



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินศักยภาพและการสร้างตำรับยาใหม่ของสมุนไพรไทย
สำหรับการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ
(Evaluation and new formulation of Thai herbs
for treatment of erectile dysfunction)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข
รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 181711

สัญญาเลขที่ 74/2559

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การประเมินศักยภาพและการสร้างตำรับยาใหม่ของสมุนไพรไทย

สำหรับการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ

(Evaluation and new formulation of Thai herbs

for treatment of erectile dysfunction)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม พ.ศ. 2561

บทคัดย่อ

โรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ คือการที่อวัยวะเพศชายไม่สามารถแข็งตัวหรือคงการแข็งตัวได้ตลอดการมีเพศสัมพันธ์ สาเหตุหนึ่งของโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศของเพศชายคือ ภาวะความเครียดจากออกซิเดชันทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ช่วยในการคลายตัวของหลอดเลือดลดลง ส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงอวัยวะเพศชายไม่เพียงพอจึงเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาตำรับยาสมุนไพรสสูตร BUU-ED-B3 ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากกวาวเครือแดงและกระชายดำ พบว่าสูตรสมุนไพรมีฤทธิ์ที่ดีในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 และมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH และซูเปอร์ออกไซด์ จากนั้นทำการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากตำรับยาสมุนไพรรไทยสูตร BUU-ED-B3 โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมด 13 ส่วน คือ BUU-ED-B3-1 ถึง BUU-ED-B3-13 ซึ่งพบว่าส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9 มีจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์สูงมากกว่าเซลล์ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ แต่ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-9 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-7 ที่ความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำการแยกสารจากส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-7 โดยเทคนิค HPLC และพิสูจน์โครงสร้างด้วยการวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลกับสเปกตรัมของ NMR ของรายงานก่อนหน้านี้ ได้สารบริสุทธิ์จำนวน 6 ชนิด คือ สาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone สาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone สาร 5,7-dimethoxyflavone สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone สาร 3,5,7-trimethoxyflavone และสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone ผลการศึกษาเหล่านี้อาจเป็นข้อมูลในการใช้สารออกฤทธิ์เหล่านี้เป็นตัวกำหนดปริมาณของสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพรร BUU-ED-B3 ที่มีฤทธิ์ในการรักษาอาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศในอนาคต

คำสำคัญ : กระชายดำ, กวาวเครือแดง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, เอนไซม์ eNOS, เซลล์เยื่อบุ

Abstract

Erectile dysfunction (ED) is the inability of penis to maintain or achieve completely sexual intercourse. Oxidative stress is one risk factor of ED. This causes insufficient blood supply to penis by decrease in nitric oxide regulating vasorelaxation. In this study, we investigated Thai herbal mixture BUU-ED-B3, which include extracts of *Butea superba* Roxb. (Leguminosae family) root and *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker rhizomes. Herbal mixture BUU-ED-B3 increased nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cell line (EA.hy 926 cells) and scavenged DPPH and superoxide radicals. The herbal mixture was fractionated by silica gel column chromatography to afford 13 fractions (BUU-ED-B3-1 to BUU-ED-B3-13). The BUU-ED-B3-7 and BUU-ED-B3-9 increased significantly nitric oxide production compared to control cells. The fraction BUU-ED-B3-9 caused significant cytotoxicity against endothelial cells but BUU-ED-B3-7 did not. Thus, 6 compounds (5,7,3',4'-tetramethoxyflavone, 3,5,7,3'4'-pentamethoxyflavone, 5,7-dimethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone, 3,5,7-trimethoxyflavone and 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone) were isolated from the fraction BUU-ED-B3-7 by HPLC technique. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis and by comparison of their NMR spectroscopic data with those reported in the literature. The obtained data indicated that the active compounds might be used as a marker for quality control of herbal mixture to determine bioactive compound from herbal mixture BUU-ED-B3 for treatment of erectile dysfunction.

Keywords: *Kaempferia parviflora*, *Butea superba*, Antioxidant activity, eNOS, Endothelial cell

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ นางสาวเพชรรัตน์ ไสว นางสาวฐิติพร ทองเย็น นางสาวสุปรีดา แซ่ตั้ง และนางสาวสุนันทา สีสมุทร์ สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
สารบัญตาราง	7
บทนำ	8
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
วิธีการทดลอง	20
ผลการทดลอง	30
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	71
บรรณานุกรม	75
ผลผลิตของโครงการวิจัย	78
ประวัตินักวิจัย	79

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2-1	กวาวเครือแดง	15
ภาพที่ 2-2	เหง้ากระชายดำ	16
ภาพที่ 2-3	ใบมะรุ้ม	17
ภาพที่ 2-4	ใบ ลำต้นและดอกของต้นค้ำควาดำ	18
ภาพที่ 2-5	ลักษณะเหง้าของเร่วหอม (A) ลักษณะใบของเร่วหอม (B) และลักษณะดอกของเร่วหอม (C)	19
ภาพที่ 4-1	ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสมุนไพรวัวเดี่ยวและ ตำรับยาสมุนไพรวัว BUU-ED-B3	31
ภาพที่ 4-2	ร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรวัวเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3	32
ภาพที่ 4-3	จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัส กับสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3	34
ภาพที่ 4-4	ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัส กับสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำ จากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3	36
ภาพที่ 4-5	ผล TLC จากการจุดสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากกระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3	37
ภาพที่ 4-6	ผล TLC จากการสเปกโตรสโกปีส่วนสกัดย่อย 13 แฟรงชัน (BUU-ED-B3-(1-13))	39
ภาพที่ 4-7	จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัส กับส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรงชัน	41
ภาพที่ 4-8	ร้อยละความมีชีวิตรอดในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัส กับส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรงชัน	42
ภาพที่ 4-9	ร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรงชัน	44
ภาพที่ 4-10	ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ของสารสกัดสมุนไพรวัวเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรวัวสูตร BUU-ED-B3	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 4-11	ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) แพรกชั้น ของตำรับยาสมุนไพรสูตร	60
ภาพที่ 4-12	ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ของแพรกชั้นย่อยของ BUU-ED-B3-7	64
ภาพที่ 4-13	ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ของแพรกชั้นย่อยของ BUU-ED-B3-9	65
ภาพที่ 4-14	โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone	68
ภาพที่ 4-15	โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone	68
ภาพที่ 4-16	โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7-dimethoxyflavone	69
ภาพที่ 4-17	โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7,4'-trimethoxyflavone	69
ภาพที่ 4-18	โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7-trimethoxyflavone	69
ภาพที่ 4-19	โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone	70
ภาพที่ 5-1	การเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของสาร methoxyflavone ที่สกัดได้	74

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 3-1	ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล้ระบบ gradient	27
ตารางที่ 3-2	การรวมแฟรกชัน	28
ตารางที่ 4-1	ผล %yield ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	30
ตารางที่ 4-2	ผลการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและ ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	30
ตารางที่ 4-3	ผลการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	32
ตารางที่ 4-4	ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมมนุษย์ EA.hy926 เมื่อทดสอบด้วย สารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	33
ตารางที่ 4-5	ปริมาณร้อยละความมีชีวิตรอดในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมมนุษย์ EA.hy926 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	35
ตารางที่ 4-6	น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชันจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	38
ตารางที่ 4-7	จำนวนเท่าการผลิตไนตริกออกไซด์ และร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ เมื่อสัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อยทั้ง 13	40
ตารางที่ 4-8	ผลการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรกชัน	43
ตารางที่ 4-9	% yield TLC NMR การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ร้อยละความมีชีวิตรอด และจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมมนุษย์ EA.hy 926 ของแต่ละแฟรกชันจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	45
ตารางที่ 4-10	การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7	47
ตารางที่ 4-11	การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่องHPLC Water 600	51
ตารางที่ 4-12	การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่องHPLC Agilent infinity 1260	55
ตารางที่ 4-13	น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชัน BUU-ED-B3-7	57
ตารางที่ 4-14	น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชัน BUU-ED-B3-9	57
ตารางที่ 5-1	การวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารที่แยกได้จาก BUU-ED-B3-9	73

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction, ED) หรือ ED หมายถึงภาวะที่ไม่สามารถทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัว หรือคงการแข็งตัวอยู่เป็นเวลานานพอจนกระทั่งเสร็จสิ้นการมีเพศสัมพันธ์ได้อย่างที่คาดหวัง โดยมีหลายสาเหตุและปัจจัยทั้งทางด้านร่างกาย จิตใจ หรือภาวะทางสังคม ความเครียดระดับการศึกษา มีผลต่อภาวะนี้ ซึ่งสภาวะการทำงานที่มีการแข่งขันสูง การใช้ชีวิตที่สัมผัสกับสารเคมี และอื่นๆในสังคมปัจจุบันทำให้มีความเสี่ยงมีความเสื่อมสมรรถภาพทางเพศนี้เพิ่มขึ้น และปัญหาที่เกิดจากการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศก็ส่งผลให้เกิดความเดือดร้อนทั้งกายและใจต่อผู้ป่วย ทั้งสูญเสียความมั่นใจ อับอาย ขาดความสุขในชีวิต จนบางครั้งก่อให้เกิดปัญหาครอบครัวแตกแยก หย่าร้างซึ่งทำให้คุณภาพชีวิตของคนเหล่านั้นแย่ลง ส่งผลต่อสุขภาพกายและจิตใจของผู้ป่วยและคนใกล้ชิดได้ ภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน สูบบุหรี่ และรุนแรง การผ่าตัดต่อลูกหมาก และพบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามอายุที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะนี้คือ อายุ โรคอ้วน การสูบบุหรี่เป็นปัจจัยเสี่ยงเดียวกันกับโรคหัวใจและหลอดเลือด มีหลักฐาน ในทางปริคลินิกเภสัชวิทยา และทางคลินิกเภสัชวิทยาว่า โรคหลอดเลือดหัวใจเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดภาวะนี้ (Cirino et.al, 2006, Ferrini et.al, 2001, Low and Tan, . 2007, MacKay, 2004, Toda et.al, 2005)

ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นยาที่สามารถรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศมาแต่โบราณ ทั้งในรูปแบบสมุนไพร ตำรับยา และยาแผนปัจจุบัน ที่เห็นผลอย่างชัดเจน คือ ยาไวอากร้า (Viagra) ที่เริ่มจากการพัฒนายาขยายหลอดเลือดในตอนแรกแต่ผลข้างเคียงทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัวได้ มีตัวยาที่สำคัญคือ Sildenafil citrate ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ phosphodiesterase-5 (PDE-5) ทำให้ลดการสลายตัวของ cGMP ที่ถูกสร้างโดยการกระตุ้นจาก nitric oxide จึงทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดมากขึ้น และทำให้อวัยวะเพศชายแข็งตัวได้ เมื่อมีการจำหน่ายยาไวอากร้าในท้องตลาดพบว่ามีความนิยมใช้เป็นจำนวนมาก

แต่อย่างไรก็ตามพบว่ามีผลข้างเคียงในการใช้ยาตามปกติ หรือใช้ยาเกินขนาด เช่น สูญเสียการมองเห็นอย่างฉับพลัน หรืออาจเกิดตาบอด การสูญเสียการได้ยินอย่างฉับพลัน การเจ็บปวดอวัยวะเพศที่เกิดจากการแข็งตัว อาการวิงเวียนศีรษะ ปวดศีรษะ ความดันโลหิตสูง และผลข้างเคียงเมื่อใช้ร่วมกับยาอื่น เช่น ยาในกลุ่มไนเตรท บางครั้งบางรายที่ใช้ยาเกินขนาดอาจทำให้เสียชีวิตได้ เนื่องจากยามีราคาแพง และมีความต้องการในการใช้ยามาก ทางองค์การเภสัชกรรมจึงได้ทำการผลิตและจำหน่ายยาที่มีตัวยา Sildenafil citrate เองในชื่อ Sidegra เพื่อลดราคาขายในตลาดลง และลดการจำหน่ายยาเถื่อน

อย่างไรก็ตามการใช้ยา Viagra เป็นการรักษาที่ปลอดภัยเพียงอย่างเดียว และยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนาหลายประการ แต่ในขณะที่ทางสมุนไพรดั้งเดิมที่มีสรรพคุณบำรุงกำลังด้านสมรรถภาพทางเพศของไทยและเอเชีย เช่น กระจ่างดำ โดไม่รู้ล้ม ปลาไหลเผือก ม้ากระทืบโรง กวาวเครือแดง กำลังเสือโคร่ง กำลังวัวเถลิง ค้างคาวดำ เป็นต้น ที่มีประวัติการใช้มาอย่างยาวนานและมีการใช้ในการบำรุงสุขภาพด้วย ทางคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทำการวิจัยเพื่อทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรเหล่านี้ ในผลการขยายหลอดเลือด และรวมทั้งการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ และการเกิดการอักเสบ ที่เป็นสาเหตุในเสื่อมของอวัยวะหรือโปรตีนในร่างกาย และพัฒนาตำรับยาใหม่ที่เกิดจากการสกัดด้วยยาจากสมุนไพรเหล่านี้ ที่เป็นทางเลือกให้แก่ประชาชนในการรักษาแบบป้องกัน (Chemopreventive therapy) บำรุงร่างกาย และแก้ไขภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศได้ ปราศจากผลข้างเคียงที่รุนแรง นอกจากนี้ยังเป็นส่งเสริมการปลูกและจำหน่ายสมุนไพรภายในประเทศ ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศอีกด้วย

1.2 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เซลล์เยื่อบุทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เป็นเครื่องหมายของการเกิดโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจะมีไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) เป็นสารสื่อกลางในการรักษาภาวะธำรงดุลย์ของหลอดเลือด โดยยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด ป้องกันการจับและการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาว และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดเกิดการคลายตัว ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Vanhoutte et al., 2009) สาเหตุที่ทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดทำงานผิดปกติและเกิดพยาธิสภาพของโรคความดันโลหิตสูง และภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการลดลงของชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ไนตริกออกไซด์ที่ควบคุมการทำงานของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดถูกผลิตจากเอนไซม์ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ไนตริกออกไซด์นี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ soluble guanylate cyclase ที่อยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบทำให้มีการเพิ่ม cGMP ส่งผลให้เกิดขยายตัวของหลอดเลือด และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือด (Koltermann et al., 2007) ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ขึ้นอยู่กับสมดุลระหว่างการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ และการสลายของไนตริกออกไซด์ ปัจจัยที่ทำให้ปริมาณไนตริกออกไซด์น้อยลง คือ ความเครียดจากออกซิเดชัน ความชราภาพ การพักผ่อนไม่เพียงพอและการสูบบุหรี่ เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009) ดังนั้นการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในผู้สูงอายุ หรือในผู้ป่วยกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นวิธีการรักษาที่น่าสนใจอีกทางหนึ่ง แม้ว่าเอนไซม์ eNOS เป็นเอนไซม์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา แต่ปริมาณการแสดงออกของยีนสามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยสิ่งกระตุ้นทางชีวเคมี ชีวฟิสิกส์ และฮอร์โมน ทั้งในสภาวะสรีรวิทยา และพยาธิสภาพ (Li et al., 2002) รวมทั้งอาหาร (Vanhoutte et al., 2009) ปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007;

Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010) ดังนั้นการบริโภคส่วนสกัดพืชต่างๆ นี้จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันและรักษากลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมทั้งการกระตุ้นให้มีปริมาณ BH4 ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น เพื่อป้องกันการปฏิกริยา uncoupling ทำให้เกิด superoxide anion radical (O_2^-)

ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS มีหน้าที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือดและการยึดของเกร็ดเลือดจับกับผนังหลอดเลือด ลดการจับของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด และทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง (Forstermann and Sessa, 2012) เป็นผลให้การไหลเวียนของเลือดเป็นปกติ ผู้ป่วยที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูง ผู้สูบบุหรี่ และผู้ที่มีความเครียด เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009; Forstermann and Sessa, 2012) และผู้ป่วยโรคหลอดเลือดและหัวใจ มีเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เช่น มีชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริก ออกไซด์ลดลง โดยลดการผลิตไนตริกออกไซด์ และเพิ่มการผลิต reactive oxygen species ทำให้เกิดความเครียดจากออกซิเดชัน วิธีการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่มปริมาณซับสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH₄ และการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การบริโภคสารจากธรรมชาติที่สามารถเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดเป็นวิธีการหนึ่งในการป้องกันผู้ที่มีความเสี่ยงในการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ และรักษาอาการของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจ เนื่องจากสารที่ได้จากธรรมชาติมีความปลอดภัย การค้นคว้าหาสารที่จะนำมาเป็นยาขยายหลอดเลือด โดยเฉพาะจากพืชที่มีศักยภาพในการเพิ่มไนตริกออกไซด์ เช่น สมุนไพรบำรุงสุขภาพสมรรถภาพทางเพศเป็นพืชพื้นถิ่นที่พบในประเทศไทยและยังไม่มีการศึกษาวิจัยในต่างประเทศ ควรทำวิจัยอย่างเร่งด่วน เพื่อให้สิทธิดังกล่าวตกกับประเทศไทย ดังนั้นการศึกษากการออกฤทธิ์และกลไกในการขยายหลอดเลือดโดยเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ของสมุนไพรเหล่านี้ และการค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ในการขยายหลอดเลือดนี้ จึงมีความสำคัญเพื่อความเข้าใจและยืนยันการออกฤทธิ์ของสมุนไพรเพื่อที่จะนำส่วนสกัดของสมุนไพรเหล่านี้ไปพัฒนาเป็นยาบำรุงสุขภาพด้านสมรรถภาพทางเพศ นอกจากนี้สมุนไพรมีสารหลายชนิดน่าจะช่วยในการป้องกันการเกิดโรคเช่น ต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ และการนำสมุนไพรมาสกัดรวมกันจะทำให้ได้ตำรับยาใหม่ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นด้วย

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกสารจากตำรับยาของสมุนไพรมะนาวโดยเทคนิค bioassay-guided isolation
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด
3. เพื่อศึกษาข้อมูลทางโครมาโตกราฟีและข้อมูลทาง NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำสมุนไพรมะนาวที่คัดเลือกในปีที่ 1 ที่ออกฤทธิ์ดีมาศึกษาการสร้างตำรับใหม่ โดยการผสมสมุนไพรมะนาวที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดี ทำการแยกสารบริสุทธิ์ที่เป็นตัวออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัด โดยวิธี bioassay-guided isolation ด้วยเทคนิค column chromatography และ HPLC และพิสูจน์โครงสร้างของสารกึ่งบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์โดยเทคนิค 1D, 2D NMR spectroscopy, High resolution mass spectroscopy เป็นต้น.

ทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay) ผลของส่วนสกัดต่อปริมาณการกระตุ้นการผลิต nitric oxide และทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไนตริกออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์จาก L-arginine เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS, EC 1.14.13.39) มีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม เกิด five-electron oxidation ขึ้นที่อะตอมของไนโตรเจนที่อยู่ในกลุ่มกัวนิดิน (guanidine) ของ L-arginine ได้เป็นไนตริกออกไซด์รวมทั้งได้ L-citrulline เป็นผลผลิตร่วม โดยในปฏิกิริยานี้จะอาศัย nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) flavin adenine dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), heme, calmodulin (CaM) และ tetrahydrobiopterin (BH₄) เป็นโคแฟกเตอร์ร่วม (Alderton et al., 2001) โมเลกุลของ NOS ที่แยกทีมีลักษณะเป็น dimer โครงสร้างของ NOS แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย reductase domain และ oxygenase domain โดย oxygenase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของกลุ่ม heme, L-arginine และ BH₄ ส่วน reductase domain ประกอบด้วยบริเวณจับของ NADPH, FAD, FMN และ calmodulin ในขณะที่ปฏิกิริยาจะมีการไหลของอิเล็กตรอนจาก NADPH ผ่านไปสู่ FAD และ FMN ใน reductase domain และไปที่กลุ่ม heme ใน oxygenase domain ซึ่งอิเล็กตรอนนี้จะใช้ในการรีดิวซ์อะตอมออกซิเจน และเกิดการออกซิไดซ์ L-arginine เป็น L-citrulline และไนตริกออกไซด์ (Forstermann and Sessa, 2012) เอนไซม์ NOS มีทั้งหมด 3 ไอโซฟอร์ม คือ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) และ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ซึ่งมีการแสดงออกตลอดเวลา (constitutive isoforms) ผลิตไนตริกออกไซด์ในปริมาณต่ำ และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งจะมีการแสดงออกของยีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ (MacMicking, et al., 1997 และ Alderton et al., 2001) ไนตริกออกไซด์มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ในร่างกาย เช่น การสื่อสารสัญญาณประสาท (neurotransmission) ควบคุมความดันโลหิตโดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vascular relaxation) ป้องกันการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet aggregation) และการจับตัวกันของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion) รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity)

ไอโซฟอร์ม eNOS ส่วนมากมีการแสดงออกที่เซลล์เยื่อ การทำงานของเอนไซม์ eNOS จะถูกกระตุ้นเมื่อระดับ Ca²⁺ ในเซลล์เพิ่มสูงขึ้น Ca²⁺ ที่สูงขึ้นจะจับกับ calmodulin และเหนี่ยวนำให้ calmodulin จับกับเอนไซม์ eNOS ได้แน่นขึ้นทำให้เพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ (Alderton et al., 2001) นอกเหนือจากการกระตุ้นด้วยการเพิ่มระดับของ Ca²⁺ แอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS ยังถูกกระตุ้นด้วยการถูกฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) เอนไซม์ eNOS ถูกฟอสโฟรีเลชันที่กรดอะมิโนเซอรีน (Ser), ทรีโอนีน (Thr) และไทโรซีน (Tyr) ที่อยู่ในโครงสร้าง เช่น การฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 จะกระตุ้นการไหล

ของอิเล็กตรอนในบริเวณ reductase domain เพิ่มความไวต่อ Ca^{2+} (Fleming and Busse, 2003) สารต่างๆ ที่สามารถกระตุ้นการแยกตัวของเอนไซม์ของ eNOS โดยผ่านการกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ได้แก่ oestrogen และ VEGF กระตุ้นเอนไซม์ Akt ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ฮอโรโมน insulin กระตุ้นเอนไซม์ Akt และ AMP-activated protein kinase (AMPK) ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 สาร bradykinin กระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 ผ่านการกระตุ้นเอนไซม์ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) และ shear stress กระตุ้นเอนไซม์ PKA ก่อนกระตุ้นการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการรายงานว่าเอนไซม์ kinase ต่างๆ ควบคุมเอนไซม์ eNOS ผ่านการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 แต่เอนไซม์ Akt เป็นเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่มีรายงานว่าควบคุมเอนไซม์ eNOS ได้ในสิ่งมีชีวิต (Forstermann and Sessa, 2012) นอกเหนือจากการควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Ser1177 เอนไซม์ eNOS ยังถูกควบคุมโดยการฟอสโฟรีเลชันที่ Thr495, Ser114, Ser633, Tyr81 และ Tyr657 แต่กลไกที่ชัดเจนยังอยู่ในระหว่างการศึกษา

ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS มีผลทางสรีรวิทยาต่างๆ โดยเฉพาะการควบคุมหลอดเลือด เช่น ทำให้หลอดเลือดขยายตัวโดยการไปจับกับกลุ่มฮีมของเอนไซม์ soluble guanylyl cyclase (sGC) ที่อยู่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบรอบหลอดเลือดทำให้มีการเพิ่มการผลิต cGMP ส่งผลให้มีการขยายตัวของหลอดเลือด (Ignarro et al., 1986) และยับยั้งการเกาะตัวของเกร็ดเลือดและการยึดของเกร็ดเลือดจับกับผนังหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดเกิดได้ดี ไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS ยังลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis) เช่น โปรตีน MCP-1 ลดการจับของเม็ดเลือดขาวกับผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังไปยับยั้งการหลั่งของ platelet-derived growth factor (PDGF) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลดลง (Forstermann and Sessa, 2012) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าไนตริกออกไซด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ eNOS แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดการแข็งตัวของหลอดเลือด เมื่อเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) จะทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (NO bioavailability) ลดลง สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ลดลงคือการเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน เนื่องจากในขณะที่เกิดความเครียดจากออกซิเดชันทำให้มีการผลิต reactive oxygen species ในปริมาณที่สูงขึ้น โดยเฉพาะการผลิต superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$) โดยเอนไซม์ NADPH oxidase ทำให้มีการรวมกันของไนตริกออกไซด์ และ $\text{O}_2^{\bullet-}$ เป็น peroxynitrite (ONOO^-) มากขึ้นจึงมีปริมาณไนตริกออกไซด์ลดลง นอกจากนี้ ONOO^- ที่เพิ่มมากขึ้นยังไปออกซิไดซ์ BH_4 ที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ eNOS ทำให้ลด affinity ระหว่างเอนไซม์ eNOS กับ L-arginine จึงทำให้ eNOS เร่งปฏิกิริยา uncoupling แทน ทำให้เกิด $\text{O}_2^{\bullet-}$ แทนการสังเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (Zou et al., 2002) ดังนั้นจึงทำให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดลดลงเป็นผลให้การควบคุมการทำงานของหลอดเลือด

ผิดปกติ นำไปสู่ภาวะการแข็งตัวของหลอดเลือด และโรคหลอดเลือดและหัวใจในที่สุด โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจ เช่น ผู้ป่วยเบาหวาน ผู้ที่มีภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูง ผู้สูบบุหรี่ และผู้ที่มีความเครียด เป็นต้น (Vanhoutte et al., 2009; Forstermann and Sessa, 2012)

มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ eNOS โดยการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS การเพิ่มปริมาณซัสเตรต L-arginine และการเพิ่มโคแฟกเตอร์ BH₄ และการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์โดย NO donor เป็นต้น (Zhang et al., 2010) การเพิ่มปริมาณ BH₄ โดยการเสริม BH₄ เป็นวิธีการป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดและหัวใจทางหนึ่ง แต่ปัญหาของการให้ BH₄ เสริมคือความไม่เสถียรของ BH₄ (Zhang et al., 2010) จึงมีความพยายามหาสารที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ BH₄ ในเซลล์ เช่น fluvastatin สามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 (GTPCH-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการผลิต BH₄ ทำให้มีปริมาณ BH₄ มากขึ้น (Aoki et al., 2010) ในปัจจุบันมีการรายงานว่าส่วนสกัดจากพืชต่างๆ และสารบริสุทธิ์จากพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ได้ (Steinkamp-Fenske et al., 2007; Koltermann et al., 2007; Wattanapitayakul et al., 2007; Vanhoutte et al., 2009; Li et al., 2010)

Balayssac และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศที่จำหน่ายในฝรั่งเศส โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค diffusion ordered spectroscopy (DOSY) ¹H NMR พบว่ามีผลิตภัณฑ์ 8 ชนิดที่มีองค์ประกอบของสารที่มีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับตัวยับยั้งเอนไซม์ PDE-5 ได้แก่ Sildenafil, tadalafil, vardenafil, hydroxyhomosildenafil, thiosildenafil, และยังพบสาร thiomethisosildenafil ใหม่ ได้ศึกษาการหาปริมาณของสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค HPLC หรือ NMR นอกจากนี้ยังสามารถพิสูจน์สาร 30 ชนิดที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

ข้อมูลของพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

1. กวาวเครือแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Butea superba* Roxb

ชื่อวงศ์ : Papilionaceae

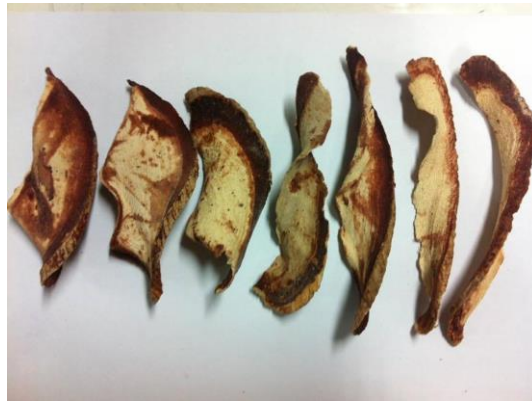
ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : -

ส่วนที่ใช้ : หัวใต้ดิน เถา

อยู่ในจำพวกไม้เลื้อยเป็นเถาวัลย์ เนื้อแข็ง ชอบขึ้นพาดกับต้นไม้ใหญ่ ใบใหญ่คล้ายใบของต้นทองกวาว ดอกใหญ่คล้ายดอกแคแสด เป็นพวงระย้าเหมือนดอกทองกวาว ฝักเล็กแบนบาง หัวใต้ดินมีรูป

ทรงกระบอกยาว เปลือกสีน้ำตาล มีหลายขนาด ผ่านเปลือกออกจะมียางสีแดงสดซึมออกมา เนื้อในสีขาว (รูปที่ 2-1)

เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ ช่วย บำรุงสมรรถภาพทางเพศ (Manosroi et al., 2006) ส่วนสกัดเอทานอลของกาวเครือแดงมีประสิทธิภาพในการขยายหลอดเลือดของแกนองคชาติในหนูแรท (Tocharus et al., 2006)



รูปที่ 2-1 กาวเครือแดง
(ภาพโดย จูฑิตพร ทองเย็น)

2. กระชายดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : Belamcanda chinensis

ต้น กระชายดำเป็นพรรณไม้ล้มลุก ส่วนของแกนกลางลำต้นจะมีลักษณะแข็ง มีกาบใบที่อาบหนา นุ่ม หุ้มแกนลำต้นไว้ ใบของกระชายดำ เป็นใบเลี้ยงเดี่ยว สีของใบกระชายดำเมื่อเริ่มแตกใบอ่อนจะมีสีเขียวอมแดง และจะค่อยๆ สีจางไปเป็นสีเขียวเข้ม เหง้า รูปทรงกลม เรียงต่อกัน มักมีขนาดเท่าๆกัน หลายเหง้า อวบน้ำ ผิวเหง้าสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม อาจพบรอยที่ผิวเหง้าเป็นบริเวณที่จะงอกของต้นใหม่ เนื้อภายในสีม่วง (รูปที่ 2-2)



รูปที่ 2-2 เหง้ากระชายดำ
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณเป็นยาบำรุงกำลัง เป็นยาอายุวัฒนะ (เชื่อว่าช่วยบำรุงสมรรถภาพทางเพศชาย) แก้ปวดเมื่อย และแก้อาการเหนื่อยล้า แก้โรคกระเพาะ และปวดท้อง (Yenjai et al., 2004) ส่วนสกัดจากเหง้ากระชายดำสามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์และเร่งการแสดงออกของโปรตีนและเอนไซม์เอ็นเอชของเอนไซม์ eNOS (Wattanapitayakul et al., 2007) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 รายงานว่าส่วนสกัดจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์เป็นยาบำรุงสมรรถภาพทางเพศ โดยเพิ่มการไหลเวียนของเลือด แต่ไม่มีผลต่อความดันเลือดที่หัวใจ และส่วนสกัดนี้ยังลดความเครียดจากออกซิเดชัน และเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ (Malakul et al., 2011).

