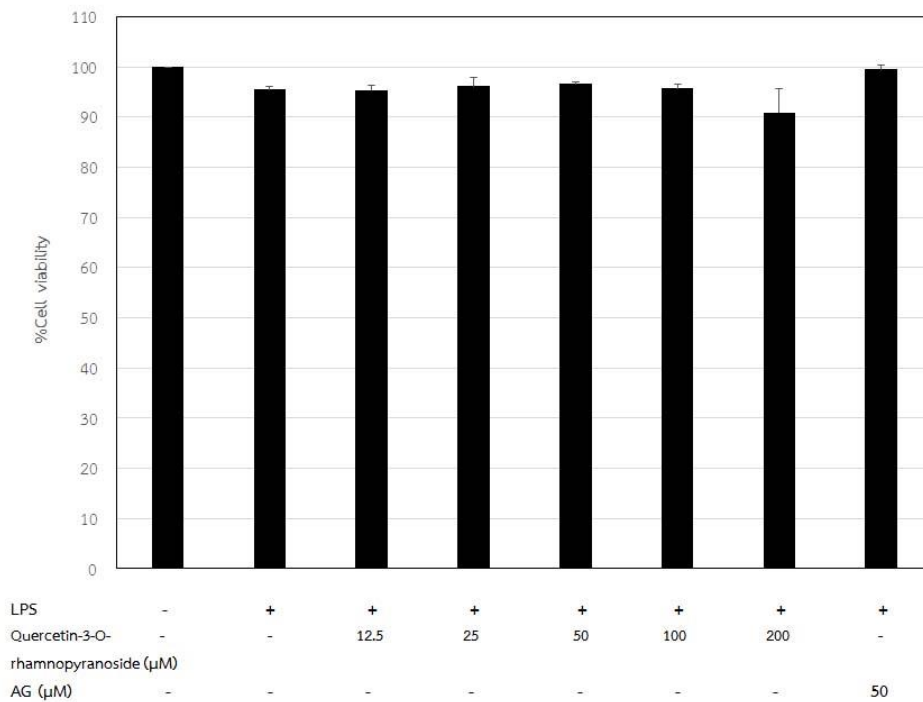


รูปที่ 3-6 การผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และควมมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อประเมินด้วย MTT assay (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ **, *** $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว

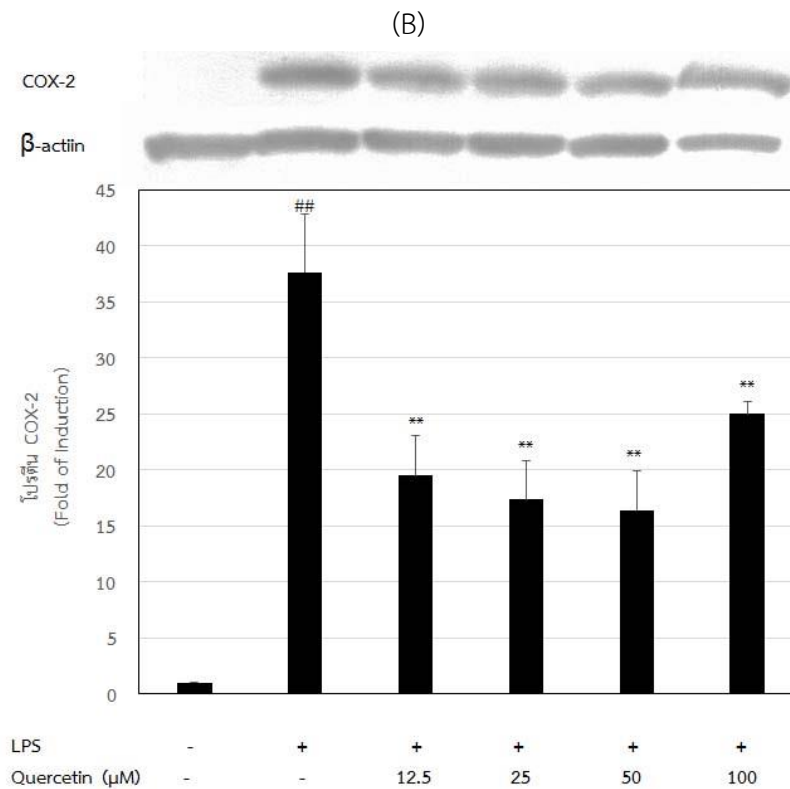
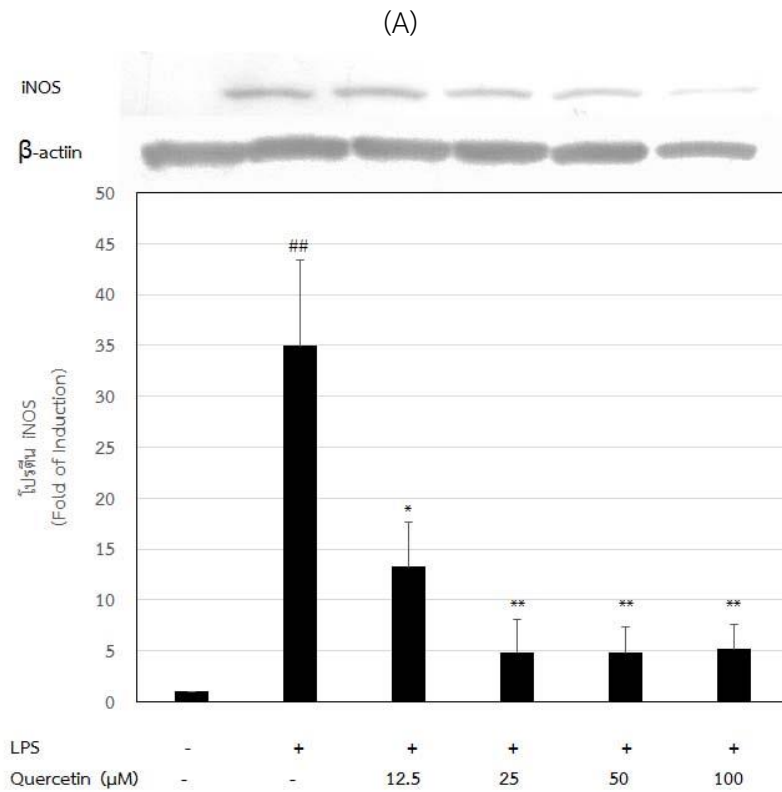
(A)



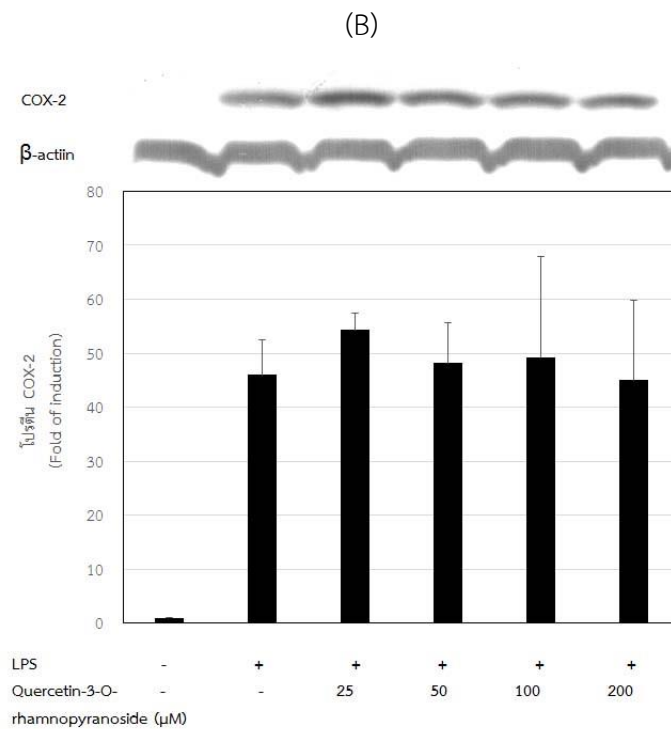
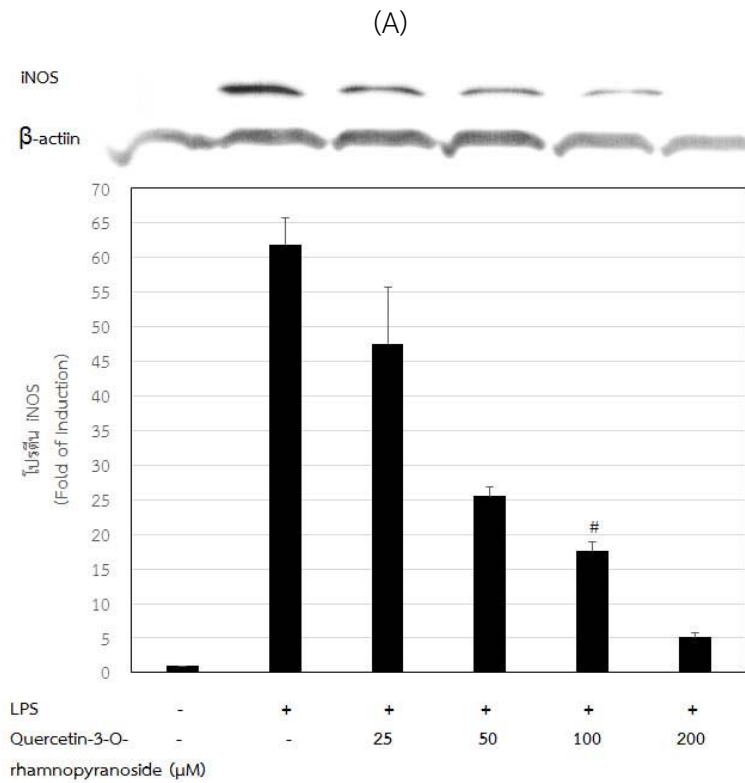
(B)



รูปที่ 3-7 การผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) และ ความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อประเมินด้วย MTT assay (B) ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่อิสระต่อกัน แต่ละครึ่งทำ 3 ซ้ำ *, *** $p < 0.05$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 3-8 ผลของสาร quercetin ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B) ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผล Western blot ที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ซ้ำ



รูปที่ 3-9 ผลของสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ต่อการแสดงออกของโปรตีน iNOS (A) และ COX-2 (B) ในเซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 ที่ถูกบ่มด้วยสาร MCC ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ LPS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผล Western blot ที่แสดงเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นโครงการต่อเนื่องได้ทำการเก็บพืชสมุนไพรจากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี จำนวน 21 ชนิด เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพร พบว่าส่วนสกัดเอทานอลของใบสบางร้างสบางออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ดี สอดคล้องกับการรายงานการต้านการอักเสบของต้นสบางร้างสบางกา ในสัตว์ทดลอง (Moura et al., 2005; Biradar et al., 2011; Rahman et al., 2012; Awad et al., 2013) แม้ว่าจะมีการรายงานการแยกสารพิษเคมีจากต้นสบางร้างสบางกว่ามี monoerpene, sesquiterpene, chromene, chromone, benzofuran, coumarin, flavonoids, triterpenes, sterols, alkaloids and amino acid (Okunade, 2002; Shailajan et al., 2013) แต่ยังไม่มีการรายงานถึงสารออกฤทธิ์ที่พบในใบสบางร้างสบางกาที่ได้จากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี ในการศึกษาปีที่สองนี้จึงทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในใบสบางร้างสบางกา โดยการสกัดลำดับส่วนของส่วนสกัดเอทานอลได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และส่วนสกัดย่อยน้ำ พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Awad et al. (2013) ที่พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดเมทานอลของใบสบางร้างสบางกามีฤทธิ์ดีที่สุดเช่นกัน

ดังนั้นเราจึงนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตนี้มาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้เป็นส่วนสกัดย่อย (F1-F10) หลังทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าส่วนสกัดย่อย F2-F10 มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี แต่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F2-F7 ลดลงอย่างมาก แต่ส่วนสกัดย่อย F8-F10 ไม่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการลดลงของไนโตรเจนในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F2-F7 นี้เป็นผลมาจากเซลล์ตาย และในขณะที่การลดลงของปริมาณไนโตรเจนของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8-F10 นี้เป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดย่อย F8-F10 เอง ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสบางร้างสบางกา โดยทำการแยกส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสบางร้างสบางกาด้วยเทคนิคแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้สารทั้งหมด 14 ส่วนสกัดย่อย คือ F8.1 ถึง F8.14 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.3, F8.7 และ F8.8 ที่ความเข้มข้นทั้งสองสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ใกล้เคียงกัน ส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของทุกส่วนสกัด สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนสกัดย่อย F8.3 และ F8.8 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่าความมีชีวิตรอดประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ส่วนสกัด

ย่อย F8.7 ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ มีค่าความมีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณไนโตรทีนในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.3 และ F8.8 เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ ในขณะที่การลดลงของไนโตรทีนในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.7 ไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ แต่เป็นผลมาจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อย F8.7 ส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.8 ที่ความเข้มข้นทั้งสองที่ทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูง โดยส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดที่ต่ำ ดังนั้นการลดลงของปริมาณไนโตรทีนในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อยเหล่านี้ น่าจะมาจากการตายของเซลล์ ซึ่งเป็นผลจากความพิษของส่วนสกัดต่อเซลล์ เนื่องจากความเข้มข้นของส่วนสกัดที่สูงเกินไป จึงได้ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์และการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ความเข้มข้นต่ำ คือ 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ไม่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แต่ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทุกส่วนสกัดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงใกล้เคียงกัน คือ มากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเพียงส่วนสกัดย่อย F8.4 เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงถึงการลดลงของไนโตรทีนในเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.4 ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ได้เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ แต่เป็นผลมาจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยเอง โดยจากการทดลอง จะเห็นได้ว่า ส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 นั้น มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ดีไม่ค่อยแตกต่างกัน และมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ผลโครมาโทแกรม TLC ของส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 ที่ปรากฏ (รูปที่ 2-6) ยังมีลักษณะที่คล้ายกันอีกด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่า ในส่วนสกัดย่อย F8.4 ถึง F8.6 น่าจะมีสารที่มีคุณสมบัติเหมือนกันหรือจะเป็นสารกลุ่มเดียวกันเป็นองค์ประกอบ แต่ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดย่อยจาก F8 จะเห็นว่าส่วนสกัดย่อย F8.4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัด พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.3 ถึง F8.5 มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่ต่ำ ส่วน F8.6 ถึง F8.8 นั้นมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งที่สูงกว่า และเมื่อพิจารณาสเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อยทั้งหมด (รูปในภาคผนวก ผ-17 ถึง ผ-19) พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.8 มีโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าส่วนสกัดย่อย F8.3 และ F8.7 ดังนั้นส่วนสกัดย่อย F8.8 จึงถูกนำไปทำการแยกสารจากส่วนสกัดย่อย F8.8 ด้วยเทคนิคแฟลช คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อย 6 ส่วนสกัดย่อย คือ ส่วนสกัดย่อย F8.8.1-F8.8.6

