



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อหลอดเลือด
มนุษย์ของส่วนสกัดจากใบขลุ่ยเพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
เพื่อต้านภาวะหลอดเลือดแข็ง

(Study on anti-inflammatory and anti-oxidant activities on human
vascular endothelial cells of *Pluchea indica* leaf extracts for
development as anti-atherogenic health care product)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 59427

สัญญาเลขที่ 37.1/2562

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด
มนุษย์ของส่วนสกัดจากใบขลุ่ยเพื่อใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ
เพื่อต้านภาวะหลอดเลือดแข็ง

(Study on anti-inflammatory and anti-oxidant activities on human
vascular endothelial cells of *Pluchea indica* leaf extracts for
development as anti-atherogenic health care product)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2563

บทคัดย่อ

ในประเทศไทยมีการบริโภคใบชาในรูปของชาสมุนไพร ส่วนสกัดน้ำร้อนของชาใบชาแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์ (EA.hy 926) ที่กระตุ้นด้วย TNF- α โดยยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะของเซลล์ คือ intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านอักเสบนี้ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะแยกและระบุสารออกฤทธิ์ในชาใบชาโดยวิธีฤทธิ์ทางชีวภาพนำการสกัด ทำการสกัดใบชาจากจังหวัดจันทบุรีด้วยน้ำร้อน และสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และ 1-บิวทานอล ได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ โดยพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุดจึงทำการเลือกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต ไปแยกสารด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ที่บรรจุ Sephadex LH-20 และสามารถแยก quercetin จากส่วนสกัดย่อย F8.5 ได้ ทำการศึกษาโครงสร้างและสเตอริโอเคมีของสารด้วยข้อมูลทาง nuclear magnetic resonance (NMR) และ high resolution mass spectrometry (HRMS) สาร quercetin ที่แยกได้สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น ในการศึกษานี้ได้ทำการสร้าง HPLC fingerprinting ของส่วนสกัดจากชาใบชาโดยใช้ quercetin เป็นโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของชาใบชาและวิเคราะห์ปริมาณของสารออกฤทธิ์ quercetin โดยพบว่าส่วนสกัดน้ำร้อนของชาใบชาใบชา มี quercetin ในปริมาณ 1.48 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของส่วนสกัด นอกจากนี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณ quercetin ในใบชาชูลู่ที่เตรียมจากใบชาชูลู่อ่อน และใบชาชูลู่แก่ ผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดจากใบชาชูลู่อ่อน และใบชาชูลู่แก่ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณ quercetin ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าทั้งใบชาชูลู่อ่อน และใบชาชูลู่แก่เป็นแหล่งของสารต้านอักเสบจากธรรมชาติ ที่อาจจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือเป็นองค์ประกอบของอาหารฟังก์ชันในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

คำสำคัญ: ชลู่ ฤทธิ์ต้านอักเสบ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด quercetin

Abstract

Pluchea indica leaves are consumed as herbal tea in Thailand. The hot water extract from *P. indica* herbal tea leaves showed anti-vascular inflammatory effect in TNF- α -stimulated human vascular endothelial cells (EA.hy 926 cell line) by suppressing the expression of cell adhesion molecule, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). However, the compound responsible for this anti-inflammatory effect has not been explored. Therefore, the purpose of this study was to isolate and identify the bioactive compound from *P. indica* leaves by bioassay-guided fractionation technique. The herbal tea leaf of *P. indica* from Chantaburi province was extracted with hot water and then partitioned with hexane, ethyl acetate and 1-butanol to yield hexane, ethyl acetate, 1-butanol and water fractions, respectively. Among extraction solvents, the ethyl acetate fraction showed the greatest anti-vascular inflammatory effect which then chosen to subject to Sephadex LH-20 gel column. A flavonoid, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one or 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone (quercetin) was isolated from subfraction F8.5. The structure and relative stereochemistry of the compound was determined based on comparison with nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic analysis, supported by high resolution mass spectrometry (HRMS) data. The isolated quercetin inhibited the expression of ICAM-1 and VCAM-1 protein in a concentration-dependent manner. To control the quality of herbal tea leaf of *P. indica*, a simple and reliable method of high-performance liquid chromatography (HPLC) was established for both the fingerprint analysis and the quantitative determination of an active compound, quercetin. HPLC fingerprinting of *P. indica* leaf water extract revealed amounts of quercetin at 1.48 ± 0.10 mg/g dried weight. Moreover, anti-inflammatory activity and quercetin content of *P. indica* herbal tea leaves prepared from young and mature leaves were comparatively studied. The extracts from both maturity stages of leaves contained significant indifference in anti-inflammatory activity and quercetin content. Taken together, the data suggest that both young and mature leaves of *P. indica* are a promising source of natural anti-inflammatory agents which might be developed as dietary supplements and an ingredients of functional food for preventing an early step of atherosclerosis.

Keywords: *Pluchea indica*, anti-inflammatory, endothelial cell, quercetin

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือด้านต่างๆ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี และ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาสำหรับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณนางสาว เพชรรัตน์ ไสว สำหรับความช่วยเหลือทางเทคนิค ขอขอบคุณกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี ที่ช่วยอนุเคราะห์เตรียมขาใบปลูที่ใช้ในการศึกษา

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	3
Abstract	4
กิตติกรรมประกาศ	6
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญรูป	8
สารบัญตาราง	10
บทนำ	11
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
วิธีการทดลอง	20
ผลการทดลองและอภิปราย	38
สรุปผลการทดลอง	60
บรรณานุกรม	61
ผลผลิตของโครงการวิจัย	65
ภาคผนวก	66
ประวัตินักวิจัย	83

สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 3-1	ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอลและน้ำ	21
รูปที่ 3-2	การเตรียมตัวอย่างลงคอลัมน์	22
รูปที่ 3-3	การบรรจุตัวอย่างลงแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี	23
รูปที่ 3-4	แฟรกชันที่เก็บได้จากแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี	23
รูปที่ 3-5	โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-1026	24
รูปที่ 3-6	การเตรียมตัวอย่างลงแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี	29
รูปที่ 3-7	การบรรจุตัวอย่างลงแฟลชคอลัมน์	30
รูปที่ 3-8	โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-295	31
รูปที่ 3-9	การแช่ Sephadex LH20 ข้ามคืน (a) แพ็คคอลัมน์ Sephadex LH20 (b) และ โหลดตัวอย่างลงคอลัมน์ (c)	33
รูปที่ 3-10	โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-39	33
รูปที่ 4-1	โครมาโทแกรม TLC ใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน (a) และระบบตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (b)	38
รูปที่ 4-2	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 11 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่	39
รูปที่ 4-3	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย 11 แฟรกชัน	42
รูปที่ 4-4	โครมาโทแกรม TLC ของส่วนสกัดย่อย F8 ใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต ต่อเฮกเซน (a) และระบบตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (b)	43
รูปที่ 4-5	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8	46
รูปที่ 4-6	โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 5 ส่วนสกัดย่อย F8 ด้วย Sephadex LH20	47
รูปที่ 4-7	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5	50

รูปที่ 4-8	Mass spectrum ของ F8.5 (Quercetin)	51
รูปที่ 4-9	HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ย (EA)	52
รูปที่ 4-10	HPLC chromatogram ของ quercetin ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน (a) และกราฟมาตรฐานของ quercetin (b)	53
รูปที่ 4-11	ใบชาขลุ่ยอบแห้งที่ได้จากใบขลุ่ยอ่อน (เหนือใบเพสลาด) และใบแก่ (ใบเพสลาด)	54
รูปที่ 4-12	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำของใบชาขลุ่ยใบแก่ และใบอ่อน	56
รูปที่ 4-13	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของ ใบชาขลุ่ยใบแก่ และใบอ่อน	58
รูปที่ 4-14	HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ยใบแก่	58
รูปที่ 4-15	HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ยใบอ่อน	59

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 3-1	ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่ระบบ gradient ของการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต	24
ตารางที่ 3-2	การรวมแฟรกชันที่แยกได้จากเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี	28
ตารางที่ 3-3	ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่ระบบ gradient ของการแยกส่วนสกัดย่อย F8	31
ตารางที่ 3-4	การรวมแฟรกชันของการแยกส่วนสกัดย่อย F8	32
ตารางที่ 3-5	การรวมแฟรกชันของการแยก ส่วนสกัดย่อย F8 โดย Sephadex LH20	34
ตารางที่ 4-1	น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแฟรกชันของการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต	39
ตารางที่ 4-2	น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแฟรกชันที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี	44
ตารางที่ 4-3	น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแฟรกชันที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 โดยใช้ Sephadex LH20	47
ตารางที่ 4-4	สภาวะของการทำ HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่	52

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases หรือโรค NCDs) เป็นกลุ่มโรคที่กำลังคุกคามชีวิตและสุขภาพของประชากรทั่วโลก องค์การอนามัยโลก (WHO) ระบุว่า ในปี พ.ศ. 2552 ประมาณ 63% ของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกมีสาเหตุมาจากกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังนี้ และยังเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรไทยอีกด้วยโดยคิดเป็น 73% ของการเสียชีวิตของประชากรไทยทั้งหมดในปี 2552 ตามรายงานสถิติสาธารณสุขของไทย เมื่อประเมินเป็นมูลค่าความเสียหายทางเศรษฐกิจมีค่าถึง 200,000 ล้านบาทต่อปี กลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) ได้แก่ โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง (อัมพฤกษ์และอัมพาต) รวมทั้งโรคเบาหวาน เป็นกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่สำคัญ มีอัตราผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตสูงในอันดับต้นๆ ของกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, ม.ป.ป.) ข้อมูลเปรียบเทียบในรอบ 8 ปี จากปี 2550 ถึงปี 2557 พบว่าอัตราการป่วยด้วยโรคไม่ติดต่อเรื้อรังเพิ่มสูงขึ้น โดยสถิติในปี 2557 มีดังนี้ โรคความดันโลหิตสูงจาก 1,710.89 ต่อประชากรแสนคน โรคหัวใจขาดเลือด 407.70 ต่อประชากรแสนคน โรคหลอดเลือดสมอง 352.30 ต่อประชากรแสนคน และโรคเบาหวาน 1,032.50 ต่อประชากรแสนคน (สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค, ม.ป.ป.) สาเหตุหรือปัจจัยเสี่ยงของโรคกลุ่มนี้มาจากการไม่ดูแลสุขภาพตัวเอง เช่น พักผ่อนไม่เพียงพอ เครียด ไม่ออกกำลังกาย และรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลและไขมันสูง แต่รับประทานผักผลไม้ น้อยลง (สถาบันวิจัยโรคเรื้อรัง, 2552; ศกพลวรรณ แก้วกลิ่น และนิตยา พันธุ์เวท, มปป) นอกจากนี้ยังมีภาวะชราภาพเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าโรคในกลุ่มโรคหัวใจและหลอดเลือดเหล่านี้ รวมทั้งโรคเบาหวาน กำลังเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ควรได้รับการแก้ไข เนื่องจากเป็นโรคที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง และมีโอกาสเกิดความพิการตามมา ส่งผลกระทบต่อผู้ป่วย ครอบครัวและประเทศชาติ ทั้งในแง่การเสียชีวิตของตัวบุคคล องค์กร และใช้งบประมาณของประเทศในการดูแลรักษาพยาบาลผู้ป่วยชื่อยาจากต่างประเทศปีละหลายพันล้านบาท แนวทางแก้ไขที่ดีที่สุดคือปรับเปลี่ยนพฤติกรรม และดูแลสุขภาพมากขึ้น

ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีบรรณานุกรมให้มีการรักษาสุขภาพให้แข็งแรง เช่น การออกกำลังกาย การเลือกรับประทานอาหารที่มีประโยชน์

ภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) เป็นภาวะที่นำไปสู่การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดต่างๆ รวมทั้งการเกิดอาการแทรกซ้อน (complication) ในผู้ป่วยเหวน และยังพบในภาวะชราภาพ (ageing) สูงกว่าช่วงวัยอื่น สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง คือการอักเสบเรื้อรังของหลอดเลือด (Libby, 2002; Stoner et al., 2013) ร่วมกับภาวะไขมันในเลือดสูง และภาวะที่เซลล์เยื่อบุทำงานผิดปกติ (endothelial dysfunction) เมื่อมีสิ่งกระตุ้นให้มีการอักเสบ เซลล์เยื่อหลอดเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงให้มีการสังเคราะห์ pro-inflammatory cytokines และ cell adhesion molecule เพิ่มขึ้น ทำให้มีการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาว (leukocyte emigration) มายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เซลล์เยื่อหลอดเลือดยังมีความเครียดจากออกซิเดชันเพิ่มขึ้นจากการสังเคราะห์ superoxide radical อันจะนำไปสู่การเพิ่มการอักเสบและภาวะหลอดเลือดแข็งได้มากขึ้น ในอดีตที่ผ่านมา การป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งทำโดยความพยายามลดปริมาณไขมันในเลือด แต่ก็ยังมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งถึง 70-80% (Charo and Taub, 2011) จากข้อมูลในปัจจุบันที่พบว่าการอักเสบเรื้อรังและภาวะความเครียดจากออกซิเดชันเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาสารที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบของหลอดเลือดและต้านออกซิเดชัน เพื่อนำมาใช้ป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

ปัจจุบันความนิยมในการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดต่างๆ มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสุขภาพที่ทำมาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากแนวโน้มการใช้ชีวิตแบบใส่ใจสุขภาพของคนรุ่นใหม่ และการเตรียมความพร้อมในการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (ageing society) โดยในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารถึง 7 % มูลค่าของตลาดมีมากกว่า 100,000 ล้านบาทต่อปีจากการจำหน่ายทั้งในประเทศและนอกประเทศ (ข่าวสภาอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย, 2559) อย่างไรก็ตาม การศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดใหม่ๆ ที่มีพืชสมุนไพรเป็นส่วนผสมที่สำคัญ ยังคงมีความจำเป็นเพื่อให้มีการเติบโตของอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพิ่มขึ้น และทำให้ประชาชนมีทางเลือกในการรักษาแบบป้องกัน (chemopreventive therapy) ได้มากยิ่งขึ้น คณะผู้วิจัยเล็งเห็นศักยภาพของต้นขลุ (Pluchea indica Less.) ในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากขลุมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย อาทิ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ฤทธิ์ต้านการ

อักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเบาหวาน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ glucosidase (Sen et al., 2002; Choi and Hwang, 2005; Biswas et al., 2007; Roslida et al., 2008; Srisook et al., 2012; Arsiningtyas et al., 2014) ในปัจจุบันมีการผลิตชาใบชูลูโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูกขัน จังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีกรรมวิธีการผลิตแบบดั้งเดิมที่เฉพาะตัว กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของชาใบชูลูอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าสารสกัดน้ำจากใบชูลูมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านอักเสบในหลอดทดลอง (Srisook et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบชูลูมีฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยง และในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำการอักเสบด้วย carrageenan (Buapool et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลของชูลูต่อการอักเสบและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดเลือด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดจากชาใบชูลูในการต้านอักเสบและต้านออกซิเดชันในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด และกลไกในการแสดงฤทธิ์นี้เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรพื้นบ้านจากชูลูในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของหลอดเลือด เพื่อใช้ป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง โดยเฉพาะโรคหัวใจและหลอดเลือด เพื่อลดการนำเข้ายาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากต่างประเทศ และอาจนำไปสู่รายได้เข้าประเทศ นอกจากนี้จะทำการแยกสารประกอบในชาใบชูลูที่เป็นสารออกฤทธิ์เพื่อใช้เป็นสารที่ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชูลูที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบของหลอดเลือดจากส่วนสกัดของชาใบชูลู
2. เพื่อศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชูลูที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ
เลือดของมนุษย์

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำส่วนสกัดน้ำจากชาใบชูลูมาทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของมนุษย์เมื่อสัมผัสกับสารทดสอบ โดยใช้เซลล์ไลน์ EA.hy926 เป็นโมเดลในการศึกษา นำความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไปใช้ในศึกษาต่อไป

การแยกสารที่เป็นตัวออกฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดโดยวิธี bioassay-guided isolation ด้วย column chromatography และวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดด้วยเทคนิค HPLC

ศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชู่ที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอักเสบ

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะหลอดเลือดแข็งเป็นผลมาจากการอักเสบเรื้อรังของหลอดเลือด นำไปสู่โรคในกลุ่มหัวใจและหลอดเลือดอันเป็นส่วนหนึ่งของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง ในขณะที่เกิดการอักเสบจะมีการเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากเซลล์เยื่อหลอดเลือดมีการสังเคราะห์โมเลกุลที่ใช้ในการยึดเกาะกับเม็ดเลือดขาวมากขึ้น โมเลกุลเหล่านี้ คือ ICAM-1, VCAM-1 และ E-selectin การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกมายังบริเวณที่มีการอักเสบนี้ เป็นขั้นตอนสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบ นอกจากนี้เซลล์เยื่อหลอดเลือดในบริเวณที่มีการอักเสบจะสังเคราะห์ inflammatory cytokine IL-1 β ที่เป็นสารที่ส่งสัญญาณให้เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณที่มีการอักเสบเพิ่มขึ้น และยังทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ในเซลล์เยื่อหลอดเลือด ส่งผลให้มีการผลิต superoxide สูงขึ้น ดังนั้นถ้ามีสารที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของโมเลกุล ICAM-1, VCAM-1 และ E-selectin จะช่วยลดการยึดเกาะของเม็ดเลือดขาวกับเซลล์เยื่อหลอดเลือด ทำให้เซลล์เคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดน้อยลงและเกิดการอักเสบน้อยลง การลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase จะช่วยทำให้ปริมาณ superoxide และ reactive species ชนิดอื่นลดลงด้วย ทำให้ลดออกซิเดชันบนโมเลกุล LDL (ปัจจัยร่วมที่ทำให้เกิดการสะสมของคราบไขมันในบริเวณที่มีการอักเสบ) และยังทำให้ปริมาณชีวปริมาณออกฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ของเซลล์เยื่อหลอดเลือดเพิ่มขึ้น คณะผู้วิจัยเห็นว่าส่วนสกัดจากใบชูลู่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS และ COX-2 รวมทั้งลดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPKs ในเซลล์แมคโครฟาจ ดังนั้นส่วนสกัดจากใบชูลู่อาจจะลดการแสดงออกและการทำงานของโปรตีน ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, IL-1 β และ NADPH oxidase ในเซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ได้ เนื่องจากการแสดงออกของโมเลกุลเหล่านี้ถูกควบคุมโดยการทำงานของ NF- κ B และ MAPKs ส่งผลทำให้ลดการอักเสบของหลอดเลือดและลดโอกาสเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งรวมทั้งลดอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดและหัวใจต่างๆ ในที่สุด