3. มะรุม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Moringa oleifera* Lam

ชื่อวงศ์ : Moringaceae.

ชื่อสามัญ (ชื่อภาษาอังกฤษ) : moringa, drumstick tree

ไม้พุ่ม หรือไม้ยืนต้น ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อย 8-10 คู่ ดอก ออกเป็นช่อแบบแยกแขนง (รูปที่ 2-3) กลีบดอกสีเขียวยาวอ่อน ผลเป็นฝักรูปดาบ หรือกระบอง เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้เปลือก ขับลมในลำไส้ พอกแผล ห้ามเลือด ใบ ห้ามเลือด ชับน้ำมัน ทำให้นอนหลับ รักษาเลือดออกตามไรฟัน ดอก ชับน้ำตา ชับปัสสาวะ กระตุ้นกำหนด ผล บำรุงกำลัง ถอนพิษไข้ แก้ขัดเบา แก้โรคตับและม้าม เมล็ด แก้ปวดตามข้อ (ฐานข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์, http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2256) ใบมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ต้านเบาหวาน และต้านแบคทีเรีย (Anwar et al., 2007; Sreelatha & Padma, 2009)



รูปที่ 2-3 ไบมะรุ้ม
(ภาพโดย วิภาดา ศิริตันหยง)

4. ค้างคาวดำ

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tacca chantrieri* Andr.

ชื่อวงศ์ : Taccacea

ชื่ออื่น : เนระพูสีไทย (ตะวันออก) คลุ้มเลีย วานหัวฟา (จันทบุรี) ติงหว้า (ภาคเหนือ) ดีปลากั้ง (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ดีปลาซ่อน (ตราด) นิลพูสี (ตรัง) มังกรดำ (กรุงเทพฯ ฯ) ม้าถอนหลัก (ชุมพร) วานพังพอน (ยะลา)

เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน ใบรูปขอบขนานถึงรูปใบหอก ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งแหลม โคนใบแหลมเบี้ยวเล็กน้อย ดอกออกเป็นช่อมี 1-3 ช่อ แต่ละช่อมี 4-25 ดอก ลักษณะคล้ายค้างคาวบิน กลีบประดับมี 2 คู่ ไร่ก้านสีม่วงแกมเขียวถึงสีม่วงดำ คุ่นอกรูปไข่ รูปขอบขนานหรือรูปใบหอก กลีบประดับเป็นเส้นมี 5-25 เส้น สีอ่อนกว่าแผ่นกลีบประดับยาว 10-25 ซม. กลีบรวมติดเป็นหลอดสั้นๆปลายแยกเป็น 6 กลีบ (รูปที่ 2-4) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้เหง้ารักษาโรคความดันเลือดต่ำ บำรุงกำหนด บำรุงกำลัง ช่วยเจริญอาหาร ดับพิษไข้ กล่อมพิษทั้งปวง ทั้ง 5 แก้วเม็ดฝิ่นคันตามร่างกาย (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550a และ http://www.panmai.Com/Warn/Warn_TACCAC_01.shtml)



รูปที่ 2-4 ใบ ลำต้นและดอกของต้นค่างควาดำ
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

5. เร่วหอม

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Etilingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm.)

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นเหง้าใต้ดิน ใบเดี่ยว เรียงสลับดอกช่อ แหวงจากเหง้า ดอกย่อยสีแดง ทุกส่วนมีกลิ่นหอมเหง้าเร่วหอม แสดงดังรูปที่ 2-5 เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณใช้ ผล ใช้เป็นเครื่องเทศ ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ จุกเสียด เหง้า ขับลมในลำไส้ช่วยย่อยอาหาร แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่นอาหาร ใบ ช่วยในการขับปัสสาวะ หน่ออ่อน รับประทานเป็นผัก ขับลมในลำไส้ ช่วยย่อยอาหาร (พงศศักดิ์ พลเสนา, 2550b)

(A)



(B)



(C)



รูปที่ 2-5 ลักษณะเหง้าของเร่วหอม (A) ลักษณะใบของเร่วหอม (B) และลักษณะดอกของเร่วหอม (C)
(ภาพโดย กล่าวขวัญ ศรีสุข)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) (Olympus IX70, ประเทศญี่ปุ่น)
2. กล้องสำหรับแช่เยือกแข็ง (Nalgene, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. ขวด Duran ขนาด 1000 มิลลิลิตร (Schott, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
4. คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. (NK laboratory, ประเทศไทย)
5. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) (Eyela, ประเทศญี่ปุ่น)
6. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate and stirrer) (Jenway, ประเทศสหราชอาณาจักร)
7. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) (Agilent infinity 1260, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
8. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatograph, HPLC) (Water 600, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
9. เครื่องแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) (Scanvac, ประเทศเดนมาร์ก)
10. เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) (Crest, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
11. เครื่องนับจำนวนเซลล์ (hemocytometer) (Blau Brand, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐ เยอรมนี)
12. เครื่องบดความเร็วสูง (high speed grinder) (Daming, ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (K240R, Centurion Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. เครื่องผสมสารละลาย (vortex) (VelpScientifica, สาธารณรัฐอิตาลี)
15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (absorbance microplate reader) (Versa Max Molecular Devices, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
16. เครื่องวัดระดับ pH (Metrohm, ประเทศสมาพันธรัฐสวิส)
17. จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 มิลลิเมตร (Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
18. จานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (Sterilin, ประเทศสหราชอาณาจักร)
19. ตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) (CB210, Binder, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
20. ตู้ชีวนิรภัย คลาส II (biological safety carbinet class II) (NU-440, Nuair, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
21. ตัวกรองสารสำหรับไซริงค์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเมมเบรน 0.45 ไมโครเมตร (syringe filter) (JET Biofil, ประเทศจีน)
22. แผ่นทินเลเยอร์ โครมาโทกราฟี ซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ analytical chromatography (thin-layer chromatography) (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
23. ปิเปตดูด-จ่าย สารละลายอัตโนมัติ (Liopette, ราชอาณาจักรไทย)

24. ไมโครเพลทแบบ 96 หลุม (Sterilin, ประเทศสหราชอาณาจักร)
25. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (WB-22, WiseBath, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2 สารเคมี

1. Acetonitrile HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson, สาธารณรัฐเกาหลี)
2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical) (Sigma-Aldrich, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
3. 0.4% Typan blue (Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
4. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5. D-(+)-Glucose (Sigma-aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. Dichloromethane Commercial grade (ประเทศไทย)
7. Dimethyl sulfoxide-D6, DMSO สำหรับ NMR (Merk, ประเทศสมาพันธรัฐสวิส)
8. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
9. Di-Sodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4 (Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
10. Dullbecco's modified Eagle medium, DMEM ที่มี phenol red (Gibco, ประเทศไทย)
11. Dullbecco's modified Eagle medium, DMEM ที่ไม่มี phenol red (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
12. Ethanol Commercial grade (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
13. Fetal bovine serum, FBS (Gibco-Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. Gallic acid (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
15. Hexane Commercial grade (ประเทศไทย)
16. Methanol AR. (RCI Labscan, ประเทศไทย)
17. Methanol HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson, สาธารณรัฐเกาหลี)
18. Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (AOS, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
19. Nitrotetrazolium Blue chloride (NBT) (Sigma-Aldrich, ประเทศอเมริกา)
20. Penicillin/Steptomycin (Gibco-Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา) Invitrogen
21. Phenazinemethosulfate (PMS) (MP Biomedicals, ประเทศฝรั่งเศส)
22. Potassium chloride, KCl (Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
23. Potassium dihydrogen orthophosphate, KH_2PO_4 (Analar, ประเทศสหราชอาณาจักร)
24. Resveratrol (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
25. Silica gel 60 ขนาด 1.09385 (Merck, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐ เยอรมนี)
26. Sodium dihydrogen phosphate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, ประเทศฝรั่งเศส)
27. Sodium bicarbonate, NaHCO_3 (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
28. Sodium chloride, NaCl (Carlo Erba, ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)
29. Sodium nitrite, NaNO_2 (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
30. Sterile distilled water (A.N.B. Laboratory, ประเทศไทย)
31. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารสกัดตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3

นำหัวกวาวเครือแดงที่หั่นเป็นแผ่นมาล้าง ตากให้แห้ง บดด้วยเครื่องบดความเร็วสูง นำผง 200 กรัม ที่ได้มาห่อด้วยผ้าดิบ แช่ในโหลที่มีเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดหยาบหัวกวาวเครือแดงที่ได้มากรองด้วย กระดาษกรอง 2 ครั้ง นำผงพืชมาห่อด้วยผ้าดิบและแช่ในเอทานอลอีกครั้ง จากนั้นนำสารสกัดหยาบหัว กวาวเครือแดงที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง 2 ครั้ง นำสารสกัดหยาบหัวกวาวเครือแดงที่ได้จากทั้ง 2 ครั้ง รวมกันและทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง

นำผงแห้งกระชายดำ 100 กรัม ต้มในน้ำกลั่นเดือด นำมากรองด้วยผ้าขาวบางและนำไปต้มต่ออีก รอบโดยทำแบบเดิมซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารสกัดน้ำจากแห้งกระชายดำที่ได้จากทั้ง 2 ครั้ง มากรองด้วย กระดาษกรอง 2 ครั้ง ทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง

นำสารสกัดหยาบหัวกวาวเครือแดงและสารสกัดหยาบแห้งกระชายดำผสมรวมกัน ด้วยเครื่อง stirrer ได้เป็นตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และ ซุปเปอร์ออกไซด์ เป็นลำดับถัดไป

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH (กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ, 2553)

เตรียมสารละลาย DPPH ที่ละลายในเมทานอลให้มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และสารสกัด ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 ที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการปิเปตสาร สกัดสมุนไพร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัด ค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารควบคุมทางบวกและทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ การกำจัดอนุมูล DPPH จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูล DPPH} = \frac{[(A-B)(C-D)]}{(A-B)} * 100$$

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH 100 ไมโครลิตร + เมทานอลหรือน้ำหรือเอทานอลหรือน้ำ รวมกับเอทานอล 50 ไมโครลิตร

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเมทานอล 100 ไมโครลิตร + เมทานอลหรือน้ำหรือเอทานอลหรือน้ำ รวมกับ เอทานอล 50 ไมโครลิตร

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH 100 ไมโครลิตร + ส่วนสกัด 50 ไมโครลิตร

D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ เมทานอล 100 ไมโครลิตร + ส่วนสกัด 50 ไมโครลิตร

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็น อิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.3.3 ทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์

เตรียมสารละลายกรดแกลลิกในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ไว้สำหรับใช้ละลาย NADH, NBT

และ PMS จากนั้นทำการปิเปตต์สารสกัดหัวกวาวเครือแดง สารสกัดเหง้ากระชายดำ ตำรับยาสมุนไพโรไทย สูตร BUU-ED-B3 อย่างละ 100 ไมโครลิตร และสารละลาย NADH ที่ความเข้มข้น 468 มิลลิโมลาร์ สารละลาย NBT ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ สารละลาย PMS ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร อย่างละ 62.5 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท โดยใช้กรดเกลติกเป็นสาร ควบคุมทางบวกและทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จากสมการ

เปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ = $[(A-(B-C))/A]*100$
 โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร + NADH, NBT, PMS อย่างละ 62.5 ไมโครลิตร
 B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 100 ไมโครลิตร + NADH, NBT, PMS อย่างละ 62.5 ไมโครลิตร
 C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของส่วนสกัด 100 ไมโครลิตร + ฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 187.5 ไมโครลิตร

3.3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ (EA.hy926) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี phenol red ที่ไร้เชื้อ และเสริมด้วยซีรัมเข้มน้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สารละลายยาเพนิซิลลิน (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และสเตรปโตไมซิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่าน ศูนย์กลางขนาด 100 มิลลิเมตร และนำไปบ่มเซลล์ในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส ในอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 2 คืน จากนั้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ต่ออีก 1 คืน เมื่อเซลล์เจริญ เต็มโตประมาณร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง จึงทำการเก็บเซลล์ออกจากผิวภาชนะ

3.3.5 การซับล้างเซลล์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิ 10 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ทิ้งแล้ว เติมสารละลายทริปซิน/อีดีทีเอ เข้มน้อยละ 0.25 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด DMEM ที่มี phenol red ที่ไร้เชื้อ และเสริมด้วยซีรัมเข้มน้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวจานเพาะเลี้ยง ปิเปตสาร แขนงลอยเซลล์ใส่ในหลอด 50 มิลลิลิตร หลอดเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 900 g นาน 5 นาที ดูดอาหาร เลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ที่เสริมด้วยซีรัมเข้มน้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในหลอด แล้วทำการกระจายเซลล์โดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวดี ทำการนับเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการ ย้อมสี trypan blue เข้มน้อยละ 0.4 แล้วนับเซลล์ในสไลด์สำหรับนับเซลล์ (Hemocytometer slide) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วแบ่งเซลล์ลงในภาชนะอันใหม่ในอัตราส่วนที่ต้องการ

3.3.6 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยทดสอบกระบวนการเมแทบอลิซึม (กล่าวขวัญ ศรีสุข, 2555)

ทำการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 0.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มี phenol red และซีรั่ม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม phenol red และซีรั่มเป็นตัวควบคุมที่ไม่สัมผัสกับส่วนสกัดและไม่ถูกกระตุ้น เติม 100 ไมโครโมลาร์ resveratrol และร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) DMSO ที่เจือจางโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม phenol red และซีรั่ม หลุมละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดย MTT เป็นสารสีเหลืองละลายน้ำได้ จะเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ ในเซลล์ที่มีชีวิตจะพบเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) จะทำการรีดิวซ์ MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มazan (formazan) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ปริมาณของสารฟอร์มazanที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อครบเวลาแล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง เติม DMSO หลุมละ 500 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึกฟอร์มazan นำไปบ่มต่อ 5 นาที จะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ดูดสารละลายจากแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม และนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ในเชิงสัมพัทธ์เทียบกับสถานะของเซลล์ควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารทดสอบจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

3.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess

ทำการทดลองโดยการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม จำนวน 0.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่มี phenol red และซีรั่ม แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม phenol red และซีรั่มเป็นตัวควบคุมที่ไม่สัมผัสกับส่วนสกัดและไม่ถูกกระตุ้น เติม 100 ไมโครโมลาร์ resveratrol และร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) DMSO ที่เจือจางโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม phenol red และซีรั่ม หลุมละ 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้อบแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g นาน 5 นาที แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลทแบบ 96 หลุมแล้วผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-Naphyl)ethylene-diaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric acid]

ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 546 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ โดยรายงานผลเป็นอัตราส่วนระหว่างการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารตัวอย่างกับการผลิตไนตริกออกไซด์ของกลุ่มควบคุม

3.3.8 การวิเคราะห์แยกสารประกอบทางเคมีโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

นำแผ่นทินเลเยอร์ โครมาโตกราฟี ซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ มาตัดให้มีขนาด 4x4 เซนติเมตร จุดสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดงละลายในเอทานอลร้อยละ 95 สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำละลายในน้ำกลั่น และตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 ลงบนแผ่น TLC (จุดจุดสารสกัดให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร) รอให้ระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ที่จุดสารสกัดเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายต่างๆ โดยให้มีตำแหน่งของจุดอยู่เหนือตัวทำละลาย ภายในภาชนะแก้วควรใส่กระดาษกรองและปิดฝาภาชนะให้สนิท เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนถึงขอบบนให้นำแผ่น TLC ออก แล้วนำไปส่องภายใต้แสงยูวีในที่มืดเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารและวิเคราะห์แยกสารต่อไป การวิเคราะห์หาสถานะของวิภูภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิภูภาคเคลื่อนที่ที่จะใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90, 30 ต่อ 70, 40 ต่อ 60 และระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90, 40 ต่อ 60, 100 ต่อ 0 พบว่า วิภูภาคเคลื่อนที่ที่แยกส่วนสกัดสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิภูภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ คือระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90

3.3.9 การแยกสารโดยแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Flash column chromatography)

นำตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 แยกในแฟลชคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร) โดยใช้ซิลิกาที่มีมวลโมเลกุล 60.08 กรัมต่อโมล ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร ปริมาตร 50 กรัม แขนในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 ที่ใช้ชะคอลัมน์ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปบรรจุลงคอลัมน์ (ซิลิกาจะมีความสูงประมาณ 14 ถึง 15 เซนติเมตร) แล้วล้างคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ และใช้ความดันช่วยในการเคลื่อนที่ของวิภูภาคเคลื่อนที่ ควรเคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด ปล่อยให้ผงซิลิกานิ่งนอนกัน แล้วจึงเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกไปข้างจนมีระดับอยู่เหนือซิลิกาเล็กน้อย ควรพยายามทำให้ผิวหน้าของซิลิกาเรียบ

นำตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 น้ำหนัก 10.00 กรัม ละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนประมาณ 450 มิลลิลิตรรวมกับตัวทำละลายเมทานอลประมาณ 700 มิลลิลิตร แต่เมื่อละลายแล้วเกิดเป็นตะกอน และนำตะกอนที่เกิดขึ้นไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง โดยตะกอนมีน้ำหนัก 6.20 กรัม จากนั้นนำตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ส่วนใสที่ได้ผสมกับซิลิกาปริมาณ 5.70 กรัม (ใช้ซิลิกาประมาณ 1.5 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อ

เดียวกัน จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน แล้วบรรจุลงแฟลชคอลัมน์ส่วนบน ใส่ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 และปรับผิวหน้าให้เรียบ

ทำการแยกสารโดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายดังตาราง ที่ 3-1 โดยจะเก็บตัวทำละลายลงหลอด หลอดละปริมาตรประมาณ 28 มิลลิลิตร จำนวน 820 หลอด ยกเว้นหลอดที่ 821 และ 822 ที่เก็บในขวดดูแรนปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด และนำตัวทำละลายที่ได้ในแต่ละหลอดมาจุดลงบนแผ่นTLC เพื่อดูแบนที่ปรากฏว่ามีตำแหน่งเดียวกันหรือไม่ ถ้ามีตำแหน่งเดียวกัน นำมารวมเป็นแฟรกชันเดียวกัน ได้แฟรกชันทั้งหมด 13 แฟรกชัน ดังตารางที่ 3-2 และนำแฟรกชันที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ การเพิ่มการผลิตปริมาณไนตริกออกไซด์ และความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ต่อไป โดยการทดสอบอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ไม่เติม phenol red และซีรัมที่มีตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรกชัน ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางจาก stock ความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกัน โดยตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยที่ BUU-ED-B3-(6-13) เจือจางจาก stock ความเข้มข้นของสารที่ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดย่อยที่ BUU-ED-B3-(1,4,5) เจือจางจาก stock ความเข้มข้นของสารที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสกัดย่อยที่ BUU-ED-B3-3 เจือจางจาก stock ความเข้มข้นของสารที่ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.5 ที่เป็นตัวทำละลายสารทดสอบที่เจือจางจาก stock ความเข้มข้นของสารที่แตกต่างกันตามลำดับ

ตารางที่ 3-1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่ระบบ gradient

Gradient	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	หลอดที่
10% Dichloromethane :Hexane	2,350	1-66
20% Dichloromethane :Hexane	2,500	67-153
40% Dichloromethane :Hexane	2,000	154-223
50% Dichloromethane :Hexane	2,600	224-313
100% Dichloromethane :Hexane	500	314-330
0.5% Methanol :Dichloromethane	8,100	331-608
1.0% Methanol :Dichloromethane	2,000	609-678
2.0% Methanol :Dichloromethane	1,000	679-714
5.0% Methanol :Dichloromethane	1,000	715-750
10% Methanol :Dichloromethane	500	751-767
20% Methanol :Dichloromethane	1,000	768-803
30% Methanol :Dichloromethane	500	804-820
50% Methanol :Dichloromethane	1,000	821-822

ตารางที่ 3-2 การรวมแฟรกชัน

แฟรกชัน	หลอดที่
BUU-ED-B3-1	1-49
BUU-ED-B3-2	50-91
BUU-ED-B3-3	92-174
BUU-ED-B3-4	175-208
BUU-ED-B3-5	209-235
BUU-ED-B3-6	236-294
BUU-ED-B3-7	295-330
BUU-ED-B3-8	331-345
BUU-ED-B3-9	346-410
BUU-ED-B3-10	411-569
BUU-ED-B3-11	570-607
BUU-ED-B3-12	608-645
BUU-ED-B3-13	646-822

3.3.10 การแยกสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatograph, HPLC)

3.3.10.1 การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase)

นำตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตไนไตรล์และน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) มากรองด้วย Membrane Filter แล้วโซนิเคท (sonicated) 30 นาที

3.3.10.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 และBUU-ED-B3-9 มาละลายด้วยเมทานอลหรืออะซีโตไนไตรล์ สำหรับ HPLC ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วกรองด้วย Membrane Filter นำสารละลายใส่หลอดตัวอย่างHPLC เพื่อเตรียมฉีดเข้าเครื่องHPLC

3.3.10.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9

การแยกสารด้วยเครื่องHPLC (Water 600) ใช้คอลัมน์ C18(5 μ x 250 mm x 4.6 mm,100A) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรในการฉีดครั้งละ 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ 220 นาโนเมตร นาน 30 นาที โดยใช้เฟสเคลื่อนที่อัตราส่วนที่ต่างกันอย่างเหมาะสม เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม แฟรกชัน BUU-ED-B3-7 เริ่มจากใช้เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 20 50 และ80 ต่อ 80 50 และ20 ตามลำดับ และอะซีโตไนไตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 10 20 40 และ70 ต่อ 90 80 60 และ30 ตามลำดับ พบว่าสารยังไม่ออกมาซึ่งดูได้จากการล้างคอลัมน์ยังพบสารอยู่ในแฟรกชันที่ล้างคอลัมน์ จึงทำการเพิ่มเปอร์เซ็นต์เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 และเพิ่มเปอร์เซ็นต์อะซีโตไนไตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 90 95 และ100 ต่อ 10 5 และ 0 ตามลำดับพบว่า

สารออกมาที่อะซีโตไนโตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 จึงเลือกใช้ในการแยกแพรกชั้น BUU-ED-B3-7 ส่วนแพรกชั้น BUU-ED-B3-9 เริ่มจากใช้เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 20 50 และ80 ต่อ 80 50 และ20 ตามลำดับ และอะซีโตไนโตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 10 20 40 50 และ70 ต่อ 90 80 60 50 และ30 ตามลำดับ พบว่าสารแยกกันได้ไม่ดีแต่แยกในเมทานอลต่อน้ำได้ดีกว่า อะซีโตไนโตรล์ต่อน้ำแต่ยังมีบางพีคที่เหลื่อมซ้อนกันจึงทำการแยกเพิ่มที่เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 60 65 68 และ70 ต่อ 40 35 32 และ30 ตามลำดับ พบว่าสารแยกเป็นพีคเดี่ยวไม่ซ้อนทับกันที่เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 65 ต่อ 35 จึงเลือกใช้ในการแยกแพรกชั้น BUU-ED-B3-9 ในการแยกแพรกชั้น BUU-ED-B3-9 มีการแยกสารเพิ่มด้วยเครื่องHPLC (Agilent infinity 1260) แต่แยกด้วยเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 65 ต่อ 35 พีคสารออกมาชิดกันซึ่งไม่เหมาะสมในการแยกในเครื่อง HPLC (Agilent infinity 1260) จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มโดยหาสภาวะใช้เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 60 62 63 และ65 ต่อ 40 38 37 และ35 ตามลำดับ พบว่าพีคสารแยกห่างจากกันเหมาะสมที่จะเก็บแพรกชั้นที่เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 62 ต่อ 38

ดังนั้นในการแยกสารด้วยเครื่องHPLC พบว่าสามารถแยกแพรกชั้น BUU-ED-B3-7 ด้วยอะซีโตไนโตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 และสามารถแยกได้ 4 แพรกชั้น และแยกแพรกชั้น BUU-ED-B3-9 ด้วยเมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 62 ต่อ 38 และสามารถแยกได้ 8 แพรกชั้น

3.3.10.4 การแยกสารออกฤทธิ์จากแพรกชั้น BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9

เมื่อทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ได้เหมาะสมแล้ว จึงทำการรับแพรกชั้นจากพีคสารที่ออกมาตามเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแพรกชั้น BUU-ED-B3-7 สามารถรับได้ 4 แพรกชั้น และแพรกชั้น BUU-ED-B3-9 สามารถรับได้ 8 แพรกชั้น เมื่อทำการรับแพรกชั้นได้ปริมาณเยอะจึงนำมาทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็งแล้วนำไปการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์(NMR) เพื่อหาโครงสร้างสารออกฤทธิ์และนำไปทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ การเพิ่มการผลิตปริมาณไนตริกออกไซด์ และความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ต่อไป