นอกจากนี้ทำการแยกสารกึ่งบริสุทธิ์จากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิค HPLC ได้สารทั้งหมด 4 ส่วนสกัดย่อย คือ F9.1 ถึง F9.4 จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และความมีชีวิตรอด พบว่าส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่

สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งส่วนสกัด F9.4 สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของส่วนสกัด พบว่า ส่วนสกัดย่อย F9.4 เป็นส่วนสกัดย่อยที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งเพียง 3.33 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย F9.1 ที่เป็นส่วนสกัดย่อยที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งสูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง 55.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจถือได้ว่าเป็นส่วนที่น่าจะเป็นองค์ประกอบหลักของส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา กลับมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ต่ำกว่าส่วนสกัดย่อยอื่นๆ ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา และเมื่อนำส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วย ^1H NMR พบว่า สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 (รูปในภาคผนวก ผ-26 ถึง ผ-29) เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา (รูปในภาคผนวก ผ-13) พบว่าพีคของสารที่น่าจะเป็นกลุ่มหลักที่ปรากฏในสเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา กลับไม่ปรากฏให้เห็นในสเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F9.1 ถึง F9.4 เนื่องจากการแยกส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาด้วยเทคนิค HPLC ไม่สามารถแยกสารที่น่าจะเป็นตัวสำคัญได้ ดังนั้น จึงควรนำส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกาไปทำการแยกด้วยวิธีอื่นต่อไป

มีรายงานก่อนหน้านี้แสดงถึงโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากต้นสาบแร้งสาบกา ได้แก่ monoerpene, sesquiterpene, chromene, chromone, benzofuran, coumarin, flavonoids, triterpenes, sterols, alkaloids and amino acid (Okunade, 2002; Kamboj and Saluja, 2011; Shailajan et al., 2013 และ Awad et al., 2013) ดังนั้นสารประกอบเหล่านี้อาจเป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่อยู่ในใบสาบแร้งสาบกา ดังนั้นเราจึงทำการวิเคราะห์ HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อย F8 ถึง F10 พบว่าทุกส่วนสกัดย่อยประกอบด้วยสาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside ในขณะที่ quercetin พบเฉพาะในส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 โดยสารทั้งสองนี้มีการรายงานว่าเป็นสารที่แยกได้จากใบสาบแร้งสาบกา (Awad et al., 2013) และมีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Awad et al., 2013; Yang et al., 2014) ในการศึกษาพบว่าสาร quercetin มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดี ในขณะที่สาร quercetin-3-O-rhamnopyranoside มีฤทธิ์การยับยั้งที่อ่อนในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang et al. (2014) ที่รายงานว่า quercetin สามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และ PGE_2 นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบว่าสาร quercetin ที่เป็นองค์ประกอบของส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 จากใบสาบแร้งสาบกา มีกลไกการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์โดยการลดการแสดงออกของโปรตีน iNOS และ COX-2 ซึ่งเหมือนกับกลไกการยับยั้งการอักเสบของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกาที่แสดงไว้ในรายงานของการศึกษาในปีที่ 1

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารประกอบที่แยกจากส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 ของ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดีและมี ความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย และข้อมูลต่างๆ เหล่านี้จะนำมาซึ่งหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะเป็นข้อมูล สนับสนุนการใช้สมุนไพรสาบแร้งสาบกาเป็นยารักษาโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบต่างๆ เช่น โรคข้ออักเสบรู มาตอยด์ โรคหลอดเลือดแข็งตัว โรควัลไซเมอร์ ภาวะช็อกที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้ออย่างรุนแรงทั่วร่างกาย เป็นต้น และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาตัวยาต้านอักเสบชนิดใหม่ที่สามารถรักษาโรคต่างๆ จาก การอักเสบต่อไป

5.2 สรุปผลการทดลอง

1. ทำการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา ได้ 10 ส่วนสกัดย่อย คือ F1 ถึง F10

2. ทำการแยกส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา ได้ 14 ส่วนสกัดย่อย คือ F8.1 ถึง F8.14 และแยกทำการแยกส่วนสกัดย่อย F9 ได้ 4 ส่วนสกัดย่อย คือ F9.1 ถึง F9.4 ส่วนสกัดย่อย F8.4 ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ในการ ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ดี ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

3. ทำการแยกส่วนสกัดย่อย F9 ได้ 4 ส่วนสกัดย่อย คือ F9.1 ถึง F9.4 ส่วนสกัดย่อย F9.4 ที่ แยกได้จากส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตจากใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ ดี ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่แสดงความเป็นพิษ ต่อเซลล์

4. พบ quercetin ในส่วนสกัดย่อย F8 และ F9 และพบ quercetin-3-O-rhamnopyranoside ในส่วนสกัดย่อย F9 ถึง F10 สาร quercetin นี้มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่กระตุ้นด้วย LPS โดยการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน iNOS

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. (ฉบับพิเศษ) : 143-150
- พงศ์ดี พลเสนา. (2550). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน(ฉบับสมบูรณ์). ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณัณฑ์: ปราจีนบุรี. 301 น.
- พีรยุทธ สิทธิไชยากุล. (2552). เอกสารประกอบการสอนวิชา 499303 หลักพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยาและนิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์การศึกษาค้นคว้าเพื่อการเรียนการสอนและการวิจัย. ศูนย์สื่อเสริม. กรุงเทพฯ 242 น.
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ และทรงพร จึงมั่นคง. 2551. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสาร ฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- อรพินท์ เทพสิงห์แก้ว เบญจลักษณ์ ทองช่วย และสาคร พรประเสริฐ. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหายาจากใบสาบเสือ และสาบแร้งสาบกา. ปริญญานิพนธ์. 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.
- Awad NE, Kassem HA, Elkhayat ZA, El-feky AM, Matloub AA. (2013). Chemical composition and anti-inflammatory evaluation of *Ageratum conyzoides* L. leaves. *Journal of Applied Sciences Research*. 9(3): 2126-2134.
- 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 264.7and 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 Rio red grapefruits and sour orange fruit extracts in different in vitro model systems. *Bioresource Technology*. 99 : 4484 – 4494.
- Kamboj A, Saluja AK. (2011). Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 94-96.
- 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, Afiatpour P, Maia MBS. 2005. Antiinflammatory and chronic toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. in rats. *Phytomedicine*. 12, 138-142.
- Okunade AL. (2002). *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*. 73: 1-16.
- 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 taiwaniaflavone. *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.

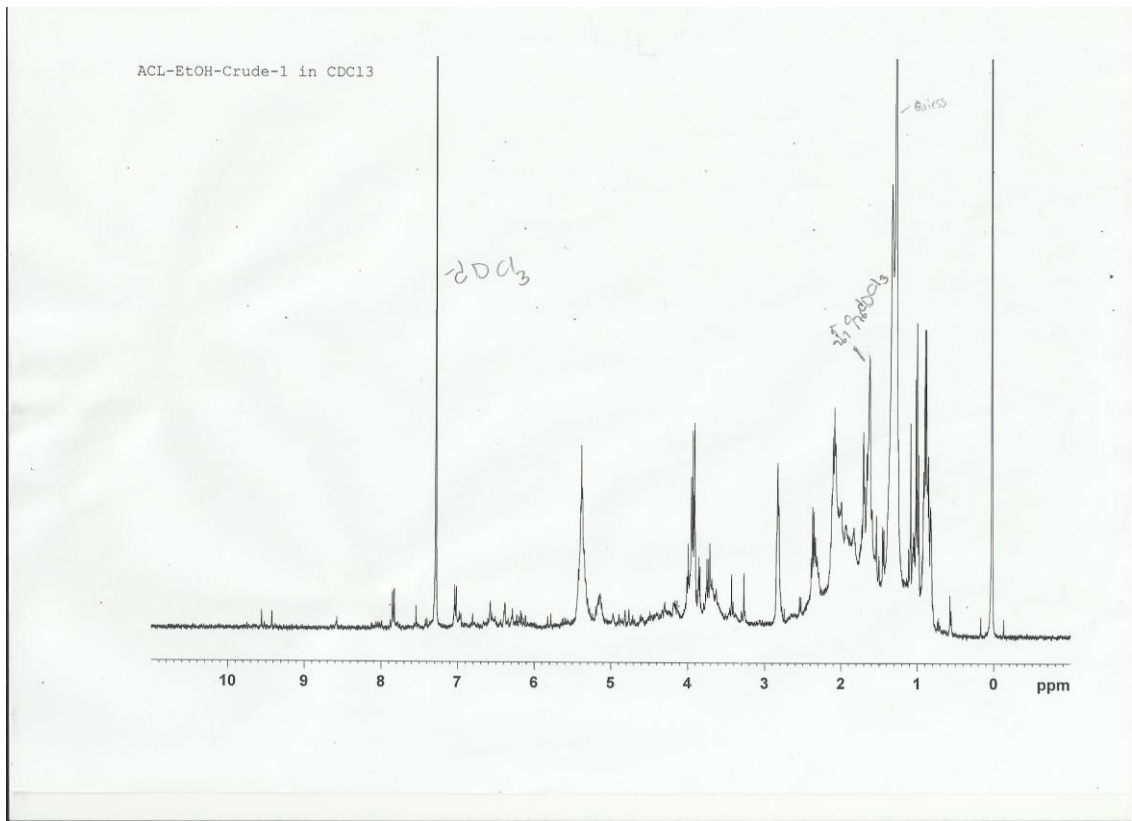
- Raghav, S.K. , Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H.R. (2006). Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells *J Ethnopharm* 104 : 234–239
- Ravipati AS, Zhang Lin, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, J Bartlett, PT Smith, Shanmugam K, Munch G, Wu MJ, Satyanarayanan 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.
- Shailajan A, Wadke P, Joshi H, Tiwari B. (2013). Evaluation of quality and efficacy of an ethnomedicinal plant *Ageratum conyzoides* L. in the management of pediculosis. *Journal of Young Pharmacists*. 5(4): 139-143.
- 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-kB activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 133 : 1008-1014
- Tunctan, B., Altug, S., Uludag, O., Demirkay, B., Abacioglu, N., (2003). Effects of cyclooxygenase inhibitors on nitric oxide production and survival in a mice model of sepsis. *Pharmacological Research* 48, 37–48.
- 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.

Yang, W.S.; Jeong, D.; Yi, Y.S.; Lee, B.H.; Kim, T.W.; Htwe, K.M.; Kim, Y.D.; Yoon, K.D.; Hong, S.; Lee, W.S.; Cho, J.Y. (2014). Myrsine seguinii ethanolic extract and its active component quercetin inhibit macrophage activation and peritonitis induced by LPS by targeting to Syk/Src/IRAK-1. *Journal of Ethnopharmacology*. 151, 1165-1174.

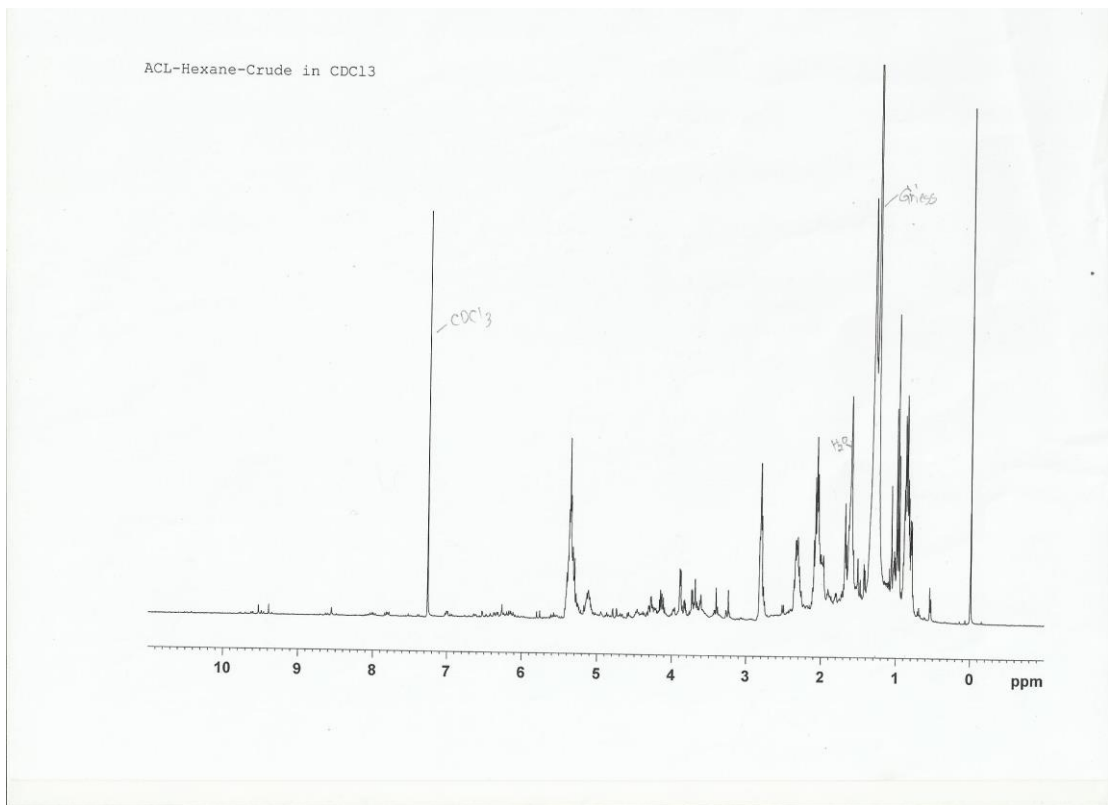
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. โครงการวิจัยนี้ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ จำนวน 1 คน คือ นางสาว สาวินีย์ สีมาพันธ์ ระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จำนวน 1 คน คือ นางสาวมยุรี ปุณาศรี
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้ Sawinee Seemakhan, Ekaruth Srisook and Klaokwan Srisook. Mechanism Underlying Anti-Inflammatory Activity of *Ageratum conyzoides* Leaf Extract and its compounds in RAW 264.7 Macrophages (Manuscript in preparation).
3. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของใบสาบแร้งสาบกาที่เป็นพืชสมุนไพร พื้นบ้านของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของชุมชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