ภาวะหลอดเลือดแข็ง เป็นภาวะที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดจากคราบสะสมไขมันและการเกิดพังผืด (Fibrosis) ก่อให้เกิด atherosclerotic plaque เกาะบริเวณภายในผนังหลอดเลือด ปัจจัยหนึ่ง

ที่ทำให้เกิดคือ การมีระดับ LDL-คอเลสเตอรอล ในกระแสเลือดสูง ทำให้มีการเคลื่อนของ LDL ผ่านผนังหลอดเลือดออกมายังบริเวณชั้นใต้ผนังหลอดเลือด หรือชั้น intima ได้มากขึ้น LDL-คอเลสเตอรอลที่อยู่ในกระแสเลือดสามารถแทรกผ่านเยื่อผนังหลอดเลือดได้ดี นอกจากนี้มีปัจจัยบางประการที่เอื้อให้ LDL ออกมานอกหลอดเลือดได้มากขึ้น เนื่องจากมีความเสียหายของชั้นเยื่อผนังหลอดเลือด ซึ่งมีสาเหตุมาจากความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่ โรคเบาหวาน มีการติดเชื้อหรือการอักเสบเกิดขึ้น และเมื่อ LDL เข้าไปภายในผนังหลอดเลือดแล้วจะถูกออกซิไดซ์เกิด lipid peroxidation ที่กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบของ LDL โดยอนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นภายในผนังหลอดเลือด เป็น oxidized-LDL ซึ่งจะถูกจับกินโดยเซลล์ macrophage อย่าง จากนั้น oxidized-LDL ที่ถูกนำเข้าสู่เซลล์ macrophage จะถูกสะสมไว้ในเซลล์ ในลักษณะเป็นหยดไขมันเล็กๆ เมื่อมีปริมาณมากขึ้น เซลล์จะเปลี่ยนไปเป็น foam cell (Cholesterol-rich macrophage) ภายใน foam cell จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยผลิตสารต่างๆ ดังนี้ในปริมาณที่มากขึ้น เช่น มีการผลิตอนุมูลอิสระ, cytokine และเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) สาร cytokine ที่ถูกหลั่งออกมาจะทำให้มีเซลล์เม็ดเลือดขาว monocyte เข้ามายังบริเวณนี้มากขึ้น และเปลี่ยนเป็น macrophage จากนั้นจะกลืนกิน oxidized-LDL ที่มีมาก เมื่อ foam cell ตายทำให้มีการสะสมของเซลล์บริเวณนี้มากขึ้นเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า fatty streak และมีพังผืดเกิดขึ้นคลุมเซลล์ที่ตายรวมทั้งเศษเนื้อเยื่อที่ได้จากการสลายเซลล์ที่ตาย นั่นคือการเกิด plaque ที่บริเวณรอยโรคเอนไซม์ MMP ที่หลั่งจาก foam cell จะย่อยสลายโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์ทำให้มีการแตกหรือฉีกขาดของ plaque จึงเกิดการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่บริเวณ plaque เกร็ดเลือดเหล่านี้จะหลั่งสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด เช่น platelet-derived growth factor (PDGF) การเกิด plaque เป็นขั้นตอนที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ เป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และไฟโบรบลาสต์ ส่วนเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดก็จะหลั่งสารที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบออกมารวมทั้งสารที่ชักนำให้เม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ monocytes เข้ามารวมกันมากขึ้น และถูกกระตุ้นให้เจริญไปเป็น macrophage ส่งเสริมให้รอยโรคนี้ขยายใหญ่และลุกลามเข้าไปทางด้านในของหลอดเลือด ทำให้ทางเดินของเลือดเล็กลง เนื้อเยื่อปลายทางขาดอาหารและออกซิเจนส่งผลทำให้เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดรุนแรงหรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย รวมทั้งเกิดเส้นเลือดในสมองอุดตัน (Bhagavan, 2015)

เมื่อมีการอักเสบเกิดขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด คือ มีการขยายตัวของหลอดเลือด และมีการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดเองก็มีการเปลี่ยนแปลงเกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ทำให้มีการรั่วของโปรตีนและสารน้ำออกนอกหลอดเลือด รวมทั้งมีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวออกนอกหลอดเลือด (leukocyte extravasation) มายังบริเวณที่มีการอักเสบมากขึ้น เพื่อจะทำการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ก่อให้เกิดการอักเสบและอันตรายต่อเนื้อเยื่อ การเคลื่อนที่ออกนอกหลอดเลือดของเม็ดเลือดขาวเริ่มต้นจากการที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจับกับเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (adhesion) ได้แน่นขึ้น และเคลื่อนตัวผ่านช่องรอยต่อระหว่างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดออกมาออกหลอดเลือด (transmigration) กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยโมเลกุลที่อยู่บนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด คือ adhesion molecule เช่น intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1), และ E-selectin เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผ่านออกมาอยู่บริเวณที่มีการอักเสบจะหลั่ง inflammatory cytokine เช่น $IL-1\beta$ และ $TNF-\alpha$ ออกมา และกลับไปทำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสังเคราะห์ adhesion molecule เพิ่มขึ้นรวมทั้งกระตุ้นให้มีการผลิต inflammatory cytokine มากขึ้น (Stoner et al., 2013) จึงมีเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาบริเวณรอยโรคมากขึ้น นอกจากนี้ทั้งเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและเซลล์เม็ดเลือดขาวมีการผลิต superoxide radical จากเอนไซม์ NADPH มากขึ้น (Nathan and Cuningham-Bussel, 2013) ยิ่งทำให้มีการออกซิไดซ์โมเลกุล LDL-คอเลสเตอรอล เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการพัฒนาการเกิด atherosclerotic plaque มากขึ้นและนำไปสู่ภาวะหลอดเลือดแข็งในที่สุด

มีการรายงานที่ $TNF-\alpha$ กระตุ้นการทำงานของ nuclear factor kappa B (NF- κ B) ซึ่งเป็น transcription factor ชนิดหนึ่งภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดและก่อให้เกิดการแสดงออกของ ICAM-1, VCAM-1, E-selectin และ pro-inflammatory cytokines (Rahman et al., 2002; Hung et al., 2014) ในสถานะที่เซลล์ไม่ถูกกระตุ้น NF- κ B จะอยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) จับกับโปรตีน inhibitor of κ B (I κ B) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง NF- κ B ทำให้ NF- κ B ไม่สามารถเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสได้ (Zhang et al., 2012) ในสถานะที่ถูกกระตุ้นจะเกิดการจับกับตัวรับสัญญาณ (receptor) ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ inhibitor of κ B kinase (I κ B kinase) ทำให้เกิดกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) จากนั้น I κ B จะถูกทำลายด้วยการกระบวนการ proteasome-mediated proteolytic ทำให้ NF- κ B อยู่ในรูป heterodimer ของ p65 ที่รวมกับ p50 หรือ p52 (Tak and

Firestein, 2001) ทำให้สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่ง NF- κ B binding site ที่บริเวณส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน (promoter) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสของยีน

นอกเหนือจาก NF- κ B ยังมี transcription factor ชนิดอื่น เช่น AP-1 ที่ควบคุมการแสดงออกของ ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ (Yan et al., 2015) ซึ่ง AP-1 นี้มี upstream signaling มาจาก MAPKs (Hung et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการรายงานที่ reactive species เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของโมเลกุล ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Cook-Mills et al., 2011) แหล่งของ superoxide และ reactive species ที่สำคัญภายในเซลล์ คือ การผลิตโดยเอนไซม์ NADPH oxidase (NOX) เอนไซม์ NOX2 และ NOX4 เป็นรูปเอนไซม์ NADPH oxidase หลักที่ผลิต superoxide ภายในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด มีการรายงานที่เอนไซม์ NADPH oxidase นี้ถูกกระตุ้นได้ด้วย TNF- α และถูกควบคุมการแสดงออกโดย NF- κ B (Yan et al., 2015)

ขลุ่ (*Pluchea indica* Less.) เป็นพืชในวงศ์ Compositae (Asteraceae) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกอ มีกิ่งก้านสาขามาก สูง 1-1.5 เมตร มักชอบขึ้นริมน้ำตอบนบป่าชายเลน เติบโตได้รวดเร็วในทุกฤดูกาล แตกกิ่งก้านใหม่ได้มากขึ้นเมื่อมีการหักกิ่งก้านไปใช้ มีประโยชน์ทางด้วยสมุนไพรในทุกระดับของต้น เช่น การใช้ขลุ่ทั้งต้นต้มน้ำแล้วนำน้ำมาดื่ม สามารถรักษาอาการ ชัดเบา ปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ ใบของขลุ่ใช้แก้ริดสีดวงทวาร แก้กระษัย ขับนิ่ว ขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาอายุวัฒนะ แก้ไข้ขับเหื่อ และแก้เบาหวาน ใบขลุ่ที่ผึ่งแห้ง หรือคั่วแห้งแล้ว มาทำเป็นชาขลุ่ขงดื่มเพื่อลดน้ำหนักตัว ลดระดับน้ำตาลในเลือด บรรเทาอาการปวดเมื่อย ใบสดตำพอกบริเวณที่เป็นแผล แก้อักเสบ เปลือกต้นของขลุ่นิยมนำมาต้มน้ำเพื่อเอาไอน้ำใช้ในการบรรเทาอาการอักเสบของริดสีดวงทวาร ขูดผิวด้านนอกออกให้เหลือเปลือกบางๆ ชั้นในไม่ให้ชนติดกัน ล้างให้สะอาดทำเป็นเส้นคล้ายเส้นยาสูบตากแดดให้แห้ง มวนใบยาหรือใบตองแห้งสูบแก้ริดสีดวงจมูก ดอกของขลุ่ ใช้ต้มน้ำเพื่อดื่มในการขับนิ่วในทางเดินปัสสาวะ (พันธุ์ไม้ป่าชายเลนในประเทศไทย, 2549)

ขลุ่เป็นพืชที่ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านต่างๆ เช่น ส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบของอุ้งมือหนูที่ถูกกระตุ้นโดย arachidonic acid, platelet activation factor หรือ compound 48/80 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่มีฤทธิ์ป้องกันแผลเยื่อบุกระเพาะอาหารของหนูที่ได้รับเอทานอล และ indomethacin (Sen et al., 1993) ในปี 2002 ผู้วิจัยกลุ่มเดียวกันนี้ยังรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเมทานอลของราก

ขลุ่ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยการเหนี่ยวนำของ hydrogen peroxide ยับยั้งการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย carbon tetrachloride และยับยั้งการอักเสบของอุ้งมือหนูที่ถูกกระตุ้นโดย glucose oxidase (Sen et al., 2002) ส่วนสกัดเมทานอลของใบขลุ่มีฤทธิ์ลดปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย LPS ส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ได้มากกว่า 50% (Choi และ Hwang, 2005)

Biswas et al. (2006) รายงานผลของสารบริสุทธิ์ R/J/3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ พบว่าสาร R/J/3 ที่ความเข้มข้น 50 µg/mL สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อโปรโตซัว *Entamoeba histolytica* สายพันธุ์ HM1 และสามารถทำให้ trophozoites ของเชื้อโปรโตซัวนี้แตก สารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากส่วนสกัดเมทานอลของรากขลุ่ คือ β -sitosterol และ stigmasterol แสดงฤทธิ์ในการต้านพิษงูในหนูที่ได้รับพิษงูแมวเซา โดยยับยั้งอัตราการตายจากพิษงู และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phospholipase A2 ในพิษงูแมวเซา ในปี ค.ศ. 2008 Ohtsuki และคณะ สกัดสาร quinic acid ester และ quercetin จากใบของต้นขลุ่ และพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ collagenase ในขณะที่สาร quinic acid ester ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 และ matrix metalloproteinase-9

ในปี ค.ศ. 2012 Srisook และคณะ ได้รายงานว่าส่วนสกัดน้ำร้อนจากใบขลุ่มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในระดับหลอดทดลอง และยังสามารถลดการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจที่กระตุ้นด้วย LPS นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังทำการศึกษาค้นคว้าส่วนสกัดเอทานอลของใบขลุ่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งในระดับเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงและในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้มีการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยส่วนสกัดจากใบขลุ่ไปลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ผ่านทางการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPKs (Buapool et al., 2013)

สารประกอบเคมีที่พบในใบขลุ่ประกอบด้วย terpenes, terpenic glycosides, benzenoids, phenyl propanoids, lignans glycosides, steroids, , caryophyllene oxide, sabinene, limonene, α -carene, azulene, Cis-caryophyllene, α -humulene , isopropyl myristate and γ -cadinene, stigmasterol, stigmasterol glycoside, 2-(Prop-1-ynyl)-5(5,6-dihydroxyhexa-1, 3-diyanyl)-thiophene, และcatechin (Uchiyama et al., 1989; 1991; Karttisri, 2002; Biswas et al., 2005; Traithip, 2005).

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมส่วนสกัดจากใบชาขลุ่

ชาใบขลุ่ที่ใช้เตรียมโดยกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อ.ขลุ่ จ.จันทบุรี จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำใบชาขลุ่ที่บดละเอียด มาต้มในน้ำเดือด ในอัตราส่วน 1: 10 นาน 30 นาที ก่อนกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman ภายใต้สุญญากาศโดยเครื่องดูดลดความดันที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำส่วนสกัดที่ได้มาใส่หลอดพลาสติกขนาด 50 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 RPM เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเอาผงละเอียดของใบชาขลุ่ที่ลอยอยู่ในสารสกัดตกลงมา เทเอาส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำฟิซมาสกัดซ้ำอีก 1 รอบ ในอัตราส่วนเท่าเดิม นำส่วนสกัดน้ำที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวน้ำออกบางส่วนด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ปริมาตรประมาณ 1100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการสกัดแยกส่วนด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอล และน้ำต่อไป

นำส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ปริมาตร 1100 มิลลิลิตร ใส่ในกรวยแยกขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมเฮกเซน 200 มิลลิลิตร ใส่ตามลงไปแล้วเขย่าตั้งกรวยกรองทิ้งไว้ให้สารละลายแยกชั้นกันโดยส่วนสกัดน้ำจะอยู่ชั้นล่าง และส่วนเฮกเซนจะอยู่ชั้นบน ไขส่วนชั้นน้ำออกก่อนแล้วทำการแยกส่วนเฮกเซนเก็บไว้ นำส่วนสกัดน้ำมาสกัดแยกส่วนกับเฮกเซนต่ออีก 2 ครั้ง จากนั้นทำการสกัดแยกส่วนด้วย เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอล และน้ำตามลำดับ (รูปที่ 3-1) ทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งน้ำหนักส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอลและน้ำ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต่อไป



รูปที่ -3-1 ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอลและน้ำ

เมื่อนำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดไปทดสอบผลต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตสามารถลดการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้มากที่สุด จึงทำการนำผงใบชาขลุ่มาสกัดด้วยน้ำจำนวน 3.89 กิโลกรัม แล้วนำมาสกัดแยกส่วนต่อ ได้ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต 28.72 กรัม แล้วนำไปแยกสารออกฤทธิ์ด้วย Flash Column chromatography ต่อไป

3.2 การวิเคราะห์แยกสารประกอบทางเคมีของสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

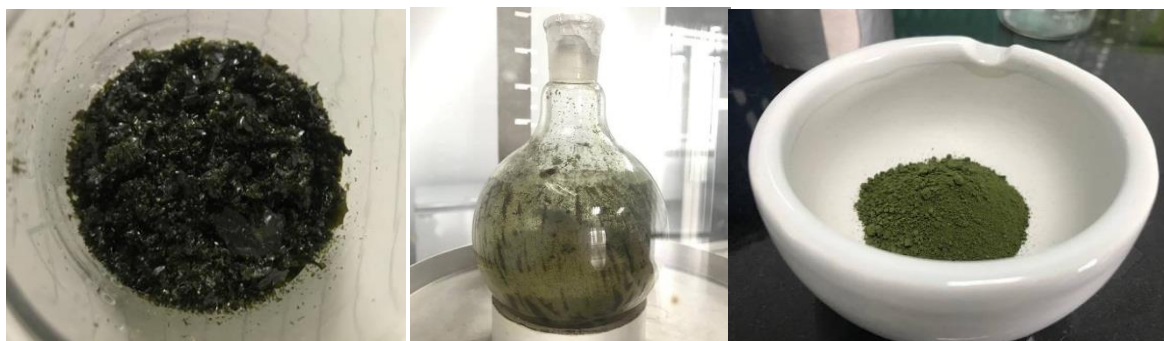
นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี เริ่มจากการทำ TLC เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้แยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี นำแผ่น TLC (silica gel aluminium plate P254) มาตัดให้มีขนาด 6.5x4 เซนติเมตร จุดส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ด้วยหลอดคาปิลลารี ลงบนแผ่น TLC จุดสารให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตรและแต่ละจุดห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้ระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ที่จุดสารเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายต่างๆ โดยให้ตำแหน่งของจุดอยู่เหนือตัวทำละลายภายในภาชนะแก้วควรใส่กระดาษกรองและปิดฝาภาชนะให้สนิท เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบนประมาณ 0.5 เซนติเมตรให้นำแผ่น TLC ออก แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มีดเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารและวิเคราะห์แยกสารต่อไป การ

วิเคราะห์หาสภาวะของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ โดยทำการใช้ตัวทำละลายดังนี้ ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 1 ต่อ 99, 10 ต่อ 90, 30 ต่อ 70, 50 ต่อ 50, 70 ต่อ 30 และ 100 ต่อ 0 ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 และ 100 ต่อ 0 ตามลำดับ โดยทำการเลือกระบบตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนใช้แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่

3.3 การแยกสารของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตโดยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Flash column chromatography)

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต 26.3257 กรัม มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจล 39.48855 กรัม (ใช้ซิลิกาเจลประมาณ 1.5 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วนำมาบดละเอียดด้วยโกร่ง แล้วบรรจุลงแฟลชคอลัมน์ส่วนบน แสดงดังในรูปที่ 3-2



รูปที่ 3-2 การเตรียมตัวอย่างลงคอลัมน์

3.3.2 การบรรจุคอลัมน์

นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตแยกในแฟลชคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร) โดยใช้ซิลิกาที่มีมวลโมเลกุล 60 กรัมต่อโมล ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร แช่ในตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 0.1 ต่อ 99.9 จากนั้นนำไปบรรจุลงคอลัมน์โดยให้ซิลิ

ภาจะมี ความสูงประมาณ 12 ถึง 14 เซนติเมตร ใช้ความดันช่วยในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ ควรเคาะคอลัมน์เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด เคาะปรับผิวซิลิกาเจลให้เรียบ แล้วบรรจุตัวอย่างที่เตรียมไว้บนซิลิกาเจล แสดงดังในรูปที่ 3-3