3.3.11 การวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์(NMR)

นำสารสกัดหัวกวาวเครือแดง เหง้ากระชายดำ ตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 แพรกชั้นจากตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 และแพรกชั้นย่อยของแพรกชั้นที่ 7 และ 9 แพรกชั้นตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 ชั่งน้ำหนักประมาณ 5 mg มาละลายด้วยตัวทำละลายDMSO หรือ CDCl₃ แล้วนำสารละลายใส่หลอดNMR ส่งวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ที่ห้องปฏิบัติการ NMR คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผล %yield ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

การเตรียมสารสกัดจากหัวกวาวเครือแดงมี %yield อยู่ที่ 7.58% และสารสกัดจากเหง้ากระชายดำมี %yield อยู่ที่ 22.41% ดังแสดงในตารางที่ 4-1 จากนั้นนำสารละลายหัวกวาวเครือแดง และเหง้ากระชายดำมารวมกันเป็นตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ทำให้แห้งแล้วทำการคำนวณ %yield พบว่าตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มี %yield อยู่ที่ 80.50%

ตารางที่ 4-1 ผล %yield ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยว และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

ชื่อพืชที่ใช้สกัด	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g)	% yield สารสกัดหยาบ (%)
หัวกวาวเครือแดง	15.16	7.58
เหง้ากระชายดำ	22.41	22.41
ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	11.27	80.50

4.2 ผลการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

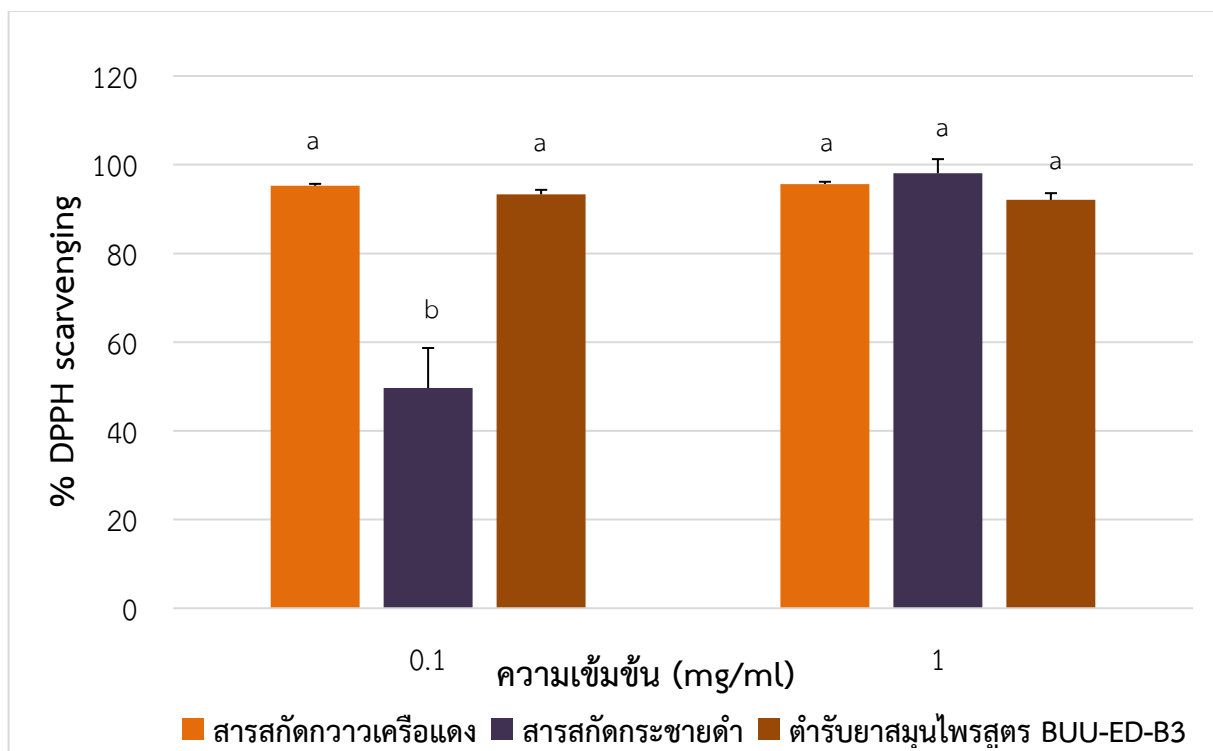
นำสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH พบว่า สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดงมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ 95.25 ± 0.43 และ 95.65 ± 0.50 ตามลำดับ สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ 49.65 ± 9.027 และ 98.08 ± 3.18 ตามลำดับ และ ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มีฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH เท่ากับ 93.34 ± 0.99 และ 92.06 ± 1.52 ตามลำดับ ผลดังตารางที่ 4-2 และดังภาพที่ 4-1

ตารางที่ 4-2 ผลการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดสารตัวอย่าง	% DPPH scavenging ที่ความเข้มข้น	
	0.1 mg/ml	1 mg/ml
สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง	95.25 ± 0.43^a	95.65 ± 0.50^a
สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ	49.65 ± 9.03^a	98.08 ± 3.18^b
ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	93.34 ± 0.99^a	92.06 ± 1.52^a

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-1 ร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ a, b แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3 ผลการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

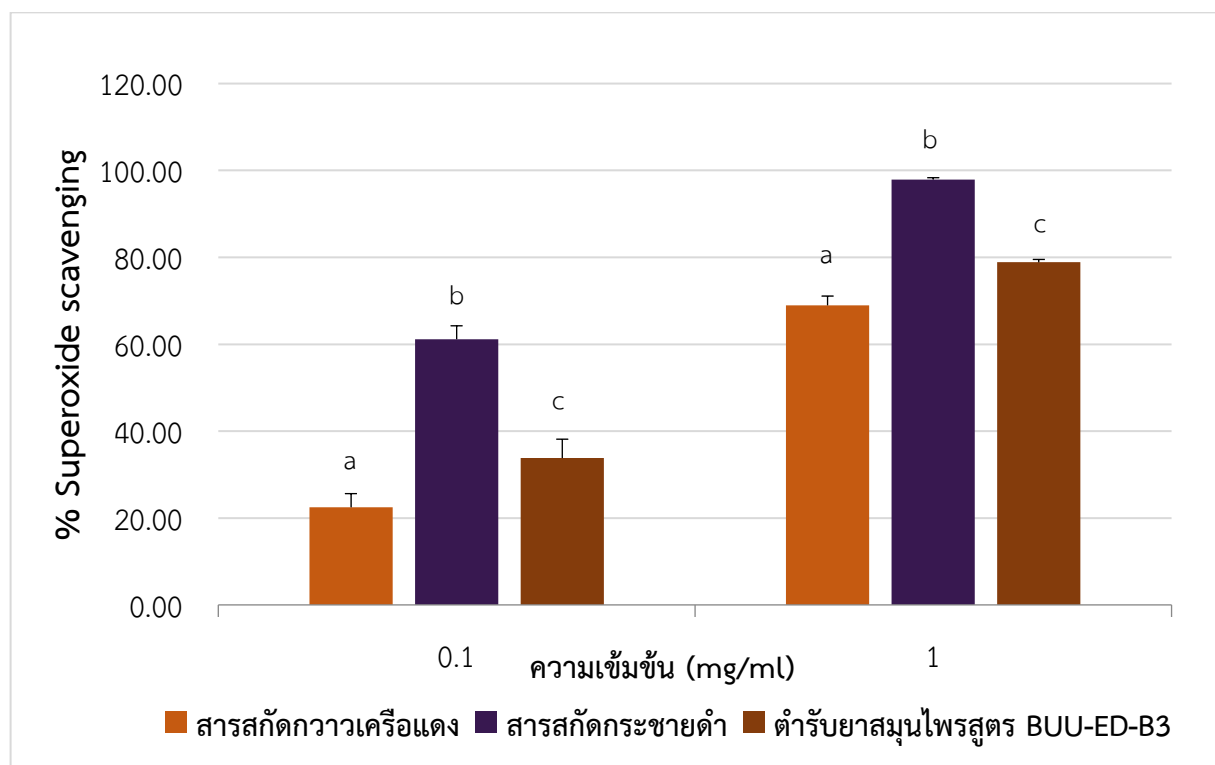
นำสารสกัดเอทานอลจากหัวกวางเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์พบว่า สารสกัดเอทานอลจากหัวกวางเครือแดงมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 22.48 ± 3.13 และ 68.97 ± 2.14 ตามลำดับ สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 61.17 ± 3.07 และ 97.90718 ± 0.43 ตามลำดับ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 33.82 ± 4.33 และ 78.86895 ± 0.65 ตามลำดับ ผลดังตารางที่ 4-3 และดังภาพที่ 4-2 ซึ่งร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดเอทานอลจากหัวกวางเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น เช่นเดียวกับสารละลายกรดแกลลิก ที่เป็นตัวควบคุมแบบบวก โดยสารละลายกรดแกลลิก ความเข้มข้น 3.75, 7.5, 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เท่ากับร้อยละ 12.48847 ± 0.302335 , 17.88784 ± 0.027461 , 28.43409 ± 0.925784 , 46.74436 ± 0.555565 และ 66.16655 ± 0.78706 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-3 ผลการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

ชนิดสารตัวอย่าง	% Superoxide scavenging ที่ความเข้มข้น	
	0.1 mg/ml	1 mg/ml
สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง	22.48 ± 3.13 ^a	68.96 ± 2.14 ^a
สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ	61.17 ± 3.07 ^b	97.91 ± 0.43 ^b
ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	33.82 ± 4.33 ^c	78.87 ± 0.65 ^c

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-2 ร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ a, b, c แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

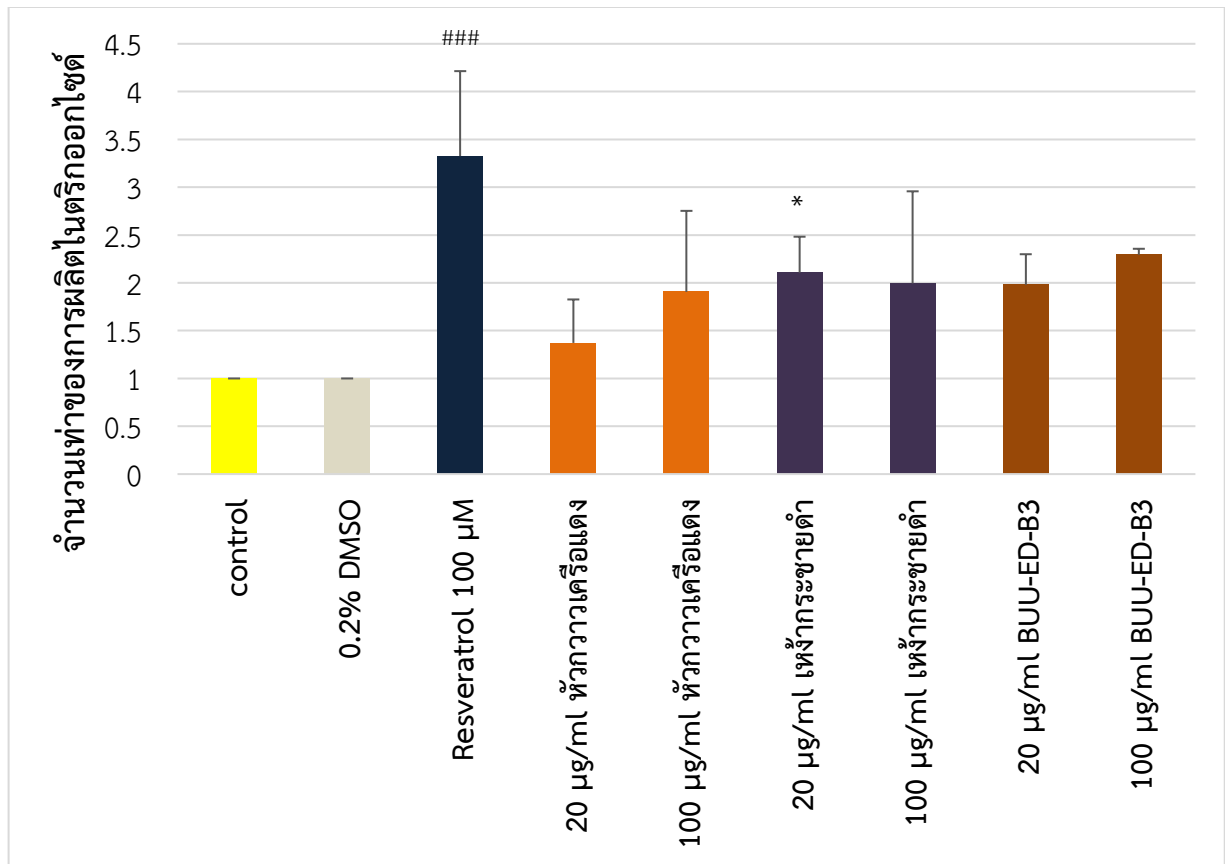
4.4 ผลของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ต่อการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์

นำสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 พบว่า สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดงมีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 1.37 ± 0.45 และ 1.91 ± 0.85 ตามลำดับ สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำมีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 2.11 ± 0.38 และ 1.99 ± 0.96 ตามลำดับ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 1.98 ± 0.32 และ 2.29 ± 0.06 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-4 ซึ่ง resveratrol ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ที่เป็นตัวควบคุมแบบบวกเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด มนุษย์พบว่ามีจำนวนเท่าในการผลิตไนตริกออกไซด์เท่ากับ 3.33 ± 0.89 เท่า

ตารางที่ 4-4 ปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

สารทดสอบ	ความเข้มข้นของสารทดสอบ	จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์
Control	-	1 ± 0.00
0.2 % (v/v) DMSO	-	1 ± 0.00
Resveratrol	100 μ M	3.33 ± 0.89
สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง	20 μ g/ml	1.37 ± 0.45
	100 μ g/ml	1.91 ± 0.85
สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ	20 μ g/ml	2.11 ± 0.38
	100 μ g/ml	1.99 ± 0.96
ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	20 μ g/ml	1.98 ± 0.32
	100 μ g/ml	2.29 ± 0.06

หมายเหตุ: ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน



ภาพที่ 4-3 จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัสกับสารสกัดเอทานอลจากหัวขาวเครื่องแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดให้ DMSO คือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ตัวทำละลายสารทดสอบ) และ control คือเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสกับส่วนสกัด โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ control และ ### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

4.5 ผลของสารสกัดสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ต่อความมีชีวิตรอดในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์

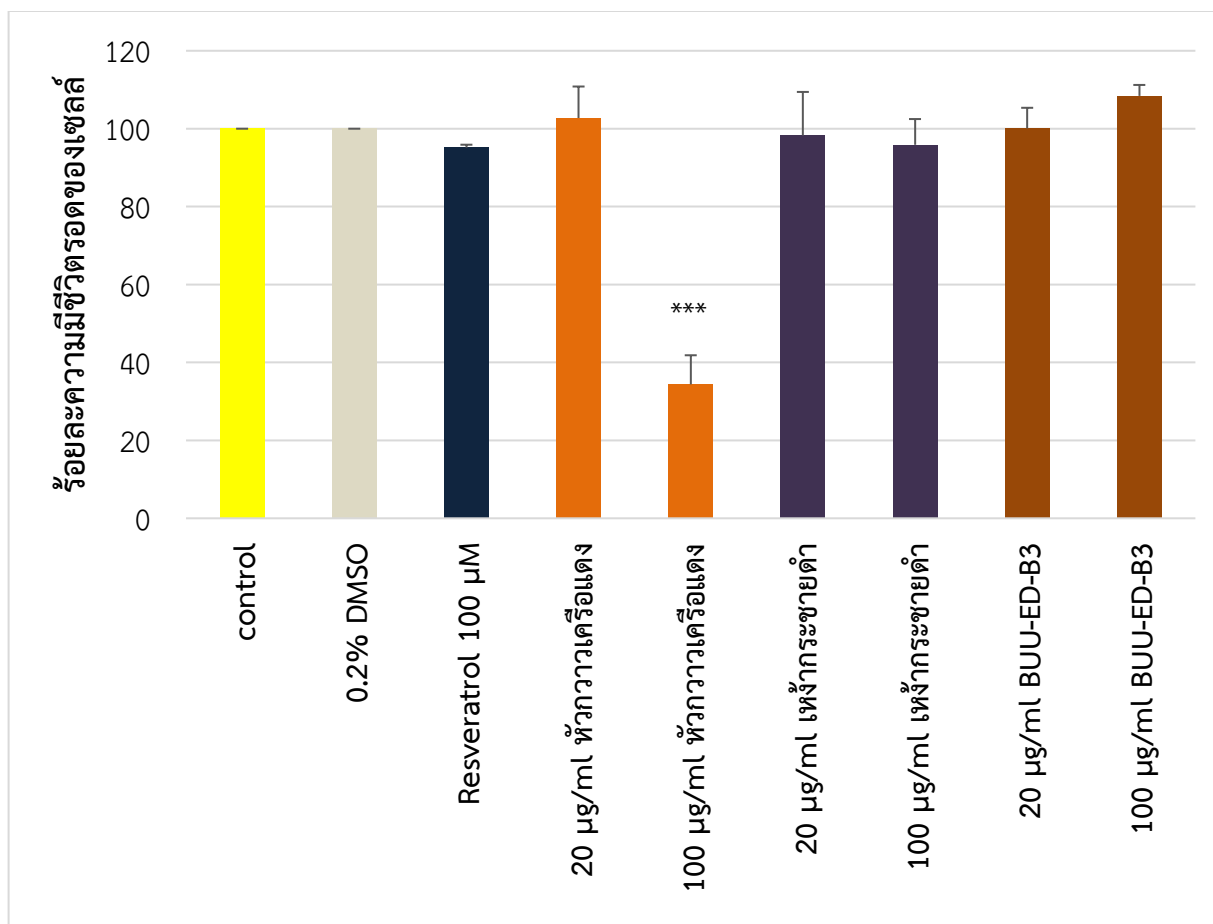
การทดสอบความมีชีวิตรอดในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดตมมนุษย์ EA.hy926 พบว่าตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 100.08 ± 5.29 และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 108.42 ± 2.81 ในขณะที่สารสกัดจากหัวขาวเครื่องแดงที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 102.73 ± 8.09 และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 34.37 ± 7.48 และสารสกัดจากเหง้ากระชายดำที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อ

เทียบกับเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 98.26 ± 11.17 และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมมีค่าเท่ากับ 95.86 ± 6.61 และค่าร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่สัมผัสด้วย resveratrol 100 ไมโครโมลาร์ เป็นตัวควบคุมแบบบวก มีค่าเท่ากับ 95.15 ± 0.74 เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-4

ตารางที่ 4-5 ปริมาณร้อยละความมีชีวิตรอดในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสมุนไพรเดี่ยวและตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3

สารทดสอบ	ความเข้มข้นของสารทดสอบ	ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์
Control	-	100 ± 0.00
0.2 % (v/v) DMSO	-	100 ± 0.00
Resveratrol	100 μ M	95.15 ± 0.74
สารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง	20 μ g/ml	102.73 ± 8.09
	100 μ g/ml	34.37 ± 7.48
สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ	20 μ g/ml	98.26 ± 11.17
	100 μ g/ml	95.86 ± 6.61
ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3	20 μ g/ml	100.08 ± 5.29
	100 μ g/ml	108.42 ± 2.81

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน

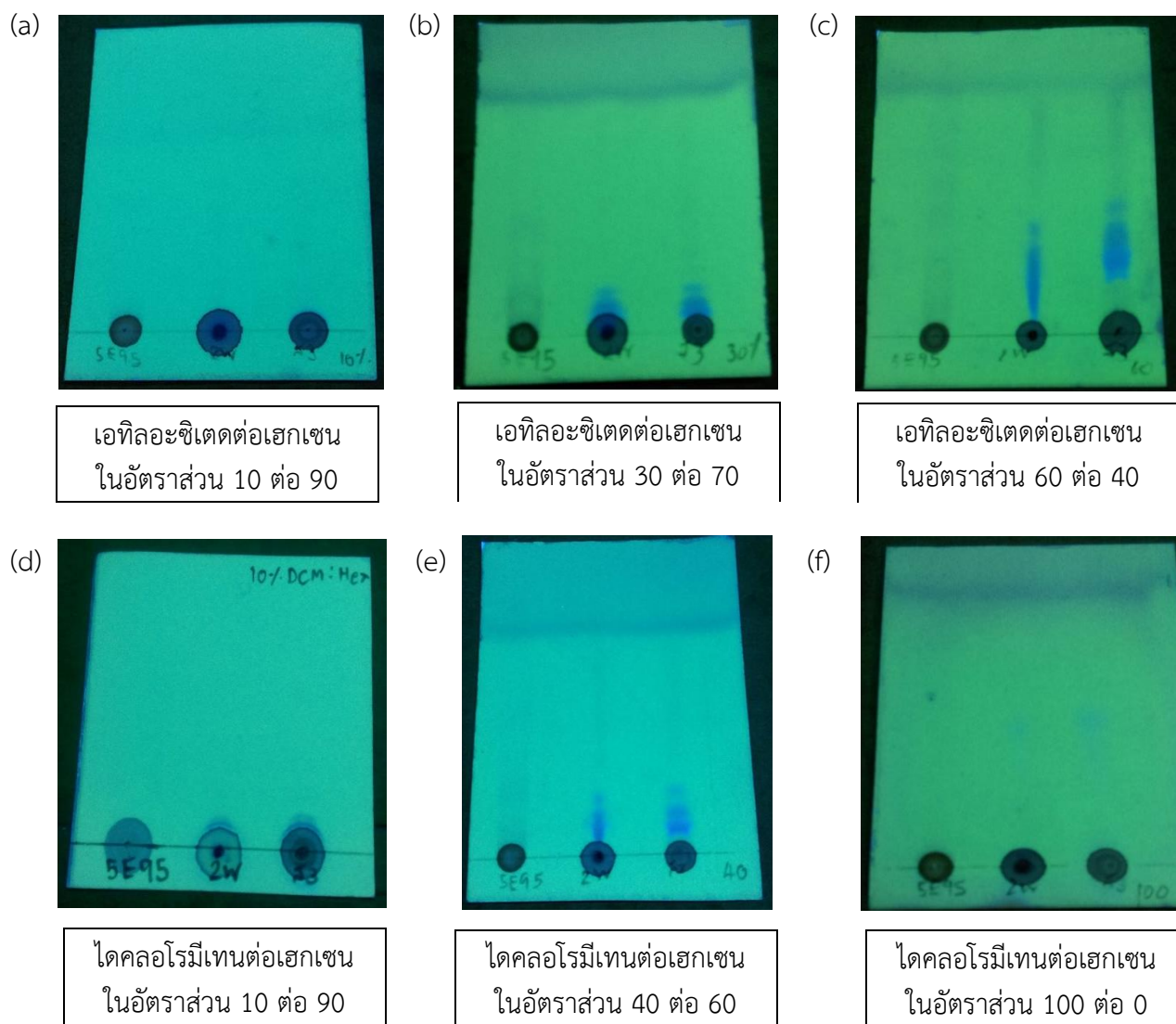


ภาพที่ 4-4 ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัส กับสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดให้ DMSO คือเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ตัวทำละลายสารทดสอบ) และ control คือเซลล์ควบคุมที่ไม่สัมผัสกับสารสกัด โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน โดยกำหนดให้ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2

4.6 ผลโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบางสำหรับการหาวิภูภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมของคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 จุดลงบนแผ่น TLC เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะของวิภูภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี วิภูภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ คือระบบตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 เนื่องจากปรากฏแถบแรกเพียงแถบเดียว และมีการเคลื่อนที่ของสารแถบแรกที่เหมาะสม ในขณะที่ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 ยังไม่ปรากฏแถบ ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 30 ต่อ 70 และ 60 ต่อ 40

ปรากฏแถบมากกว่าหนึ่งแถบและมีการเคลื่อนที่ของสารแถบแรกที่ไม่เหมาะสม เช่นเดียวกับระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 40 ต่อ 60 และ 100 ต่อ 0 ดังภาพที่ 4-5



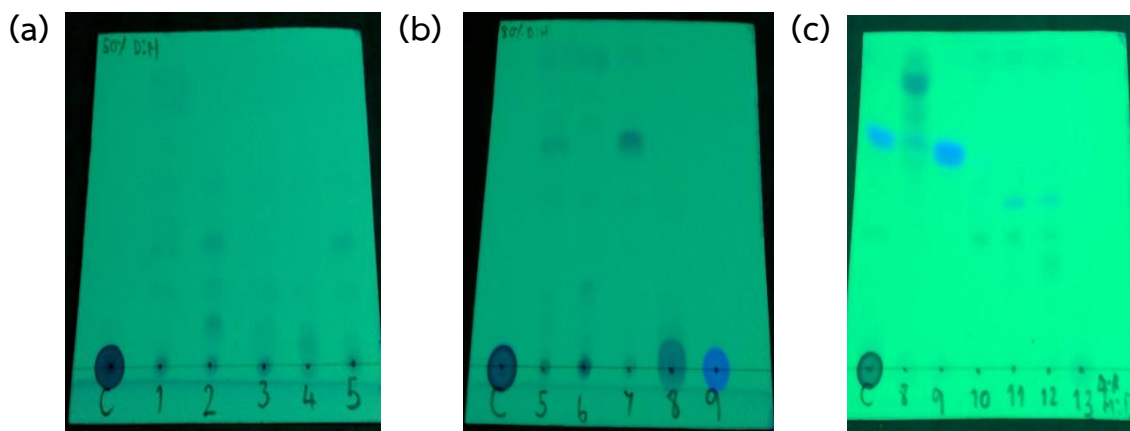
ภาพที่ 4-5 ผล TLC จากการจุดสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดง สารสกัดน้ำจากกระชายดำ และตำรับยาสมุนไพรรสูตร BUU-ED-B3 ที่ระบบวิฤภาคเคลื่อนที่ เอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 (a), เอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 30 ต่อ 70 (b), เอทิลอะซิเตดต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 (c), ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 (d), ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 40 ต่อ 60 (e) และ ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 100 ต่อ 0 (f)

4.7 ผลการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีของตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3

นำตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 น้ำหนัก 3.80 กรัม บรรจุลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแฟลช คอลัมน์โครมาโตกราฟี ระบบ gradient elution ทำการรับแฟรกชันแล้วนำแต่ละหลอดมาจุดเทียบเพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารด้วย TLC ทำการรวมแฟรกชัน นำแฟรกชันที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง แล้วทำการคำนวณหา %yield ของแต่ละแฟรกชัน ได้ผลดังตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-7 พบว่า น้ำหนักส่วนสกัดย่อยรวมทั้ง 13 แฟรกชัน เท่ากับ 3.5123 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 92.43 % แฟรกชันที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือแฟรกชันที่ 13 มีน้ำหนัก 2.4302 กรัม คิดเป็น % yield 63.95 % และแฟรกชันที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือแฟรกชันที่ 4 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.0163 กรัม คิดเป็น % yield 0.43 %

ตารางที่ 4-6 น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชันจากตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3

แฟรกชัน	น้ำหนักสาร (กรัม)	% yield
BUU-ED-B3-1	0.1277	3.36
BUU-ED-B3-2	0.0986	2.59
BUU-ED-B3-3	0.0579	1.52
BUU-ED-B3-4	0.0163	0.43
BUU-ED-B3-5	0.0291	0.77
BUU-ED-B3-6	0.0208	0.55
BUU-ED-B3-7	0.1052	2.77
BUU-ED-B3-8	0.0677	1.78
BUU-ED-B3-9	0.3712	9.77
BUU-ED-B3-10	0.0599	1.58
BUU-ED-B3-11	0.0588	1.55
BUU-ED-B3-12	0.0689	1.81
BUU-ED-B3-13	2.4302	63.95
รวม	3.5123	92.43