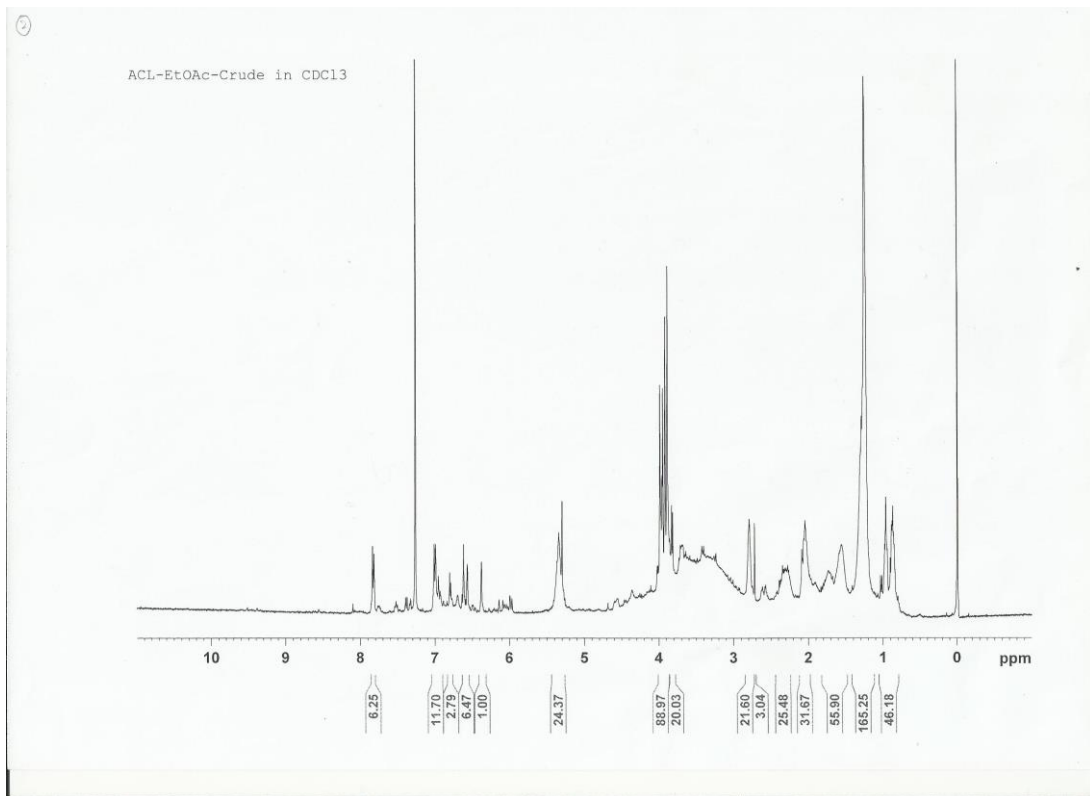
ภาคผนวก



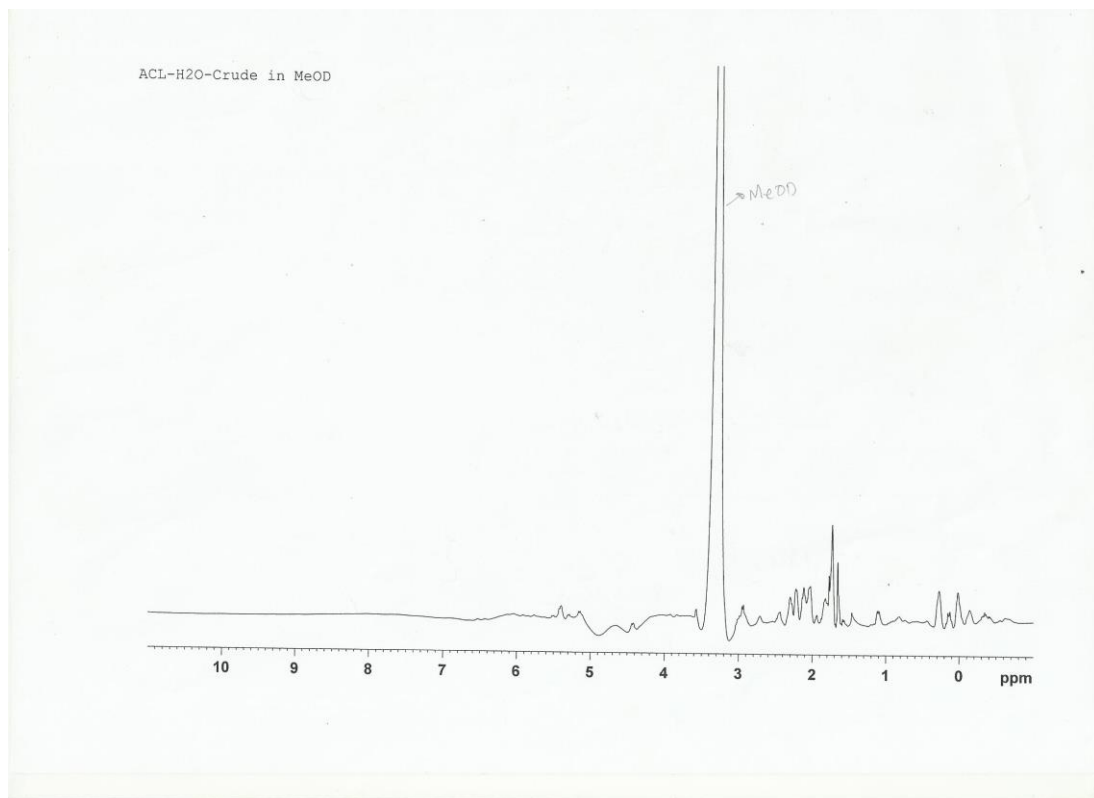
รูปที่ ผ-1 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา



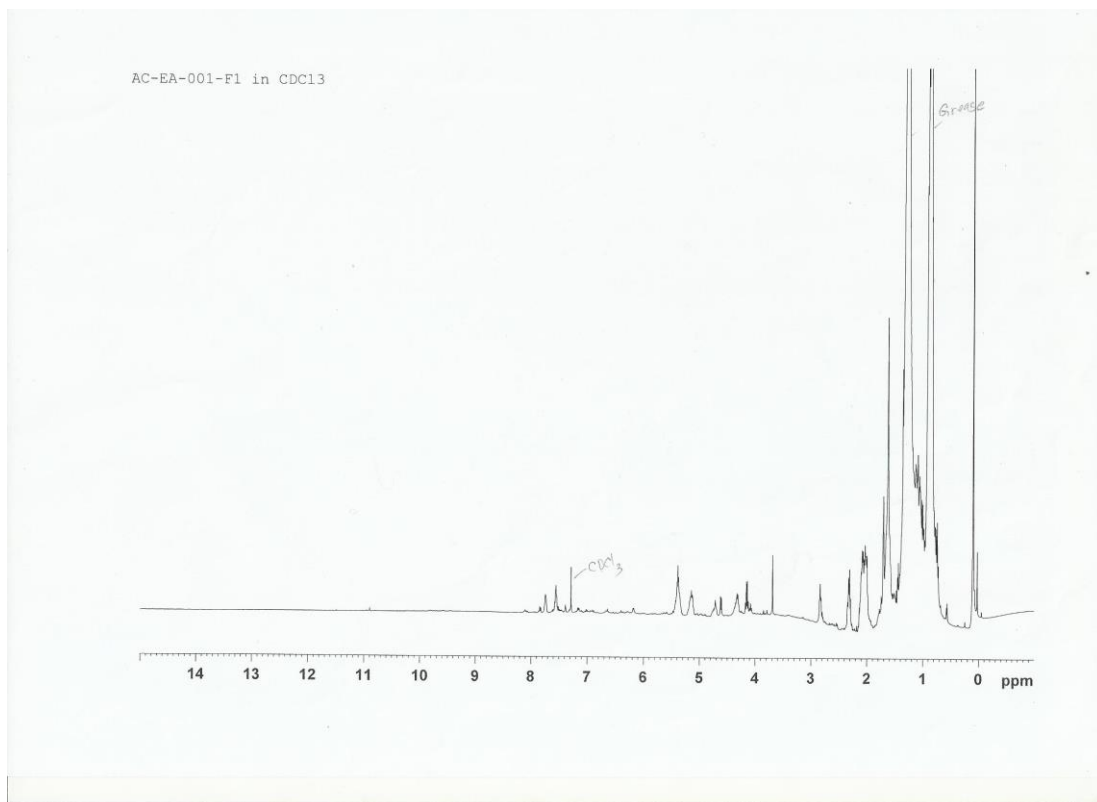
รูปที่ ผ-2 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของใบสาบแร้งสาบกา



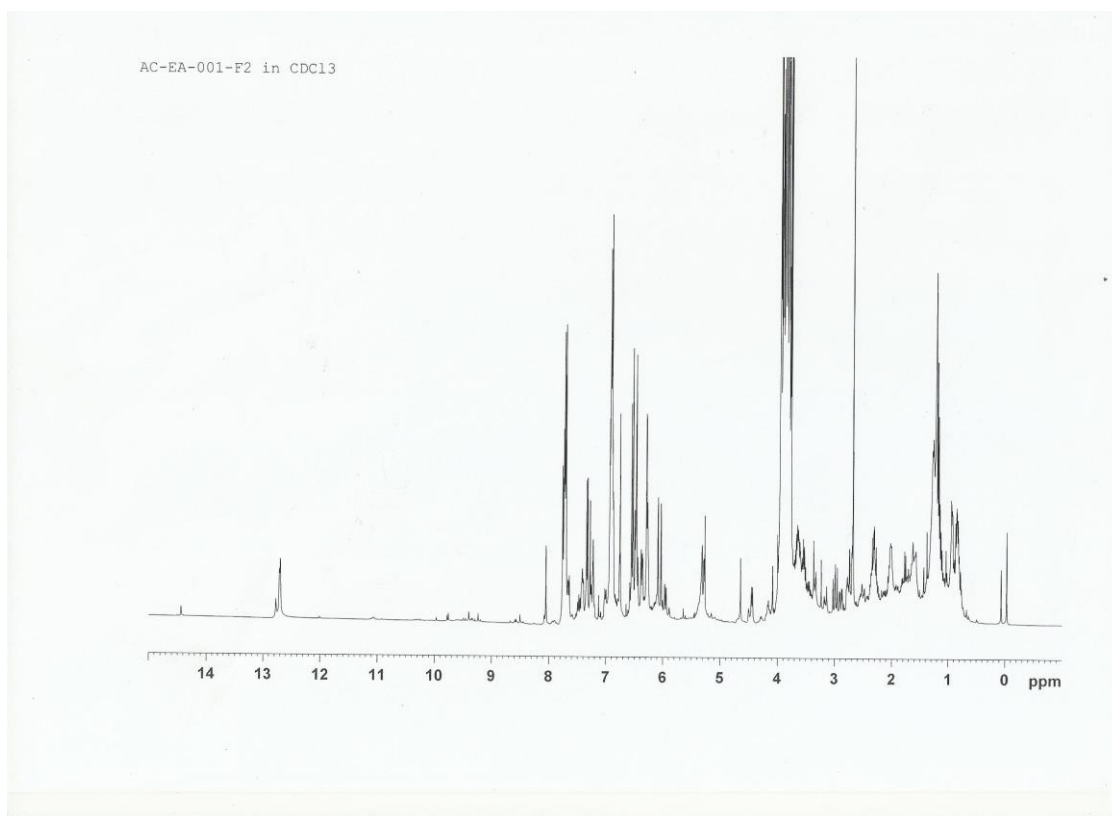
รูปที่ ๘-3 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



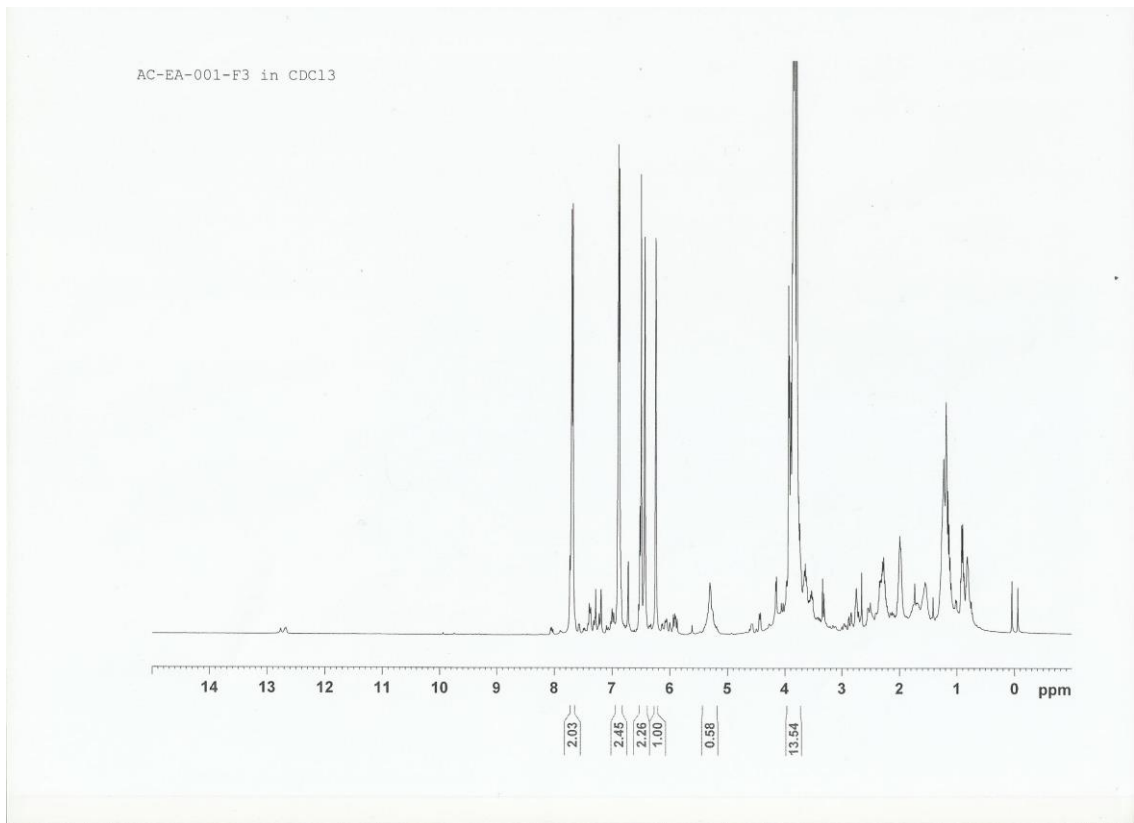
รูปที่ ๘-4 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อยน้ำของใบสาบแร้งสาบกา