รูปที่ 3-3 การบรรจุตัวอย่างลงเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

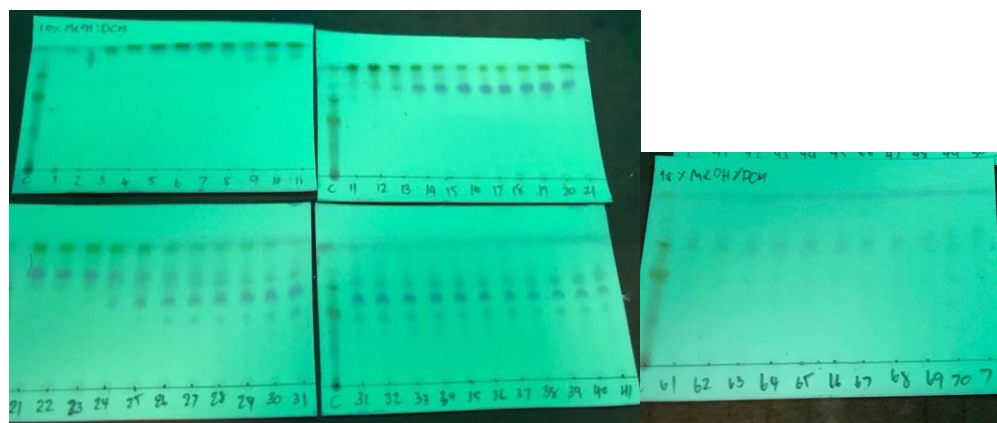
ทำการแยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายดังตารางที่ 3-1 จากนั้นนำเก็บส่วนสกัดย่อยหลอดละประมาณ 30 ml จำนวน 1026 หลอด ตามรูปที่ 3-4 แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เพื่อรวมแฟรกชันโดยดูจากแบนบนแผ่น TLC ในแต่ละหลอด ตามรูปที่ 3-5 รวมกันเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 11 แฟรกชัน ดังตารางที่ 3-2 และนำไปทำ TLC จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละโดยน้ำหนัก และนำไปการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์(NMR) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3-4 แฟรกชันที่เก็บได้จากเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

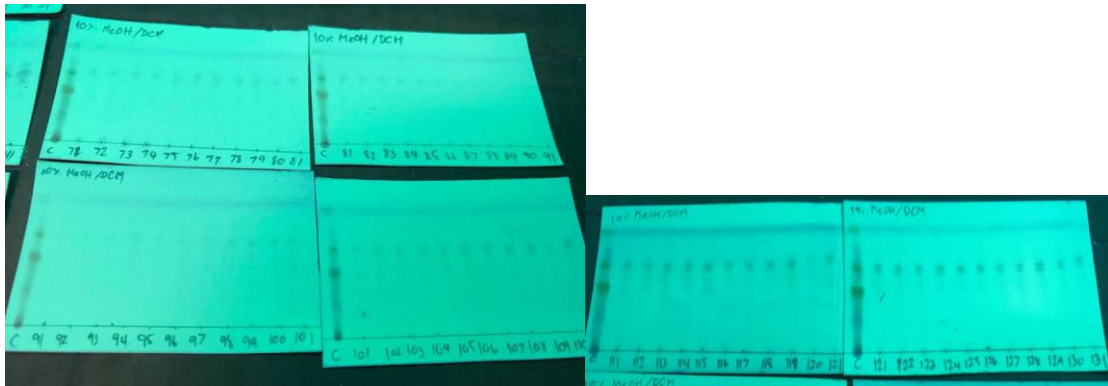
ตารางที่ 3-1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่ระบบ gradient ของการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต

Gradient	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
0.1% Methanol :Dichloromethane	5000
0.5% Methanol :Dichloromethane	3000
1% Methanol :Dichloromethane	6000
2% Methanol :Dichloromethane	3000
5% Methanol :Dichloromethane	10000
10% Methanol :Dichloromethane	2000
20% Methanol :Dichloromethane	4000
40% Methanol :Dichloromethane	1000

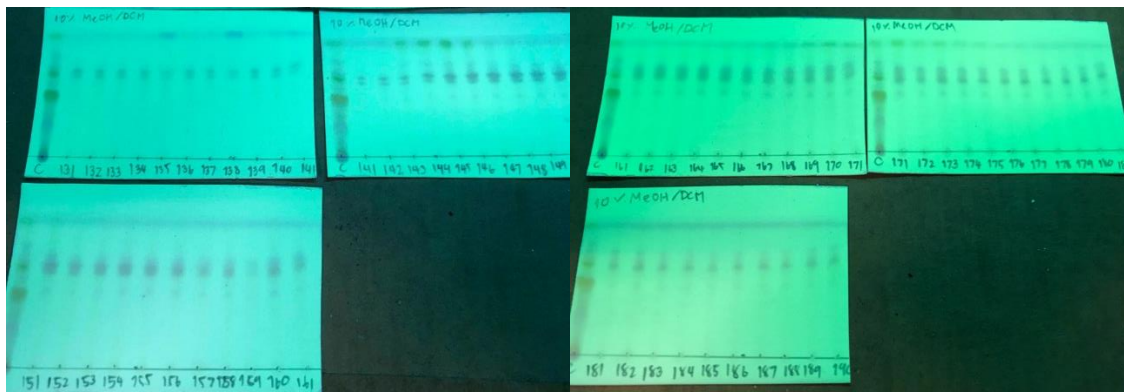


หลอดที่ 1-71

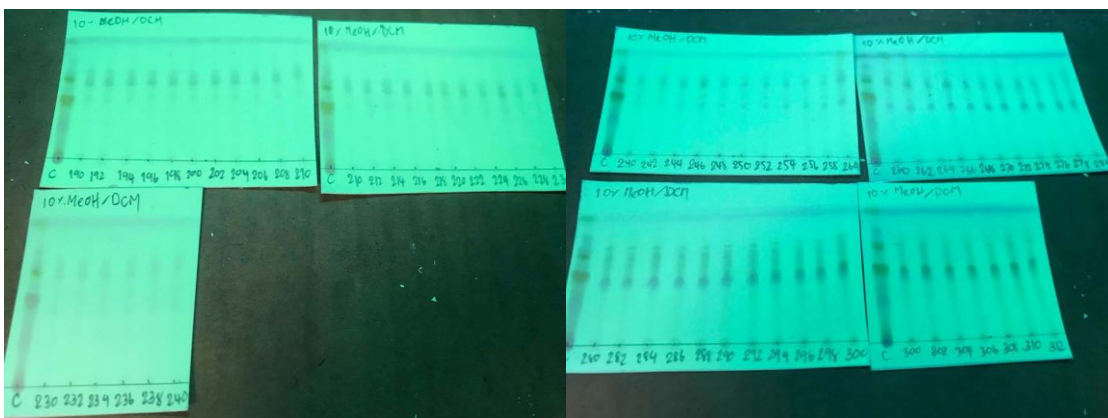
รูปที่ 3-5 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-1026



หลอดที่ 72-131

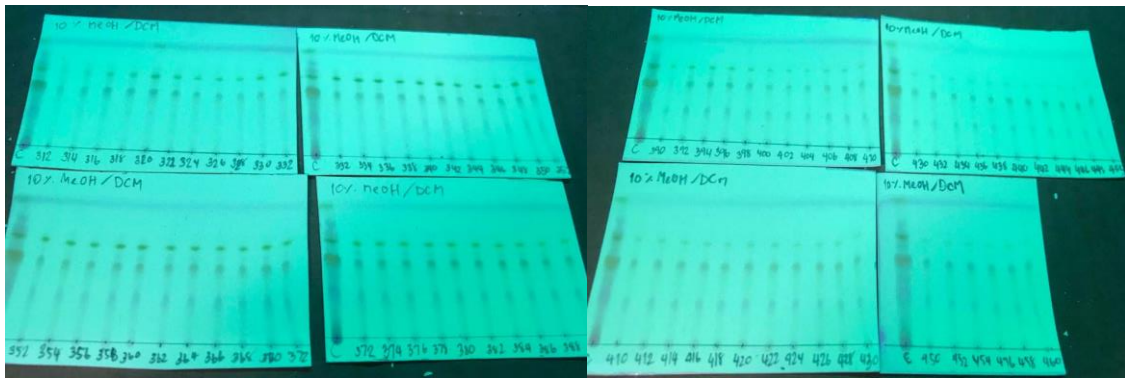


หลอดที่ 131-190

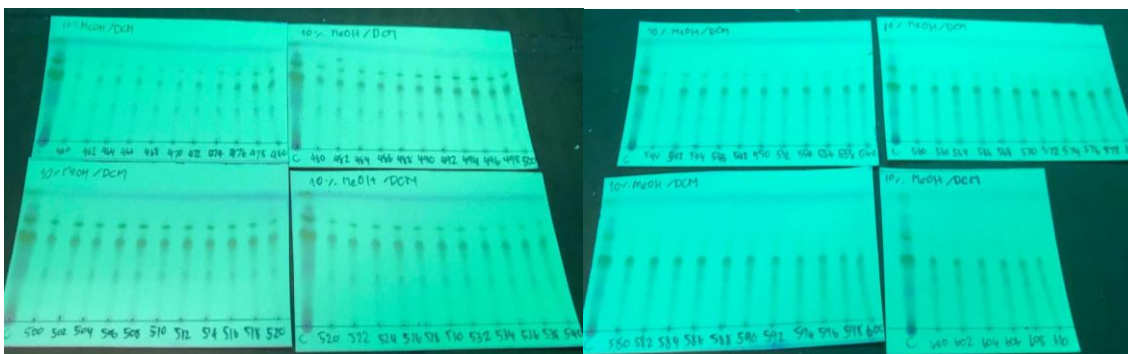


หลอดที่ 190-312

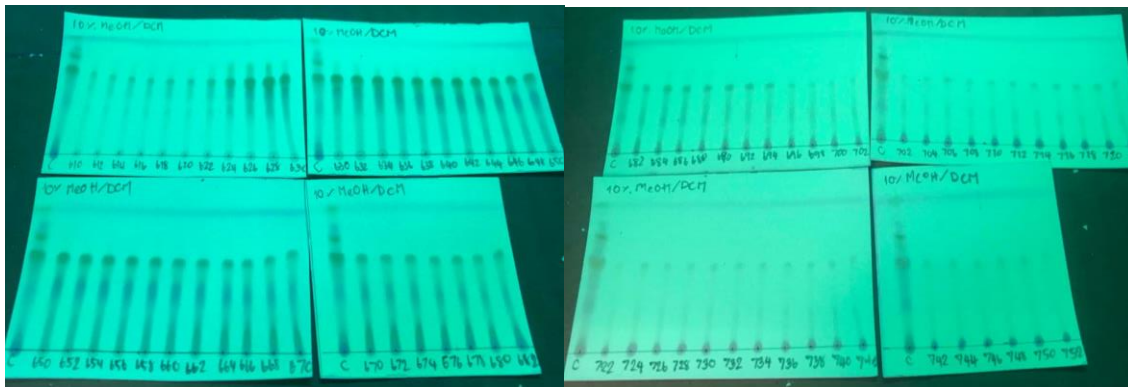
รูปที่ 3-5 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-1026 (ต่อ)



หลอดที่ 312-460

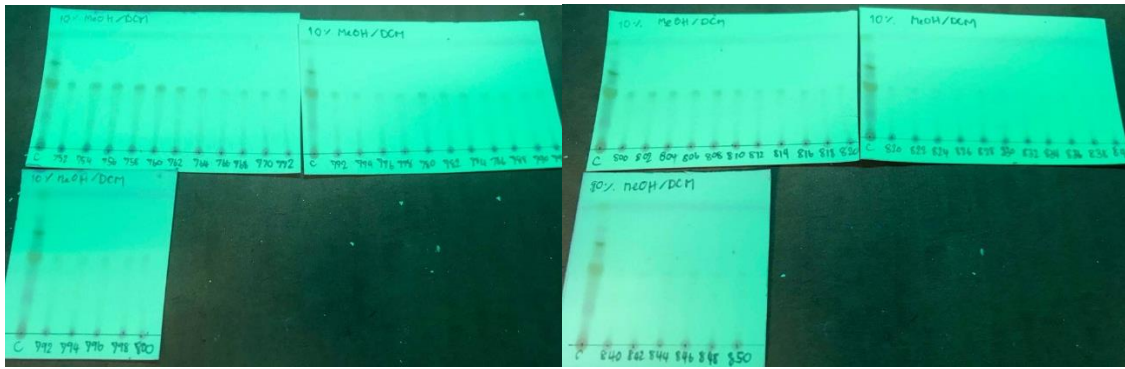


หลอดที่ 460-610

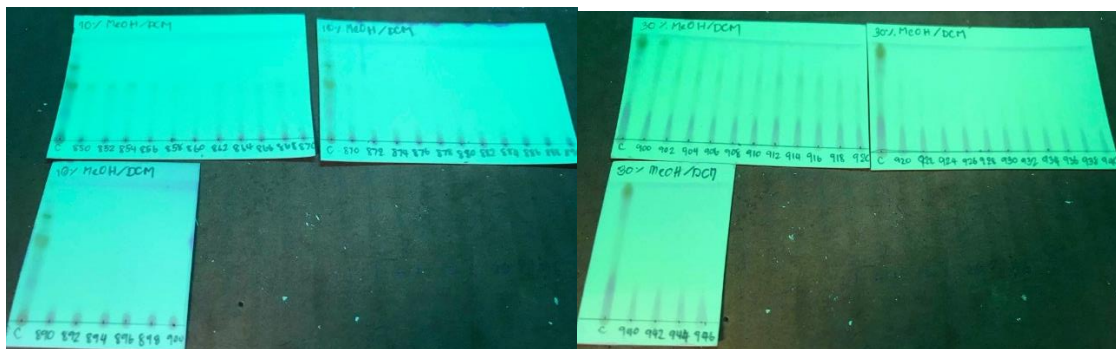


หลอดที่ 610-752

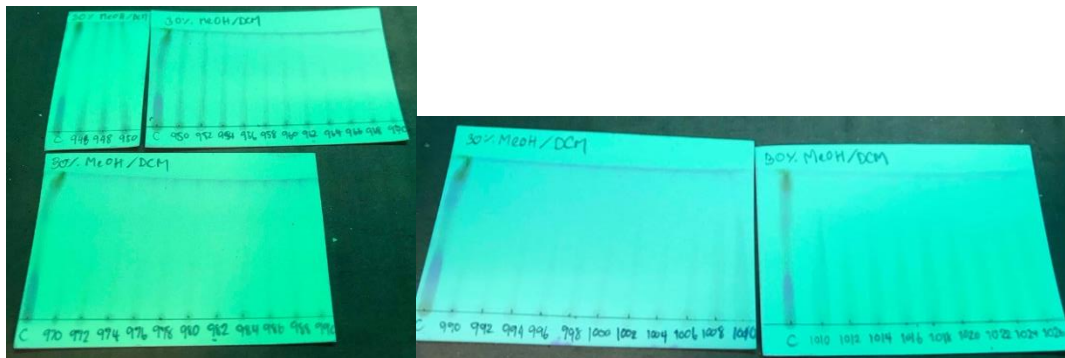
รูปที่ 3-5 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-1026 (ต่อ)



หลอดที่ 752-880



หลอดที่ 880-946



หลอดที่ 946-1026

รูปที่ 3-5 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-1026 (ต่อ)

ตารางที่ 3-2 การรวมแฟรกชันที่แยกได้จากเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี

แฟรกชัน	หลอดที่
F1	1-11
F2	12-23
F3	24-45
F4	46-90
F5	91-160
F6	161-240
F7	241-292
F8	293-610
F9	611-810
F10	811-966
F11	967-1026

3.4 การวิเคราะห์แยกสารประกอบทางเคมีของสกัดย่อย F8 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

แบบแผ่นบาง

เมื่อนำส่วนสกัดย่อย 11 แฟรกชันไปทดสอบดูการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 พบว่า ส่วนสกัดย่อย F8 สามารถลดการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้มากที่สุดและมีร้อยละโดยน้ำหนัก (%Yield) เท่ากับ 15.76 จึงนำส่วนสกัดย่อย F8 ไปแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อ โดยนำส่วนสกัดย่อย F8 ของใบชาขลุ่ยมาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี เริ่มจากการทำ TLC เพื่อวิเคราะห์หาสถานะของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้แยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำแผ่น TLC (silica gel aluminium plate P254) มาตัดให้มีขนาด 6.5x4 เซนติเมตร จุดส่วนสกัดย่อย F8 ของใบชาขลุ่ยด้วยหลอดคาปิลลารี ลงบนแผ่น TLC จุดสารให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตรและแต่ละจุดห่างกันประมาณ 0.5 เซนติเมตร รอให้ระเหยจนแห้ง นำแผ่น TLC ที่จุดสารเรียบร้อยแล้วมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายต่างๆ โดยให้ตำแหน่งของจุดอยู่เหนือตัวทำ

ละลายภายในภาชนะแก้วควรรใส่กระดาษกรองและปิดฝาภาชนะให้สนิท เพื่อให้ภายในภาชนะอึดตัวด้วย ไอของตัวทำละลาย เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบนประมาณ 0.5 เซนติเมตรให้นำแผ่น TLC ออก แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV ในที่มีมืดเพื่อตรวจสอบตำแหน่งของสารและวิเคราะห์แยกสารต่อไป การวิเคราะห์หาสถานะของตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อย F8 ของใบชาขลุ่ โดยใช้ตัวทำละลายดังนี้ ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนในอัตราส่วน 50 ต่อ 50, 70 ต่อ 30 และ 100 ต่อ 0 ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 95 ต่อ 5 และ 90 ต่อ 10 ตามลำดับ โดยทำการเลือกระบบตัวทำละลายเมทานอลและไดคลอโรมีเทนใช้แยกส่วนสกัดย่อย F8 ของใบชาขลุ่

3.5 การแยกสารของส่วนสกัดย่อย F8 โดยפלשכוכולמן כרומאטוגראפיה

3.5.1 การเตรียมตัวอย่าง

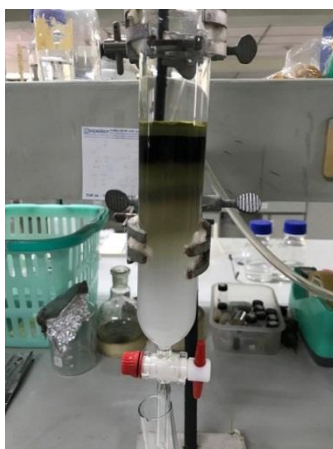
นำส่วนสกัดย่อย F8 จำนวน 1 กรัม มาละลายด้วยเอทิลอะซิเตตแล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจล 1.5 กรัม (ใช้ซิลิกาเจลประมาณ 1.5 เท่าของน้ำหนักส่วนสกัดที่ใช้) ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง แล้วนำมาบดละเอียดด้วยโกร่ง แล้วบรรจุลงפלשכוכולמן כרומאטוגראפיה แสดงดังในรูปที่ 3-6