ภาพที่ 4-6 ผล TLC จากการสเปกเทียบส่วนสกัดย่อย 13 แพรกชัน (BUU-ED-B3-(1-13)) เทียบกับตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 (c) ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-(1-5) ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ 50% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซน (a), ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-(5-9) ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ 80% ไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซน (b) และ ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ 4% เมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (c)

4.8 การทดสอบการผลิตไนตริกออกไซด์และความมีชีวิตรอดของเซลล์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน

เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์สายพันธุ์ EA.hy 926 ได้ถูกนำไปทดสอบด้วยส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าผลการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ที่สัมผัสด้วยตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO (ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) เท่ากับ 1.18 ± 0.25 และ 1.53 ± 0.39 เท่า ตามลำดับ มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 102.71 ± 2.37 และ 110.47 ± 5.25 ตามลำดับ ส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน ส่วนสกัดย่อยที่มีจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO (ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 2.35 ± 0.43 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-5 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 1.77 ± 0.27 และ 2.22 ± 0.24 ตามลำดับ ส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน ที่ลดร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ควบคุมที่สัมผัสกับ DMSO (ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 65.40 ± 0.87 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-8 ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 61.93 ± 17.72 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-9 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 12.37 ± 3.28 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-10 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 46.71 ± 5.93 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-11 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 33.94 ± 1.14 และส่วนสกัดย่อยที่เหลือไม่ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4-7

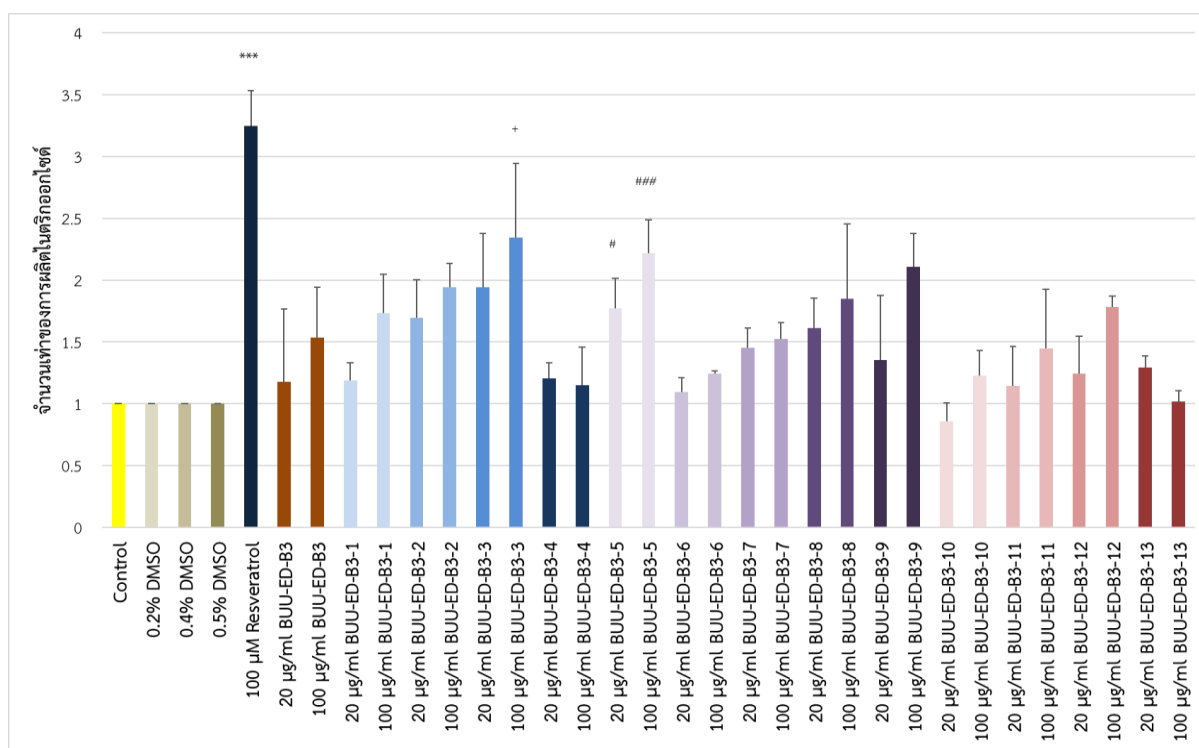
ตารางที่ 4-7 จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ และร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ เมื่อสัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชั้นที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารทดสอบ		จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์	ร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์
Control		1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
0.2% DMSO		1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
0.4% DMSO		1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
0.5% DMSO		1.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
100µM Resveratrol		3.25 ± 0.37	97.98 ± 1.76
BUU-ED-B3	20 µg/ml	1.18 ± 0.25	102.71 ± 2.37
	100 µg/ml	1.53 ± 0.39	110.47 ± 5.25
BUU-ED-B3-1	20 µg/ml	1.33 ± 0.37	99.53 ± 3.01
	100 µg/ml	1.51 ± 0.41	114.44 ± 2.60
BUU-ED-B3-2	20 µg/ml	1.49 ± 0.39	126.63 ± 15.50
	100 µg/ml	1.75 ± 0.43	138.96 ± 18.25
BUU-ED-B3-3	20 µg/ml	1.95 ± 0.60	113.82 ± 3.01
	100 µg/ml	2.35 ± 0.43	65.40 ± 0.87
BUU-ED-B3-4	20 µg/ml	1.21 ± 0.31	116.38 ± 5.69
	100 µg/ml	1.15 ± 0.13	92.99 ± 13.28
BUU-ED-B3-5	20 µg/ml	1.77 ± 0.27	135.99 ± 6.48
	100 µg/ml	2.22 ± 0.24	93.79 ± 12.19
BUU-ED-B3-6	20 µg/ml	1.09 ± 0.03	100.20 ± 2.35
	100 µg/ml	1.24 ± 0.12	104.93 ± 3.11
BUU-ED-B3-7	20 µg/ml	1.45 ± 0.13	139.49 ± 13.23
	100 µg/ml	1.52 ± 0.16	129.68 ± 6.38
BUU-ED-B3-8	20 µg/ml	1.61 ± 0.61	61.93 ± 17.72
	100 µg/ml	1.85 ± 0.24	91.29 ± 20.33
BUU-ED-B3-9	20 µg/ml	1.35 ± 0.27	103.69 ± 20.38
	100 µg/ml	2.11 ± 0.52	12.37 ± 3.28
BUU-ED-B3-10	20 µg/ml	0.86 ± 0.21	113.04 ± 12.67
	100 µg/ml	1.23 ± 0.15	46.71 ± 5.93

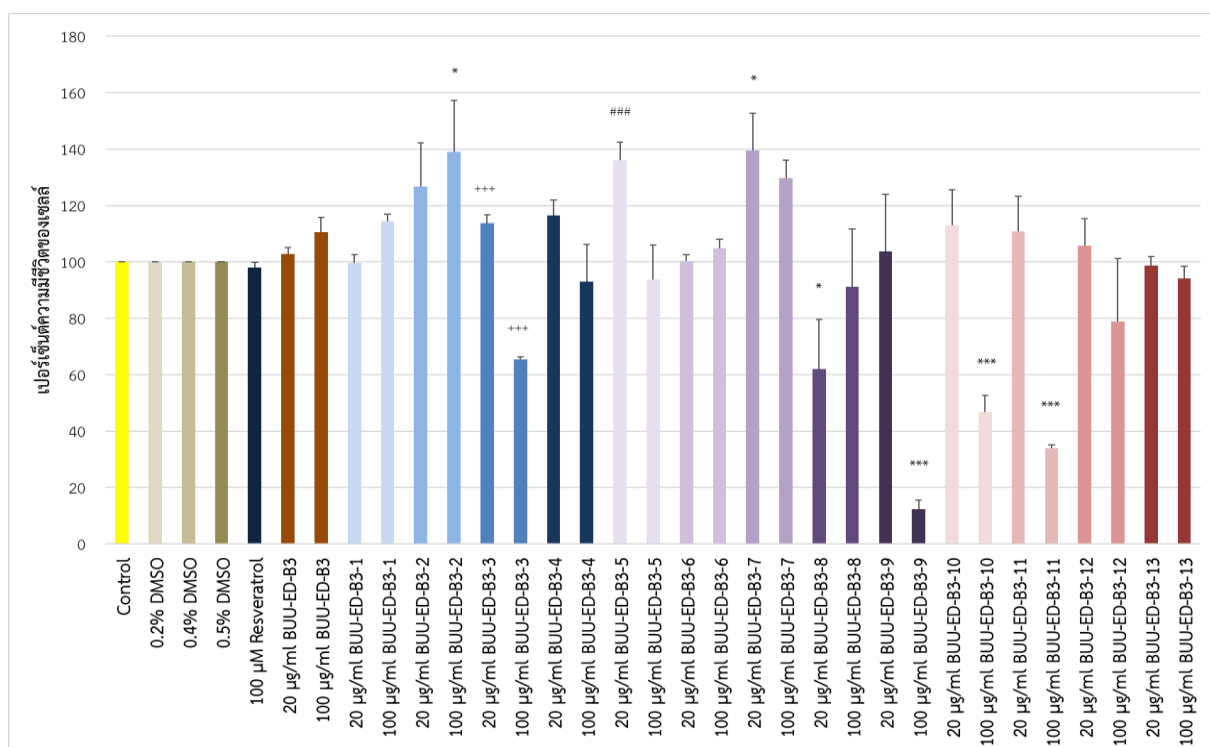
ตารางที่ 4-7 (ต่อ) จำนวนเท่าการผลิตไนตริกออกไซด์ และร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ เมื่อสัมผัสด้วย ส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชั้นที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารทดสอบ		จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์	ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์
BUU-ED-B3-11	20 µg/ml	0.98 ± 0.51	110.69 ± 12.73
	100 µg/ml	1.45 ± 0.32	33.94 ± 1.14
BUU-ED-B3-12	20 µg/ml	1.24 ± 0.09	105.85 ± 9.44
	100 µg/ml	1.78 ± 0.30	78.94 ± 22.26
BUU-ED-B3-13	20 µg/ml	1.29 ± 0.09	98.68 ± 3.28
	100 µg/ml	1.02 ± 0.09	94.08 ± 4.34

หมายเหตุ : ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เป็นอิสระต่อกัน



ภาพที่ 4-7 จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหุ้หลอดเลือดมหนูช่ย EA.hy 926 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชั้นที่แยกจากตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยข้อมูลทีแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำทีเป็นอิสระต่อกัน โดยข้อมูลทีแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำทีเป็นอิสระต่อกัน โดยกำหนดให้ *** p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ทีสัมผัสกับ DMSO ทีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 #p < 0.05 และ ###p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ทีสัมผัสกับ DMSO ทีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ +p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ทีสัมผัสด้วย DMSO ทีความเข้มข้นร้อยละ 0.5



ภาพที่ 4-8 ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 เมื่อสัมผัสกับส่วนสกัดย่อย ทั้ง 13 แพรกชันที่แยกจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำที่เป็นอิสระต่อกัน โดยกำหนดให้ * $p < 0.05$ และ *** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ +++ $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

4.9 ผลการกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน

นำตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์พบว่า ตำรับยาสมุนไพรไทยสูตร BUU-ED-B3 ที่ละลายในเอทานอลร้อยละ 47.5 มีฤทธิ์การกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 32.26 ± 9.60 และส่วนสกัดย่อย ที่มีฤทธิ์การกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์และไม่แตกต่างจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-4 มีค่าเท่ากับ 21.74 ± 2.43 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-8 มีค่าเท่ากับ 10.46 ± 2.08 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-10 มีค่าเท่ากับ 17.82 ± 4.06 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-11 มีค่าเท่ากับ 10.94 ± 4.83 ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-13 มีค่าเท่ากับ 20.12 ± 2.05 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน ที่ไม่มีฤทธิ์การกำจัดอนุมลพิษเปอร์ออกไซด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-2 มีค่าเท่ากับ -96.03 ± 4.68 ดังภาพที่ 4-10 และสารละลายกรดแกล

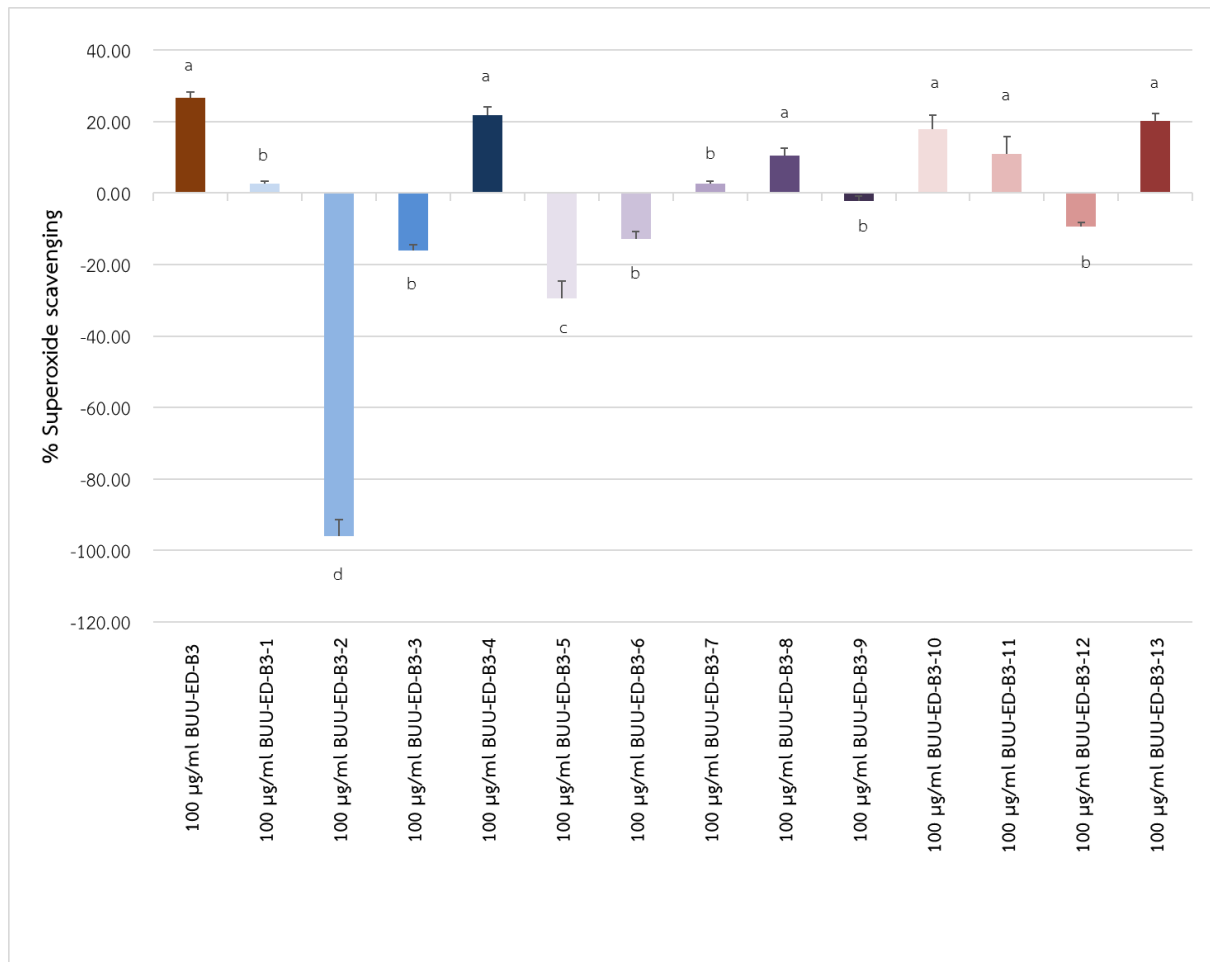
ลิกที่เป็นตัวควบคุมแบบบวก ที่ความเข้มข้น 3.75, 7.5, 12.5, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์เท่ากับร้อยละ 11.34 ± 0.24 , 16.22 ± 0.28 , 27.21 ± 2.42 , 40.65 ± 2.16 และ 56.63 ± 2.37 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-8 ผลการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อย ทั้ง 13 แพรกชัน

สารทดสอบ	% Superoxide scavenging
100 µg/ml BUU-ED-B3	32.26 ± 9.60^a
100 µg/ml BUU-ED-B3-1	2.56 ± 0.74^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-2	-96.03 ± 4.68^c
100 µg/ml BUU-ED-B3-3	-15.99 ± 1.56^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-4	21.74 ± 2.43^a
100 µg/ml BUU-ED-B3-5	-29.45 ± 4.87^d
100 µg/ml BUU-ED-B3-6	-12.73 ± 1.91^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-7	2.54 ± 0.80^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-8	10.46 ± 2.08^a
100 µg/ml BUU-ED-B3-9	-2.15 ± 1.39^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-10	17.82 ± 4.06^a
100 µg/ml BUU-ED-B3-11	10.94 ± 4.83^a
100 µg/ml BUU-ED-B3-12	-9.36 ± 1.07^b
100 µg/ml BUU-ED-B3-13	20.12 ± 2.05^a

หมายเหตุ ; ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c, d แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นและแต่ละตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-9 ร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชั้น ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ a, b, c, d แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.10 ผลการเลือกส่วนสกัดย่อยเพื่อนำมาแยกสารออกฤทธิ์จากตำรับยาใหม่ของสมุนไพร BUU-ED-B3

การเลือกส่วนสกัดย่อยเพื่อนำมาแยกสารออกฤทธิ์จากตำรับยาใหม่ของสมุนไพร BUU-ED-B3 ต้องขึ้นอยู่กับขึ้นอยู่กับปัจจัยทางเคมี เช่น %yield TLC NMR และแอกติวิตี้ของส่วนสกัดย่อย เช่น การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ร้อยละความมีชีวิตรอดและจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 จึงได้ทำการเลือกแฟรกชันย่อย BUU-ED-B3-7 ซึ่งมี%yield เท่ากับ 2.77 แบนTLC ที่ชัดเจน 1 แบน สเปกตรัมNMRเกือบเพียวริตี้ มีฤทธิ์ในการกำจัดซูเปอร์ออกไซด์ เท่ากับ 2.54 ± 0.80 สามารถเพิ่มจำนวนเท่าการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ และ $20 \mu\text{g/ml}$ ได้ เท่ากับ 1.52 ± 0.16 และ 1.45 ± 0.13 ตามลำดับและไม่เป็นพิษกับเซลล์ และ BUU-ED-B3-9 ซึ่งมี%yield เท่ากับ 9.77 แบนTLC ที่ชัดเจน 1 แบนและตรงกับแบนของตำรับยาสมุนไพรBUU-ED-B3 สเปกตรัมNMR เกือบเพียวริตี้ สามารถเพิ่มจำนวนเท่าการผลิตไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$ และ $20 \mu\text{g/ml}$ ได้ เท่ากับ 2.11 ± 0.52 และ 1.35 ± 0.27 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-9 % yield TLC NMR การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ร้อยละความมีชีวิตรอดและจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ของแต่ละแฟรกชันจากตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3

แฟรกชัน	% yield	TLC	NMR	% Superoxide scavenging (100 $\mu\text{g/ml}$)	จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์(100 $\mu\text{g/ml}$)	ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ (100 $\mu\text{g/ml}$)
BUU-ED-B3-1	3.36	แบนไม่ชัด		32.26 ± 9.60^a	1.51 ± 0.41	114.44 ± 2.60
BUU-ED-B3-2	2.59	มีแบน 3 แบน		2.56 ± 0.74^b	1.75 ± 0.43	138.96 ± 18.25
BUU-ED-B3-3	1.52	มีแบน 1 แบน		-96.03 ± 4.68^c	2.35 ± 0.43	65.40 ± 0.87
BUU-ED-B3-4	0.43	มีแบน 1 แบน		-15.99 ± 1.56^b	1.15 ± 0.13	92.99 ± 13.28
BUU-ED-B3-5	0.77	มีแบน 1 แบน		21.74 ± 2.43^a	2.22 ± 0.24	93.79 ± 12.19
BUU-ED-B3-6	0.55	มีแบน 1 แบน		-12.73 ± 1.91^b	1.24 ± 0.12	104.93 ± 3.11
BUU-ED-B3-7	2.77	เห็นแบนเดี่ยวชัดเจน	เกือบ purity	2.54 ± 0.80^b	1.52 ± 0.16	129.68 ± 6.38
BUU-ED-B3-8	1.78	มีแบน 1 แบน		10.46 ± 2.08^a	1.85 ± 0.24	91.29 ± 20.33
BUU-ED-B3-9	9.77	เห็นแบนเดี่ยวชัดเจน ตรงกับ Control	เกือบ purity	-2.15 ± 1.39^b	2.11 ± 0.52	12.37 ± 3.28

ตารางที่ 4-9 (ต่อ) % yield TLC NMR การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ร้อยละความมีชีวิตรอดและจำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy 926 ของแต่ละแฟรกชันจากตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3

แฟรกชัน	% yield	TLC	NMR	% Superoxide scavenging (100 µg/ml)	จำนวนเท่าของการผลิตไนตริกออกไซด์(100 µg/ml)	ร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ (100 µg/ml)
BUU-ED-B3-10	1.58	มีแบน 1 แบน		17.82 ± 4.06 ^a	1.23 ± 0.15	46.71 ± 5.93
BUU-ED-B3-11	1.55	มีแบน 2 แบน		10.94 ± 4.83 ^a	1.45 ± 0.32	33.94 ± 1.14
BUU-ED-B3-12	1.81	มีแบน 2 แบน		-9.36 ± 1.07 ^b	1.78 ± 0.30	78.94 ± 22.26
BUU-ED-B3-13	63.9 5	ไม่เห็น		20.12 ± 2.05 ^a	1.02 ± 0.09	94.08 ± 4.34

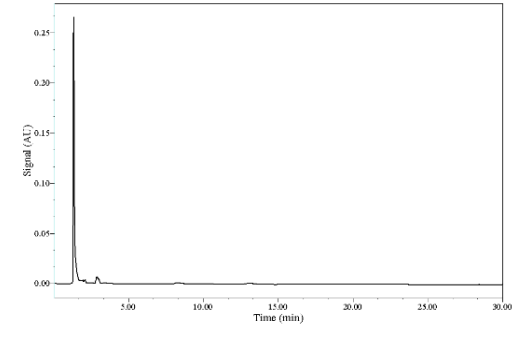
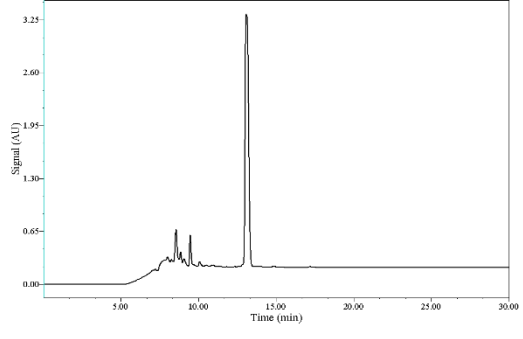
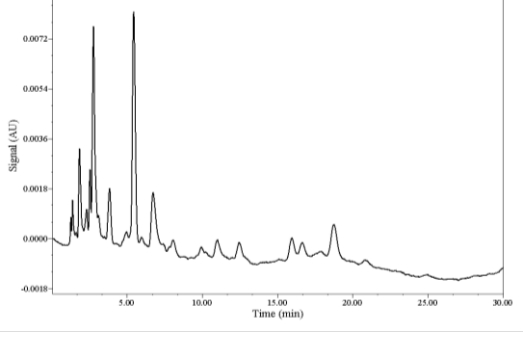
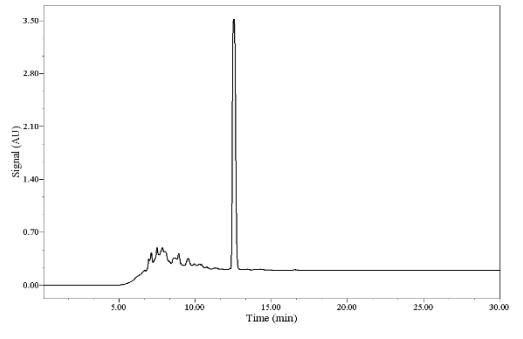
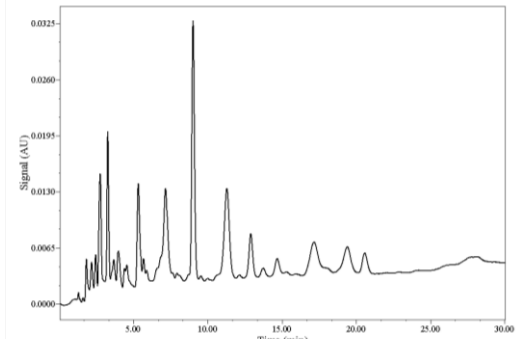
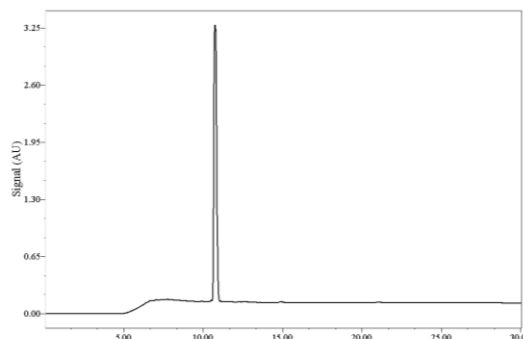
หมายเหตุ ; ข้อมูลที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c, d แสดงถึงความแตกต่างของข้อมูลในแต่ละความเข้มข้นและแต่ละตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05)

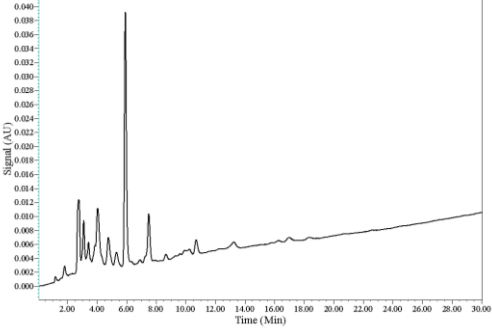
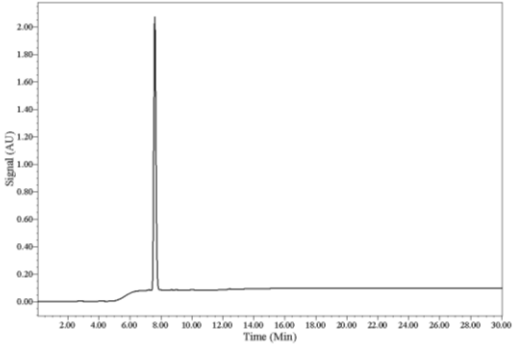
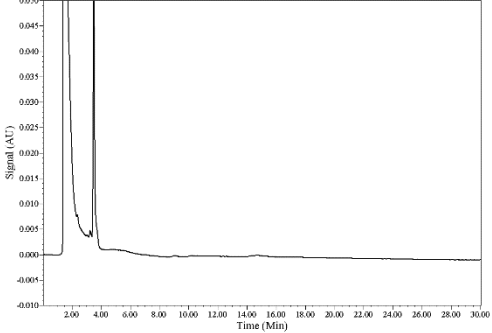
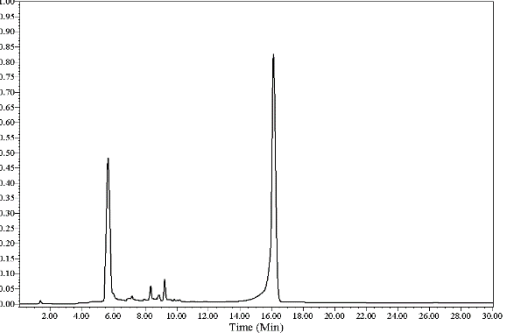
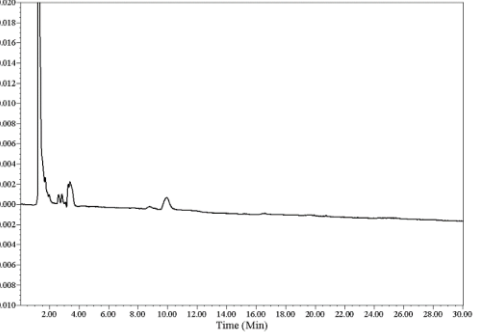
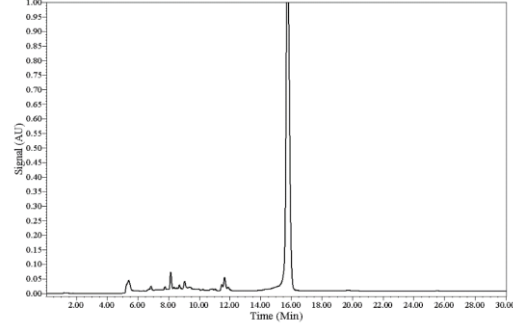
4.11 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9 ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จากการเลือกส่วนสกัดย่อยเพื่อนำมาแยกสารออกฤทธิ์จากตำรับยาใหม่ของสมุนไพร BUU-ED-B3 ซึ่งได้เลือกแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9 แล้วจึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารด้วย HPLC โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ต่างชนิดกัน คือ เมทานอลต่อน้ำ และอะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำ พบว่าการแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 ใช้อะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำจะแยกสารออกมาดีกว่าเมทานอลต่อน้ำ จึงใช้อะซิโตไนโตรล์ต่อน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 ในการแยกจากเครื่อง HPLC Water 600 ซึ่งแยกรับสารได้ 4 แฟรกชัน ส่วนแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จะใช้เมทานอลต่อน้ำ ซึ่งสามารถแยกพิกัดสารออกมาทั้งกันเหมาะสมในการรับแฟรกชันได้ดีกว่าอะซิโตไนโตรล์ จึงใช้เมทานอลต่อน้ำในอัตราส่วน 62 ต่อ 38 และ 65 ต่อ 35 จากเครื่อง HPLC Agilent infinity 1260 และเครื่อง HPLC Water 600 ในการแยกตามลำดับ ซึ่งแยกรับสารได้ 8 แฟรกชัน ซึ่งอัตราส่วนเฟสเคลื่อนที่ต่างกันอย่างเล็กน้อยเมื่อใช้เครื่อง HPLC ที่แตกต่างกัน