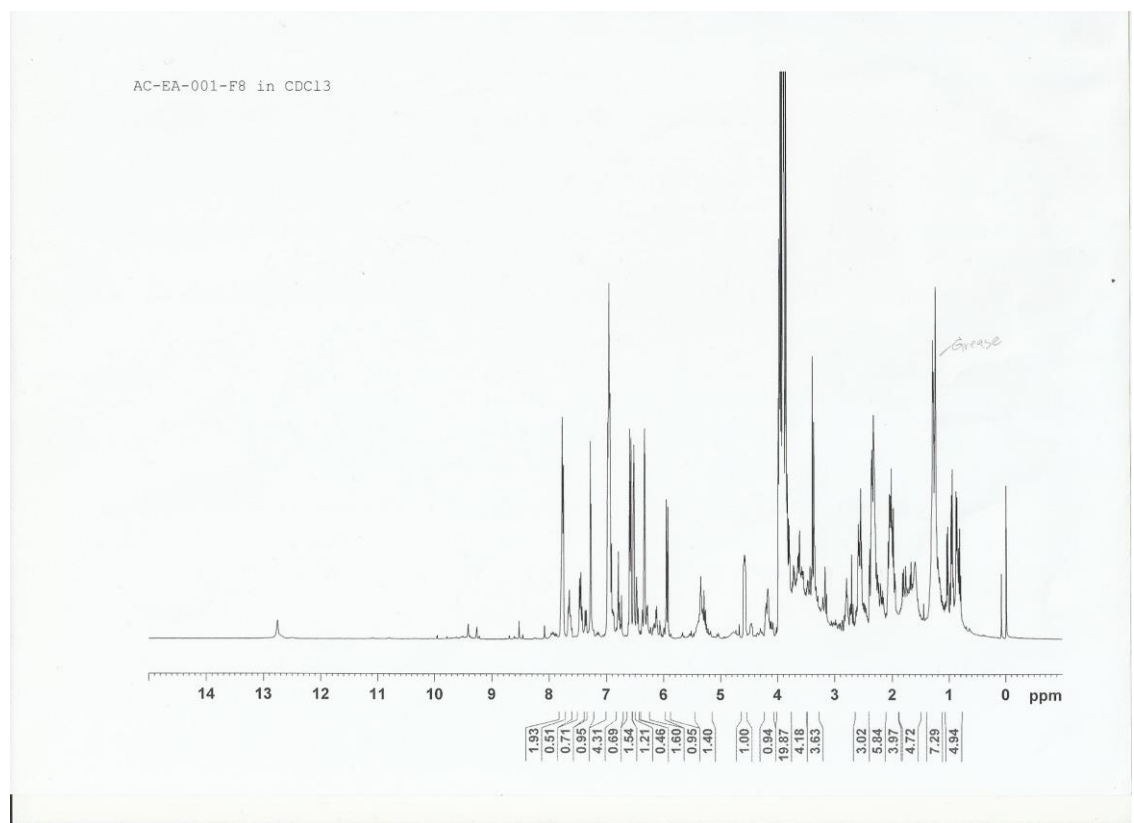
รูปที่ ผ-5 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F1 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา



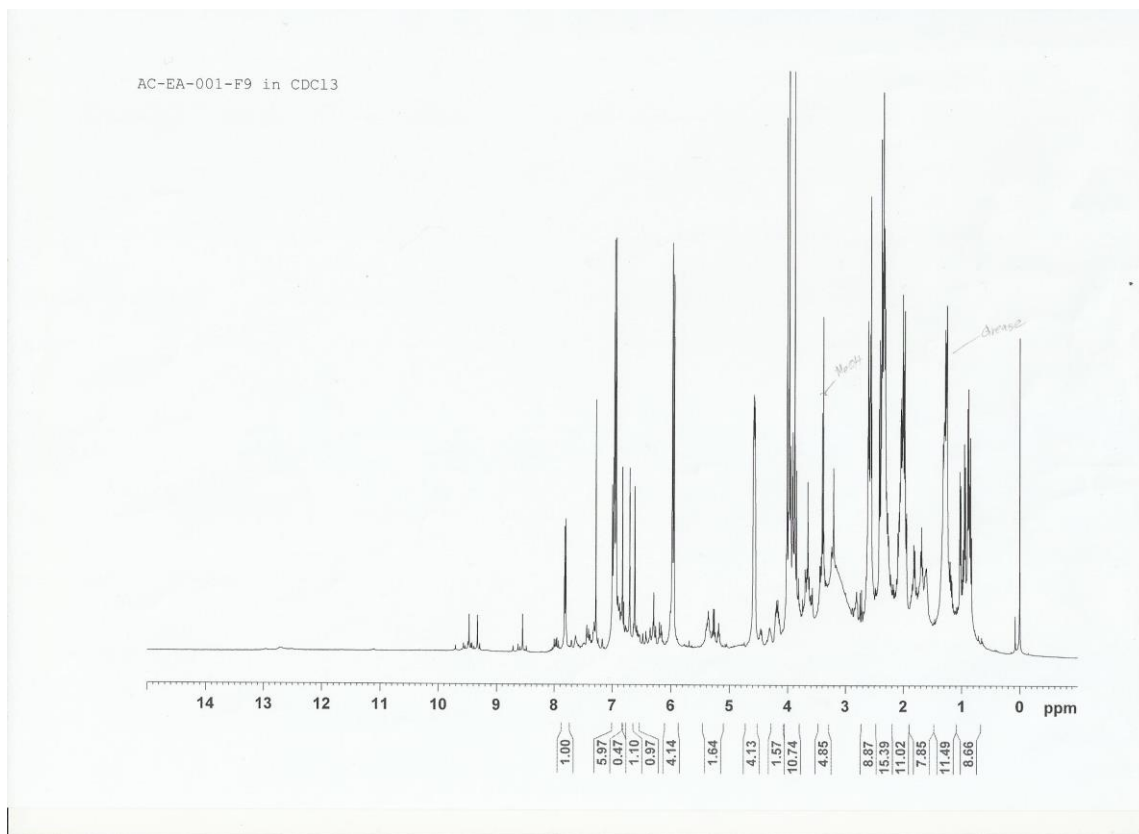
รูปที่ ผ-6 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F2 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา



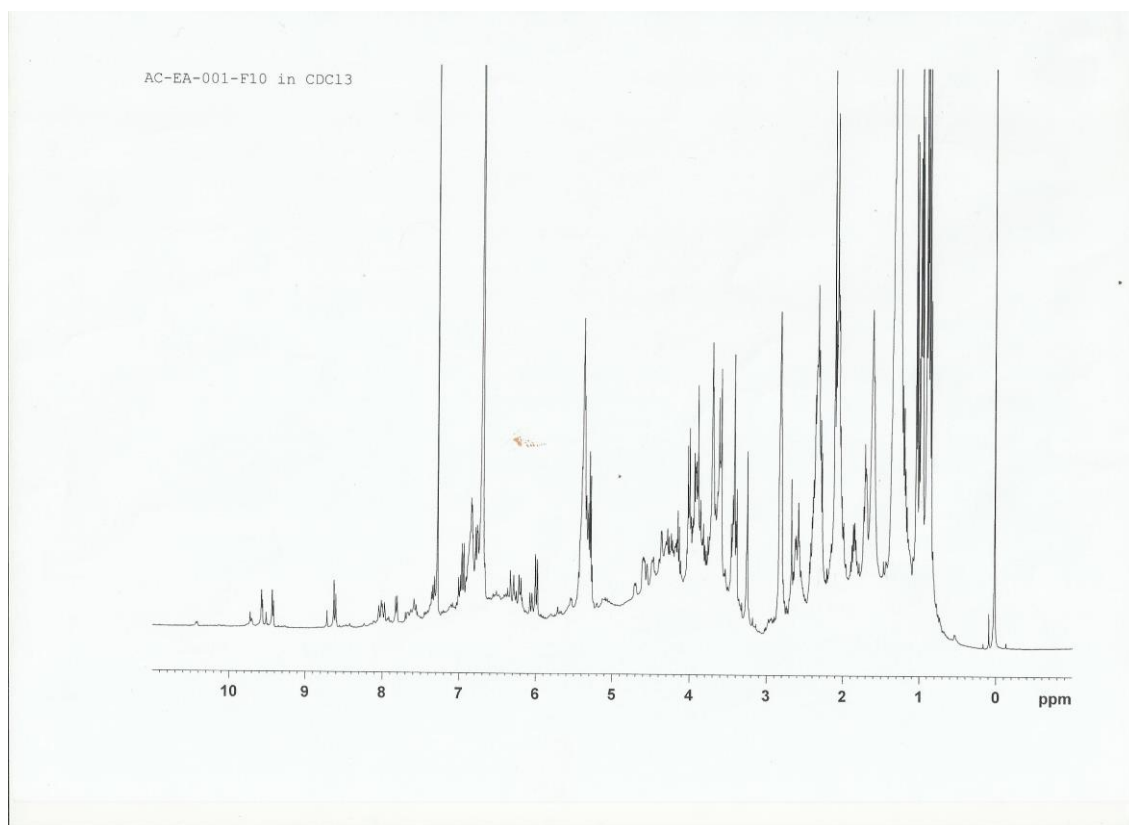
รูปที่ ๗-7 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F3 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา



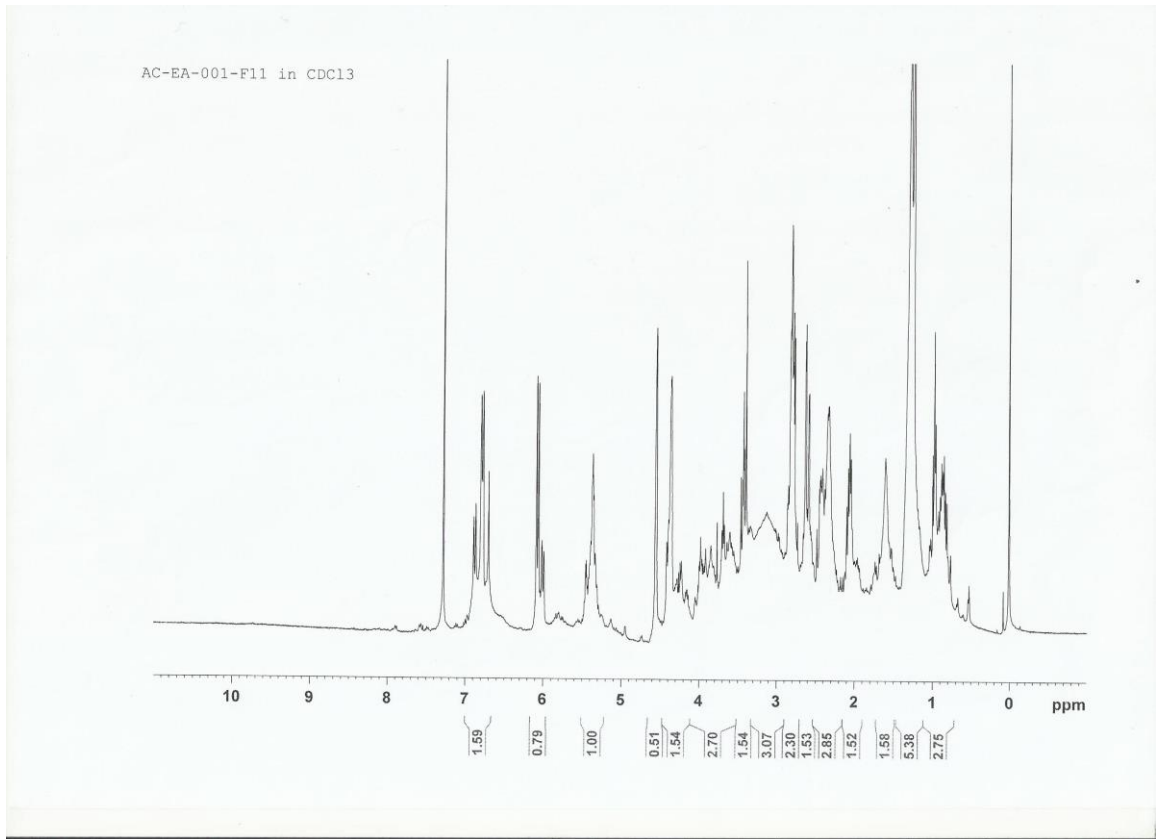
รูปที่ ๗-8 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F4 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา



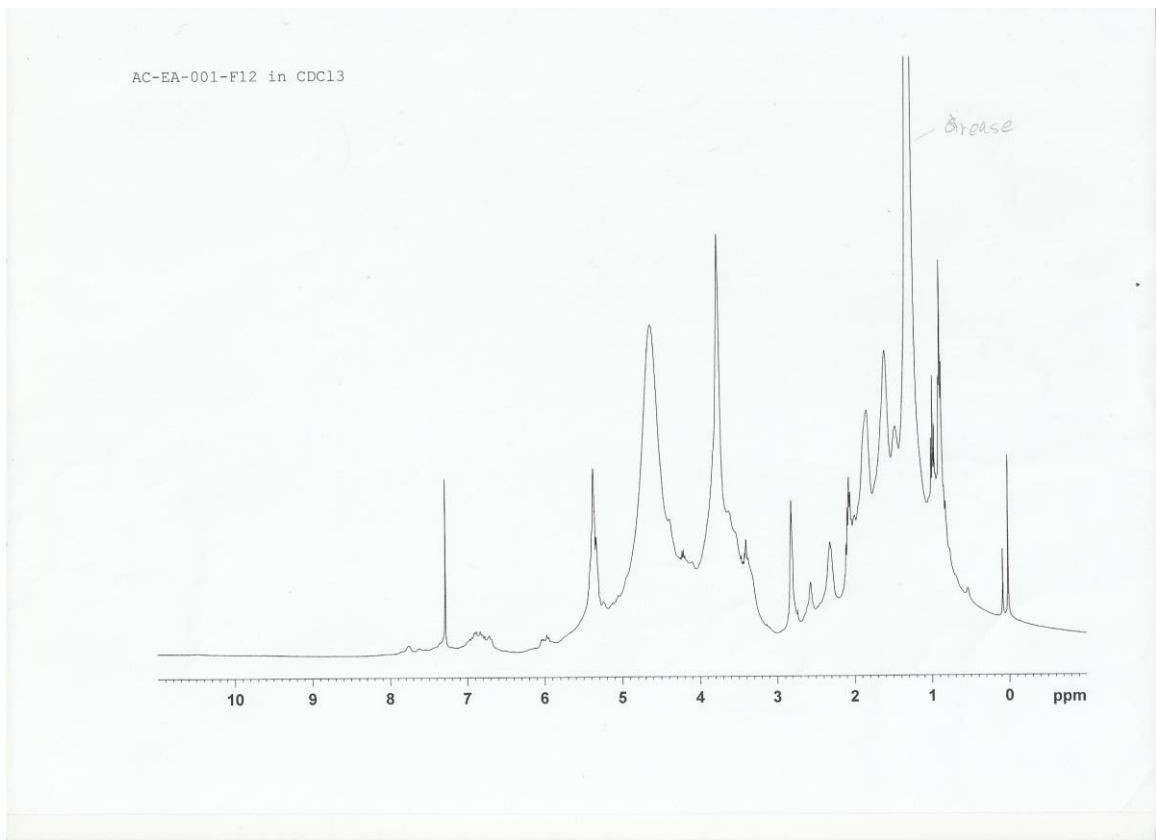
รูปที่ ๙-9 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F5 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาวแห้งสบากา