รูปที่ 3-6 การเตรียมตัวอย่างลงפלשכוכולמן כרומאטוגראפיה

3.5.2 การบรรจุคอลัมน์

นำส่วนสกัดย่อย F8 แยกในเฟลชคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร) โดยใช้ซิลิกาที่มีมวลโมเลกุล 60 กรัมต่อโมล ขนาด 0.040-0.063 มิลลิเมตร แขนในตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1 ต่อ 99 จากนั้นนำไปบรรจุลงคอลัมน์โดยให้ซิลิกาจะมีความสูงประมาณ 12 ถึง 14 เซนติเมตร ใช้ความดันช่วยในการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่ ควรเคาะคอลัมน์เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด เคาะปรับผิวซิลิกาเจลให้เรียบ แล้วบรรจุตัวอย่างที่เตรียมไว้บนซิลิกาเจล แสดงดังในรูปที่ 3-7

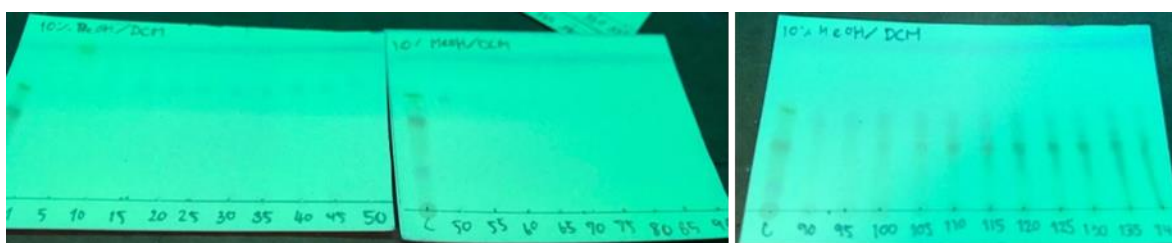


รูปที่ 3-7 การบรรจุตัวอย่างลงเฟลชคอลัมน์

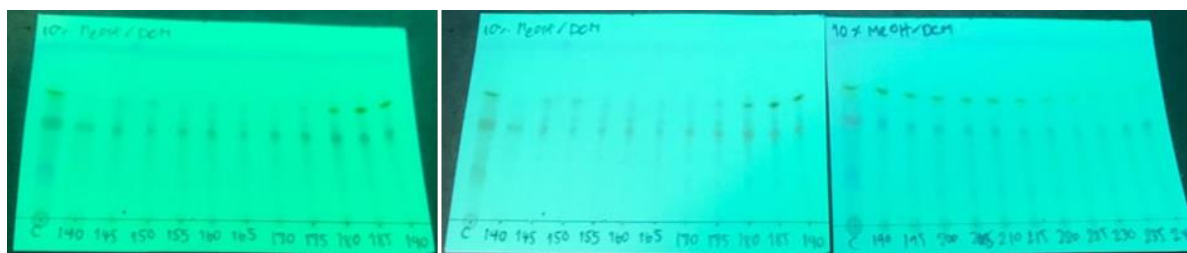
ทำการแยกสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลายดังตารางที่ 3-3 จากนั้นนำเก็บส่วนสกัดย่อยหลอดละประมาณ 30 ml จำนวน 259 หลอด แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เพื่อรวมแฟรกชันโดยดูจากแบนบนแผ่น TLC ในแต่ละหลอด ตามรูปที่ 3-8 รวมกันเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 8 แฟรกชัน ดังตารางที่ 3-4 และนำไปทำ TLC จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนัก คำนวณร้อยละโดยน้ำหนัก และนำไปการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการไล่ระบบ gradient ของการแยกส่วนสกัดย่อย F8

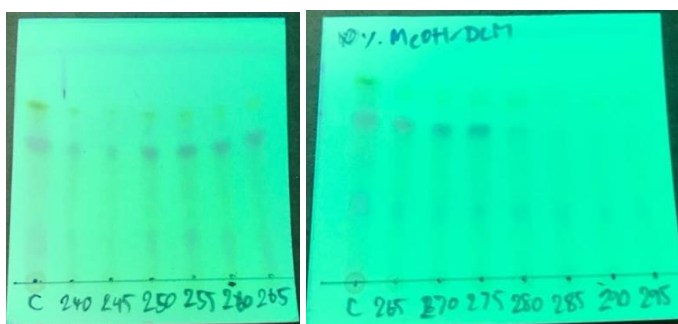
Gradient	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
1% Methanol :Dichloromethane	6000
2% Methanol :Dichloromethane	1000
5% Methanol :Dichloromethane	1000
10% Methanol :Dichloromethane	1000



หลอดที่ 1-140



หลอดที่ 140-240



หลอดที่ 240-295

รูปที่ 3-8 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-295

ตารางที่ 3-4 การรวมแฟรกชันของการแยกส่วนสกัดย่อย F8

แฟรกชัน	หลอดที่
F8.1	1-14
F8.2	15-55
F8.3	56-79
F8.4	80-96
F8.5	97-140
F8.6	141-170
F8.7	170-179
F8.8	180-295

3.6 การแยกสารของส่วนสกัดย่อยF8 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20

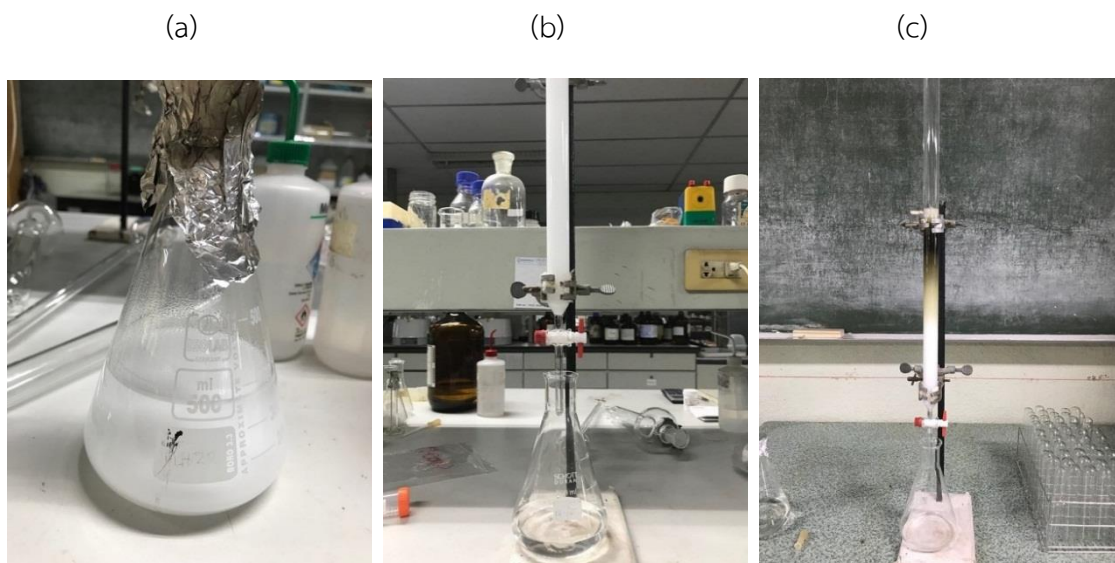
3.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนสกัดย่อย F8 จำนวน 0.5 กรัม มาละลายด้วยเมทานอล ในลักษณะที่ละลายให้พอดี หนีตไปจะทำให้สารตัวอย่างไม่สามารถแยกผ่าน Sephadex LH20 ลงมาได้ เจือจางไปจะทำให้แบนสารกว้างแยกไม่ดี กรองเอาส่วนที่ไม่ละลายออก

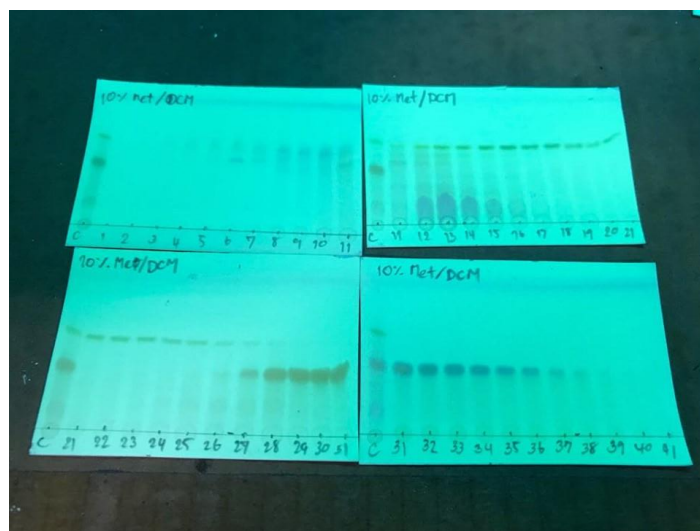
3.6.2 การบรรจุคอลัมน์

นำส่วนสกัดย่อย F8 แยกในคอลัมน์ (คอลัมน์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร) โดยใช้ Sephadex LH20 แขนในตัวทำละลายเมทานอลข้ามคืน ดังรูปที่ 3-9(a) เพื่อให้ Sephadex LH20 บวมขึ้น นำ Sephadex LH20 มาแพ็คลงคอลัมน์ให้เม็ดปิดแพ็คกันลงมาซ้าๆ และไล่ฟองอากาศ ใช้เมทานอลชะคอลัมน์ จนถึงผิวหน้าของ Sephadex LH20 ดังรูปที่ 3-9(b) จึงทำการโหลดตัวอย่างลงคอลัมน์ ปล่อยเมทานอลชะสารตัวอย่างลงมาจนถึงผิวหน้า Sephadex LH20 ดังรูปที่ 3.9(c) แล้วค่อยๆ เติมเมทานอลที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ชะสารลงมา จากนั้นนำเก็บส่วนสกัดย่อยหลอดละประมาณ 10 ml จำนวน 60 หลอด แล้วนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC เพื่อรวม แฟรกชันโดยดูจากแบนบนแผ่น TLC ในแต่ละหลอด รวมกันเป็นส่วนสกัดย่อยได้ 5 แฟรกชัน ดังตารางที่ 3-5 และนำไปทำ TLC จากนั้นนำไปประเหย

ตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณร้อยละโดยน้ำหนัก และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3-9 การแช่ Sephadex LH20 ซ้ำมคิน (a) แพ็คคอลัมน์ Sephadex LH20 (b) และ โหลดตัวอย่างลงคอลัมน์ (c)



รูปที่ 3.10 โครมาโทแกรม TLC ของหลอดแฟรกชัน หลอดที่ 1-39

ตารางที่ 3-5 การรวมแฟรกชันของการแยก ส่วนสกัดย่อย F8 โดย Sephadex LH20

แฟรกชัน	หลอดที่
F8.1	1-11
F8.2	12-16
F8.3	17-25
F8.4	26-28
F8.5	29-39

3.7 การศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตใบชาขลุ่ยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ ด้านอีกเสบ

ทำการศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตใบชาขลุ่ย โดยศึกษาปัจจัย เรื่อง ระยะของใบขลุ่ยที่ใช้ในการทำใบชาขลุ่ย ระหว่างใบอ่อน (เหนือใบเพสลาด) และใบแก่ (ใบเพสลาด) นำใบทั้ง 2 ประเภทมาผ่านกรรมวิธีทำชาใบขลุ่ยตามวิธีของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี แล้วนำมาบดละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดความเร็วสูง และทำการเตรียมส่วนสกัดน้ำ ทำโดยนำใบชาขลุ่ยใบแก่และใบอ่อนมาทำการสกัดด้วยน้ำกลั่นร้อน และสกัดแยกส่วนตามวิธีที่รายงานในข้อ 3.1

3.8 การวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

นำสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ย ส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอล และน้ำ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต 11 แฟรกชัน ส่วนสกัดย่อยF8 ที่แยกแฟรคคอลลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลจำนวน 8 แฟรกชัน ส่วนสกัดย่อยF8 ที่แยกคอลลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH 20 จำนวน 5 แฟรกชัน และสารสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ยอ่อนและแก่ ซึ่งน้ำหนักประมาณ 5 mg มาละลายด้วยตัวทำละลายDMSO หรือ CDCl₃ แล้วนำสารละลายใส่หลอดNMR ส่งวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ที่ห้องปฏิบัติการ NMR คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.8 การเตรียมโปรตีนสำหรับวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

3.8.1 การเตรียมโปรตีนรวมสำหรับวิเคราะห์ ICAM-1 และ VCAM-1

ทำการกระจายเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดดมนุษย์ EA.hy926 ลงบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบจานเดี่ยวเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 60 มิลลิเมตร จำนวน 3×10^5 เซลล์ต่อจาน แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่อุณหภูมิ 3 มิลลิลิตรพร้อมเขย่าเล็กน้อย ดูดสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มี phenol red ที่ไร้เชื้อ 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัดไบซาซูลู ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติม TNF- α (10 ng/ml) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มแบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่เย็น 2 ครั้ง แล้วเติม RIPA protein lysis buffer [150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% nonidet P-40, 1 mM DTT, 1X protease inhibitors (PI)] ปริมาตร 50 μ l จากนั้นใช้ที่ขูดเซลล์ ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml และเติม RIPA protein lysis buffer อีก 50 μ l ขูดเก็บเซลล์ลงในหลอดพลาสติกเดิม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบนแบ่งใส่ในหลอดพลาสติกใหม่ นำโปรตีนรวมที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford และทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot สามารถเก็บโปรตีนส่วนที่เหลือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.8.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford

ทำการวิเคราะห์โดยนำโปรตีนที่สกัดได้ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น 8 μ l ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม แล้วทำการผสมกับสารละลาย 1X Bradford dye reagent ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลทและคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA

3.9. การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot

ทำการเตรียม 10% SDS-PAGE จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางโปรตีนด้วย 6X protein loading buffer [0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 12%

(w/v) SDS, 0.06% (w/v) bromophenol blue, 60% (v/v) glycerol, 1.2 M β -mercaptoethanol] ในอัตราส่วน 5:1 แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ก่อนนำไปโปรตีนไปหยอดลงในเจล ทำการแยกโปรตีนในสารละลาย 1X Running buffer [0.0625 M Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) SDS] ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 80 V และให้กระแสไฟฟ้าผ่านเจลเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง จึงปิดสวิทช์เครื่อง Power supply แล้วย้ายแถบโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลไปยังแผ่นเมมเบรน PVDF ที่ทำการ pretreated โดยแช่ใน absolute methanol ประมาณ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่เมมเบรนใน Transfer buffer [192 mM glycine, 25 mM Tris, 10% (w/v) methanol] ประมาณ 5 นาที และผ่านกระแสไฟฟ้า ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 25 V เป็นเวลาข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลาย TBS-T buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20] ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ที่เจือจางในบัฟเฟอร์ 1X TBS ที่มี 5% BSA 0.1% (v/v) Tween 20 ในอัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน พร้อมทั้งเขย่า ส่วนโปรตีน GAPDH 1X TBS ที่มี 5% BSA 0.1% (v/v) Tween 20 ในอัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน นำเมมเบรนไปแช่ในสารละลาย secondary antibody (anti rabbit IgG,HRP-linked antibody) ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ในอัตราส่วน 1:5,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ล้างเมมเบรนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง พร้อมทั้งเขย่าภาชนะที่ใส่เมมเบรน ผสมสารละลาย ซับสเตรท enhanced chemiluminescence (ECL) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเมมเบรนมาบ่มกับสารละลาย ซับสเตรทจนทั่วแผ่นเมมเบรนก่อนนำไปประกบฟิล์ม X-ray ในห้องมืด วิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2

นำแผ่นเมมเบรนล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T 5 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ stripping เป็นเวลา 15-30 นาที แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำเมมเบรนมาบ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TBS-T ที่มี 5 (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเมมเบรนแช่ในสารละลาย primary antibody และสารละลาย secondary antibody ต่อไป

3.10 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ผลการทดลองที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบ one-way ANOVA โดยกำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

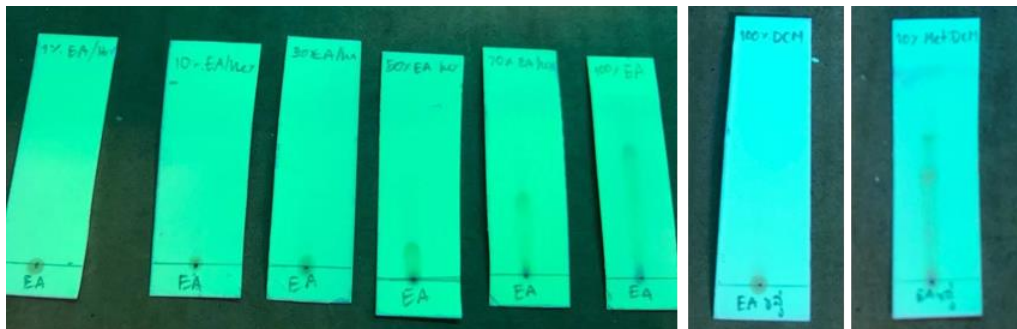
4.1 การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมของคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ โดยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่รายงานในปีที่ 1 พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอล และน้ำจากส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย 1-บิวทานอล และส่วนสกัดย่อยน้ำ ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว โดยพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดเลือดดีที่สุดในที่สุด จึงทำการสกัดแยกส่วนของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ในปริมาณมากขึ้นถึง 1100 มิลลิลิตร ได้ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต 1-บิวทานอล และน้ำ ตามลำดับ และนำส่วนสกัดมาวิเคราะห์ NMR ดังแสดงผลในภาคผนวก

จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่จุดลงบนแผ่น TLC เพื่อวิเคราะห์หาสถานะของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนกับระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล พบว่า เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีแถบสารบนแผ่น TLC ที่ชัดเจน จึงเลือกมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ดังแสดงในรูปที่ 4-1

(a)

(b)

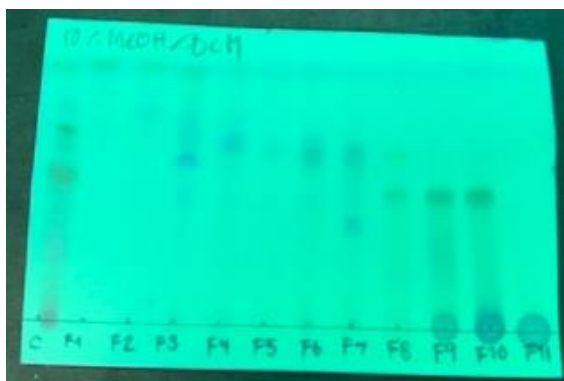


รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรม TLC ใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน (a)

และระบบตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (b)