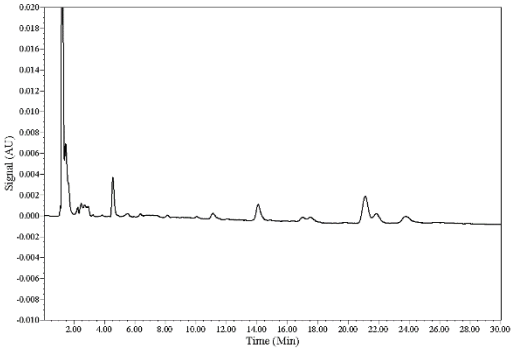
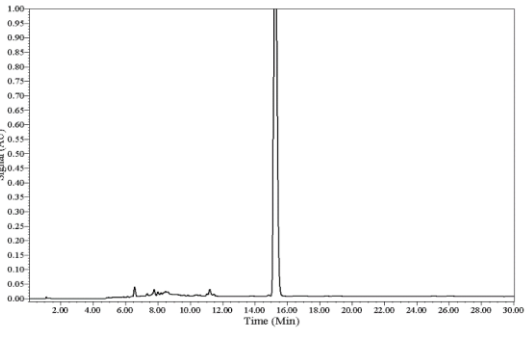
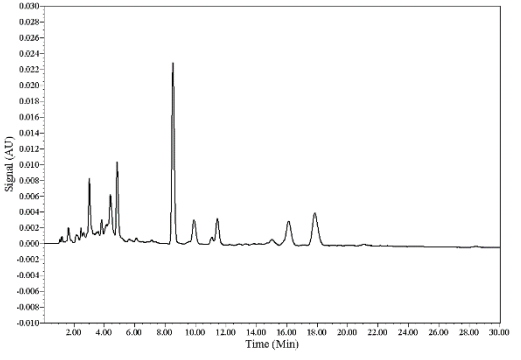
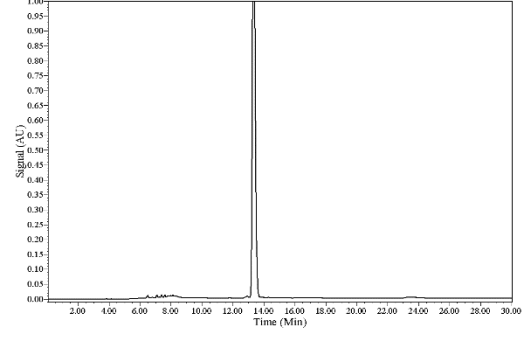
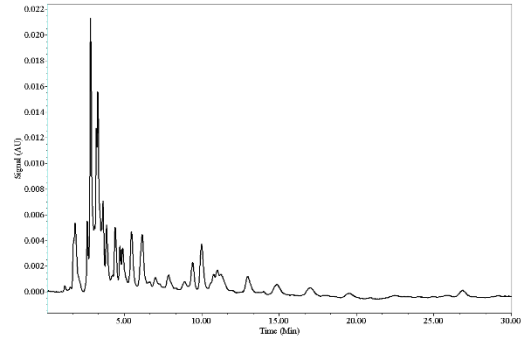
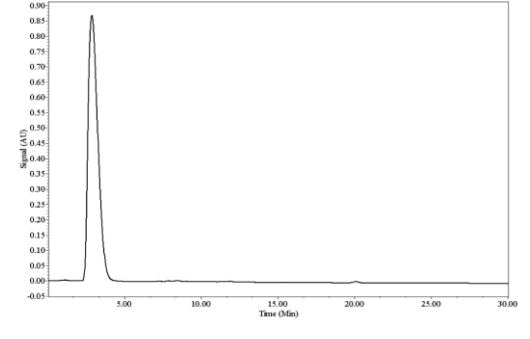
ตารางที่ 4-10 การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 จากเครื่องHPLC
Water 600

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
20% Met:H ₂ O		
50% Met:H ₂ O		
80% Met:H ₂ O		

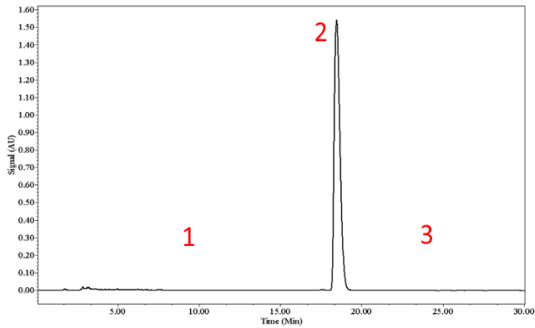
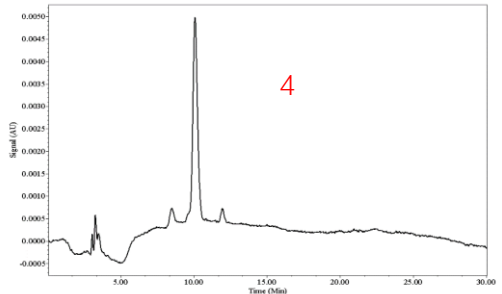
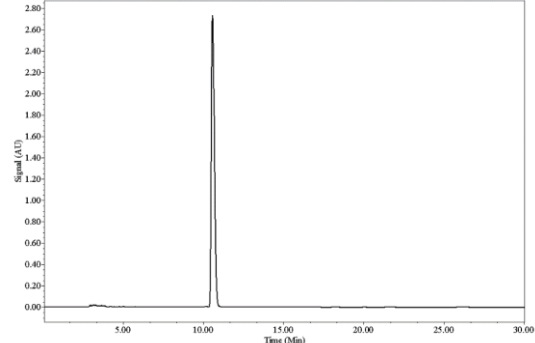
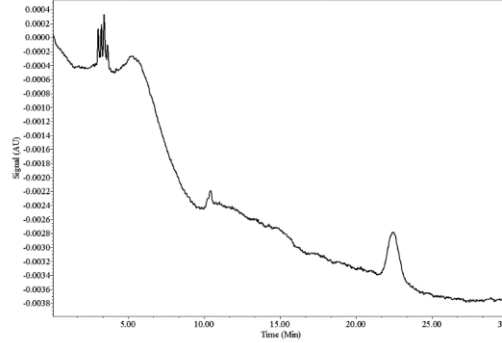
ตารางที่ 4-10 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 จากเครื่อง HPLC Water 600

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
90% Met:H ₂ O		
10% ACN:H ₂ O		
20 ACN:H ₂ O		

ตารางที่ 4-10 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 จากเครื่อง HPLC Water 600

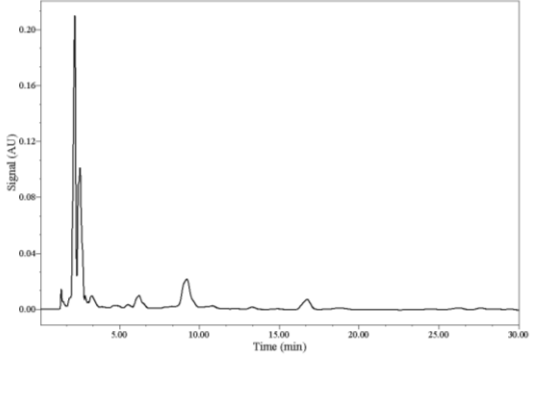
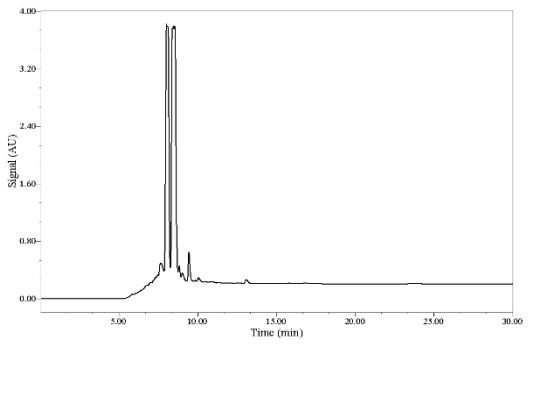
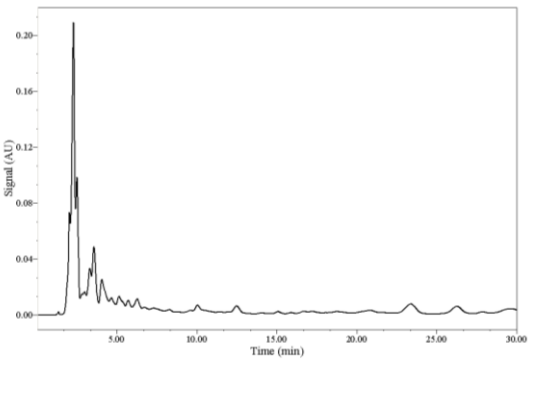
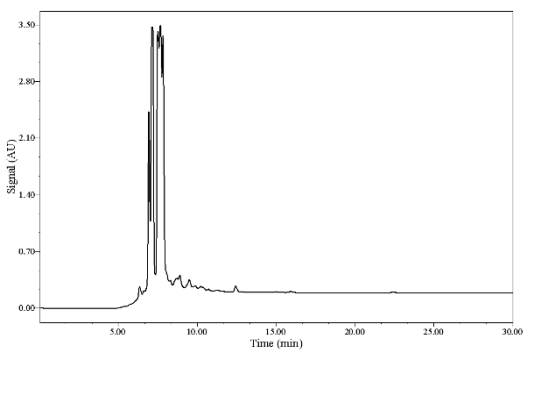
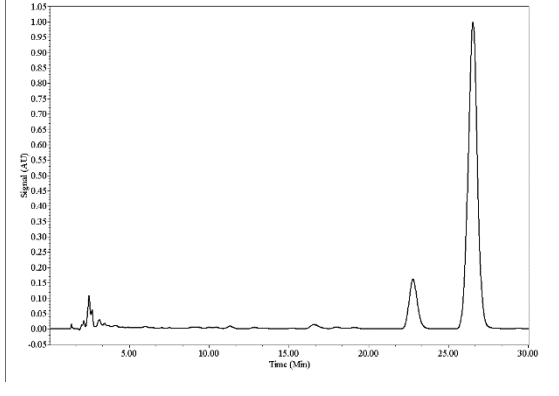
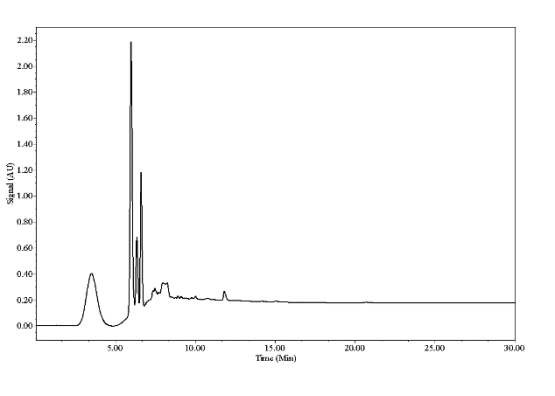
เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
40 ACN:H ₂ O		
70 ACN:H ₂ O		
90 ACN:H ₂ O		

ตารางที่ 4-10 (ต่อ) การหาสถานะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 จากเครื่อง HPLC Water 600

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
95 ACN:H ₂ O		
100 ACN:H ₂ O		

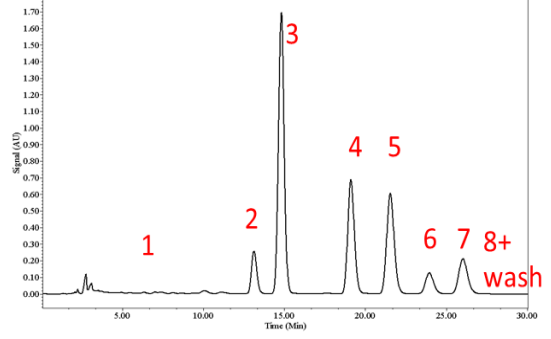
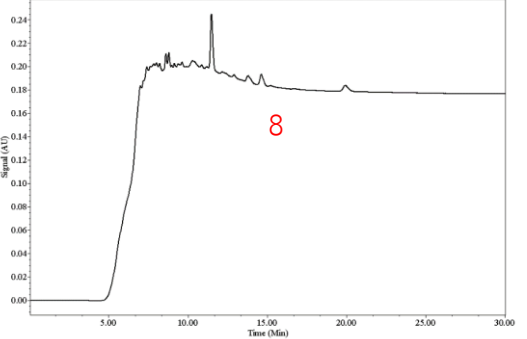
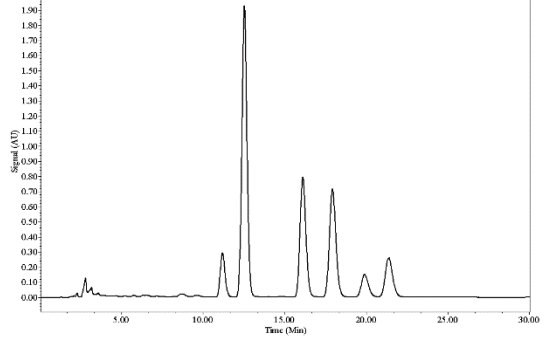
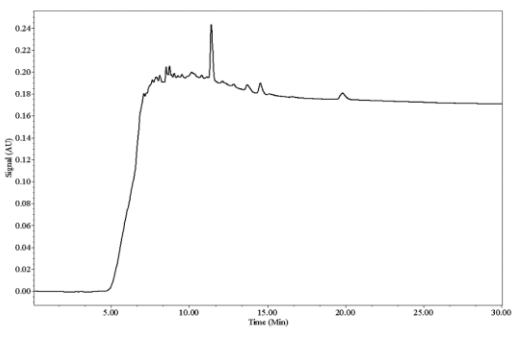
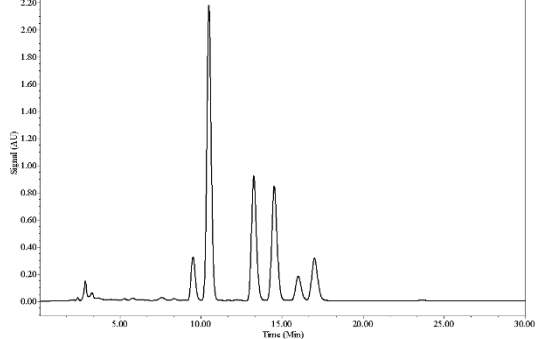
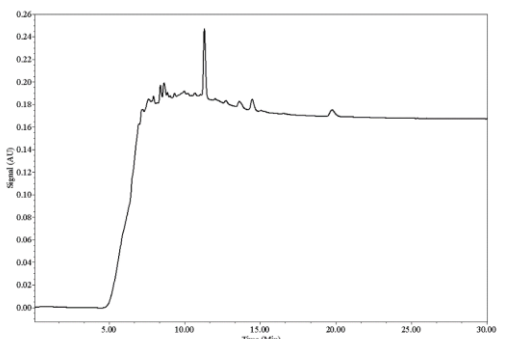
หมายเหตุ ; 1, 2, 3 และ 4 คือลำดับการรับแฟรกชัน

ตารางที่ 4-11 การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่องHPLC
Water 600

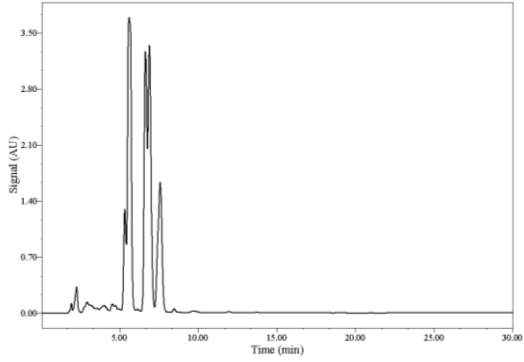
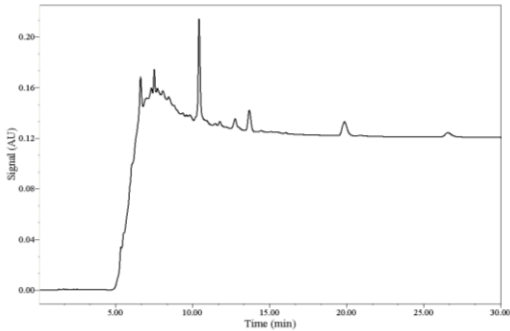
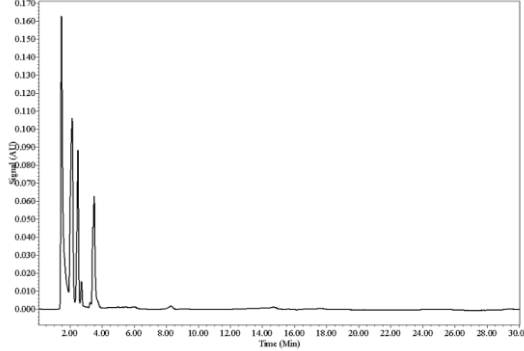
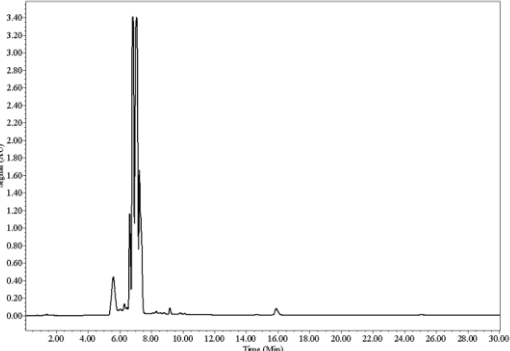
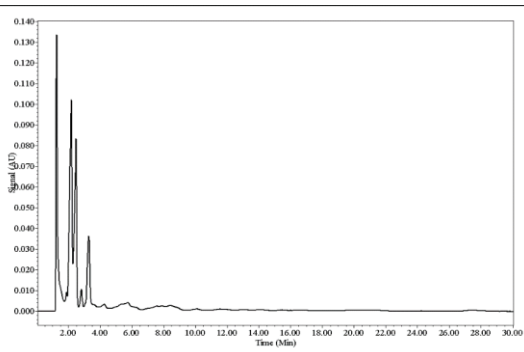
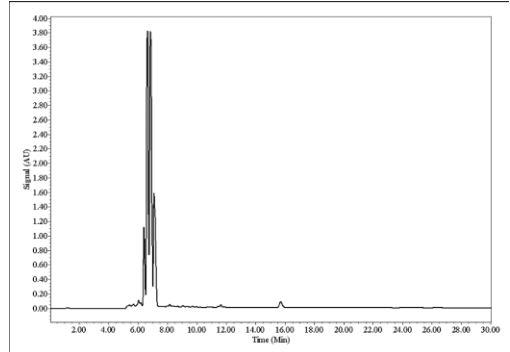
เฟส เคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
20% Met:H ₂ O		
50% Met:H ₂ O		
60% Met:H ₂ O		

หมายเหตุ ; 1, 2, 3, 4, 5, 6 ,7 และ8 คือลำดับการรับแฟรกชัน

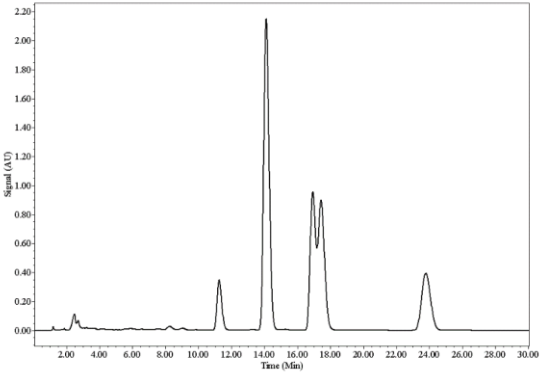
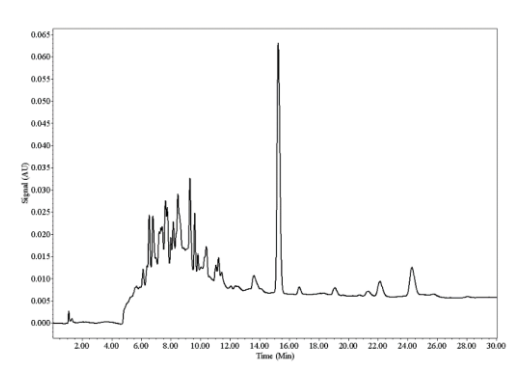
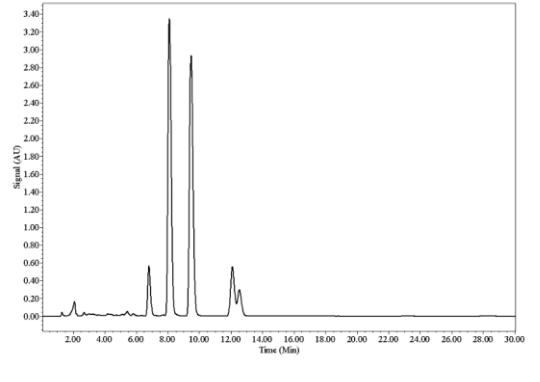
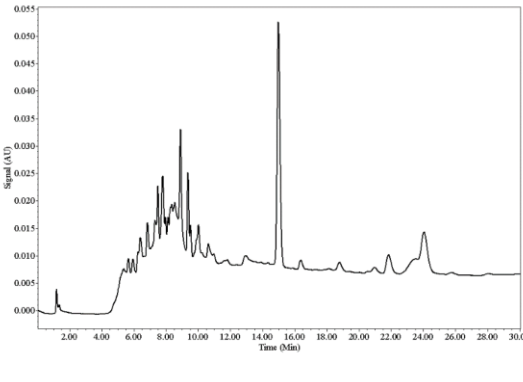
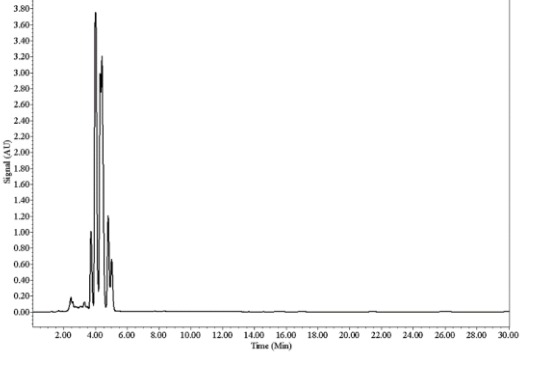
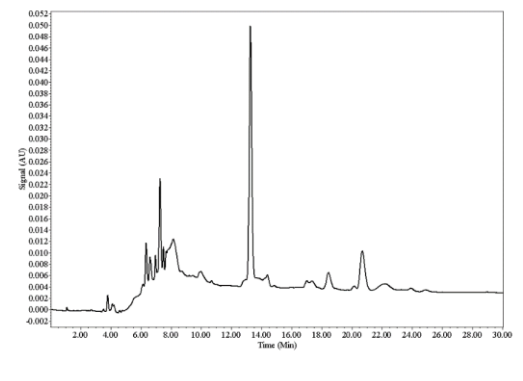
ตารางที่ 4-11 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่อง HPLC Water 600

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
65% Met:H ₂ O		
68% Met:H ₂ O		
70% Met:H ₂ O		

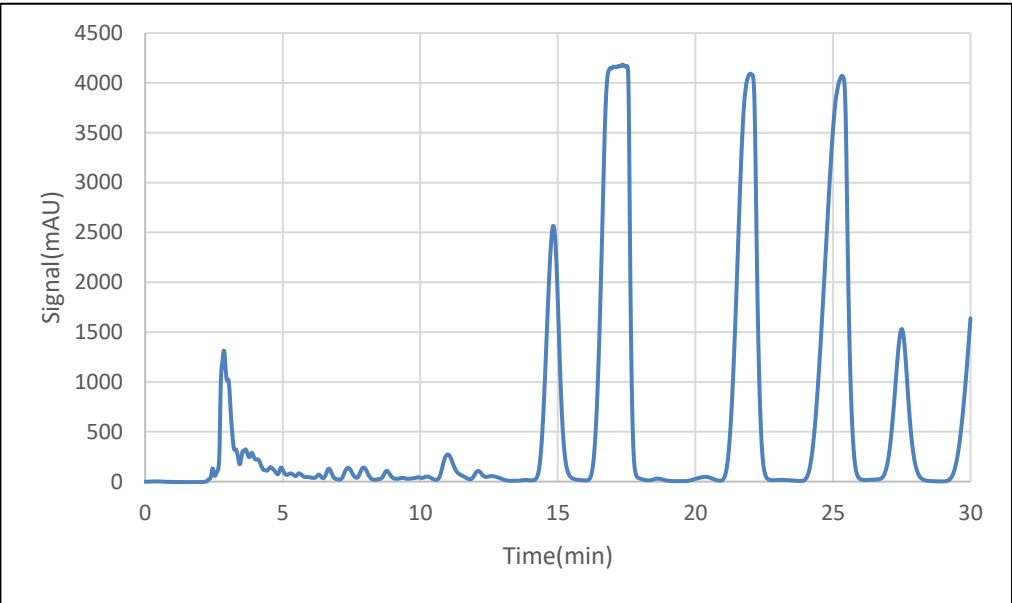
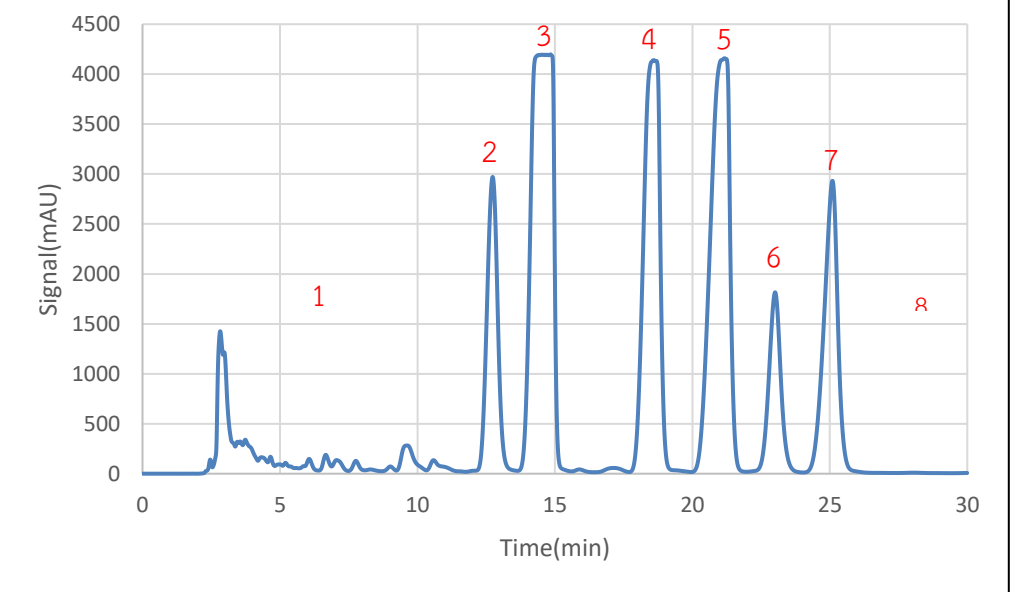
ตารางที่ 4-11 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่อง HPLC Water 600