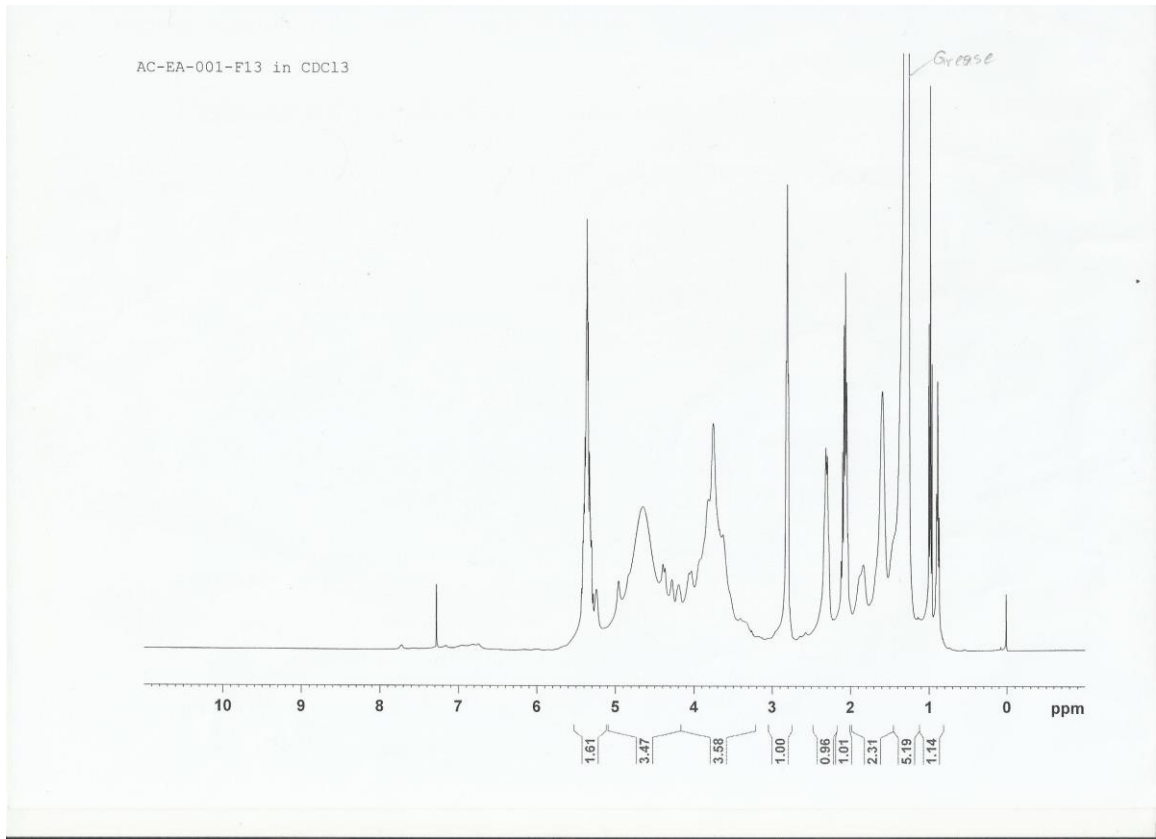
รูปที่ ๙-10 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F6 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาวแห้งสบากา



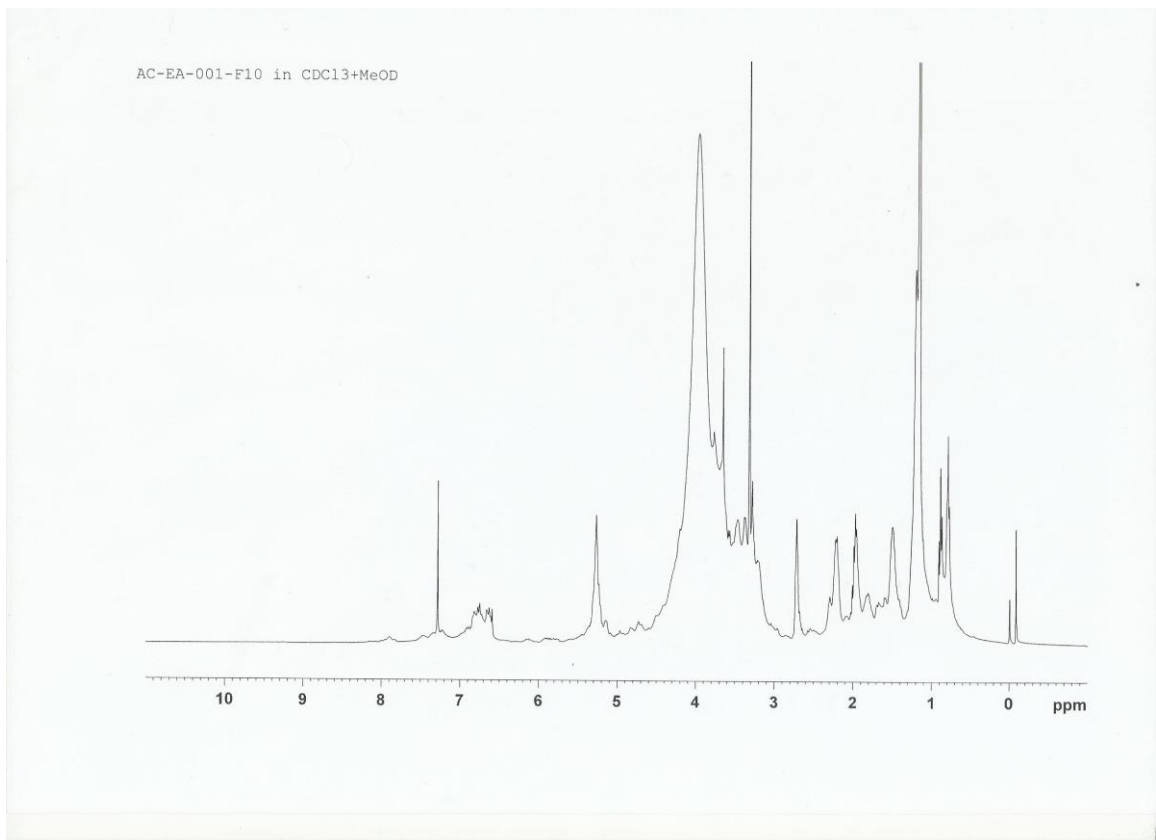
รูปที่ ผ-11 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F7 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบแห้งสบากา



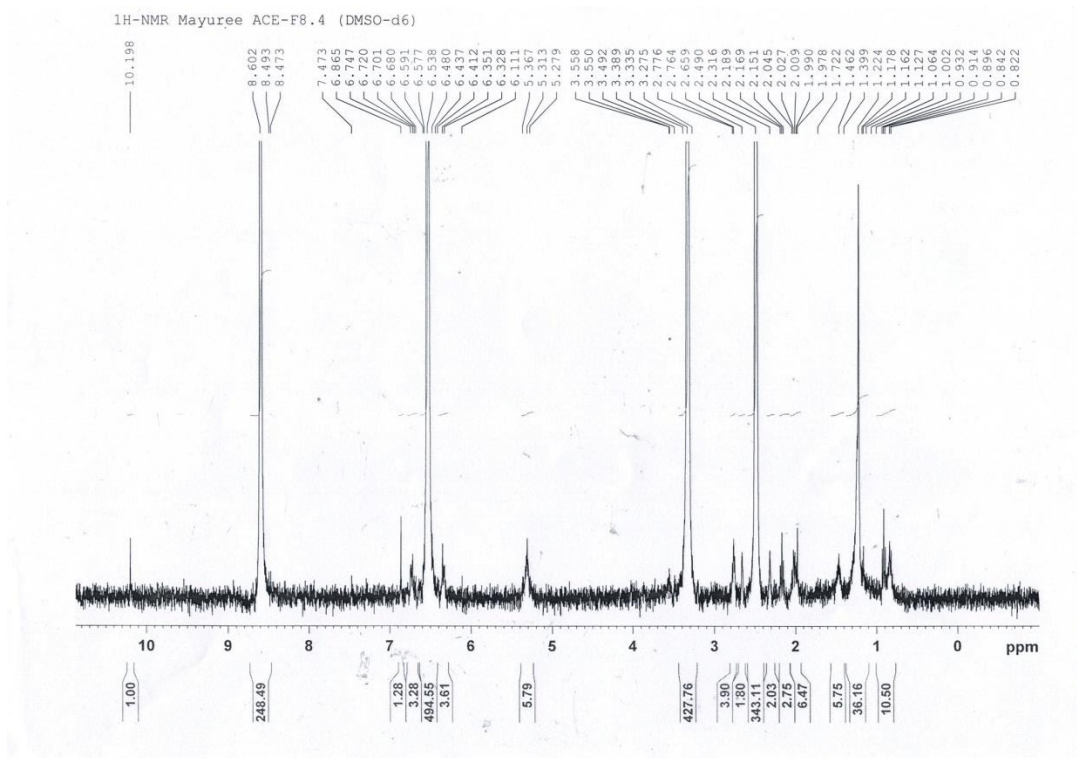
รูปที่ ผ-12 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบแห้งสบากา



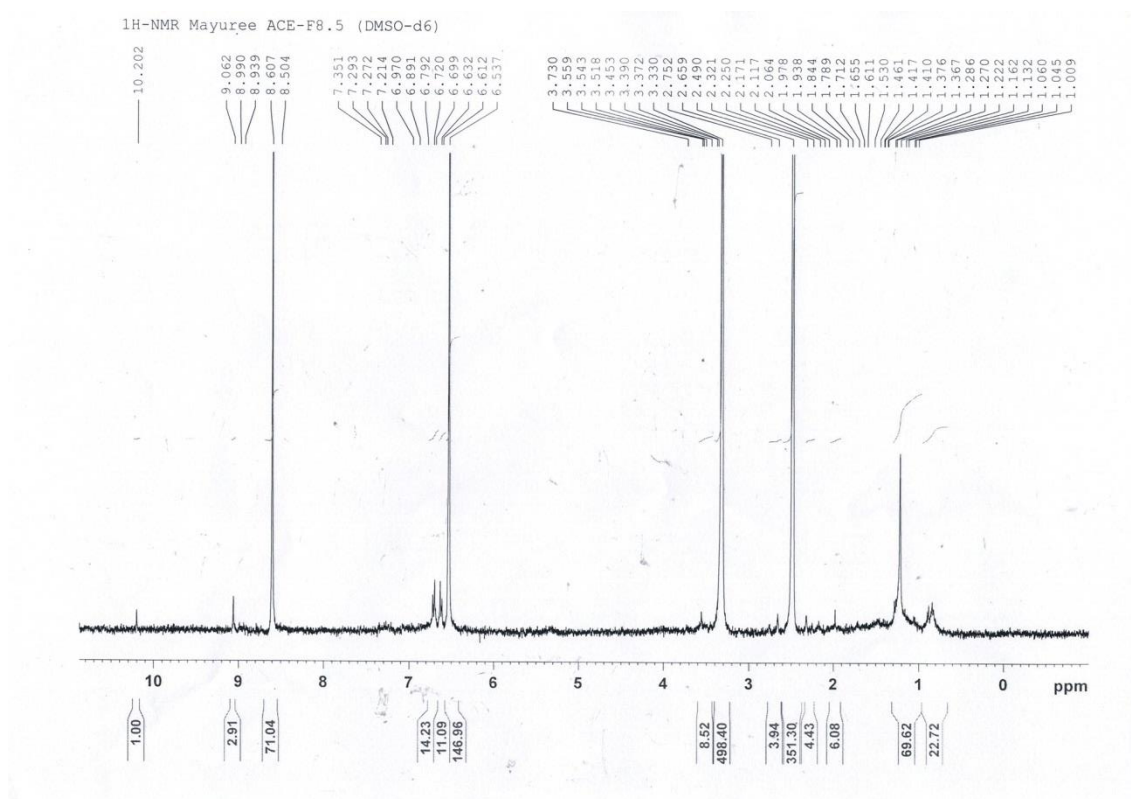
รูปที่ ผ-13 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F9 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบแห้งสาบกา



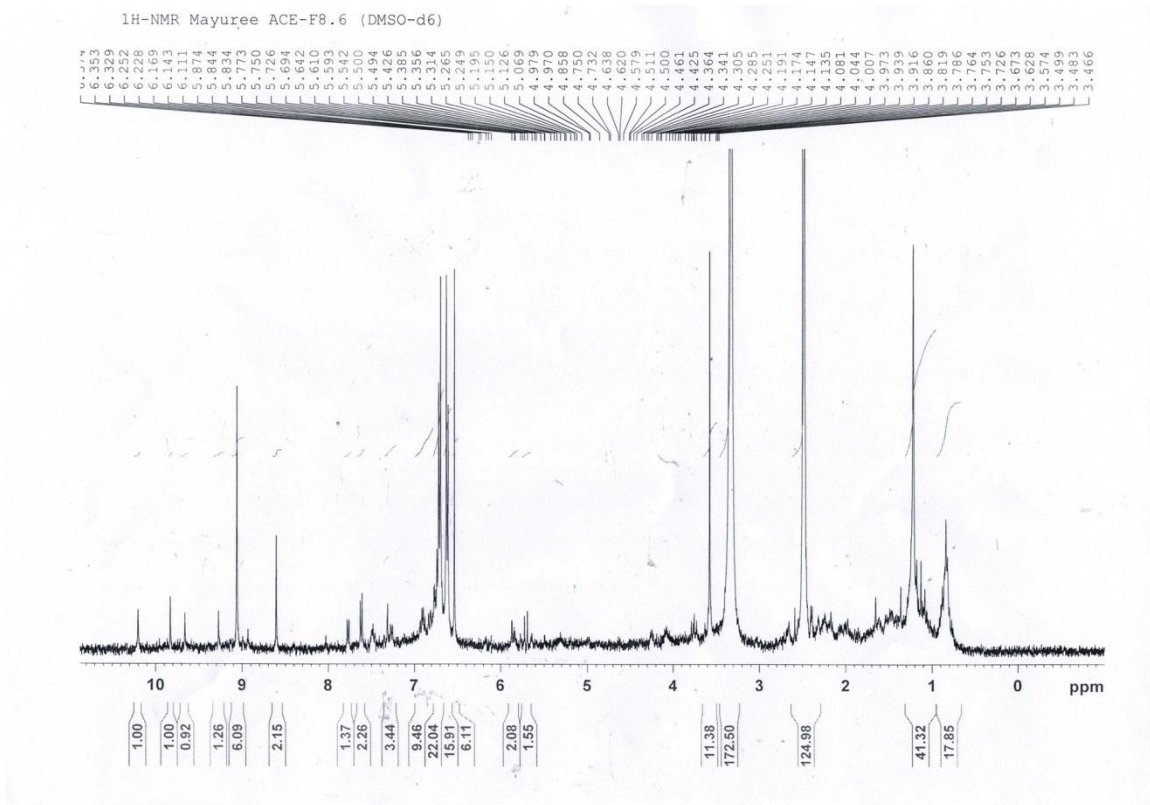
รูปที่ ผ-14 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F10 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบแห้งสาบกา