4.2 ผลการแยกสารออกฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตโดยแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต 26.3257 กรัม มาบรรจุลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี ระบบ gradient elution ทำการรับแฟรกชันแล้วนำแต่ละหลอดมาจุดเทียบเพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารด้วย TLC ทำการรวมแฟรกชันได้ 11 แฟรกชัน นำแฟรกชันที่ได้ไปและนำไปทำ TLC ดังรูปที่ 4.2 แล้วทำให้แห้ง และทำการคำนวณหา %yield ของแต่ละแฟรกชัน ได้ผลดังตารางที่ 4-1 พบว่า น้ำหนักส่วนสกัดย่อย 11 แฟรกชัน เท่ากับ 23.5598 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 89.4935 แฟรกชันที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือแฟรกชันที่ 9 มีน้ำหนัก 10.3849 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 39.44776 และแฟรกชันที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือแฟรกชันที่ 11 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.44796กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 1.70161



รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 11 ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่

ตารางที่ 4-1 น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแฟรกชันของการแยกส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต

แฟรกชัน	น้ำหนัก (กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
F1	1.11502	4.23548
F2	0.62216	2.3633
F3	0.54319	2.06334
F4	0.69245	2.63032
F5	0.60423	2.2952
F6	0.68754	2.6113

F7	0.79023	3.0017
F8	4.15	15.7641
F9	10.3849	39.44776
F10	3.5222	13.3793
F11	0.44796	1.70161
รวม	23.5598	89.4935

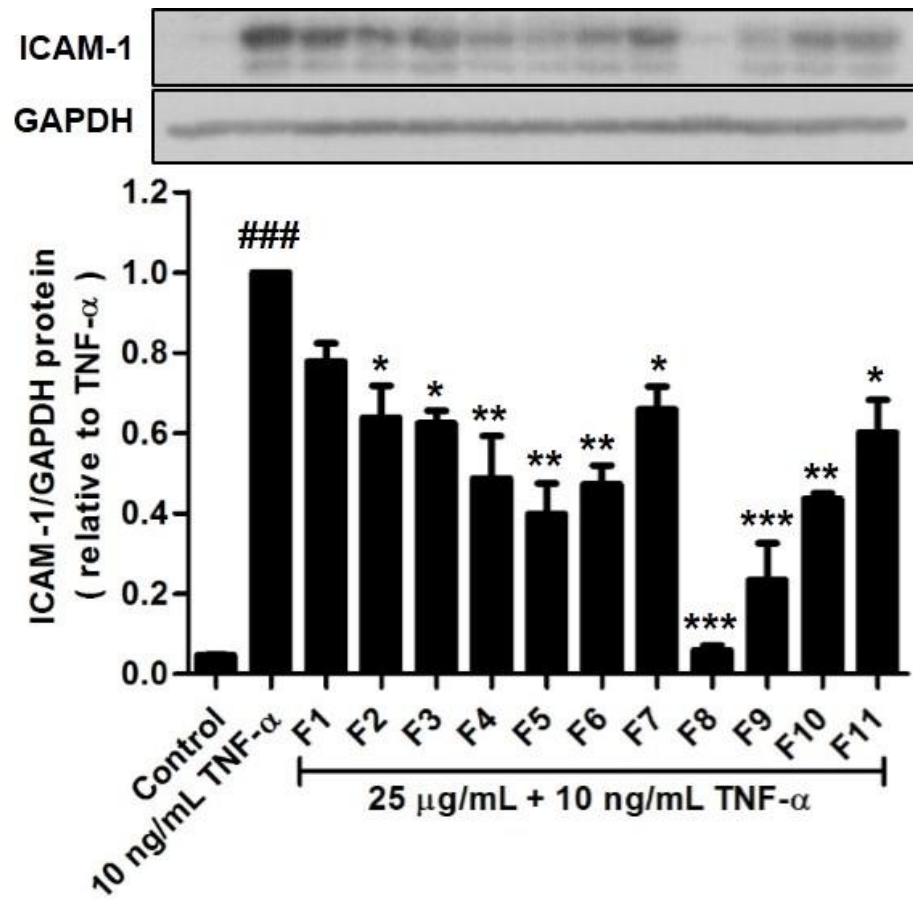
4.3 ผลของส่วนสกัดย่อย 11 แพรกชั้นต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1

เมื่อนำส่วนสกัดย่อย 11 แพรกชั้น ไปทดสอบการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 ผลการศึกษาปริมาณโปรตีน ICAM-1 จะพบว่าเมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน ICAM-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อย 11 แพรกชั้นที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีน ICAM-1 ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F2-F11 สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ TNF- α เพียงอย่างเดียว แต่ส่วนสกัดย่อย F8 ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 ได้มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4-3)

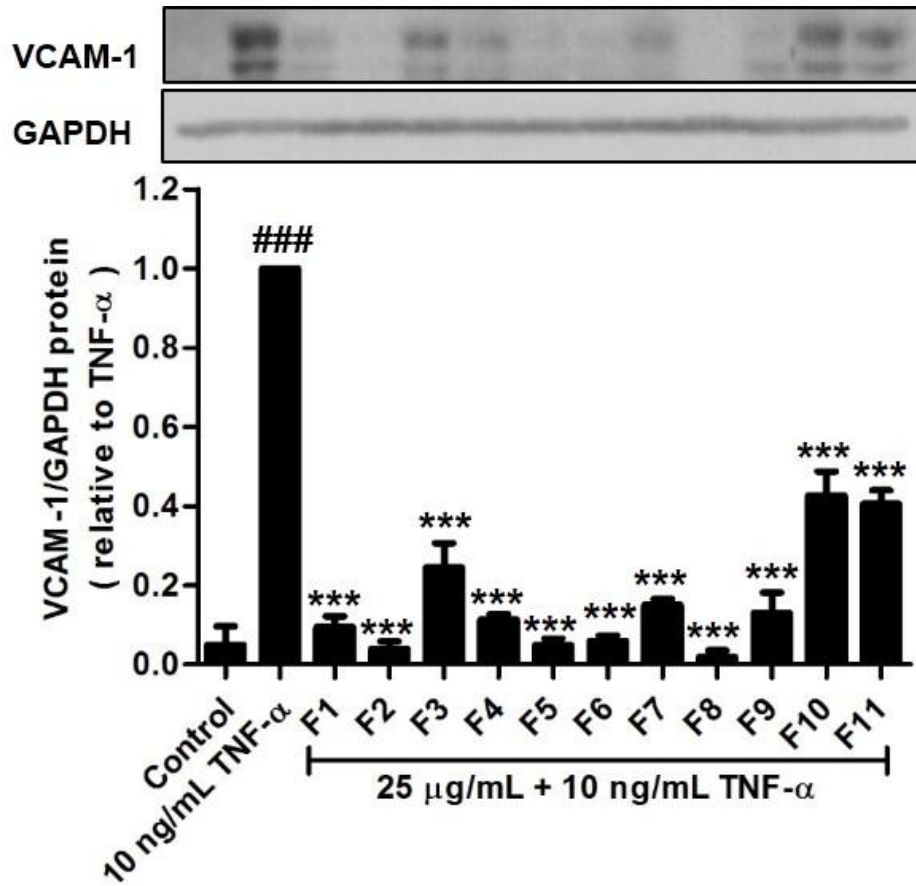
ส่วนการศึกษาปริมาณโปรตีน VCAM-1 พบว่า เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน VCAM-1 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อย 11 แพรกชั้นที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α พบว่าส่วนสกัดย่อย F1-F11 ที่ความเข้มข้น 25 μ g/mL สามารถลดปริมาณโปรตีน VCAM-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณโปรตีน VCAM-1 ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8 สามารถลดปริมาณโปรตีน VCAM-1 ได้มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่สัมผัสกับ TNF- α เพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองจะเห็นว่าส่วนสกัดย่อย F8 เป็นส่วนสกัดที่แสดงฤทธิ์

ต้านอักเสบที่ดีที่สุด สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้มากจนเกือบมีระดับเท่ากับ basal level ของเซลล์ควบคุม (control)

(a)



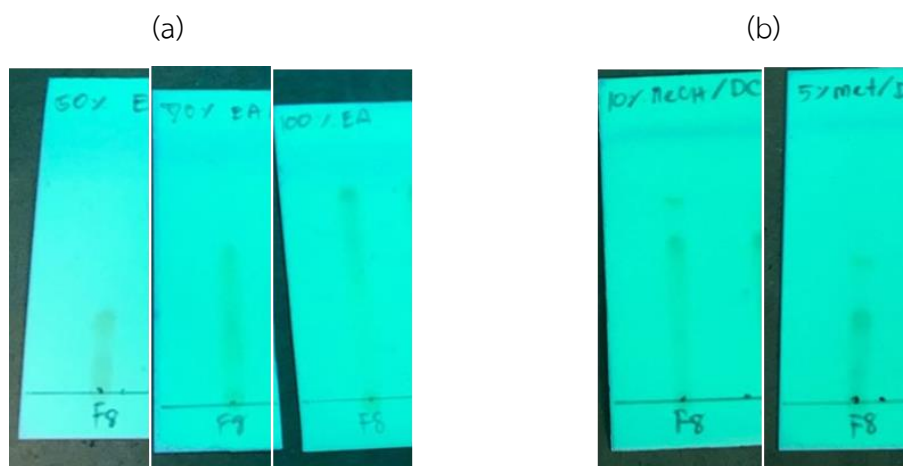
(b)



รูปที่ 4-3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย 11 แฟรกชันที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/mL}$ นาน 1 ชั่วโมง แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL นาน 6 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 หลังจาก normalized ด้วยโปรตีน GAPDH ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน #### $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ และ*** $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว

4.4 การหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมของคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดย่อย F8 ของใบชาขลุ่ย โดยโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง

นำส่วนสกัดย่อย F8 จุดลงบนแผ่น TLC เพื่อวิเคราะห์หาสถานะของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่ใช้แยกส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ คือระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซนกับระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล พบว่า เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเมทานอล มีแถบสารบนแผ่น TLC ที่ชัดเจน (รูปที่ 4-4) จึงเลือกมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรม TLC ของส่วนสกัดย่อย F8 ใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน (a) และระบบตัวทำละลายเมทานอลต่อไดคลอโรมีเทน (b)

4.5 ผลการแยกสารออกฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อย F8 โดยเฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี

นำส่วนสกัดย่อย F8 จำนวน 1 กรัม มาบรรจุลงคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบเฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี ระบบ gradient elution ทำการรับแฟรกชันแล้วนำแต่ละหลอดมาจุดเทียบเพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารด้วย TLC ทำการรวมแฟรกชันได้ 8 แฟรกชัน ทำให้แห้งแล้วทำการคำนวณหา %yield ของแต่ละแฟรกชันได้ผลดังตารางที่ 4-2 พบว่า น้ำหนักรวมของส่วนสกัดย่อย 8 แฟรกชัน เท่ากับ 0.8143 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 81.43 แฟรกชันที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือ แฟรกชันที่ 8.8 มีน้ำหนัก 0.5001 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 50.01 และแฟรกชันที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือแฟรกชันที่ 8.3 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.0201 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 2.01

ตารางที่ 4-2 น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแฟรกชันที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟี

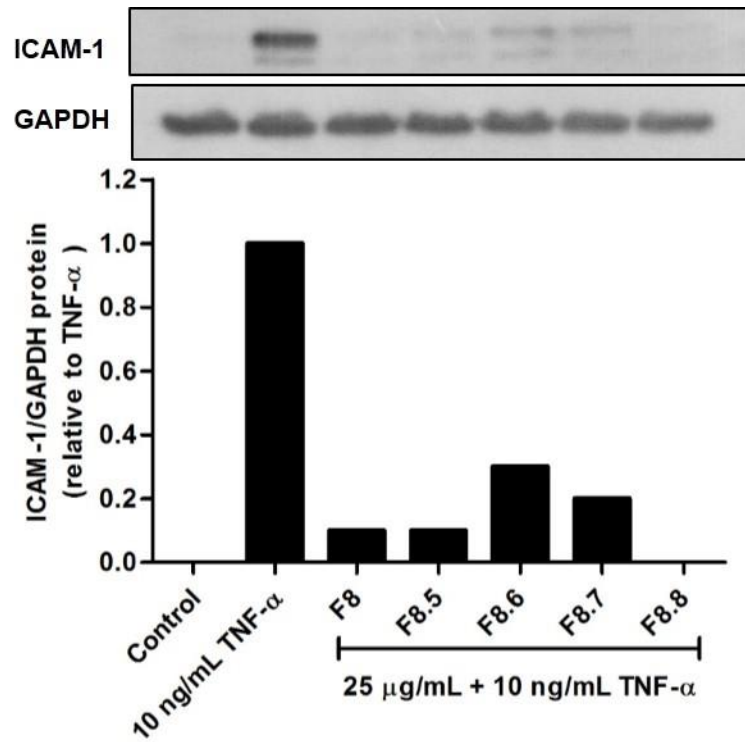
แฟรกชัน	น้ำหนัก(กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
F8.1	0.0285	2.85
F8.2	0.0408	4.08
F8.3	0.0201	2.01
F8.4	0.0232	2.32
F8.5	0.1044	10.44
F8.6	0.0664	6.64
F8.7	0.0308	3.08
F8.8	0.5001	50.01
รวม	0.8143	81.43

4.6 ผลของส่วนสกัดย่อย F8 (F8.5-F8.8) ต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และVCAM-1

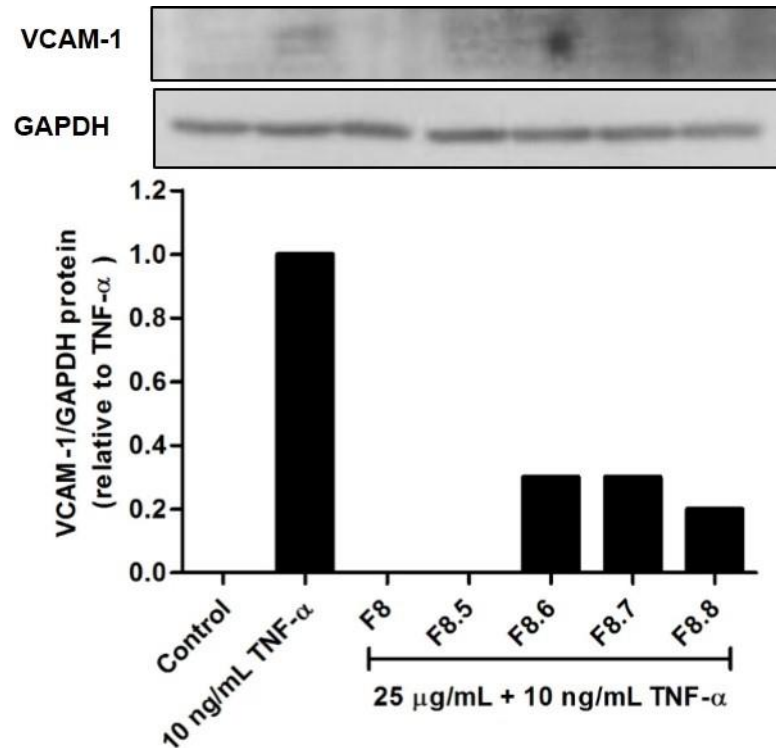
จากการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีของส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโตกราฟีไม่สามารถแยกสารออกฤทธิ์ได้ แต่จาก NMR สเปกตรัม พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 ประกอบด้วยสารกลุ่มฟีนอลิกซึ่งคาดว่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย F8.1-F8.4 น่าจะประกอบด้วยสารที่เป็นกลุ่ม oil จึงนำส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 มาทำการทดสอบการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ผลการทดลองพบว่า เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว ปริมาณโปรตีน ICAM-1 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโปรตีน ICAM-1 ของเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 ได้ทุกส่วนสกัดย่อย และส่วนเซลล์ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 ที่ความ

เข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ก็สามารถลดปริมาณโปรตีน VCAM-1 ได้ (รูปที่ 4-5) จึงทำการหาวิธีอื่นที่สามารถแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัดย่อย F8 ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

(a)



(b)

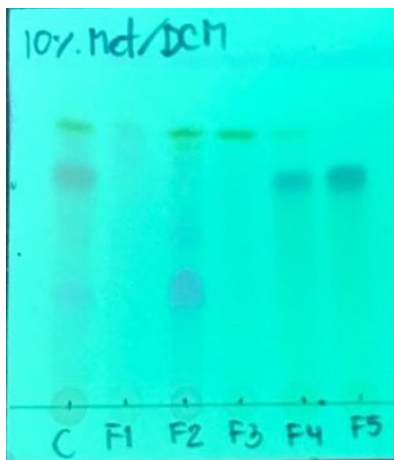


รูปที่ 4.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.5-F8.8 ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ นาน 1 ชั่วโมง แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL นาน 6 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 หลังจาก normalized ด้วยโปรตีน GAPDH ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2

4.7 การแยกสารออกฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20

เมื่อการแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยแฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟีไม่สามารถแยกกันได้อย่างชัดเจน เพราะเป็นการแยกสารสมบัติความมีขี้วและไม่มีขี้วของสาร จึงปรับมาใช้ในการแยกสารตามขนาดของสาร โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีที่บรรจุ Sephadex LH20 โดยสารที่ขนาดใหญ่จะถูกชะออกมาก่อนแล้วตามด้วยสารที่มีขนาดเล็ก

นำส่วนสกัดย่อย F8 จำนวน 0.5 กรัม มาบรรจุลงคอลัมน์ Sephadex LH20 ทำการรับแพรกชั้น แล้วนำแต่ละหลอดมาจุดเทียบเพื่อดูการเคลื่อนที่ของสารด้วย TLC ทำการรวมแพรกชั้นได้ 5 แพรกชั้น นำแพรกชั้นที่ได้ไปทำ TLC ดังรูปที่ 4.6 ทำให้แห้งโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และใช้เครื่องแช่เย็นเยือกแข็ง แล้วทำการคำนวณหา %yield ของแต่ละแพรกชั้น ได้ผลดังตารางที่ 4-3 พบว่า น้ำหนักส่วนสกัดย่อย 5 แพรกชั้น เท่ากับ 0.4808 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 96.16 แพรกชั้นที่มีน้ำหนักมากที่สุดคือ แพรกชั้นที่ 8.1 มีน้ำหนัก 0.2034 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 40.68 และแพรกชั้นที่มีน้ำหนักน้อยที่สุดคือ แพรกชั้นที่ 8.3 มีน้ำหนักเท่ากับ 0.0158 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 3.16



รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรม TLC ที่ใช้วิเคราะห์ 5 ส่วนสกัดย่อย F8 ด้วย Sephadex LH20