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
80% Met:H ₂ O	 <p>Chromatogram showing a cluster of peaks between 5 and 10 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.00 to 3.50. The x-axis is labeled 'Time (min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>	 <p>Washing chromatogram showing a broad peak around 10 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.00 to 0.20. The x-axis is labeled 'Time (min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>
10% ACN:H ₂ O	 <p>Chromatogram showing a cluster of peaks between 2 and 6 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.000 to 0.170. The x-axis is labeled 'Time (Min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>	 <p>Washing chromatogram showing a sharp peak around 7 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.00 to 3.40. The x-axis is labeled 'Time (Min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>
20% ACN:H ₂ O	 <p>Chromatogram showing a cluster of peaks between 2 and 6 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.000 to 0.140. The x-axis is labeled 'Time (Min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>	 <p>Washing chromatogram showing a sharp peak around 7 minutes. The y-axis is labeled 'Signal (AU)' and ranges from 0.00 to 4.00. The x-axis is labeled 'Time (Min)' and ranges from 0 to 30.00.</p>

ตารางที่ 4-11 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่อง HPLC Water 600

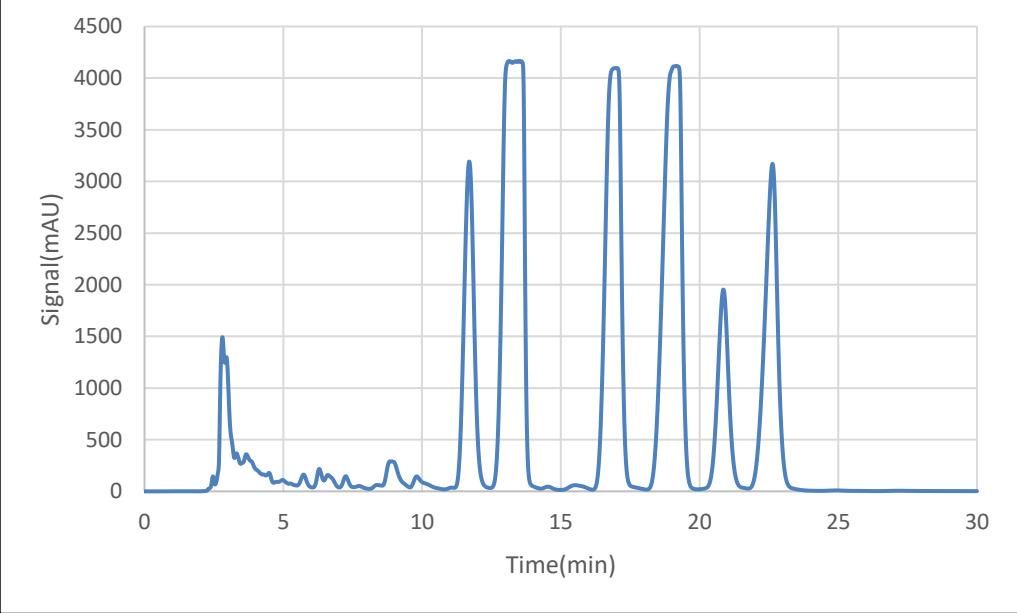
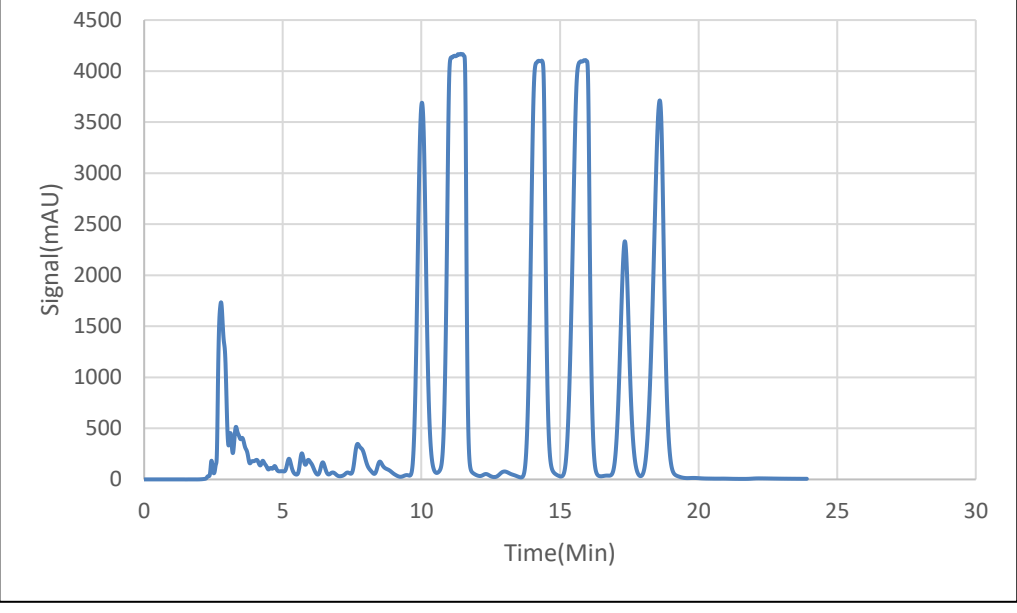
เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม	ล้างคอลัมน์
40% ACN:H ₂ O		
50% ACN:H ₂ O		
70% ACN:H ₂ O		

ตารางที่ 4-12 การหาสถานะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่อง HPLC Agilent infinity 1260

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม
60% Met:H ₂ O	 <p>The chromatogram for 60% Met:H₂O shows a signal intensity (mAU) on the y-axis ranging from 0 to 4500 and time (min) on the x-axis ranging from 0 to 30. There are several distinct peaks: a small peak at ~3 min, a larger peak at ~14 min, a very large peak at ~17 min, another large peak at ~22 min, a peak at ~25 min, a peak at ~28 min, and a final peak at ~30 min.</p>
62% Met:H ₂ O	 <p>The chromatogram for 62% Met:H₂O shows a signal intensity (mAU) on the y-axis ranging from 0 to 4500 and time (min) on the x-axis ranging from 0 to 30. Peaks are labeled with red numbers: 1 (at ~5 min), 2 (at ~13 min), 3 (at ~15 min), 4 (at ~18 min), 5 (at ~21 min), 6 (at ~23 min), 7 (at ~25 min), and 8 (at ~28 min).</p>

หมายเหตุ ; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 คือลำดับการรับแฟรกชัน

ตารางที่ 4-12 (ต่อ) การหาสภาวะที่เหมาะสมในแยกสารออกฤทธิ์จากแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 จากเครื่อง HPLC Agilent infinity 1260

เฟสเคลื่อนที่	โครมาโตแกรม
63% Met:H ₂ O	 <p>The chromatogram for 63% Met:H₂O shows a signal intensity (mAU) on the y-axis ranging from 0 to 4500 and time (min) on the x-axis ranging from 0 to 30. The baseline is relatively flat with minor noise. There are several distinct peaks: a small peak at ~2.5 min, a larger peak at ~11.5 min, a very sharp peak at ~13.5 min, another sharp peak at ~16.5 min, a peak at ~19.5 min, a smaller peak at ~21.5 min, and a final peak at ~23.5 min.</p>
65% Met:H ₂ O	 <p>The chromatogram for 65% Met:H₂O shows a signal intensity (mAU) on the y-axis ranging from 0 to 4500 and time (Min) on the x-axis ranging from 0 to 30. The baseline is relatively flat with minor noise. There are several distinct peaks: a small peak at ~2.5 min, a larger peak at ~10.5 min, a very sharp peak at ~11.5 min, another sharp peak at ~14.5 min, a peak at ~16.5 min, a smaller peak at ~17.5 min, and a final peak at ~19.5 min.</p>

4.12 ผลการแยกสารด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatograph, HPLC)

เมื่อทำการหาสถานะที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์ออกจากแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9 และเลือกสถานะที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการรับแฟรกชัน โดยแฟรกชัน BUU-ED-B3-7 แยกด้วยอะซิโตนไตรลต์่อน้ำในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 น้ำหนักสารที่นำมาแยกทั้งหมด 13.9 มิลลิกรัม ทำการรับ 4 แฟรกชัน และแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 แยกด้วยเมทานอลต่อ่น้ำในอัตราส่วน 62 ต่อ 38 น้ำหนักสารที่นำมาแยกทั้งหมด 130 มิลลิกรัม ทำการรับ 8 แฟรกชัน นำแฟรกชันที่ได้ไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง แล้วทำการคำนวณหา % yield ของแต่ละแฟรกชัน ได้ผลดังตารางที่ 4-13 และ 4-14 ตามลำดับ พบว่า แฟรกชัน BUU-ED-B3-7 มีน้ำหนักส่วนสัทย่อยรวมทั้ง 4 แฟรกชัน เท่ากับ 7.4 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 53.23 % แฟรกชันที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือแฟรกชันที่ 1 และ 2 มีน้ำหนัก 3.1 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield 22.30 % และแฟรกชันที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือแฟรกชันที่ 4 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield 2.16 % และแฟรกชัน BUU-ED-B3-9 มีน้ำหนักส่วนสัทย่อยรวมทั้ง 8 แฟรกชัน เท่ากับ 109.28 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 84.04 % แฟรกชันที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือแฟรกชันที่ 3 มีน้ำหนัก 36.19 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield 27.84 % และแฟรกชันที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือแฟรกชันที่ 2 มีน้ำหนักเท่ากับ 6 มิลลิกรัม คิดเป็น % yield 4.6 %

ตารางที่ 4-13 น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชัน BUU-ED-B3-7

แฟรกชัน	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	% yield
BUU-ED-B3-7-1	3.1	22.30
BUU-ED-B3-7-2	3.1	22.30
BUU-ED-B3-7-3	0.9	6.47
BUU-ED-B3-7-4	0.3	2.16
รวม	7.4	53.23

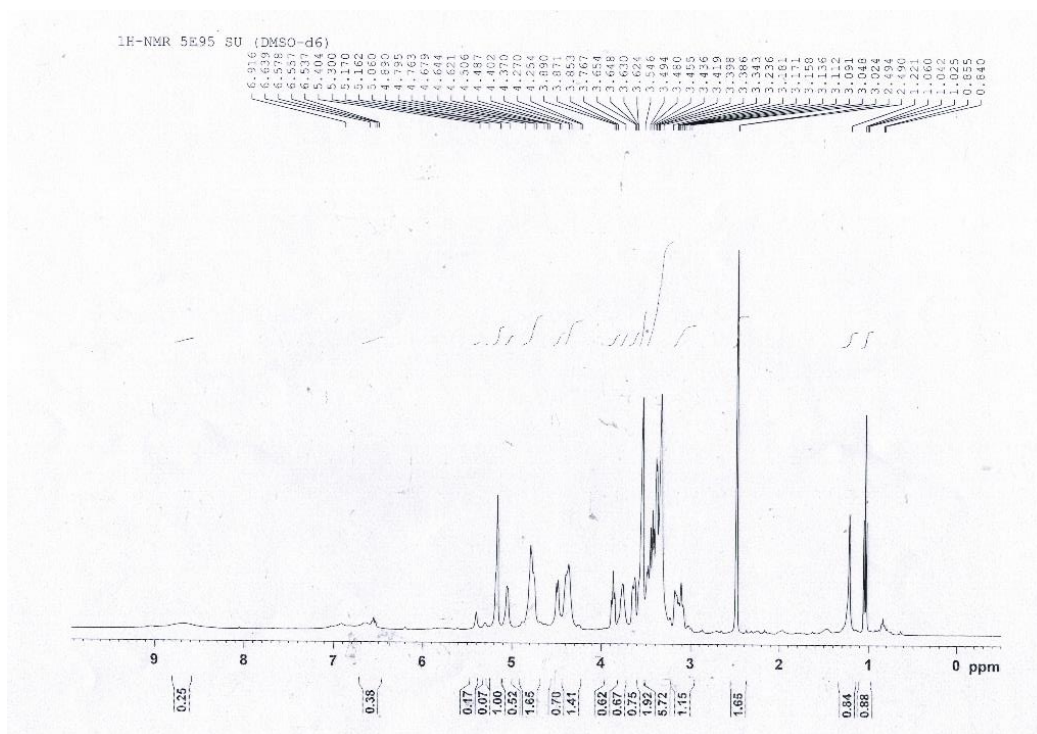
ตารางที่ 4-14 น้ำหนักและ % yield ของแต่ละแฟรกชัน BUU-ED-B3-9

แฟรกชัน	น้ำหนักสาร (มิลลิกรัม)	% yield
BUU-ED-B3-9-1	11.83	9.1
BUU-ED-B3-9-2	6	4.6
BUU-ED-B3-9-3	36.19	27.84
BUU-ED-B3-9-4	14.27	10.98
BUU-ED-B3-9-5	14.34	11.03
BUU-ED-B3-9-6	3.75	2.88
BUU-ED-B3-9-7	7.19	5.53
BUU-ED-B3-9-8	15.71	12.08
รวม	109.28	84.04

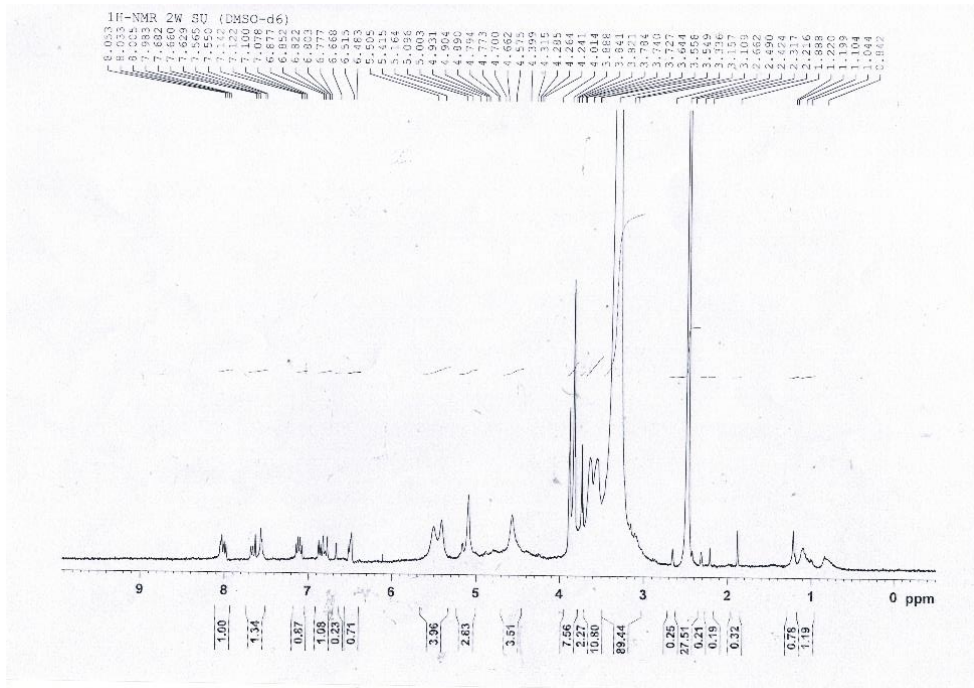
4.13 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารโดยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

นำสารสกัดหัวกวาวเครือแดง เหง้ากระชายดำ ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 แพรกชั้นจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และแพรกชั้นย่อยของแพรกชั้นที่ 7 และ 9 แพรกชั้นตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ไปการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) เพื่อหาโครงสร้างสารออกฤทธิ์ ดังแสดงในภาพที่ 4.10 – 4.12 นำสารที่แยกได้จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9 มาพิสูจน์โครงสร้างโดยเทคนิค NMR และเปรียบเทียบข้อมูลกับสเปกตรัมของ NMR ของรายงานก่อนหน้านี (Sutthanut et al., 2007) พบว่าสเปกตรัมของสารที่แยกได้จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-2 คือ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone (ภาพที่ 4.13a) จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-3 คือ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (ภาพที่ 4.13b) จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-4 คือ 5,7-dimethoxyflavone (ภาพที่ 4.13c) จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-5 คือ 5,7,4'-trimethoxyflavone (ภาพที่ 4.13d) จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-6 คือ 3,5,7-trimethoxyflavone (ภาพที่ 4.13e) จากแพรกชั้นย่อย BUU-ED-B3-9-7 คือ 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone (ภาพที่ 4.13f) โครงสร้างและข้อมูลทางสเปกโทรสโคปีของสาร แสดงในภาพที่ 4.14 – 4.19

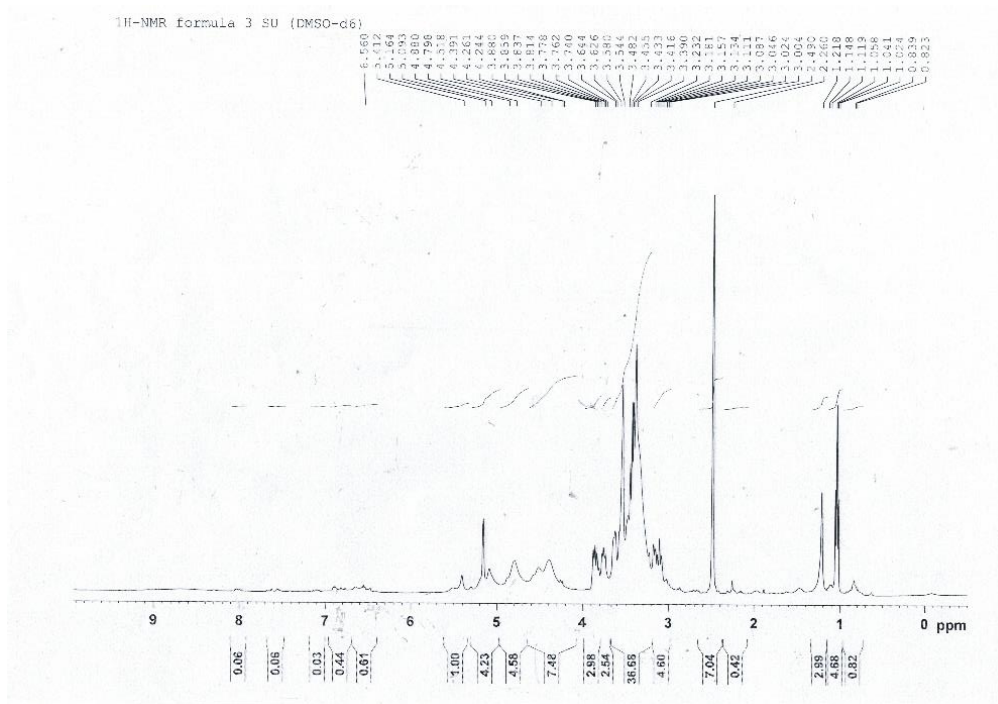
(a)



(b)

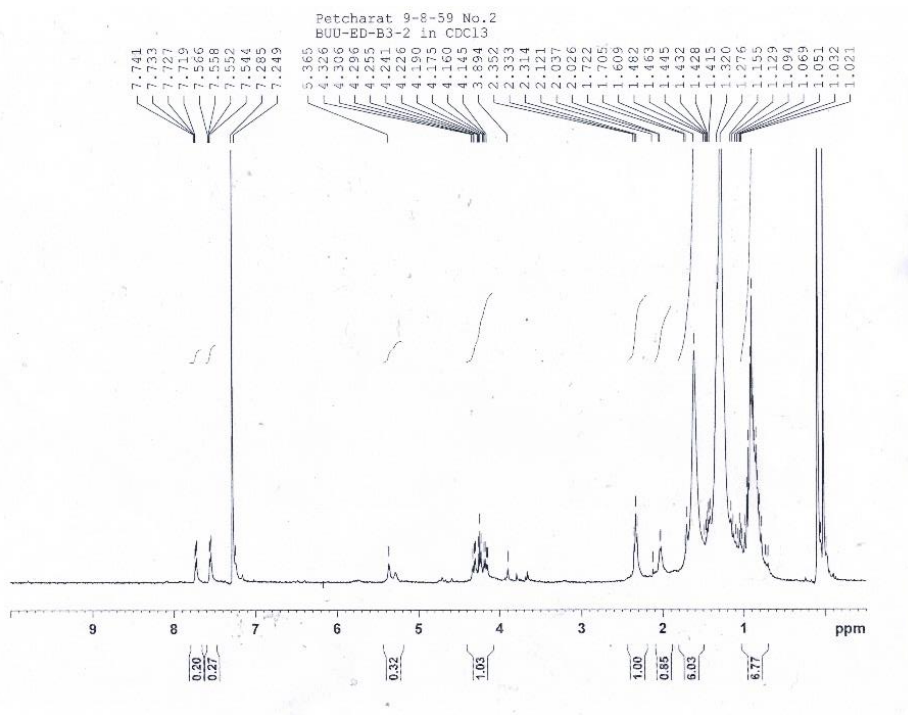


(c)

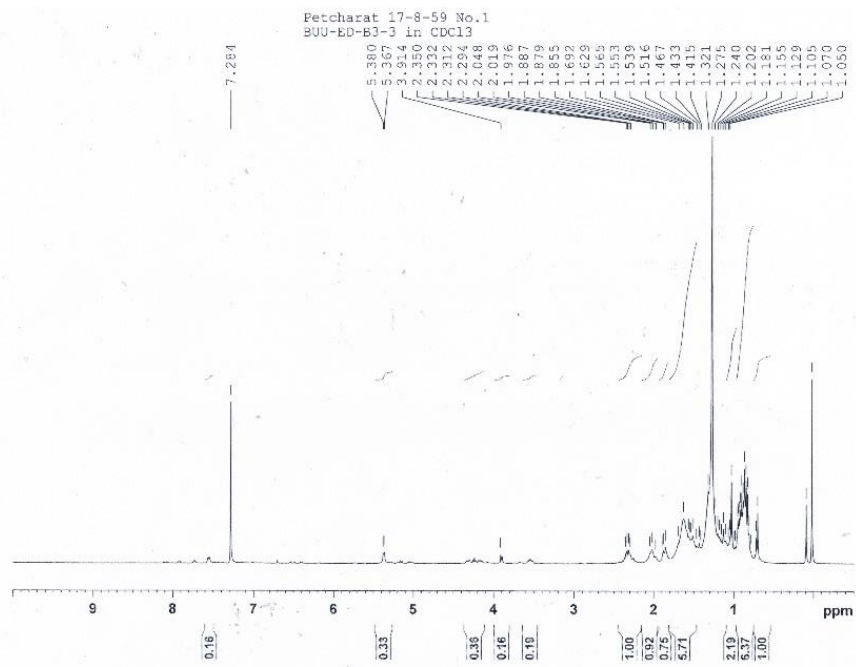


ภาพที่ 4.10 ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ของสารสกัดสมุนไพรเด็ย และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 หัวกวาวเครือแดง (a), เหง้ากระชายดำ (b) และตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 (c)

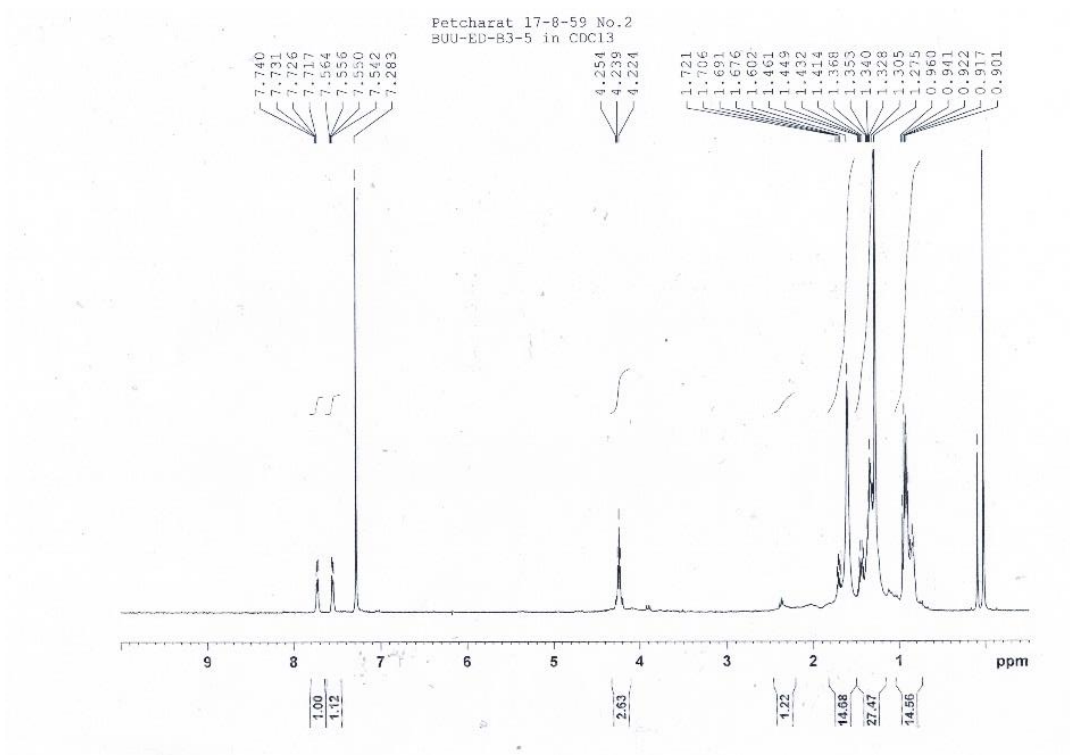
(a)



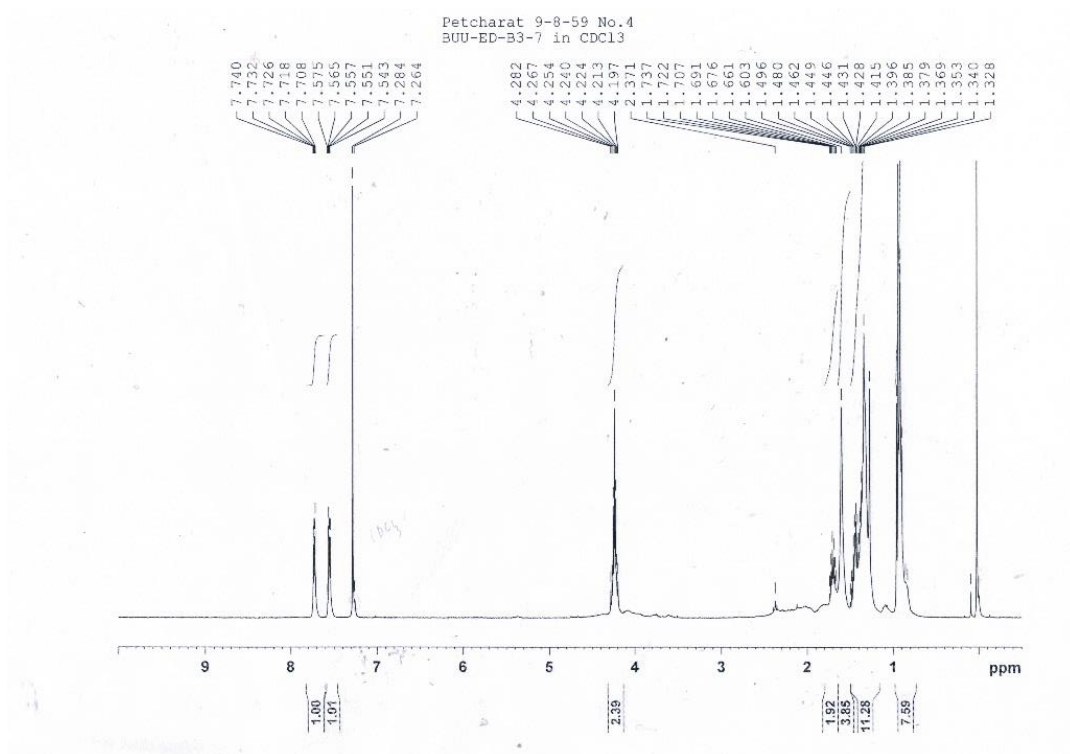
(b)