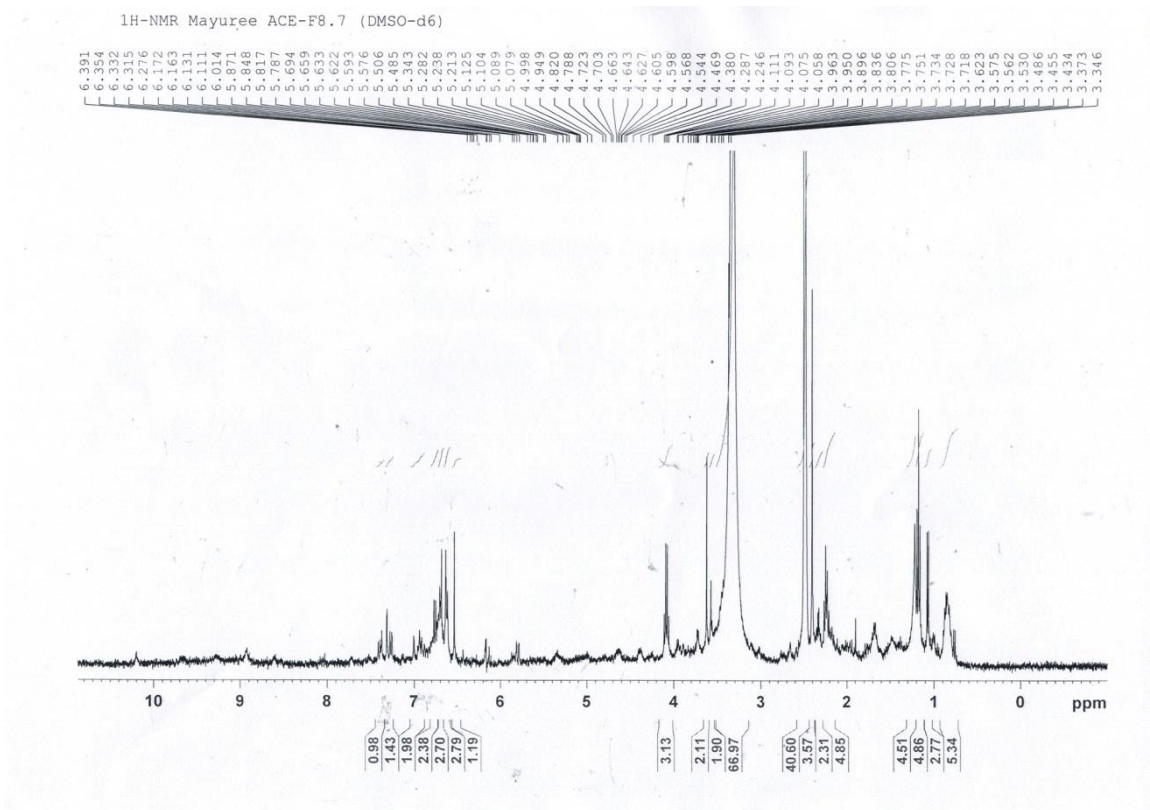
รูปที่ผ-15 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.4 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



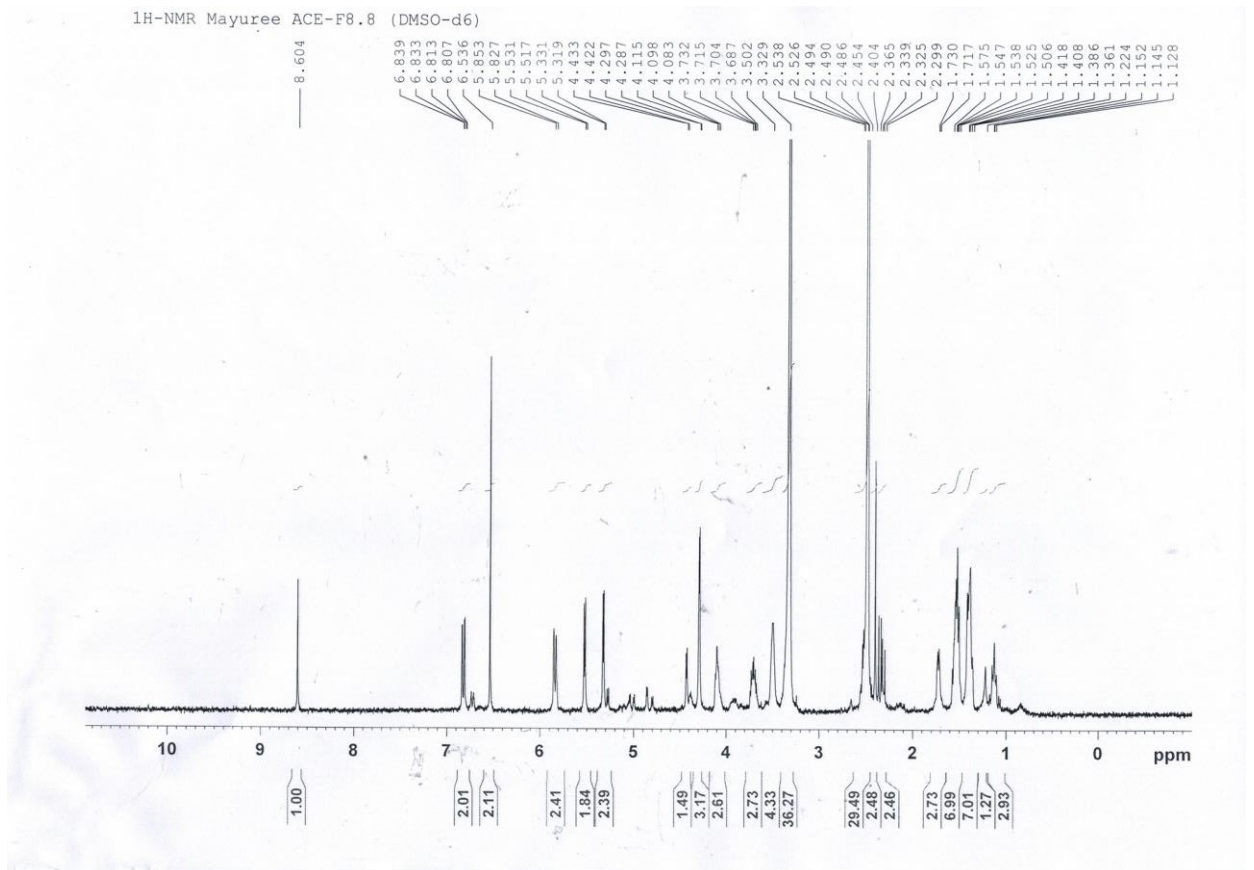
รูปที่ผ-16 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.5 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



รูปที่ 17 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.6 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบเร่งสาบกา

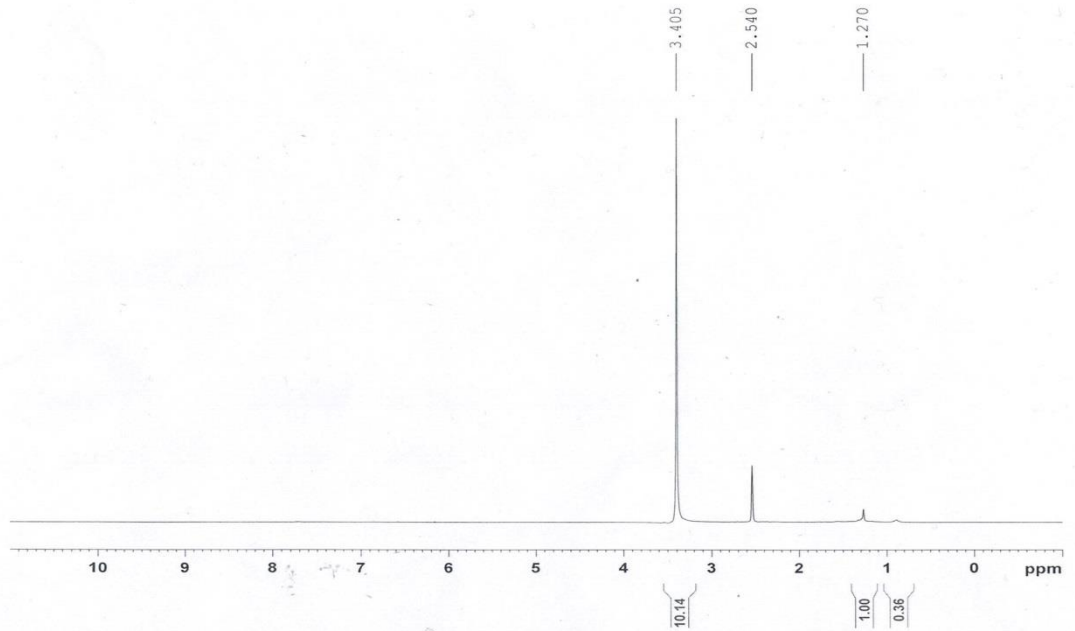


รูปที่ 18 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.7 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบเร่งสาบกา



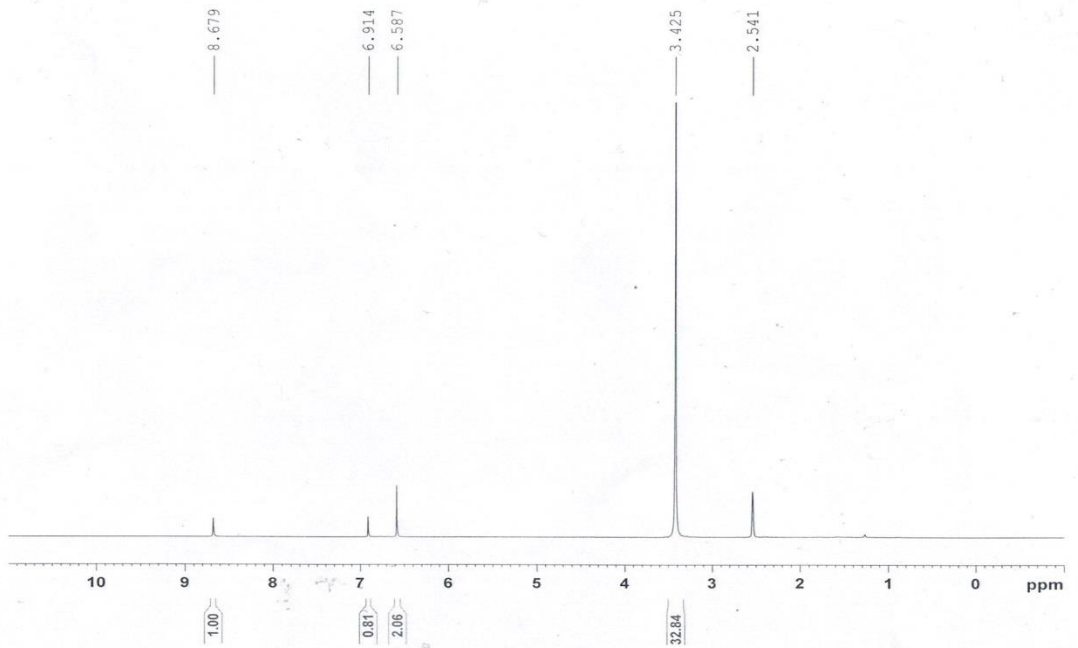
รูปที่ 19 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.8 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

ACE-F8.8-1, 1H NMR, DMSO

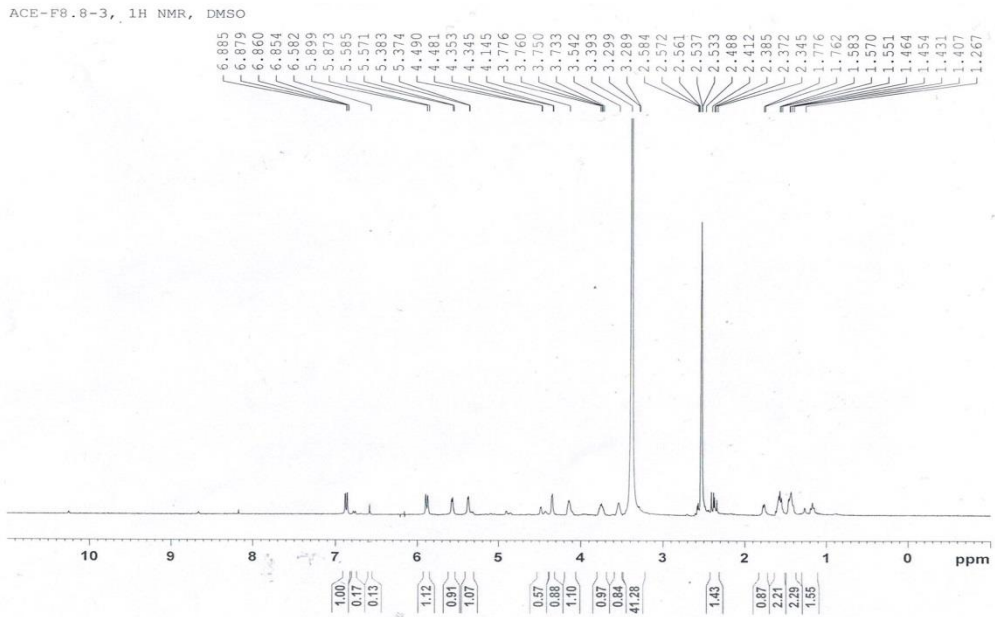


รูปที่ผ-20 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.1 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา