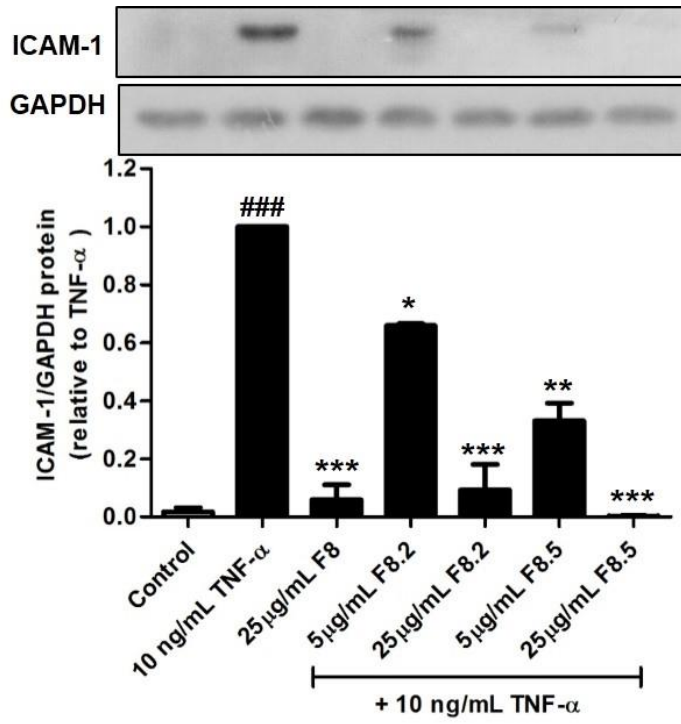
ตารางที่ 4-3 น้ำหนักและร้อยละโดยน้ำหนักของแต่ละแพรกชั้นที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8 โดยใช้ Sephadex LH20

แพรกชั้น	น้ำหนัก(กรัม)	ร้อยละโดยน้ำหนัก
F8.1	0.2034	40.68
F8.2	0.0868	17.36
F8.3	0.0260	5.2
F8.4	0.0158	3.16
F8.5	0.1488	29.76
รวม	0.4808	96.16

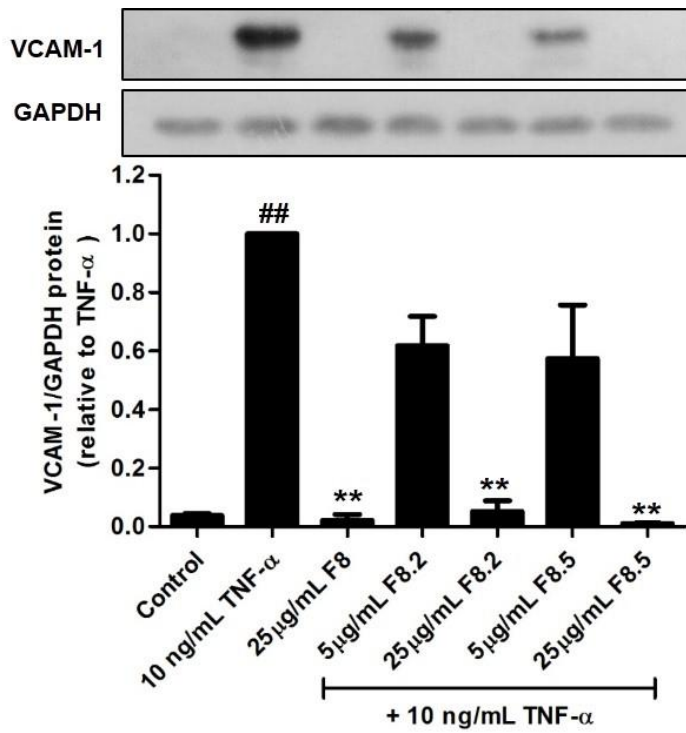
4.8 ผลของส่วนสกัดย่อย F8 (F8.2 และ F8.5) ต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และVCAM-1

เมื่อสามารถแยกสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัดย่อย F8 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ Sephadex LH20 ได้แล้ว จึงนำส่วนสกัดย่อยทั้ง 5 แพรกชั้น (F8.1-F8.5) นำไปการวิเคราะห์สเปกตรัมโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5 ค่อนข้างมีความบริสุทธิ์ (ดังแสดงในภาคผนวก) จึงนำมาทดสอบผลต่อการแสดงออกของปริมาณโปรตีน ICAM-1 และVCAM-1 พบว่า เมื่อให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียวพบว่าปริมาณโปรตีน ICAM-1 เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ส่วนเซลล์ที่สัมผัสด้วยส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วให้เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α นาน 6 ชั่วโมง พบว่าส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5 ที่ความเข้มข้น 5 และ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ (รูปที่ 4-7) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5 จึงเป็นสารที่ออกฤทธิ์ของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ย โดยส่วนสกัดย่อย F8.5 จะแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบโดยการลดการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 ได้มีประสิทธิภาพสูงกว่าส่วนสกัดย่อย F8.2 ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา NMR spectrum ของส่วนสกัดย่อย F8.5 พบว่าเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์ จึงนำไปศึกษาข้อมูล HR-MS ต่อไป ในขณะที่สารในส่วนสกัดย่อย F8.2 ยังมีสารอื่นเจือปนอยู่ ประกอบกับจำนวนส่วนสกัดที่ได้มีเพียง 15.8 mg จึงไม่สามารถศึกษาต่อได้

(a)



(b)



รูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot เซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดย่อย F8.2 และ F8.5 ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1 ชั่วโมง แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วย $\text{TNF-}\alpha$ ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL 6 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 หลังจาก normalized ด้วยโปรตีน GAPDH ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน $###p < 0.001$ และ $##p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ $*p < 0.05$ $**p < 0.01$ และ $***p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย $\text{TNF-}\alpha$ เพียงอย่างเดียว

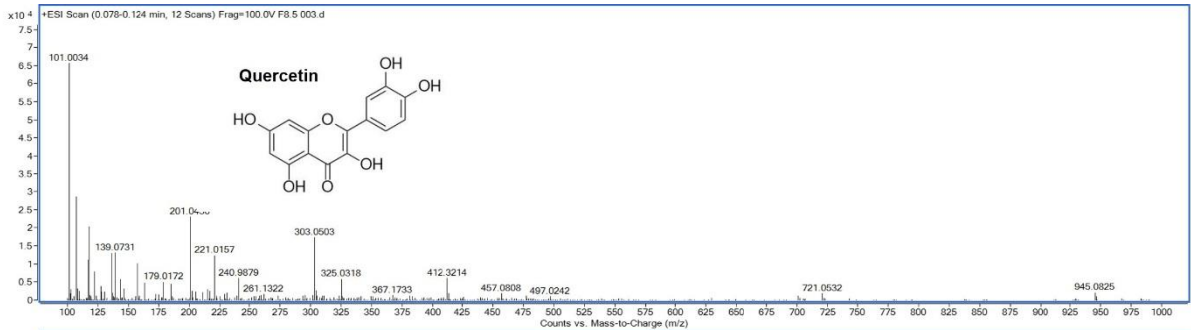
4.9 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อย F8.5 จาก Sephadex LH20

เมื่อพบว่าส่วนสกัดย่อย F8.5 เป็นสารที่ออกฤทธิ์ของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ย ซึ่งสามารถลดปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้ จึงนำไปวิเคราะห์ HR-MS และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ดังแสดงในภาคผนวก) พบว่าสารมีโครงสร้างดังรูปที่ 4.8 โดยสารนี้ คือ quercetin นอกจากนี้ quercetin จะเป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในใบขลุ่ยที่ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ ยังมีการรายงานว่า quercetin เป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการแยกด้วยวิธี bioassay-guided isolation (Traithip, 2005) จากศึกษาโครงสร้างสารด้วยข้อมูลสเปกโทรสโกปี ได้แก่ High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) พบว่า มี monoisotopic mass $(\text{M}+\text{H})^+$ เท่ากับ 303.0503 แสดงถึง สารมีสูตรโมเลกุล เป็น $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ และ Nuclear magnetic resonance spectroscopy ทั้งแบบ $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ และ $1\text{D-}^{13}\text{C-NMR}$ พบว่าข้อมูลตรงกับที่อ้างอิงโดย Wang et al. (2010)

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ได้จาก NMR และ Mass spectroscopy ของสาร quercetin ที่แยกได้

HRMS (ESI): $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, Anal. Cal. 303.0505, Found. 303.0503. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 6.18 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), 6.40 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 6.88 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.53 (1H, dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6'), 7.66 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-2'), 9.33 (1H, br, OH-3), 9.38 (1H, br, OH-3')

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz) δ (ppm) 93.8 (C-8), 98.6 (C-6), 103.5 (C-10), 115.5 (C-2'), 116.1 (C-5'), 120.5 (C-6'), 122.4 (C-1'), 136.2 (C-3), 145.5 (C-3'), 147.3 (C-4'), 148.2 (C-2), 156.6 (C-9), 161.2 (C-5), 164.3 (C-7), 176.3 (C-4), 207.2 (C-1)



รูปที่ 4.8 Mass spectrum ของ F8.5 (Quercetin)

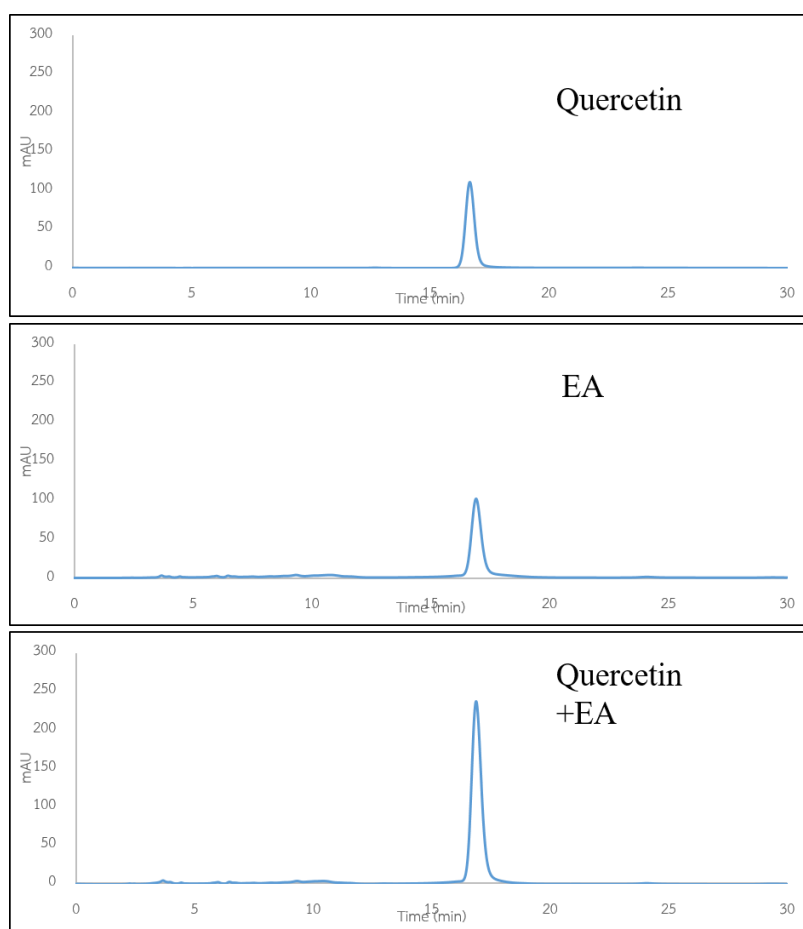
4.10 การวิเคราะห์ HPLC fingerprint ของส่วนสกัด

จากการศึกษาในข้อ 4.9 พบว่าสารในใบชาขลุ่ยที่ทำหน้าที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด คือ quercetin ผู้วิจัยจึงนำส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ยมาทำ HPLC fingerprint (รูปที่ 4.9) โดยใช้ quercetin เป็น marker โดยมีสภาวะที่ใช้ดังแสดงในตารางที่ 4-4

จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณ quercetin ในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ย โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.25 ถึง 150.0 $\mu\text{g/mL}$ และได้กราฟมาตรฐานของ quercetin ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่ามี quercetin ในส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ยและในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ย ในปริมาณ $1.48 \pm 0.10 \text{ mg/g dried weight}$ และ $106.49 \pm 3.27 \text{ mg/g dried weight}$ ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้มีแนวโน้มเดียวกับกับฤทธิ์ต้านอักเสบที่รายงานในปีที่ 1 ที่พบว่าสารสกัดน้ำใบชาขลุ่ยมีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ต่ำกว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ย (กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข, 2562) จึงเป็นหลักฐานอีกอย่างหนึ่งที่ยืนยันได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด น่าจะเป็น quercetin

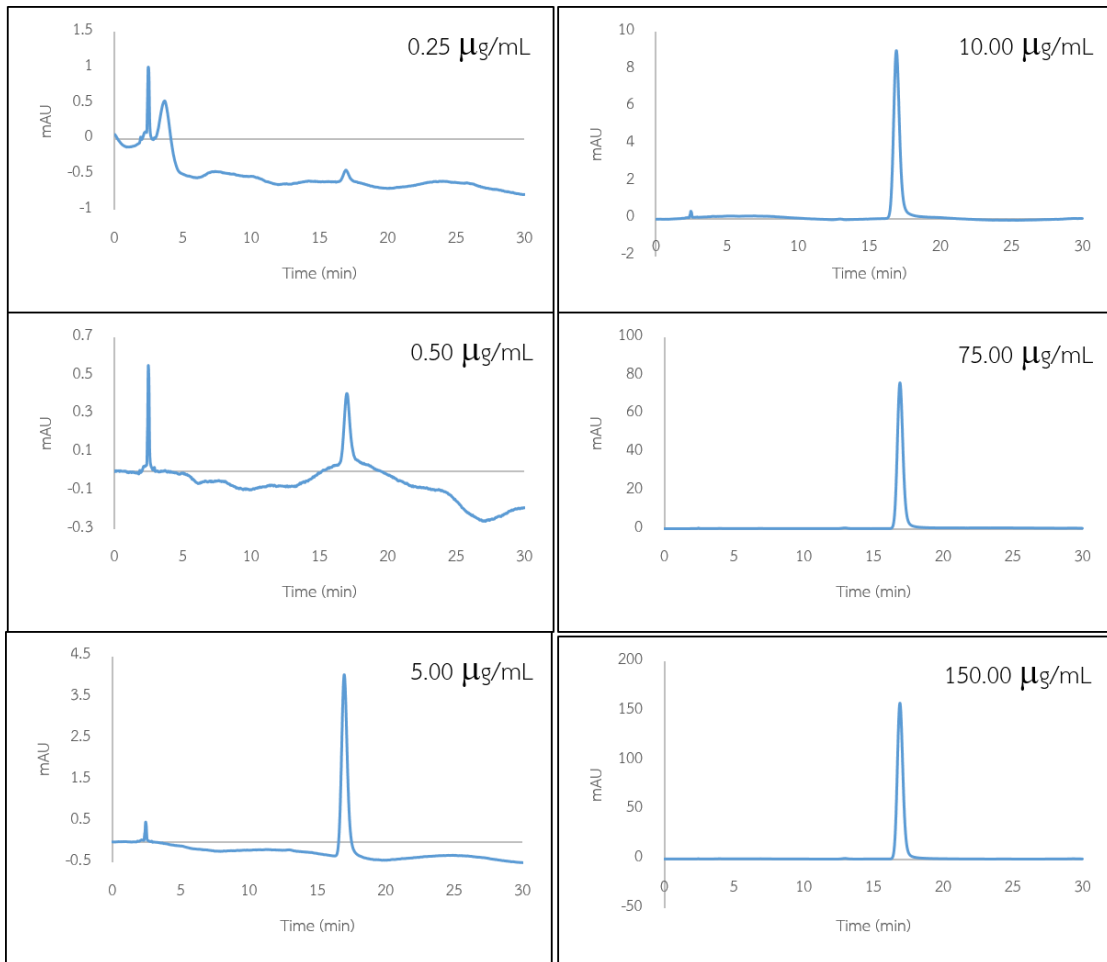
ตารางที่ 4-4 สภาวะของการทำ HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่

Model	Agilent 1260 infinity II
Sample type	Crude extract
Column	C18 (5 μ x 250 mm x 4.6 mm, 100A)
Column oven Temp.	30 °
Mobile phase	MeOH : H ₂ O (50:50)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 μ L
Detector	DAD 190-400 nm (λ = 370 nm)
Run time	30 min

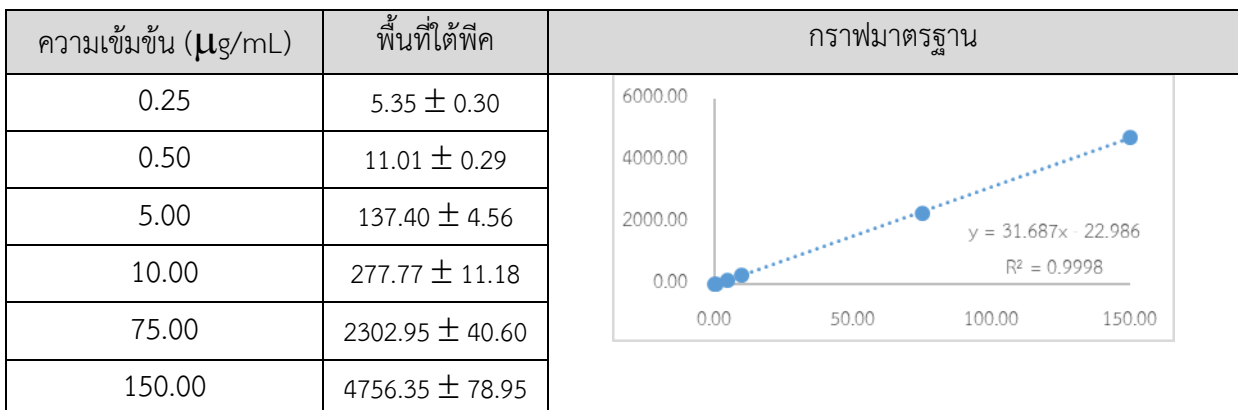


รูปที่ 4.9 HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ (EA)

(a)



(b)



รูปที่ 4.10 HPLC chromatogram ของ quercetin ที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน (a)

และกราฟมาตรฐานของ quercetin (b)

4.11 ศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชู่ที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ