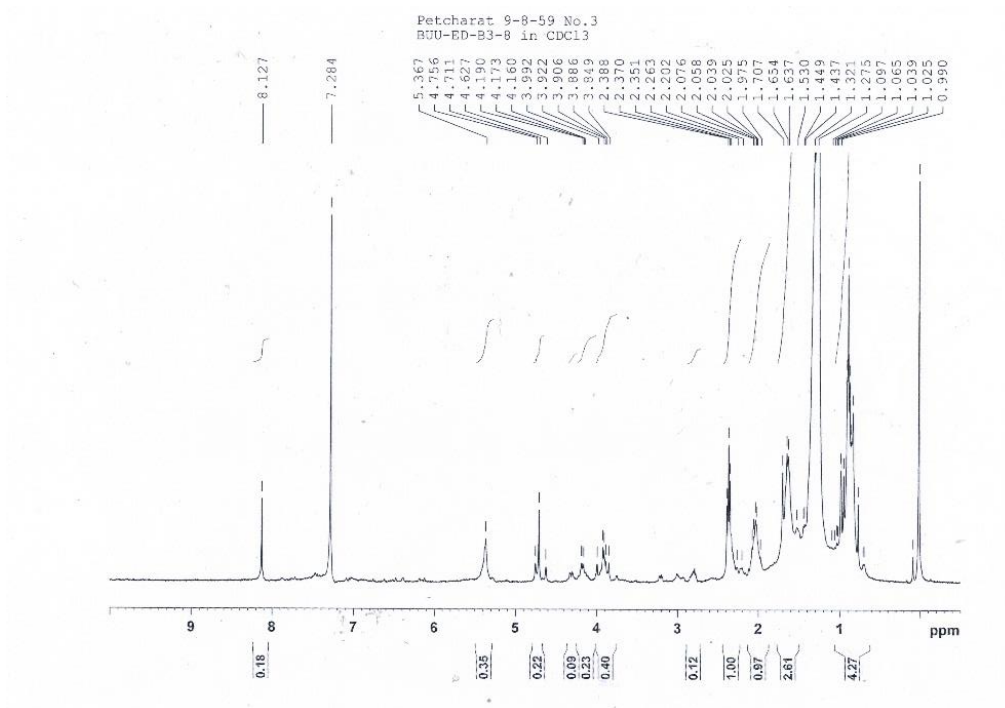
(c)



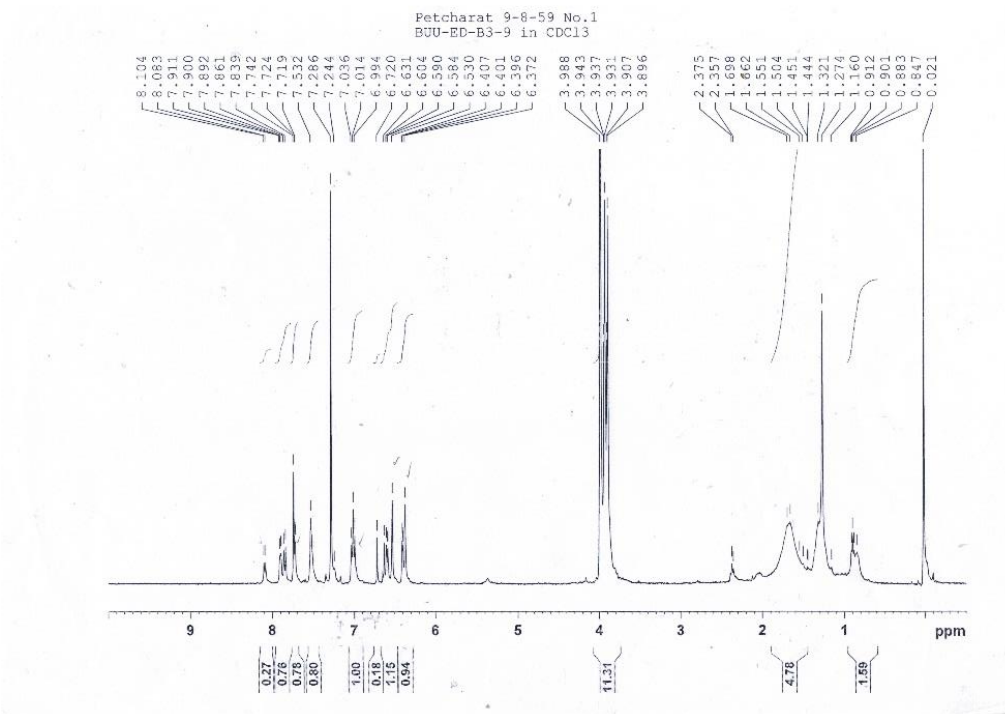
(d)



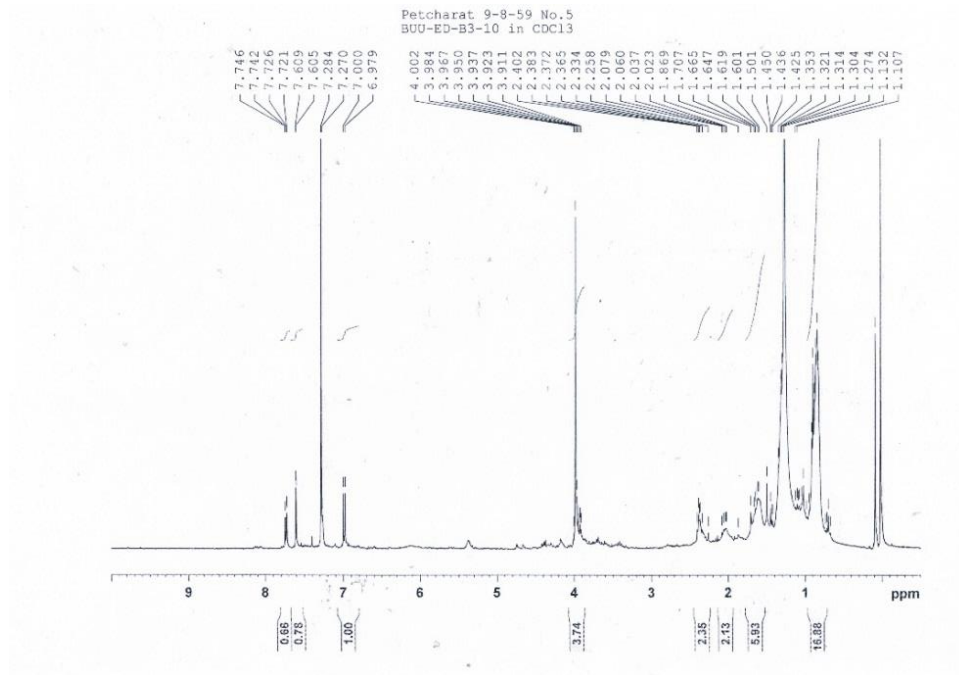
(e)



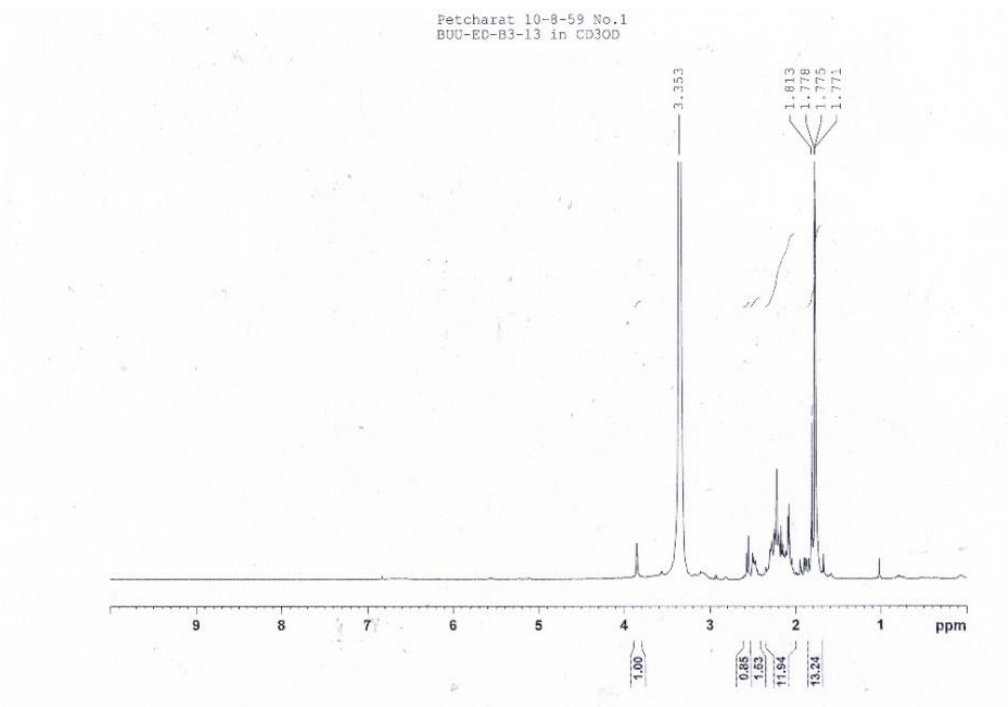
(f)



(g)

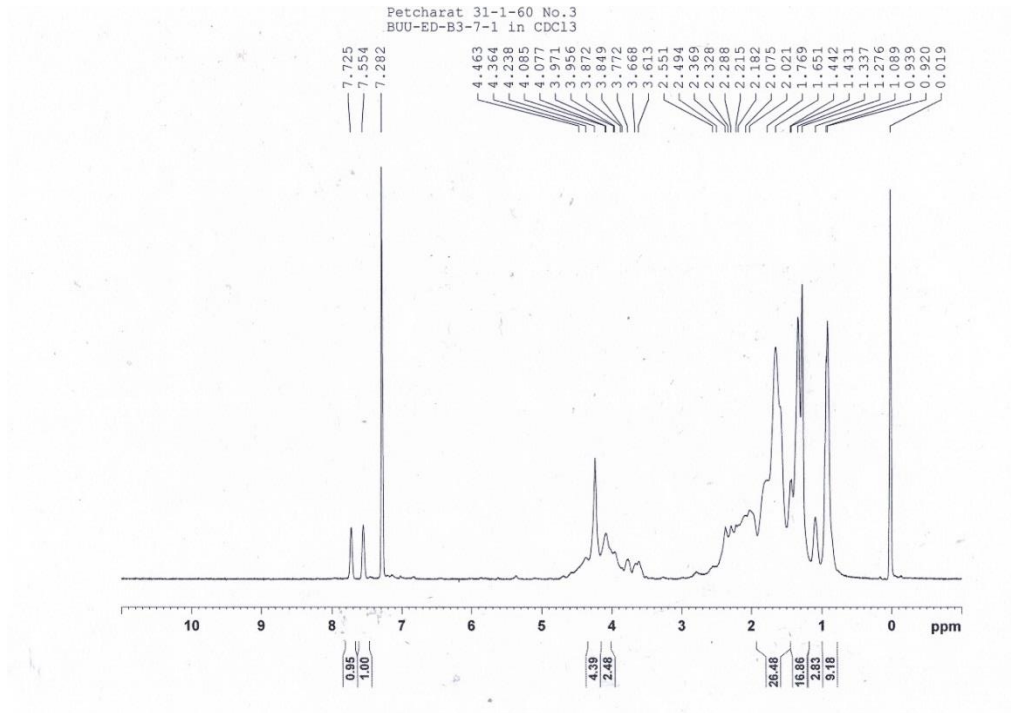


(h)

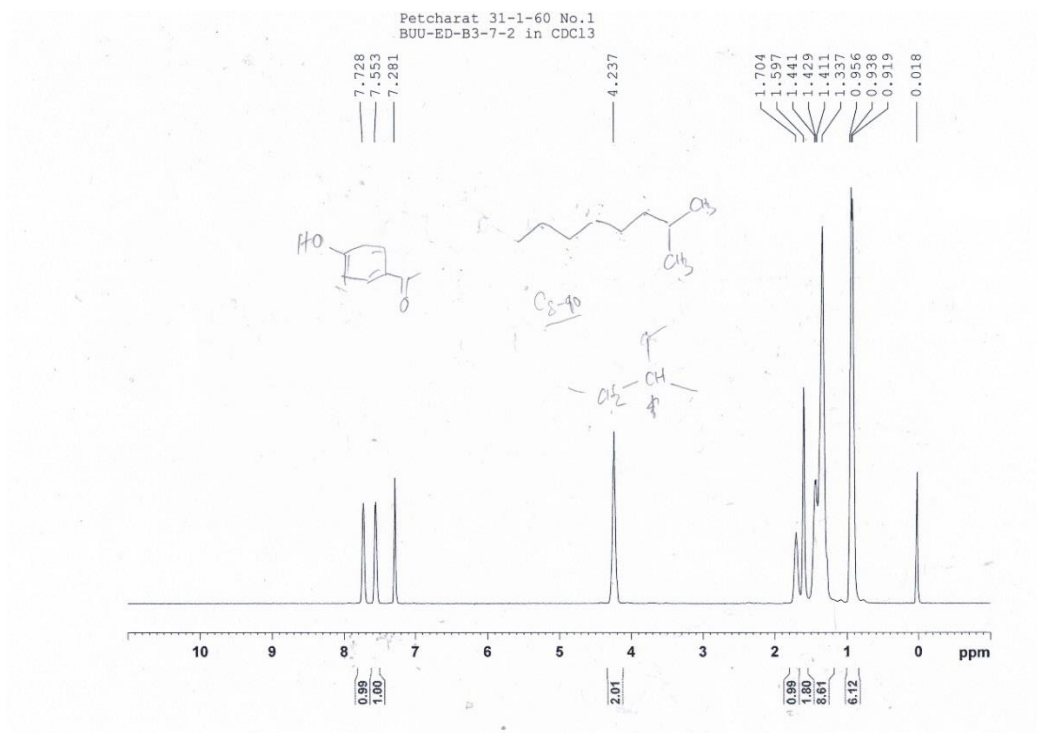


ภาพที่ 4.11 ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) แฟรงชันของตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3 คือ BUU-ED-B3-2 (a), BUU-ED-B3-3(b), BUU-ED-B3-5 (c), BUU-ED-B3-7 (d), BUU-ED-B3-8 (e), BUU-ED-B3-9 (f), BUU-ED-B3-10 (g) และ BUU-ED-B3-13 (h)

(a)

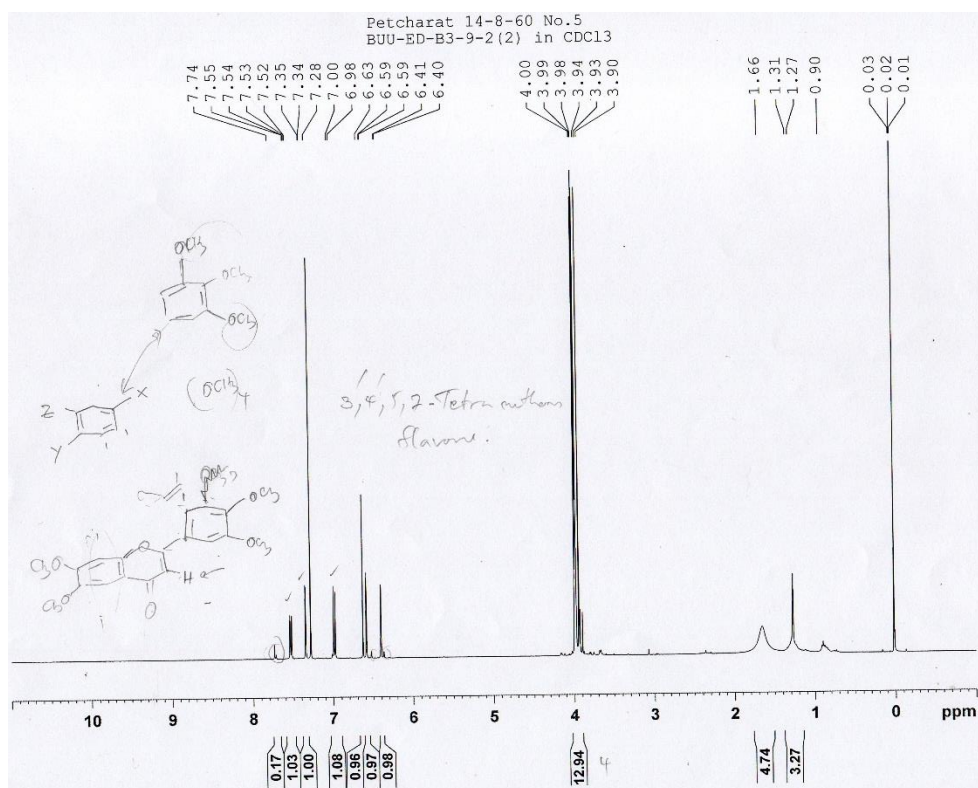


(b)

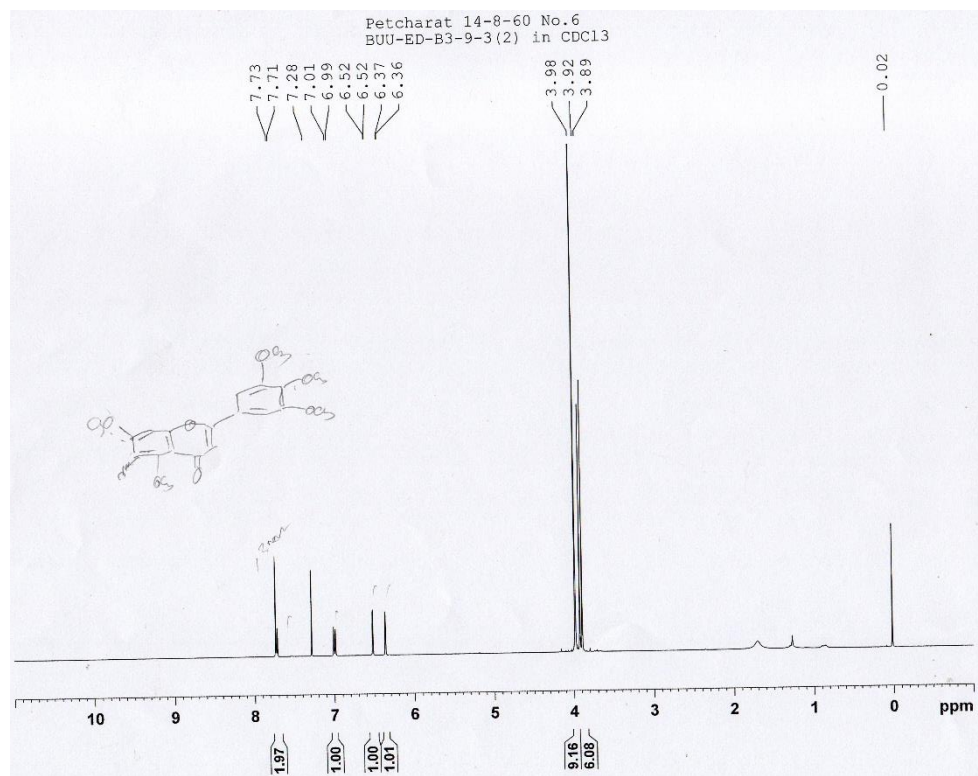


ภาพที่ 4.12 ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์(NMR) ของแฟรกชันย่อยของ BUU-ED-B3-7 คือ BUU-ED-B3-7-1 (a), BUU-ED-B3-7-2(b)

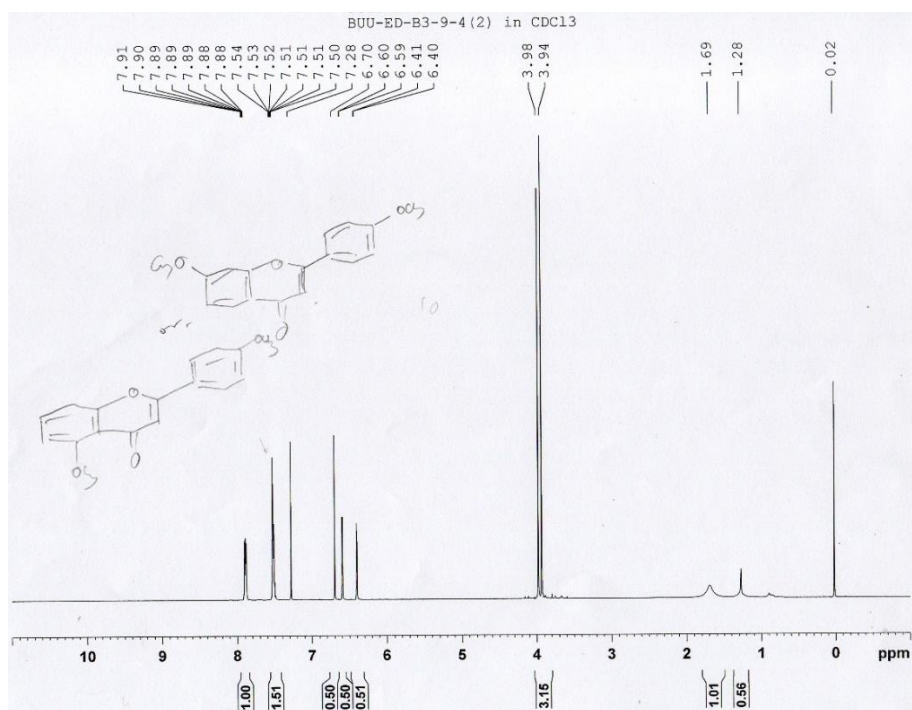
(a)



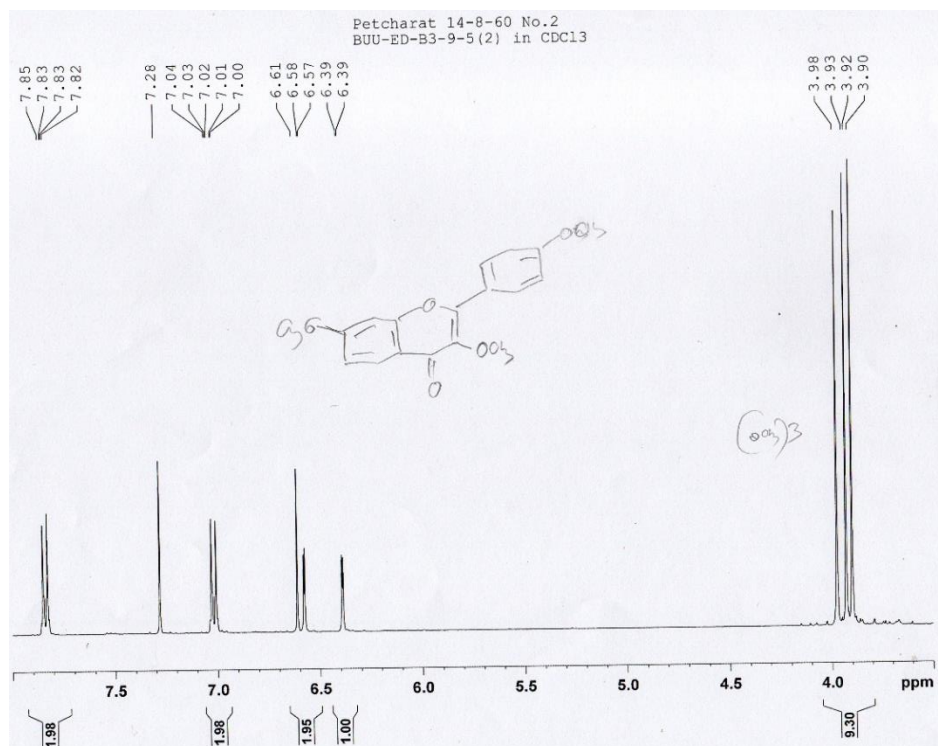
(b)



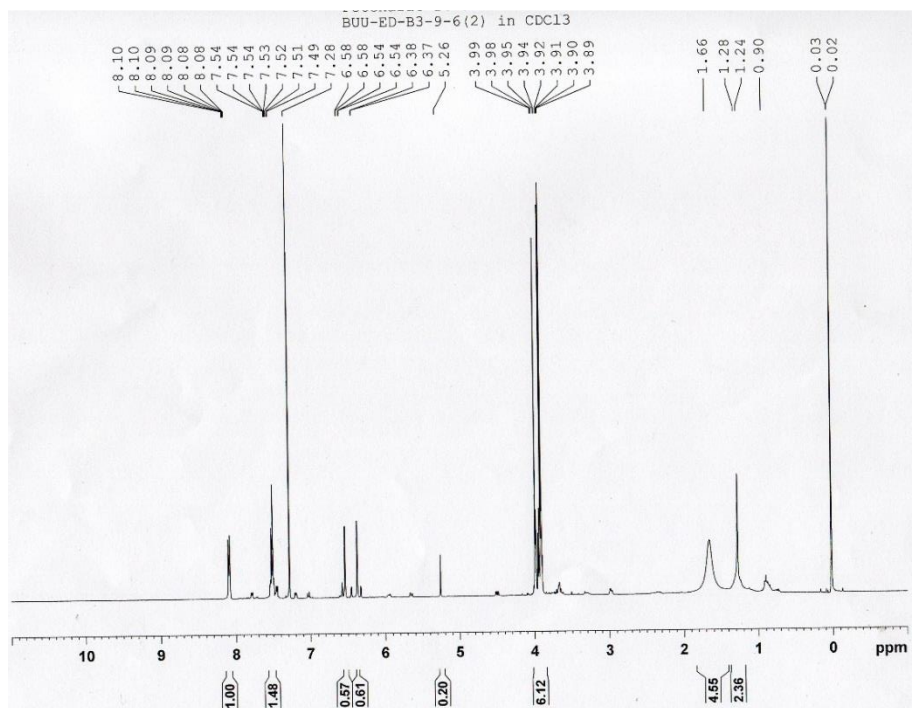
(c)



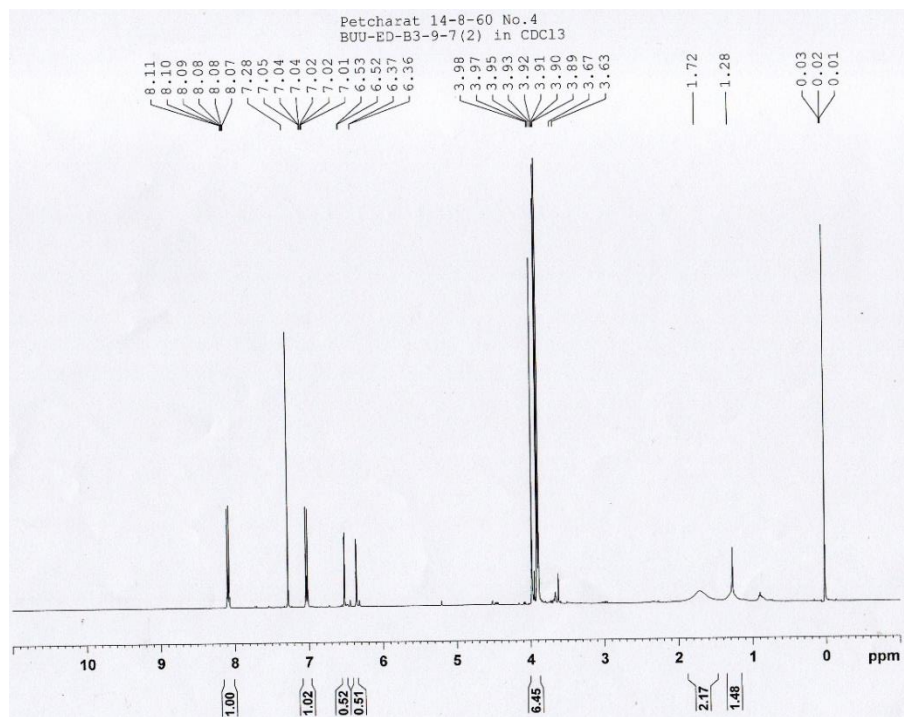
(d)