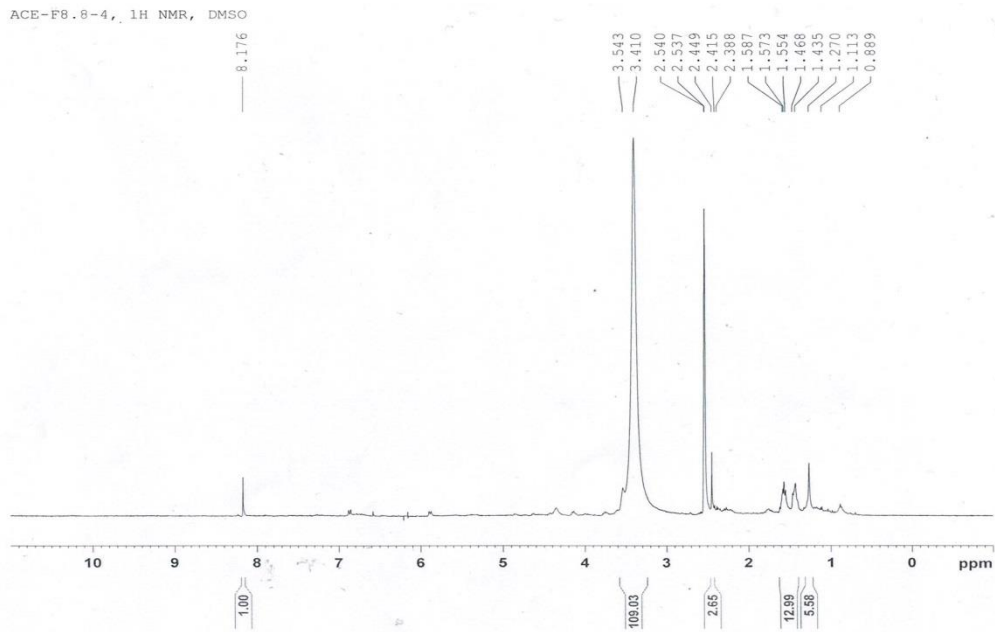
ACE-F8.8-2, 1H NMR, DMSO



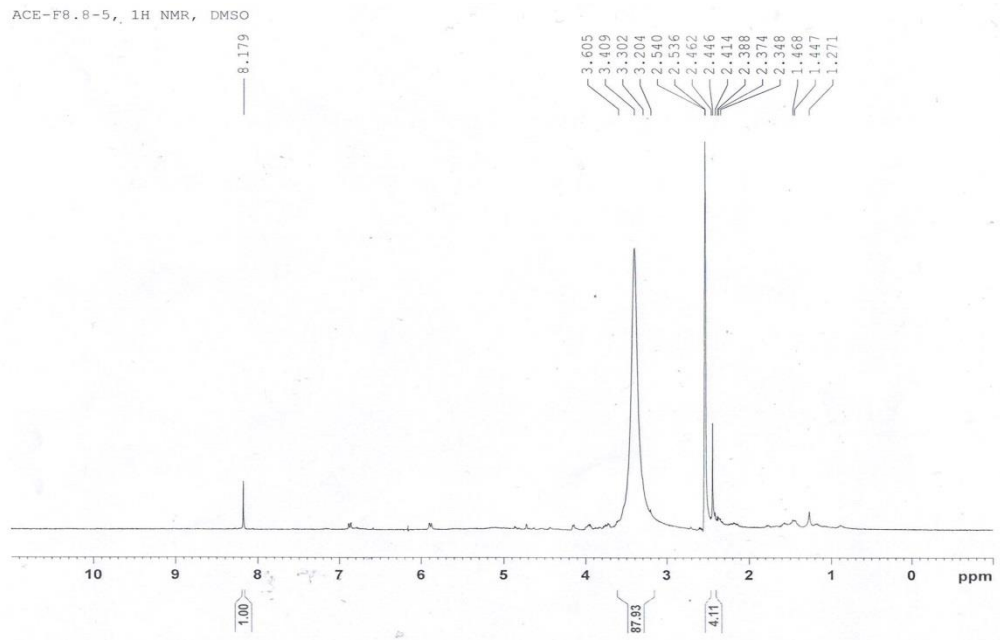
รูปที่ผ-21 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.2 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสบาบร้างสบากา



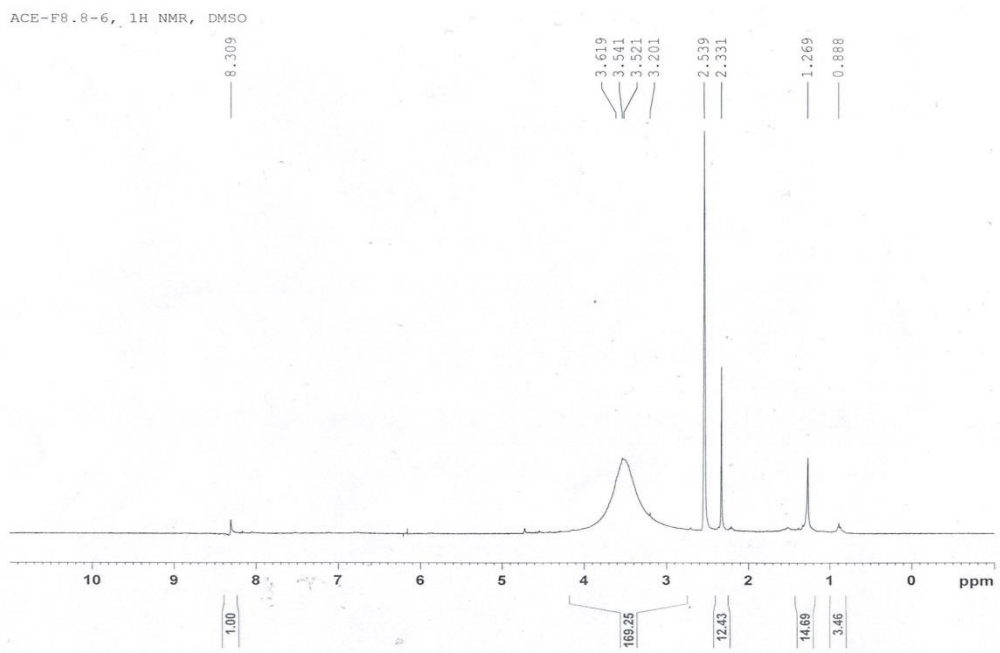
รูปที่ผ-22 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.3 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



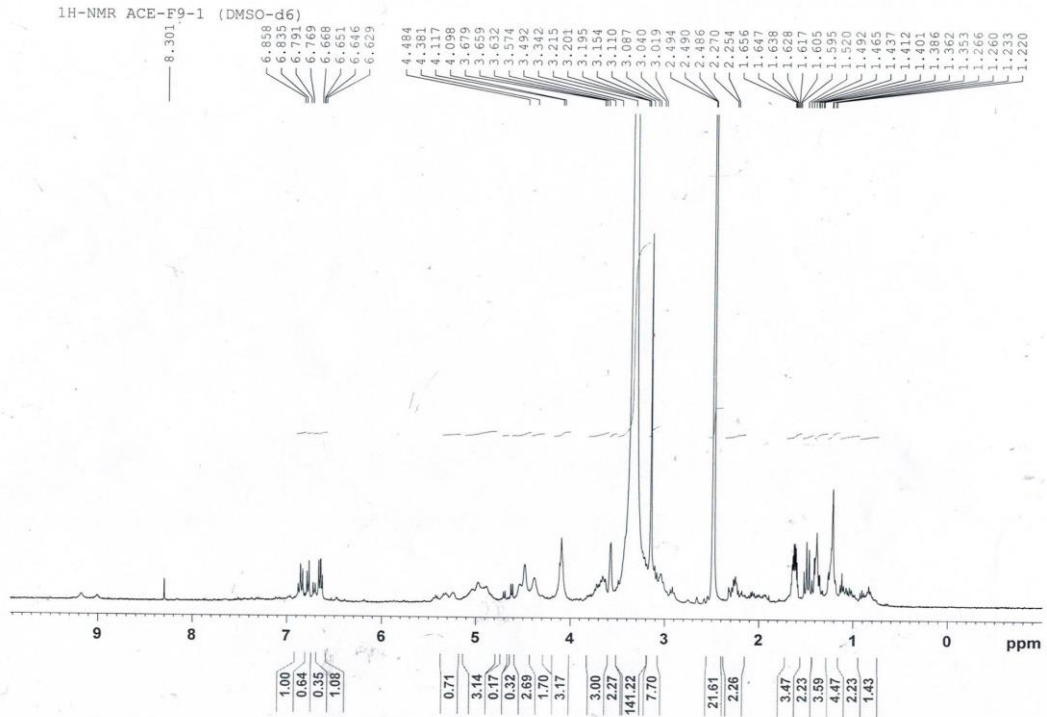
รูปที่ผ-23 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.4 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



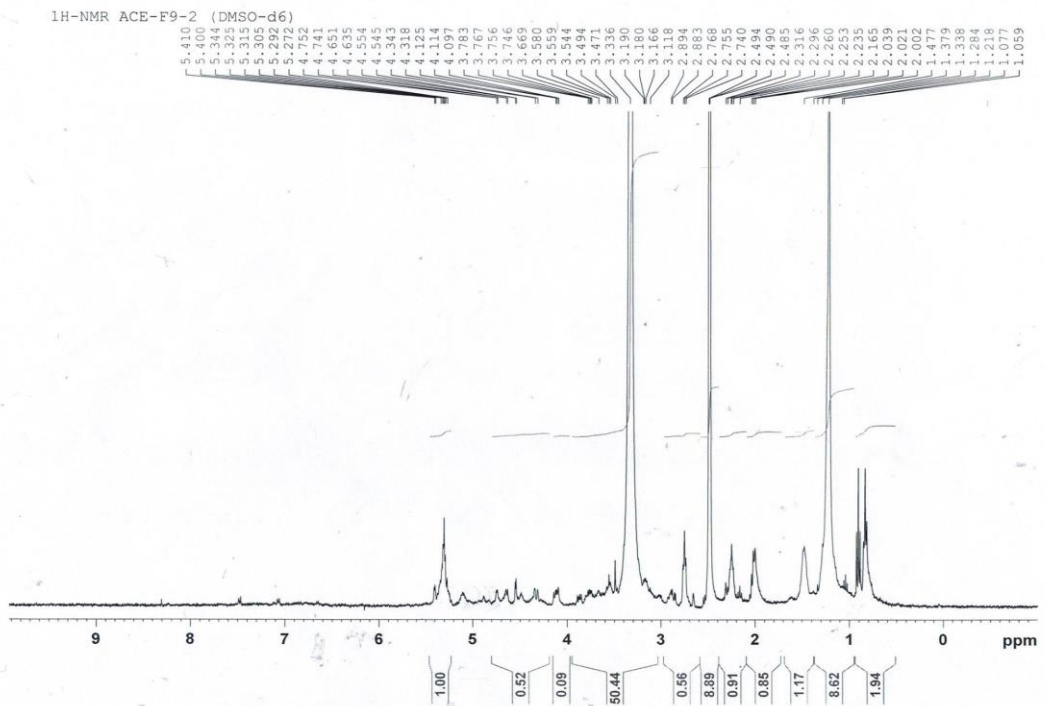
รูปที่ผ-24 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.5 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



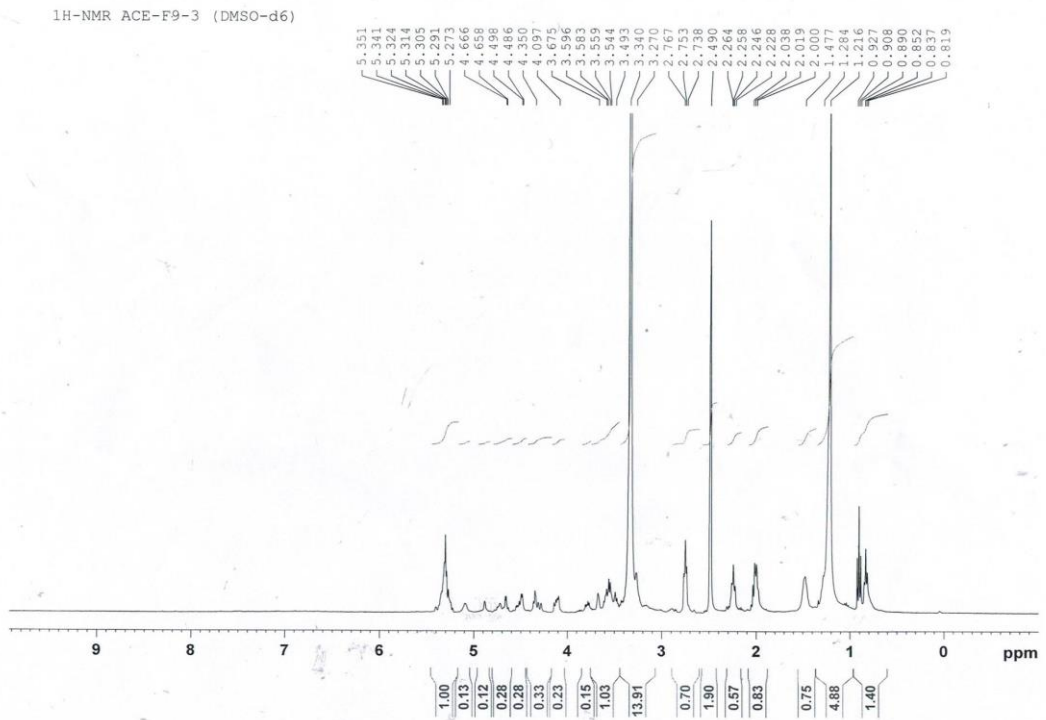
รูปที่ผ-25 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F8.8.6 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