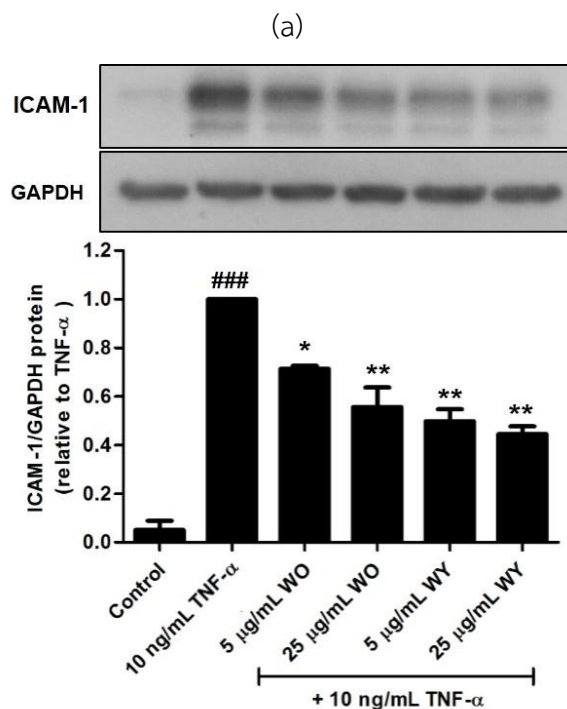
การผลิตแบบดั้งเดิมของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี ใช้ใบชู่แก่ (ใบเพสลาด) มาผลิตชาใบชู่ ในการวิจัยนี้ทำการศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชู่ โดยเปรียบเทียบชาใบชู่ที่ผลิตจากใบชู่ที่ต่างกัน 2 ระยะ คือ ใบชู่อ่อน (เหนือใบเพสลาด) และใบชู่แก่ (ใบเพสลาด) โดยกรรมวิธีดั้งเดิมของกลุ่มวิสาหกิจชุมชน ลักษณะของใบชาที่ได้ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.11



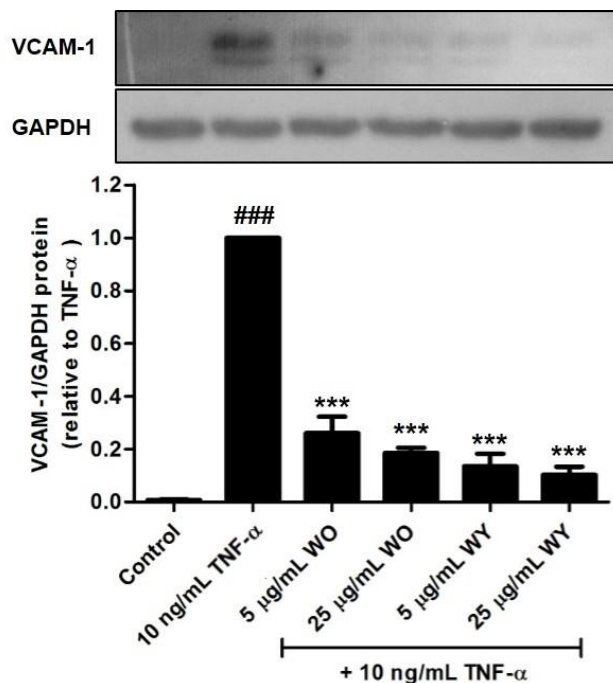
รูปที่ 4.11 ใบชาชู่อบแห้งที่ได้จากใบชู่อ่อน (เหนือใบเพสลาด) (a) และใบแก่ (ใบเพสลาด) (b)

เมื่อนำใบชาชู่ที่ได้มาเตรียมส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตต และนำมาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 พบว่าส่วนสกัดทั้งสองของใบชาชู่ทั้งหมด สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ของใบชาชู่จากใบชู่อ่อน (เหนือใบเพสลาด) มีมากกว่าใบแก่ (ใบเพสลาด) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และ 4.13 จากนั้นวิเคราะห์ HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาชู่จากใบชู่อ่อน (เหนือใบเพสลาด) และใบแก่ (ใบเพสลาด) พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4.14 และ 4.15) และมี quercetin ในปริมาณ 24.22 ± 0.28 mg/g dried weight และ 10.92 ± 0.65 mg/g dried weight ตามลำดับ ในขณะที่ใน quercetin ในส่วนสกัดน้ำใบชาชู่ของใบชู่อ่อน และใบแก่ มีค่าเท่ากับ 0.20 ± 0.03 mg/g dried

weight และ 0.14 ± 0.02 mg/g dried weight ตามลำดับ ปริมาณ quercetin ที่พบในการศึกษานี้มี ปริมาณที่ต่ำกว่าที่พบในการศึกษาข้อ 4.10 ทั้งๆ ที่เป็นใบชาชู่ที่เก็บมาจากบริเวณเดียวกัน คือ ตำบลบ่อ อ.ขลุง จ.จันทบุรี ซึ่งอาจเป็นสาเหตุจากฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวใบชู่มาผลิตชานี้มีความแตกต่างกัน โดยใบชาชู่ ที่ศึกษาในข้อ 4.10 ถูกเก็บในหน้าแล้ง (พฤศจิกายน) และชู่ที่ใช้ในการศึกษากระบวนการผลิตชานี้ถูกเก็บ ในช่วงฤดูฝน (สิงหาคม) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ quercetin ในใบชู่จากประเทศอินโดนีเซียที่มีประมาณ 0.05 mg/g dried weight ซึ่งมีปริมาณที่ต่ำกว่าที่พบในประเทศไทย ดังนั้นแหล่งหรือภูมิประเทศที่ต้นชู่ เติบโตก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ไม่เท่ากัน (Traithip, 2005; Andarwulan et al., 2010; Kongkiatpaiboon et al., 2018) นอกจากนี้ผลการศึกษาของเรายังสอดคล้องกับการศึกษา Vongsak et al., (2018) ที่พบว่าส่วนของใบอ่อนประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าใบแก่ อย่างไรก็ตามผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าการผลิตชาใบชู่สามารถนำส่วนของใบอ่อน (เหนือใบเพศลวด) มาผลิตเป็น ชาร่วมกับใบแก่ (ใบเพศลวด) ซึ่งส่วนที่ใช้ในวิธีการดั้งเดิม ซึ่งยังคงให้ได้ชาที่มีลักษณะเหมือนกับชาใบแก่ และมีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ไม่แตกต่างกัน

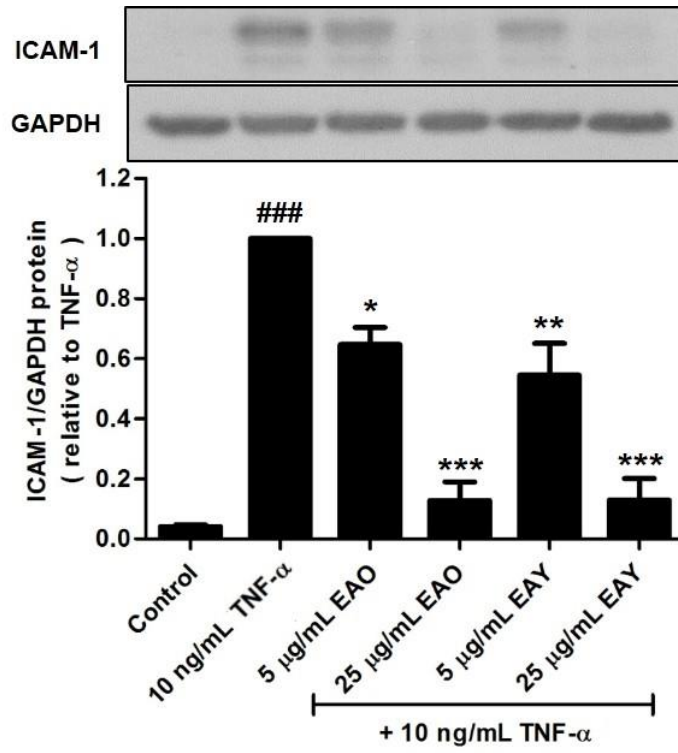


(b)

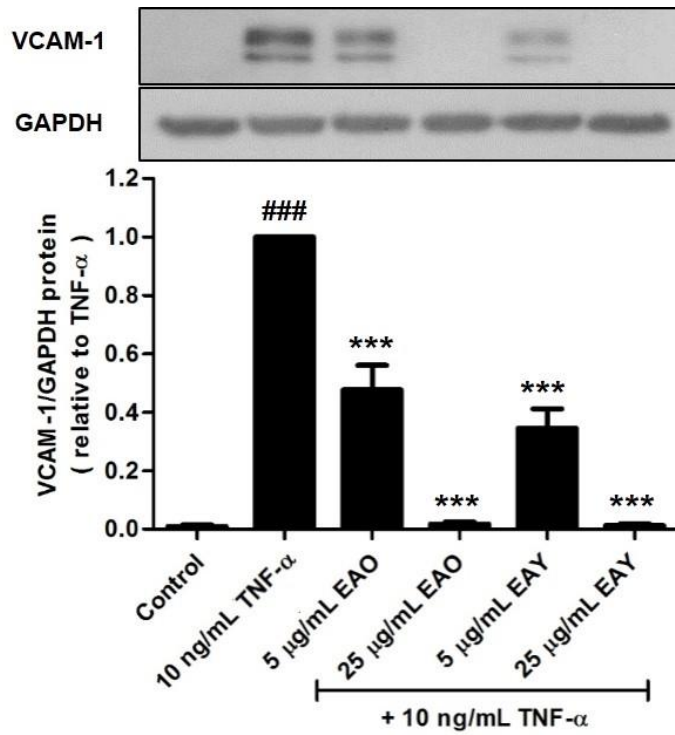


รูปที่ 4.12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot เซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดน้ำของใบชาขลุ้ใบแก่ (WO) และใบอ่อน (WY) ที่ความเข้มข้น 5 μg/mL และ 25 μg/mL 1 ชั่วโมง แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF-α ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL นาน 6 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 หลังจาก normalized ด้วยโปรตีน GAPDH ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ###p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ *p < 0.05 **p < 0.01 และ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF-α เพียงอย่างเดียว

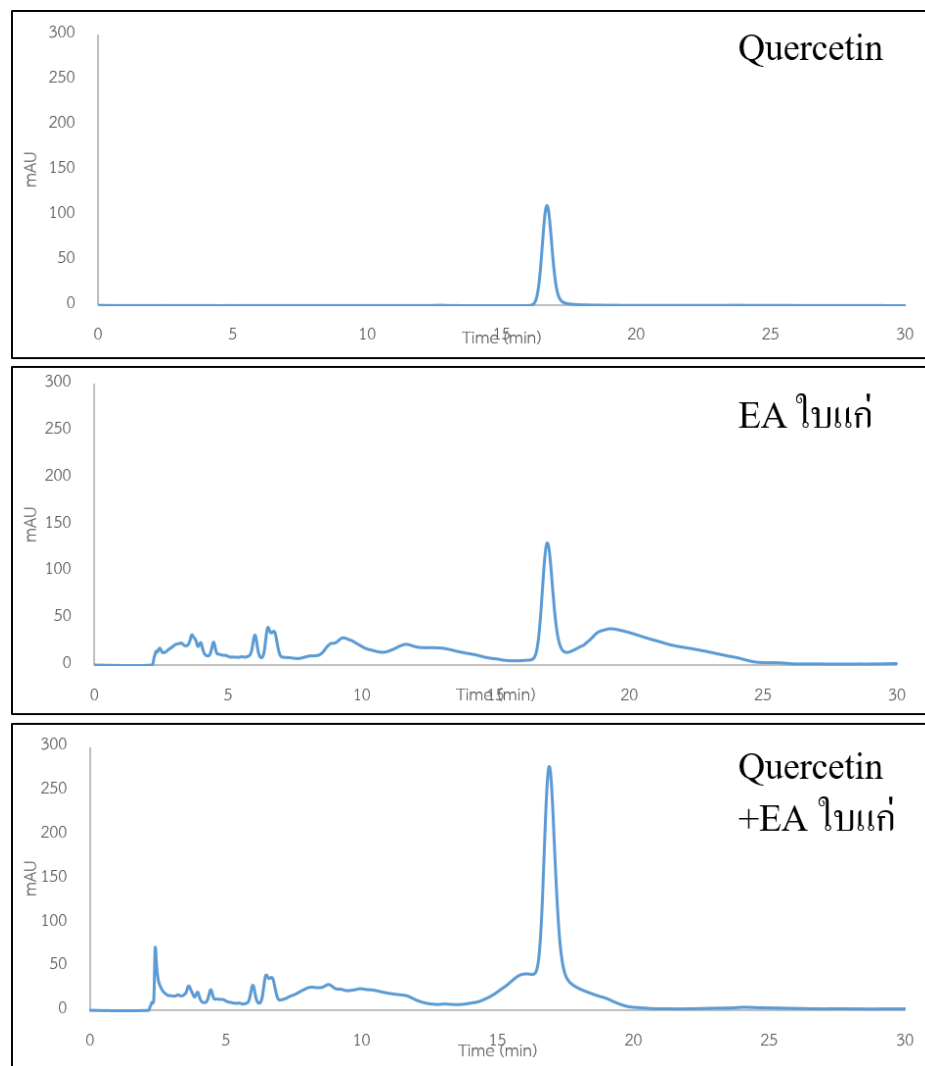
(a)



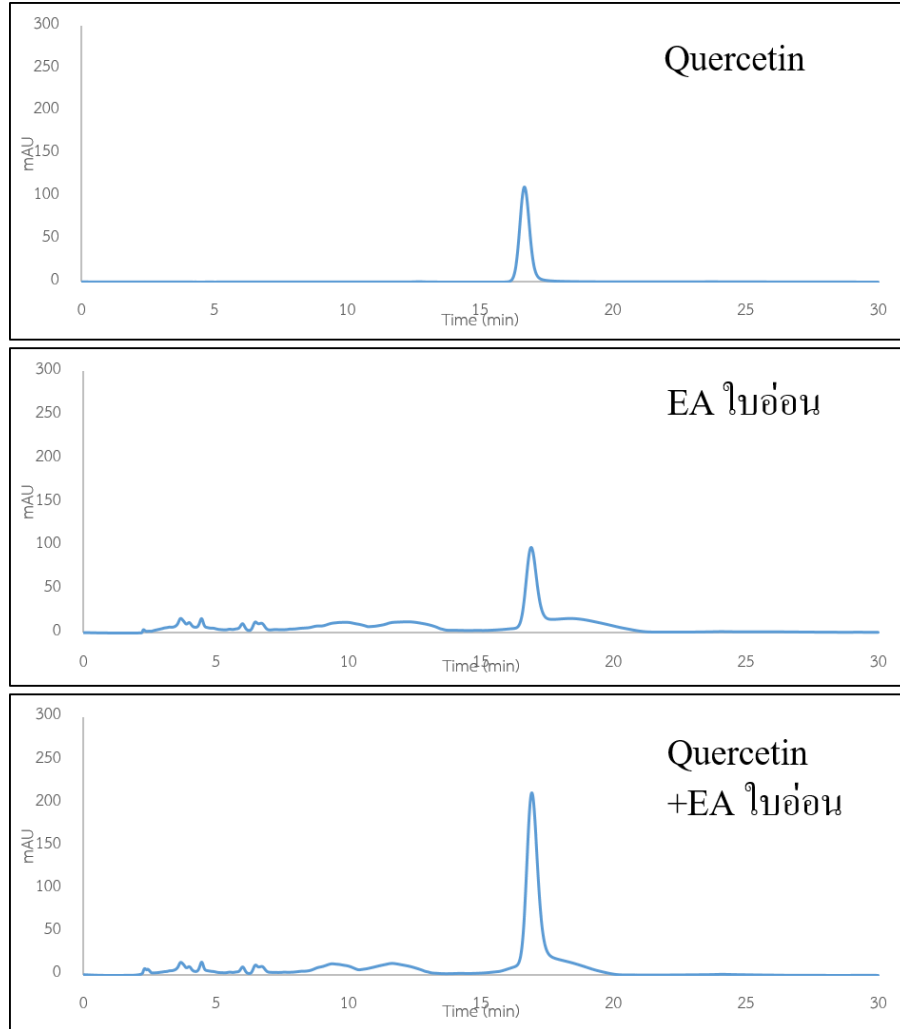
(b)



รูปที่ 4.13 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ICAM-1 (a) และ VCAM-1 (b) โดยวิธี Western blot เซลล์เยื่อหลอดเลือดมนุษย์ EA.hy926 ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุใบแก่ (EAO) และใบอ่อน (EAY) ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1 ชั่วโมง แล้วถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α ที่ความเข้มข้น 1 ng/mL นาน 6 ชั่วโมง กราฟแสดงปริมาณโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 หลังจาก normalized ด้วยโปรตีน GAPDH ซึ่งวิเคราะห์ผลความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม Image Studio Lite เวอร์ชัน 5.2 ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 2 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน ###p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม และ *p < 0.05 **p < 0.01 และ***p < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย TNF- α เพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4.14 HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุใบแก่



รูปที่ 4.15 HPLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ้ใบอ่อน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ส่วนสกัดย่อยเฮกเซน และส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ในเซลล์ human endothelial EA.hy926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
2. ทำการแยกส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ ซึ่งเป็นส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด โดยแฟลชคอลัมน์ได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน 8 ส่วนสกัด
3. ทำการแยกส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่ ซึ่งเป็นส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ดีที่สุด โดยคอลัมน์ Sephadex LH20 ได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน 5 ส่วนสกัด และสามารถแยก quercetin ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์ human endothelial EA.hy926 ที่ถูกกระตุ้นด้วย TNF- α โดยวิธี bioassay-guided isolation จากส่วนสกัดย่อย 8.5
4. ทำการวิเคราะห์ HPLC fingerprint ของส่วนสกัดจากใบชาขลุ่ โดยใช้ quercetin เป็น marker และวิเคราะห์ปริมาณ quercetin ในส่วนสกัดน้ำใบชาขลุ่และในส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของใบชาขลุ่ ในปริมาณ 1.48 ± 0.10 mg/g dried weight และ 106.49 ± 3.27 mg/g dried weight ตามลำดับ
5. การผลิตชาใบขลุ่จากส่วนของใบอ่อน (เหนือใบเพสลาด) และการผลิตชาจากใบแก่ (ใบเพสลาด) ซึ่งส่วนที่ใช้ในวิธีการดั้งเดิม ให้ชาที่มีลักษณะเหมือนกับชาใบแก่ และมีฤทธิ์ต้านอักเสบที่ไม่แตกต่างกัน

ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตตของส่วนสกัดน้ำจากชาใบขลุ่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเป็นการผลิต dietary supplement ที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบในหลอดเลือด โดยสารที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบนี้คือ quercetin ซึ่งสามารถใช้เป็นสารควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดจากใบชาขลุ่ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าใบขลุ่ที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกัน 2 ช่วงเวลา จะมีปริมาณสารออกฤทธิ์ที่ต่างกัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของฤดูกาลที่ใช้เก็บใบขลุ่ต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใบขลุ่

บรรณานุกรม

- กล่าวขวัญ ศรีสุข และเอกรัฐ ศรีสุข. (2556). การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบเร่วหอม: มูลค่าเพิ่มจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550a). พืชสมุนไพรในสวนป่าสมุนไพรเขาหินซ้อน ฉบับสมบูรณ์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เจตนารมณัณท์ ปราจีนบุรี. 301น.
- พงศักดิ์ พลเสนา. (2550b). เร่วหอมพันธุ์ไม้ชนิดใหม่ของไทย และรายงานการพบ “ผลเร่วหอม” ครั้งแรก. หมายเหตุนิเวศวิทยา: บันทึกธรรมชาติหลากหลายพันธุ์. ปีที่ 1 ฉบับที่ 4, 25-26.
- รายการเขตรนำรัฐ. พืชสมุนไพร เร่วหอม. สถานีโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 7. 28 ตุลาคม 2553.
- ภาณุวัฒน์ ปานเกตุ จุรีพร คงประเสริฐ นิตยา ภัทรกรรม นงนุช ตันติธรรม ศุภวรรณ มโนสุนทร และพัชริยา ยิ่งอินทร์ (มปป) รายงานการพยากรณ์โรคและภัยสุขภาพ สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- วารสารเคหเกษตร. เร่วหอม สมุนไพรที่ขยายพันธุ์ ปลูก และแปรรูป ไม่ยาก.
http://www.kehakaset.com/index.php?option=com_content&view=article&id=222:2011-04-11-02-29-41&catid=38. สืบค้นวันที่ 26 กันยายน 2554.
- ศกวรรณ แก้วกลิ่น และ นิตยา พันธุ์เวทย์. (มปป) ประเด็นรณรงค์วันหัวใจโลก ปี พ.ศ. ๒๕๕๔. สำนักโรคไม่ติดต่อ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2551). การค้นหาสารที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบในสมุนไพรจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- เอกรัฐ ศรีสุข และกล่าวขวัญ ศรีสุข. (2555). การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 357:593-615.
- Andarwulan A, Batari R, Sandrasari DA, Bolling B, Wijaya H. (2010). Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem*. 121: 1231-1235.