(e)



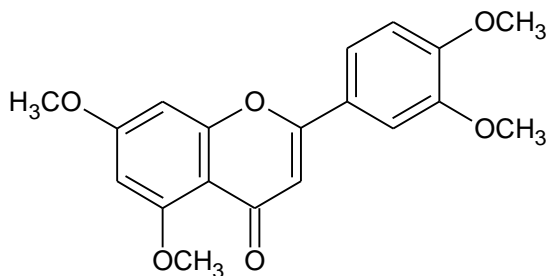
(f)



ภาพที่ 4.13 ผลสเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์(NMR) ของแฟรกชันย่อยของ BUU-ED-B3-9 คือ BUU-ED-B3-9-2 (a), BUU-ED-B3-9-3 (b), BUU-ED-B3-9-4 (c), BUU-ED-B3-9-5 (d), BUU-ED-B3-9-6 (e) และ BUU-ED-B3-9-7 (f)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone

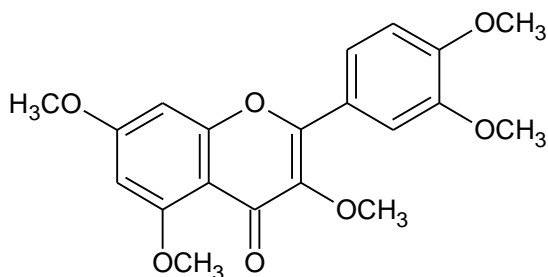
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.92 (3H, s, OCH_3), 3.96 (3H, s, OCH_3), 3.97 (3H, s, OCH_3), 3.98 (3H, s, OCH_3), 6.39 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.57 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.61 (1H, s), 6.97 (1H, d, $J=8$ Hz), 7.33 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.52 (1H, dd, $J=8, 2$ Hz)



ภาพที่ 4-14 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone

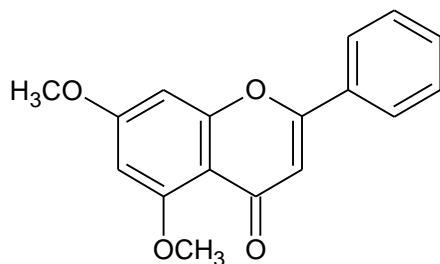
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.87 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.96 (9H, s, OCH_3), 6.35 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.50 (1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.98 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.70 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.71 (1H, s)



ภาพที่ 4-15 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 5,7-dimethoxyflavone

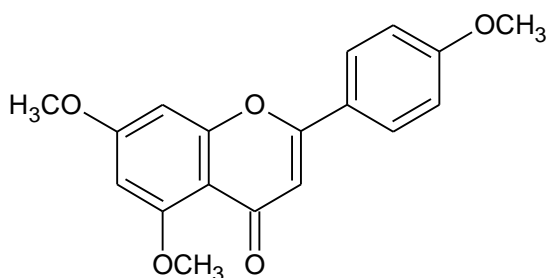
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.92 (3H, s, OCH_3), 3.96 (3H, s, OCH_3), 6.39 (1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.58 (1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.68 (1H, s), 7.51 (3H, m), 7.88 (2H, m)



ภาพที่ 4-16 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7-dimethoxyflavone

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 5,7,4'-trimethoxyflavone

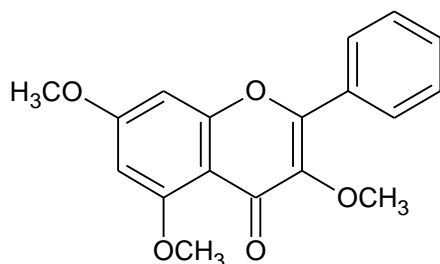
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.98 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.96 (3H, s, OCH_3), 6.38 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.56 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.59 (1H, s), 6.99 (2H, dd, $J=8.8, 2$ Hz), 7.81 (2H, dd, $J=8.8, 2$ Hz)



ภาพที่ 4-17 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,7,4'-trimethoxyflavone

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 3,5,7-trimethoxyflavone

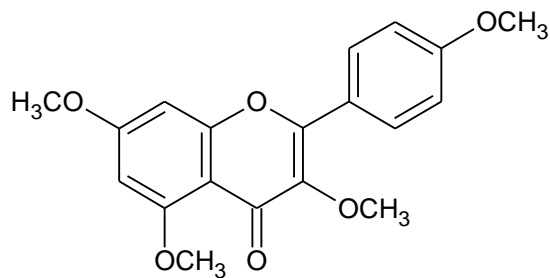
^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.88 (3H, s, OCH_3), 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3), 6.36 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.52 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.51 (3H, m), 8.07 (2H, m)



ภาพที่ 4-18 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7-trimethoxyflavone

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR ของสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.90 (3H, s, OCH_3), 3.92 (3H, s, OCH_3), 3.96 (3H, s, OCH_3), 6.35 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.51 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.01 (2H, dd, $J=9, 2$ Hz), 8.06 (2H, dd, $J=9, 2$ Hz)



ภาพที่ 4-19 โครงสร้างทางเคมีของสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองในปีที่ 1 พบว่าตำรับยาสูตร BF3 หรือ BUU-ED-B3 สามารถเพิ่มการผลิตไนโตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 นี้มีส่วนผสมของสารสกัดเอทานอลจากหัวกวาวเครือแดงและสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ เนื่องจากเป็นพืชที่มีการรายงานในการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศได้ (Manosroi et al., 2006; Tocharus et al., 2006; Wattanapitayakul et al., 2007; ชัยณรงค์ ไตจรัส, มปป.; Chaturapanich et al., 2008; Malakul et al., 2011) ในการทดลองในปีที่ 2 นี้ จึงมีการนำสูตรสมุนไพรนี้มาแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้วยเทคนิค bioactivity-guided isolation โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้นำการสกัด คือ ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน (การทดสอบการกำจัดอนุมูล DPPH และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์) และฤทธิ์การเพิ่มการผลิตไนโตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

จากนั้นนำตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มาแยกสารโดยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี และชะด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 10 ต่อ 90 แล้วเพิ่มร้อยละความเข้มข้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ขึ้น นำแต่ละหลอดมาจุดเทียบดูการเคลื่อนที่ของสารด้วย TLC ทำการรวมแฟรกชัน ได้ผลรวมทั้งหมด 13 แฟรกชัน และได้ %yield รวมเท่ากับ 92.43 ซึ่ง %yield ที่หายไปอาจเกิดจากการที่สารสกัดจากสูตร BUU-ED-B3 มีความเข้มข้นสูงจึงทำให้มีการจับแน่นกับซิลิกา จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย คือ (BUU-ED-B3-(1-13)) มาทำการทดสอบฤทธิ์ในการผลิตไนโตริกออกไซด์และหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์

การทดสอบการผลิตไนโตริกออกไซด์และความมีชีวิตรอดของเซลล์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรกชัน ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าผลการผลิตไนโตริกออกไซด์ของเซลล์ที่ทดสอบกับส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-3 ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเท่าของการผลิตไนโตริกออกไซด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีร้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ต่ำเพียงร้อยละ 65.40 อาจเป็นผลมาจากสารที่ออกฤทธิ์ในส่วนสกัดนั้นกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มการผลิตไนโตริกออกไซด์ได้ดีถึงแม้จะมีปริมาณเซลล์ที่น้อยก็ตาม ที่น่าสนใจอีกหนึ่งส่วนสกัดย่อยคือ BUU-ED-B3-5 ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการผลิตไนโตริกออกไซด์ที่สูงกว่าตัวควบคุมมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แฟรกชัน ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-4, BUU-ED-B3-8, BUU-ED-B3-10, BUU-ED-B3-11 และ BUU-ED-B3-13 มีฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และไม่แตกต่างจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดสอบการผลิตไนตริกออกไซด์ และฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของส่วนสกัดย่อย ทั้ง 13 แพรกชัน ส่วนสกัดย่อยที่มีผลที่ดีในแต่ละการทดสอบกลับไม่เป็นส่วนสกัดย่อยเดียวกัน อาจเนื่องจาก สารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดย่อยนั้นไม่ได้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยสารกลุ่มหนึ่งอาจจะมีฤทธิ์ในการผลิตไนตริกออกไซด์แต่ไม่สามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ เช่น ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-5 ที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ที่สูงแต่ไม่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และสารกลุ่มหนึ่งอาจจะมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แต่ไม่มีฤทธิ์ในการผลิตไนตริกออกไซด์ เช่น ส่วนสกัดย่อย BUU-ED-B3-13 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์ได้

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ทั้งการทดสอบการผลิตไนตริกออกไซด์ รั้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์ และฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ของตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 และส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชันที่แยกจากตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 พบว่าตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 มีฤทธิ์การเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์และมีรั้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม และยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อยทั้ง 13 แพรกชัน มีเพียงบางส่วนสกัดที่มีฤทธิ์การเพิ่มปริมาณไนตริกออกไซด์และมีรั้อยละความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุม และยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ได้ อาจเนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 อาจไม่ออกฤทธิ์เมื่ออยู่ในส่วนสกัดย่อยที่แยกออกมาได้

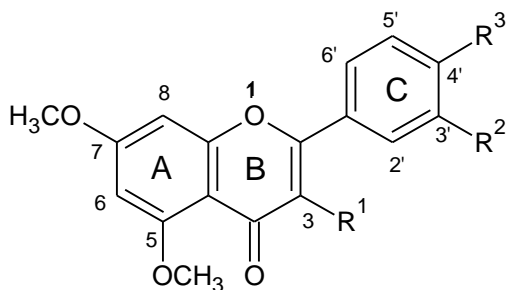
จากการเลือกส่วนสกัดย่อยเพื่อนำมาแยกสารออกฤทธิ์จากตำรับยาใหม่ของสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 คือ แพรกชัน BUU-ED-B3-7 และ BUU-ED-B3-9 ทำการแยกสารโดยเทคนิค HPLC ได้ส่วนสกัดย่อย 4 (BUU-ED-B3-7-1 ถึง BUU-ED-B3-7-4) และ 8 (BUU-ED-B3-9-1 ถึง BUU-ED-B3-9-8) แพรกชันตามลำดับ จากตารางที่ 5-1 การวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารที่แยกได้จากนั้นนำแพรกชัน BUU-ED-B3-9 แพรกชันที่ 2-7 ที่แยกด้วย HPLC ได้สารบริสุทธิ์ที่สามารถทราบถึงโครงสร้างได้ จากการวิเคราะห์และเปรียบเทียบข้อมูลพบว่า เป็นสารกลุ่ม methoxyflavone ทั้งหมด ที่มีหมู่ methoxy ที่ตำแหน่ง 5 และ 7 ที่วง A เหมือนกัน ดังแสดงในภาพที่ 5-1 สารที่ได้ คือ สาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone สาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone สาร 5,7-dimethoxyflavone สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone สาร 3,5,7-trimethoxyflavone และสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone โดยสารทั้งหมดนี้ถูกรายงานว่าพบในเหง้ากระชายดำ (Yenjai et al., 2004; Sutthanut et al., 2007) ซึ่งสารเหล่านี้มีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ ดังนี้ สาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone มีฤทธิ์chondroprotective effects (Liu et al., 2014) สาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone มีฤทธิ์เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของเอนซ์ eNOS (Yorsin et al., 2016) สาร 5,7-dimethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Sae-Wong et al., 2011) สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (Tep-areenan and Sawasdee, 2010) สาร 3,5,7-trimethoxyflavone และสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (Yenjai et al., 2004)

ตารางที่ 5-1 การวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารที่แยกได้จาก BUU-ED-B3-9

ตำแหน่ง	Methoxyflavone (ppm)											
	5,7,3'4'-tetra-		3,5,7,3'4'-penta-		5,7-di-		5,7,4'-tri-		3,5,7-tri-		3,5,7,4'-tetra-	
	B3-9-2	Ref.	B3-9-3	Ref.	B3-9-4	Ref.	B3-9-5	Ref.	B3-9-6	Ref.	B3-9-7	Ref.
H-3	6.61 (s)	6.62 (s)	-		6.68 (s)	6.67 (s)	6.59 (s)	6.57 (s)	-	-	-	-
H-6	6.39 (d)	6.39 (d)	6.35 (d)	6.33 (d)	6.39 (d)	6.37 (d)	6.37 (d)	6.35 (d)	6.36 (d)	6.36 (d)	6.35 (d)	6.17 (d)
H-8	6.57 (d)	6.58 (d)	6.50 (d)	6.49 (d)	6.58 (d)	6.56 (d)	6.56 (d)	6.53 (d)	6.52 (s)	6.52 (s)	6.51 (d)	6.34 (d)
H-2'	7.33 (d)	7.33 (d)	7.70 (d)	7.73 (m)	7.88 (m)	7.86 (m)	7.81 (d)	7.79 (d)	8.07 (m)	8.07 (m)	8.06 (d)	7.94 (d)
H-3'	-	-			7.51 (m)	7.49 (m)	6.99 (d)	6.98 (d)	7.51 (m)	7.51 (m)	7.01 (d)	6.87 (d)
H-4'	-	-			7.51 (m)	7.49 (m)	-	-	7.51 (m)	7.51 (m)	-	-
H-5'	6.97 (dd)	6.97 (dd)	6.98 (d)	6.97 (d)	7.51 (m)	7.49 (m)	6.99 (d)	6.98 (d)	7.51 (m)	7.51 (m)	7.01 (d)	6.87 (d)
H-6'	7.52 (d)	7.52 (d)	7.71 (s)	7.73 (m)	7.88 (m)	7.86 (m)	7.81 (d)	7.79 (d)	8.07 (m)	8.07 (m)	8.06 (d)	7.94 (d)
-OCH ₃	3.92 (s)	3.93 (s)	3.87 (s)	3.86 (s)	3.92 (s)	3.90 (s)	3.88 (s)	3.86 (s)	3.88 (s)	3.88 (s)	3.89 (s)	3.89 (s)
	3.96 (s)	3.96 (s)	3.90 (s)	3.89 (s)	3.96 (s)	3.94 (s)	3.91 (s)	3.9 (s)	3.89 (s)	3.89 (s)	3.90 (s)	3.90 (s)
	3.97 (s)	3.97 (s)	3.96 (s)	3.95 (s)			3.96 (s)	3.94 (s)	3.93 (s)	3.93 (s)	3.92 (s)	3.92 (s)
	3.98 (s)	3.98 (s)	3.96 (s)	3.95 (s)							3.96 (s)	3.96 (s)
			3.96 (s)	3.95 (s)								

หมายเหตุ

(s) หมายถึง singlet peak, (d) หมายถึง doublet peak, (dd) หมายถึง double doublet peak, (m) หมายถึง multiplet peak
 Ref. คือ Sutthanut, K.; Sripanidkulchai, B.; Yenjai, C.; Jayd M. (2007) *Journal of Chromatography A*, 1143, 227–233.



แฟรกชัน	สาร	R ¹	R ²	R ³
BUU-ED-B3-9-2	5,7,3',4'-tetramethoxyflavone	H	OCH ₃	OCH ₃
BUU-ED-B3-9-3	3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
BUU-ED-B3-9-4	5,7-dimethoxyflavone	H	H	H
BUU-ED-B3-9-5	5,7,4'-trimethoxyflavone	H	H	OCH ₃
BUU-ED-B3-9-6	3,5,7-trimethoxyflavone	OCH ₃	H	H
BUU-ED-B3-9-7	3,5,7,4'-tetramethoxyflavone	OCH ₃	H	OCH ₃

ภาพที่ 5-1 การเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของสาร methoxyflavone ที่สกัดได้

การศึกษานี้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนการใช้ตำรับยาสมุนไพรสูตร BUU-ED-B3 ในการรักษาโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศได้ และเป็นข้อมูลในการใช้สารออกฤทธิ์เหล่านี้เป็นตัวกำหนดปริมาณของสารสำคัญในตำรับยาสมุนไพร BUU-ED-B3

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ตำรับยาสูตรสมุนไพร BUU-ED-B3 สามารถเพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ได้
2. สารที่แยกได้จากสูตรสมุนไพร BUU-ED-B3 โดยเทคนิค bioactivity-guided isolation คือ สาร 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone สาร 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone สาร 5,7-dimethoxyflavone สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone สาร 3,5,7-trimethoxyflavone และสาร 3,5,7,4'-tetramethoxyflavone

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส. พรีน ตั้ง. แฮาส์: กรุงเทพมหานคร.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เขียวลักษณ์ เจริญสุข, เอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย. 2(ฉบับพิเศษ): 143-150.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณณ์ภัณฑ์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เระวหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเระวหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา : บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357, 593-615.
- Balayssac S., Trefi S., Gilard V., Malet-Martino M., Martino R., Delsuc M.A. (2009) 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 50(4), 602-612
- Cirino G., Fuscob F., Imbimbob C. and Mirone V. (2006) Pharmacology of erectile dysfunction in man. *Pharmacology & Therapeutics*. 111, 400-423.
- Ferrini M., Magee T.R., Vernet D., Rajfer J., Gonzalez-Cadavid N.F. (2001) Aging-related expression of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat penis. *Biology of Reproduction*. 64, 974-982
- Forstermann U, and Sessa W. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33, 829-837
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 237, 893-900.

- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. (2007) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64(13), 1715-22.
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 7, 132–147.
- Liu, Z.W., Liu, H.Q., Li, L.F., Jiao, L.Y., Wu, L.H. (2014) Protective effects of 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone on proliferation of rat chondrocytes induced by IL-1 β . *Advanced Materials Research*. 998-999, 287-290.
- Low W.Y. and Tan, H.M. (2007). Asian traditional medicine for erectile dysfunction *The Journal of Men's Health & Gender*. 4, 245–250.
- MacKay D. (2004) Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence *Alternative Medicine Review*. 9 (1), 4–16.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15, 323-350.
- Sae-Wong, C., Matsuda, H., Tewtrakul, S., Tansakul, P., Nakamura, S., Nomura, Y., Yoshikawa, M. (2011) Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 136(3), 488-495.
- Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Völler N, Xu H, Yao Y, Bauer R, Förstermann U, Li H. (2007) Ursolic acid from the Chinese herb Danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis*. 195, e104–e111.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., Jay, M. (2007) Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1143, 227-233.
- Tep-areenan, P. and Sawasdee, P. (2010) Vasorelaxant effects of 5,7,4'-trimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. *International Journal of Pharmacology*. 6: 419-424.
- Toda N., Ayajikia K., Okamura T. (2005) Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacology & Therapeutics*. 106, 233– 266.

- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxford)*. 196(2), 193-222.
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsukul S, Charuchongkolwongse S, Chansuvanich N. (2007) *Kaempferia parviflora* ethanolic extract promoted nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 110 559–562.
- Yenjai, C., Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V. and Kittakoop, P. (2004) Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*. 75, 89-92. DOI: 10.1016/j.fitote.2003.08.017.
- Yorsin, S., Kanokwiroon, K., Radenahmad, N., Jansakul, C. (2016) Increased vascular eNOS and cystathionine- γ -lyase protein after 6 weeks oral administration of 3, 5, 7, 3', 4'-pentamethoxyflavone to middle-aged male rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 389(11), 1183-1194.
- Zhang X, Xiong H, Liu L. (2012). Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 206-211.

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี จำนวน 1 คน คือนางสาวฐิติพร ทองเย็น (จบการศึกษา) ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือนางสาวสุปรีดา แซ่ตั้ง และนางสาวสุนันทา สีสมุทร์ (จบการศึกษา)
2. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะทำให้มีการเพิ่มมูลค่าของพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ได้แก่ กระชายดำ และกวาวเครือแดง นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของเกษตรกรไทย
3. ผลของการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้คือ ตำรับยาสมุนไพรใหม่ที่อาจนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมสุขภาพเพื่อใช้รักษา และป้องกันโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

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

Srisook, E.*., Palachot, M., Mankhong, S., Srisook, K. (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13(50), 230-235.

Boonruang S, Prakobsri K, Pouyfung P, **Srisook E**, Prasopthum A, Rongnoparut P, Sarapusit S. (2017). Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 1136-1142.

Sakulrat Mankhong, **Ekaruth Srisook**, Klaokwan Srisook. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*, 14(2), 58-66.

- Jang, KS., Shin, DS., **Srisook, E.**, Song, HC., Chi, DY. (2017) Versatile functionalization of electron rich-fused heterocyclic arenes via electrophilic aromatic addition reaction and their applications. *Tetrahedron*, 72(33), 5106-5114.
- 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**, Rongnoparut 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 Rongnoparut. 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
- 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 : Electrophilic 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.
- ชมพูนุช อุทัยรัตน์, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2560). ผลของสภาวะต่างๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกะบิด. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 151-165.
- ชมัยพร รอดกลิ่น, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กล่าวขวัญ ศรีสุข. (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 211-225.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมาพันธ์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, **เอกรัฐ ศรีสุข**, กาญจนา ทริมเพ็ง และคณะ. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 19: 304-311.
- กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาพรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ **เอกรัฐ ศรีสุข**. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*, 2 :143-150.

Ninted, S.; Pulasaka, W.; Duangkaew, P.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2017) Inhibition of pig (*Sus domesticus*) brain monoamine oxidase enzymes by some Thai herbal extracts. *Burapha Science Journal*, 22(2), 153-162.

Ekaruth Srisook,* Areerat Makbodee and Supatra Karnkla “Synthesis of 3-Substituted-*p*-cresol via 2,5-Cyclohexadienone Intermediate” *Burapha Science Journal*. 2006, 11 (2).

Proceedings

Titiporn Thongyena, Klaokwan Srisook, Petcharat Sawaia, **Ekaruth Srisook**. (2017). Antioxidant and eNOS activating activities of ED-BUU-BF4, new Thai herbal formulation, in endothelial EA.hy926 cells. The proceedings in the 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM2017). pp. 173-179., January 25-27, 2017.

lawsipo, P.; **Srisook, E.**; Ponglikitmongkolc, M; Somwang, T; Singaed, O. (2016) Anti-cancer effect of *Etingera pavieana* rhizome extracts. The 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6), 274-278.

Prakobsri, K.; Puangdee, T.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibition Effect of the Ethyl Acetate fraction from *Aidia wallichina* sensu Trivong Root Extract on Cytochrome P450A6 Enzyme Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 137-141.

Boonruang, S.; Khamman, J.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibition Effect of the Hexane fraction from *Aidia wallichina* sensu Trivong Root Extract on Cytochrome P450A6 Enzyme. Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 142-146.

Wongsri, T.; **Srisook, E.**; Rongnoparut, P.; Sarapusit, S. (2016) Inhibitory activity of some medicinal folk plants from Chantaburi Province on the cytochrome P450 3A4 enzyme. Proceedings of The 8th Thailand-Japan International Academic Conference 2016, 131-136.

Wilailuck Leamklang; **Srisook, E.**; Petchlert, C. (2015) Total Phenolic Content and Antioxidant Activities from *Barrington augusta* Kurz. Leaf Extracts 7th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia, 34-42.

- 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 ICST Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-ICST) and ACS Agricultural and Food Chemistry Division (ACS-AGFD).
- 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. (2011). 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.

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.*

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.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

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

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเคมีของอนุมูลอิสระ อณูชีววิทยา และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

6. ผลงานทางวิชาการ

Books

กล่าวขวัญ ศรีสุข. (๒๕๕๖). หลักการและเทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (พิมพ์ครั้งที่ ๒).

กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พรินติ้ง 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

Athit Pipattanawarothai, Chomchai Suksai, **Klaokwan Srisook**, Thanida Trakulsujaritchook. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, 178, 190-199.

Ekaruth Srisook, Mullika Palachot, Sakulrat Mankhong, **Klaokwan Srisook*** (2017). Anti-inflammatory effect of *Etlingera pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M.Sm. rhizomal extract and its phenolic compounds in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Pharmacognosy Magazine*, 13, 50, s230-235.

Sarinporn Udompong, Sakulrat Mankhong, Jaray Jaratjaroonphong, **Klaokwan Srisook*** (2017). Involvement of p38 MAPK and ATF-2 signaling pathway in anti-inflammatory effect of a novel compound bis[(5-methyl)-2-furyl](4-nitrophenyl)methane on lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *International Immunopharmacology*, 50, 6-13.

Sakulrat Mankhong, Ekaruth Srisook, **Klaokwan Srisook***. (2017). Anti-inflammatory activity of 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes in lipopolysaccharide-induced macrophages. *NU. International Journal of Science*, 14(2), 58-66.

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 isolation and mechanistic action of anti-inflammatory agents from *Clerodendrum inerme* leaves *Journal of Ethnopharmacology*. 165; 94-102
- Jaray Jaratjaroonphong, Surisa Tuengpanya, Rungnapha Saeeng, Sarinporn Udompong, **Klaokwan Srisook**. (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.
- Doungnapa Buapool, Nadtaya Mongkol, Jirapa Chantimal, Sittiruk Roytrakul, Ekaruth Srisook, **Klaokwan Srisook*** (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.
- 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.
- Klaokwan Srisook***, Mullika Palachot, Nadtaya Mongkol, Ekaruth Srisook and Songklod Sarapusit. (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.
- สุพัตรา ทองทา, เพชรรัตน์ ไสว, **กล่าวขวัญ ศรีสุข***. (2560). การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์เพิ่มการผลิตไนตริกออกไซด์ของแตงโมบางสายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22: 14-22.
- ชมพูนุช อุทัยรัตน์, เอกรัฐ ศรีสุข, **กล่าวขวัญ ศรีสุข**. (2560). ผลของสภาวะต่างๆ ของการอบแห้งและการสกัดต่อปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผลปอกกะบิต. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 151-165.
- ชัมย์พร รอดกลิ่น, เอกรัฐ ศรีสุข, **กล่าวขวัญ ศรีสุข**. (2560). ผลของสภาวะการสกัดต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของส้มซ่า. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22(1), 211-225.

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

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

Klaokwan Srisook*, Nopporn Sarataphan., Kosum Chansiri. (2005). Detection of *Babesia bovis* in cow blood by PCR-ELISA. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 10: 49-57.

Proceedings

Titiporn Thongyena, Klaokwan Srisook*, Petcharat Sawaia, Ekaruth Srisook. (2017). Antioxidant and eNOS activating activities of ED-BUU-BF4, new Thai herbal formulation, in endothelial EA.hy926 cells. The proceedings in the 2nd International Conference on Herbal and Traditional Medicine (HTM2017). pp. 173-179., January 25-27, 2017.

Wipada Siritanyong, Jaray Jaratjaroonphong and Klaokwan Srisook*. (2017). Nitric oxide inhibitory activity of selected fluorinated triarylmethane derivatives in LPS-activated RAW 264.7 macrophage. The proceedings in the Pure and Applied Chemistry International Conference 2017 (PACCON 2017). pp. 944-949., February 2-3, 2017

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 IC SCT Symposium on Agricultural and Food Chemistry*(pp. 185-190). Bangkok:The American Chemical Society International Chemical Sciences Chapter in Thailand (ACS-IC SCT) 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 9^h 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 LSUrRNA 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.