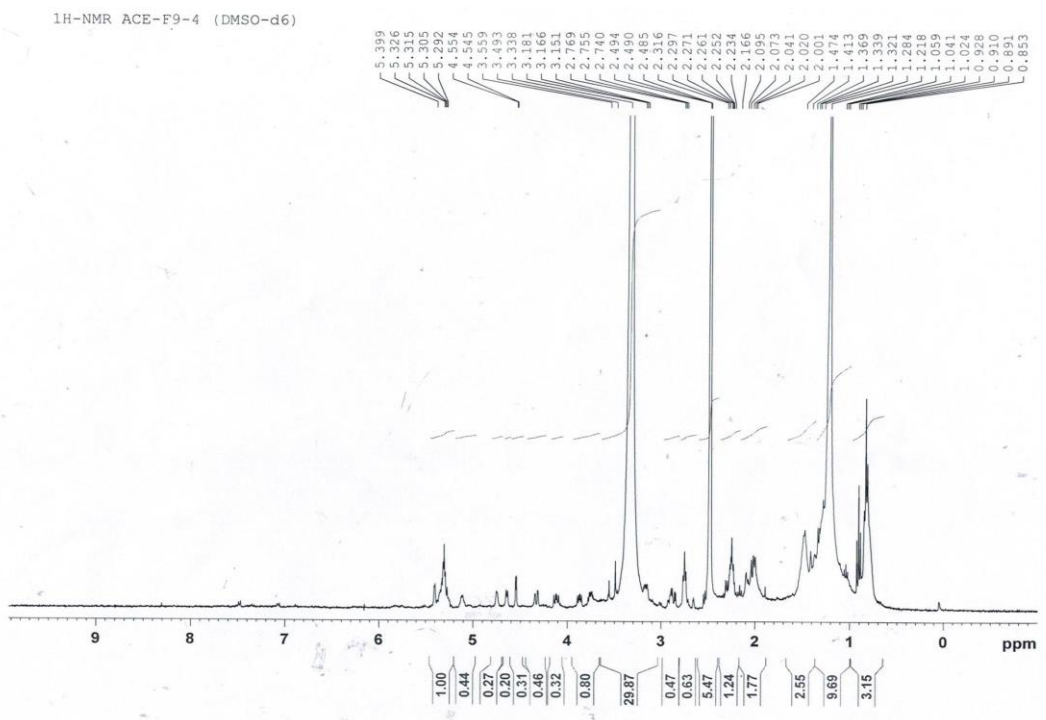
รูปที่ 26 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F9.1 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



รูปที่ 27 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F9.2 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



รูปที่ 28 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F9.3 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา



รูปที่ 29 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัด F9.4 ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบสาบแร้งสาบกา

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นางกล่าวขวัญ ศรีสุข
Mrs. Klaokwan Srisook
2. ตำแหน่ง รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ.เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745-900 ต่อ 3058 E-mail: klaokwan@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2547	Ph.D.	Medical Science	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	ชีวเคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อนุชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

6. ผลงานทางวิชาการ

Books

กล่าวขวัญ ศรีสุข. (๒๕๕๖). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (พิมพ์ครั้งที่ ๒). กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

Srisook, K. & Cha, Y. N. (2005). Biphasic induction of HO-1 in macrophages treated with lipopolysaccharide: role of HO-1 induction in cell survival from oxidative stress. In Y.J. Surh & L. Packer (Eds), *Oxidative stress, Inflammation and Health* (pp. 145-193). Boca Raton: Taylor & Francis.

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวิณีย์ สีมานันท์, ปรียาภา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หิริมเพ็ง และคณะ. (๒๕๕๗). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชน บ้านอ่างเอียด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, ๑๙, ๓๐๔-๓๑๑.

กล่าวขวัญ ศรีสุข*, ปรีดาวรรณ สาลี, ยาวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Klaiwattana, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

, **K.**, Srisook, E., Nachaiyo, W., Chan-In, M., Thongbai, J., Wongyoo, K., et al. (2015). Bioassay-guided isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 165, 94-102.

Jaratjaroonphong, J., Tuengpanya, S., Saeeng, R., Udompong, S., & **Srisook, K.** (2014). Green synthesis and anti-inflammatory studies of a series of 1,1-bis(heteroaryl)alkane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 561-568.

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*, 146, 495-504.

Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 4077-4081.

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.

- Klaokwan Srisook**, Shan-Shu Han, Hyung-Sim Choi, Mei-Hua Li, Hideo Ueda, Chaekyun Kim, Young-Nam Cha. (2006). CO from enhanced HO activity or from CO-donor inhibits both O_2^- and NO production and downregulates HO-1 expression in LPS-stimulated macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 71: 307-318.
- Klaokwan Srisook**, Nam-Hee Jung, Bum-Rae Kim, Seok-Ho Cha, Hye-Sun Kim, Young-Nam Cha. (2005). Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotection effect by NO on cadmium induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicology in Vitro*. 19: 31-39.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2005). Superinduction of heme oxygenase-1 in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by prior depletion of glutathione decreases iNOS expression and NO production. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 12: 70-79.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods in Enzymology*. 396: 368-377.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Cytotoxic and cytoprotective actions of O_2^- and NO ($ONOO^-$) are determined both by cellular GSH level and HO activity in macrophages. *Methods in Enzymology*. 396: 414-424.
- Klaokwan Srisook**, Chaekyun Kim and Young-Nam Cha. (2005). Molecular mechanisms involved in enhancing in HO-1 expression: De-repression by heme and activation by Nrf2, the “one-two” punch. *Antioxidants Redox Signaling*. 7: 1674-1687.
- Klaokwan Srisook**, Nopporn Sarataphan Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in Cow Blood by PCR-ELISA. *Burapha Science Journal*. 10: 49-57.
- Klaokwan Srisook** and Young-Nam Cha. (2004). Biphasic induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages stimulated with lipopolysaccharides. *Biochemical Pharmacology* 68: 1709-1720.
- Chantra Tananyutthawongese, **Klaokwan Saengsombut**, Wasana Sukhumsirichat, Walaya Uthaisang, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. (1999). Detection of bovine

hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *ScienceAsia* 25: 85-90.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *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* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok: The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCCT) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaronphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.

Srisook, K., Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera*

pavieana. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.

Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).

Klaokwan Srisook*, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).

Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).

Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.

Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***. Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by

NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Klaokwan Srisook and Nadtaya Mongkol. Effect of carboxy-PTIO on heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, Bangkok, Thailand, 2006.

Klaokwan Saengsombut, Wasana Sukhumsirichart, Jarun Boonchai, Nopporn Sarataphan and Kosum Chansiri. *Analysis of partial sequences of L5UrRNA genes of Theileria parasites isolated in Thailand and T. sergenti*. *The 25th Congress on Science and Technology of Thailand*, Pitsanuloke, Thailand, 1999, p. 804-805.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. ชื่อ นายเอกรัฐ ศรีสุข
Mr. Ekaruth Srisook
2. ตำแหน่ง คณบดีคณะวิทยาศาสตร์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3009 E: mail ekaruth@buu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

<u>ปี พ.ศ.</u>	<u>คุณวุฒิ</u>	<u>สาขาวิชา</u>	<u>สถานศึกษา</u>
2548	Ph.D.	Chemistry	Inha University, Korea
2539	วท.ม.	อินทรีย์เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล
2534	วท.บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยมหิดล

5. สาขาที่ชำนาญพิเศษ

Organic synthesis, Medicinal chemistry, Natural products

6. ผลงานทางวิชาการ

Journals

กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา หริ่มเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19, 304-311

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2553, 2 :143-150

Keun Sam Jang, Dong Seok Shin, **Ekaruth Srisook**, Ho-Chun Song, Dae Yoon Chi. (2016). Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*. (In press). doi: 10.1016/j.tet.2016.07.010.

Klaiwattana, P., Srisook, K., **Srisook, E.**, Vuthiphandchai, V., & Neamvonk, J. (2016). Effect of cryopreservation on lipid composition and antioxidant enzyme activity of seabass (*Lates calcarifer*) sperm. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15, 157-169.

Klaokwan Srisook*, **Ekaruth Srisook***, Wenuka Nachaiyo, Mingkwan Chan-In, Jitra Thongbai, Karnjanapa Wongyoo, Sasithorn Chawsuanthong, Kanita Wannasri, Sudarat Intasuwan and Kingkan Watcharanawee. (2015). Bioassay-guided fractionation of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. leaves and its mechanistic action through the suppression of iNOS and COX-2 pathways in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 165, 94-102.

Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, **Srisook E**, Rongnparut P. (2015). Inhibition effects of *Vernonia cinerea* active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 30, 174-181.

Rattanawadee Kotewong, Panida Duangkaew, **Ekaruth Srisook**, Songklod Sarapusit, Pornpimol Rongnparut. Structure-function relationships of inhibition of

- mosquito cytochrome P450 enzymes by flavonoids of *Andrographis paniculata*. Parasitology research. 2014; 113(9): 3381-3392.
- Phisit Pouyfung, Aruna Prasopthum, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Mechanism-based Inactivation of Cytochrome P450 2A6 and 2A13 by *Rhinacanthus nasutus* Constituents. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2014; 29:75-83.
- Klaokwan Srisook, Doungnapa Buapool, Rattiya Boonbai, Panadda Simmasut, Yaowaluck Charoensuk, **Ekaruth Srisook**. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less herbal tea. Journal of Medicinal Plants Research, 6; 4077-4081.
- Sirikun Pethuan, Panida Duangkaew, Songklod Sarapusit, **Ekaruth Srisook**, Pornpimol Rongnoparut. Inhibition against mosquito cytochrome P450 enzymes by rhinacanthin-A, -B, and -C elicits synergism on cypermethrin cytotoxicity in *Spodoptera frugiperda* cells. Journal of Medical Entomology. 2012 49(5):993-1000
- Seo JW, **Srisook E**, Son HJ, Hwang O, Cha YN, Chi DY. Syntheses of tetrahydroisoquinoline derivatives that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells Eur J Med Chem. 2008 Jun;43(6):1160-70
- Ekaruth Srisook**,^{*} Areerat Makbodee and Supatra Karnkla “Synthesis of 3-Substituted-*p*-cresol via 2,5-Cyclohexadienone Intermediate” *Burapha Science Journal*. 2006, 11 (2).
- JaeWoong Seo, **Ekaruth Srisook**, Hyo Jin Son, Oon Yoo Hwang, Young Nam Cha, Dae Yoon Chi. Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005,15:3369-3373.
- Han Young Choi, **Ekaruth Srisook**, Kun Sam Jung, Dae Yoon Chi. Electrophilic Aromatic Addition : Eletrophilic Attack at H Position. *J. Org. Chem*. 2005, 70, 1222-1226.
- Ekaruth Srisook** and Dae Yoon Chi, The Syntheses of 3-Substituted 4-(Pyridin-2-ylthio)indoles via Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Bull. Korean Chem. Soc*. 2004, 25, 895-899.

Gloria L. Silva, Roberto R. Gil, Baoliang Cui, Heebyung Chai, Thawatchai Santisuk, **Ekarath Srisook**, Vichai Reutrakul, Patoomratana Tuchinda, Smaisukh Sophasan, Suparp Sujarit *et al.* Novel cytotoxic ring-a *seco*-cycloartane triterpenes from *Gardenia coronaria* and *G. sootepensis*. *Tetrahedron*, 1997, 53, 529-538.

Proceedings

Srisook, K., Thongyen, T., Sawai, P., & Srisook, K. (2016). Role of herbal mixture on in vitro antioxidant activity and eNOS activation in human endothelial cells. *Proceeding of the 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty*. (pp. 245-248). KhonKaen: KhonKaen University.

Wohankla, M., **Srisook, K.**, & Sootanan, P. (2015). Identification of low differentially expressed responsive genes in microarray data of LPS-stimulated macrophage RAW264.7. *Proceeding of the 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* (pp.752-757). Bangkok: the Thai Society for Biotechnology.

Seemakhan, S., & **Srisook, K.** (2014). *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* (pp. 158-163). Phuket: Natural Product Research Center of Excellence, Prince of Songkla University.

Buranakit, P., **Srisook, K.**, Srisook, E., & Hrimpeng, K. (2014). Bioassay-guided isolation, characterized and antibacterial activity of isolated compound from *Zingiber mekongense* rhizome. *Proceeding of the 1st Joint ACS AGFD – ACS ICSCCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok: The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICSCCT) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).

Udompong, S., Tuengpanya, S., Jaratjaroonphong, J., & **Srisook, K.** (2013). Anti-inflammatory effect of bis(heteroaryl)alkanes in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In *Proceedings of the 5th Science Research Conference*.(pp. 273-279). Phayao: University of Phayao.

- Srisook, K.**, Nounnang, N., Thabthim, Y., & Srisook, E. (2012). A comparative study of antioxidant and anti-tyrosinase activities of rhizomes and leaves of *Etlingera pavieana*. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.332-551.335) Chiangmai: ChaingMai University.
- Srisook, E., Palachot, M., & **Srisook, K.** (2012). *In vitro* anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* rhizomes and its compounds in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Proceedings of the 4th International Natural Products for Health and Beauty* (pp. 551.329-551.331). Chiangmai: ChaingMai University.
- Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. (2011). Proteome Analysis of Murine Macrophage Cell in Response to Ethyl 2-acetyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate (EAMA). Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. p62-66. (Fulltext, CD version).
- Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook. Evaluation of Antioxidant Capacity of Fractions from *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. Rhizome. Proceeding of the 3rd International Natural Products for Health and Beauty. 16-18 March, 2011. (Fulltext, CD version).
- Yaowalak Charoensuk, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Siriporn Kongniyai. Anti-tyrosinase activity of extracts and compound from *Amomum biflorum* Jack. Leaves. Proceeding of the 3rd International Conference on Biochemistry and Molecular Biology. 6-8 April, 2011. P201-204. (Fulltext, CD version).
- Jirapa Chantiman, Ekaruth Srisook, Narumon Phaonakrop, Janthima Jaresitthikunchai, Sittiruk Roytrakul, **Klaokwan Srisook***. Proteomic analysis of murine macrophage cell line in response to lipopolysaccharide. the 6th International Symposium of the Protein Society of Thailand. 31 Aug-2 Sep 2011. P167-173.
- Yaowalak Charoensuk, Ekaruth Srisook and **Klaokwan Srisook***. Inhibitory effect of (E)-but-1-enyl-4-methoxybenzene isolated from leaves of *Amomum biflorum* Jack. On nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Proceeding of the 1st International Congress on Natural Products. Pang-nga, Thailand, 17-18 October, 2011. P133-136.

Nadtaya Mongkol, **Klaokwan Srisook***, Ekaruth Srisook and Supatra Karnkla. Suppressive effects of nitric oxide (NO) production and inducible nitric oxide synthase by NAMDA derivatives in LPS-stimulated macrophages. *The 9th National Symposium on Graduate Research*, Chonburi, Thailand, 2008.

Phrommanich, S., Techasauvapak, P., **Srisook, E.**, Mujchacheep, S., Hrimpeng, K. *Screening for anti-Staphylococcus aureus activity of plant extracts*. The 18th Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2000.8.

Ekaruth Srisook, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. Syntheses and biological activity of NAMDA derivatives. The 1st Congress on Chemistry and Applied Chemistry, Chonburi, Thailand, Mar 2007.

Ekaruth Srisook*, Supatra Karnkla and Klaokwan Srisook. "Syntheses of NAMDA derivatives as nitric oxide reducing agents." *The 6th National Symposium on Graduate Research, Bangkok, Thailand, 2006*.