- Cardoso LS, Araujo MI, Góes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact.* 6: 1. doi: 10.1186/1475-2859-6-1.
- Fleming I, Busse R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284: R1–R12.
- 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. *J Pharmacol Exp Ther.* 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. *Cell Mol Life Sci.* 64(13):1715-22.
- Kongkiatpaiboon S, Chewchinda S, Vongsak B. (2018). Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand. *REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA-BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACOGNOSY.* 28: 145-150.
- Li, H., and Förstermann, U. (2013). Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology.* 13:161–167
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. (2002). Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 7: 132–147.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology.* 15:323-350.

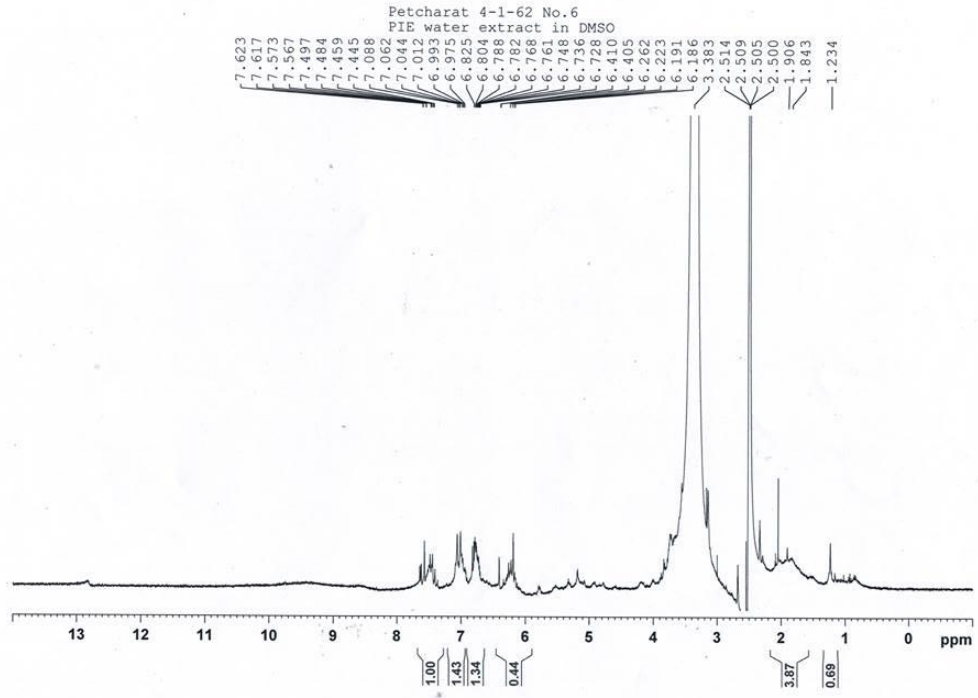
- Manning, B.D., Cantley, C.L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129, 1261-1274.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 1998. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 408 Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD (The Organisation of Economic Co-operation and Development), 2001. The OECD guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
- 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. *Pharmacogn. Mag.* 13, s230-s235.
- 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.
- Stoner, L., Lucero, A.A., Palmer, B.R., Jones, L.M., Young, J.M., Faulkner, J. (2013). Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 46: 1353–1371.
- Traithip A. (2005). Phytochemistry and antioxidant activity of *Pluchea Indica*. Thesis in Master of Science (Pharmacognosy), Mahidol University.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 196(2):193-222.
- Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Kornsap K. (2018). Comparison of active constituents, antioxidant capacity, and α -glucosidase inhibition in *Pluchea indica* leaf extracts at different maturity stages. *Food Biosci.* 25: 68-73.

- Wang J.; Gao H.; Zhao J.; Wang Q.; Zhou L.; Han J.; Yu Z.; Yang F. (2010). Preparative separation of phenolic compounds from *Halimodendron halodendron* by high-speed counter-current chromatography. *Molecules* 15, 5998-6007.
- Wattanapitayakul SK, Suwatronnakorn M, Chularojmontri L, Herunsalee A, Niumsakul 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.
- World Health Organization. World Health Statistics 2012. All rights reserved. Publications of the World Health Organization are available on the WHO web site (www.who.int)
- Xia, N., Förstermann, U., Li, H. (2014). Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 19, 16102-16121.
- 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.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002). Oxidation of the zinc–thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*. 109: 817–826.
- Zong, Y., Sun, L., Liu, B., Deng, Y-S., Zhan, D., Chen, Y-L., He, Y., Liu, J., Zhang, Z-J., Sun, J., Lu, D. (2012). Resveratrol Inhibits LPS-Induced MAPKs Activation via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway in Murine RAW 264.7 Macrophage Cells. *PloS One*. 7, 1-13.

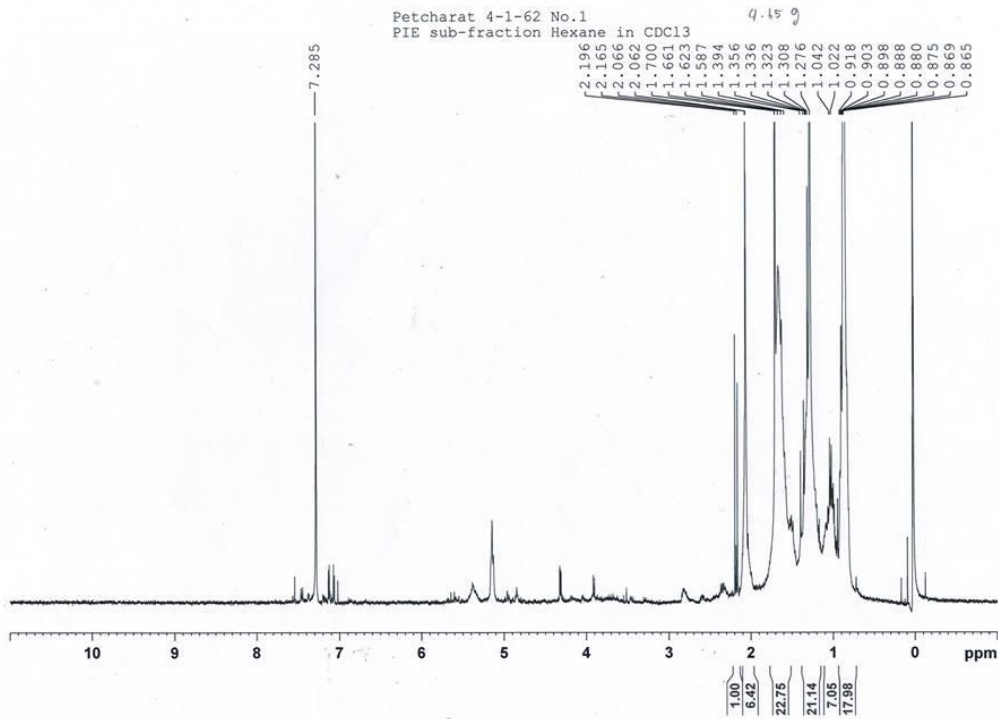
ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัยนี้บางส่วน อยู่ในระหว่างการเตรียมบทความสำหรับนำไปเสนอเพื่อพิจารณาตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ “Inflammopharmacology”
2. ผลการศึกษาที่ได้เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากการศึกษาแยกสารประกอบในชาใบชู่ที่เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอักเสบในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดของสารสกัดจากใบชู่เพื่อใช้เป็นสารที่ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบชู่ และศึกษาปัจจัยในกระบวนการผลิตชาใบชู่ที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบชู่ นำไปสู่การเพิ่มรายได้ของกลุ่มวิสาหกิจชุมชนตำบลบ่อ อำเภอลำลูก จังหวัดจันทบุรี

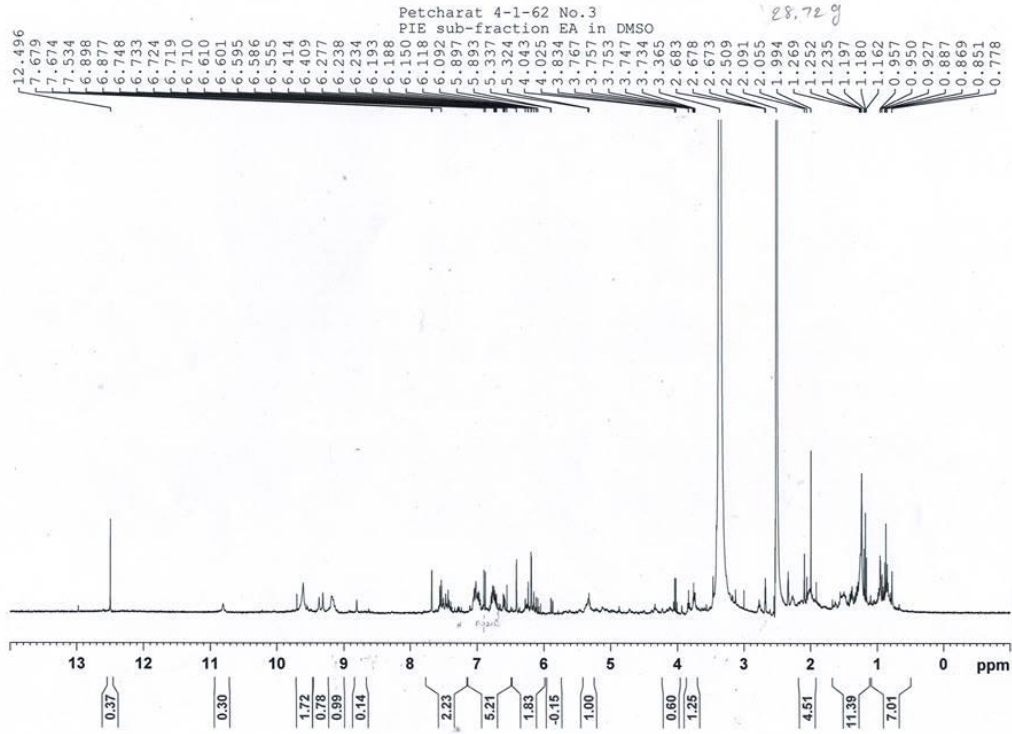
ภาคผนวก



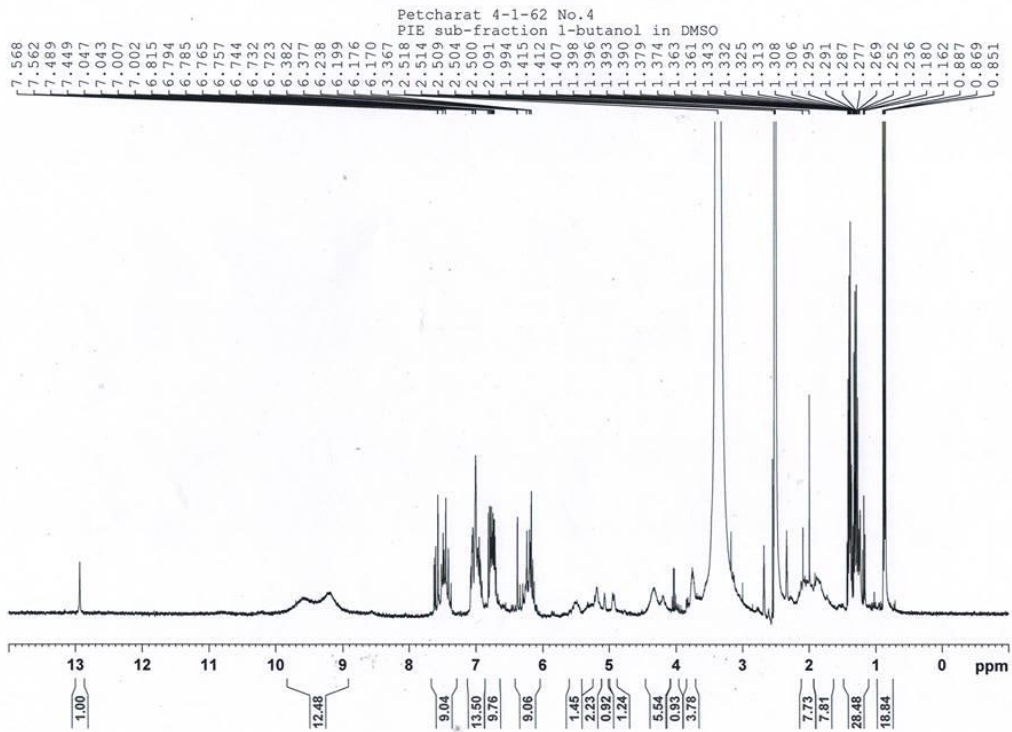
สารสกัดน้ำใบชาขลุ่



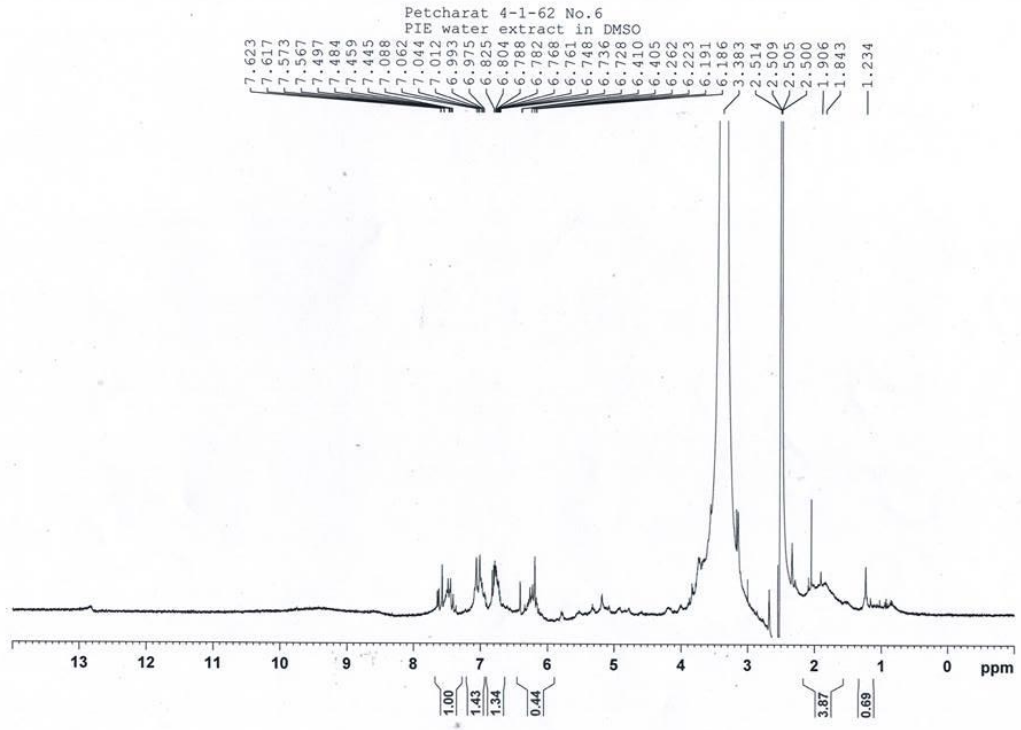
ส่วนสกัดเฮกเซน



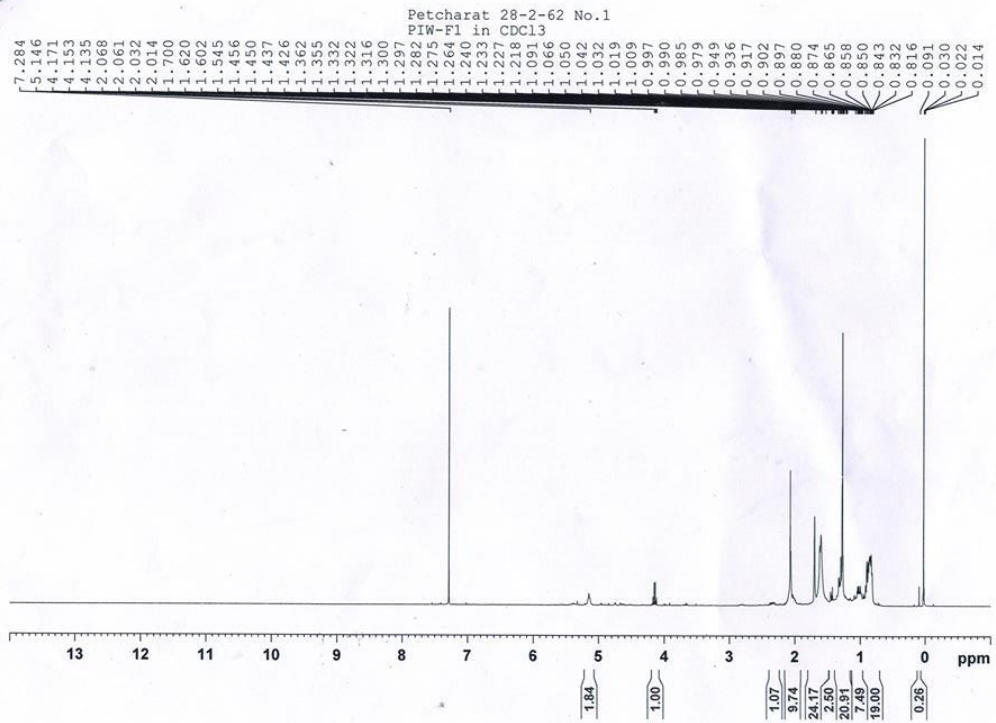
ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตต



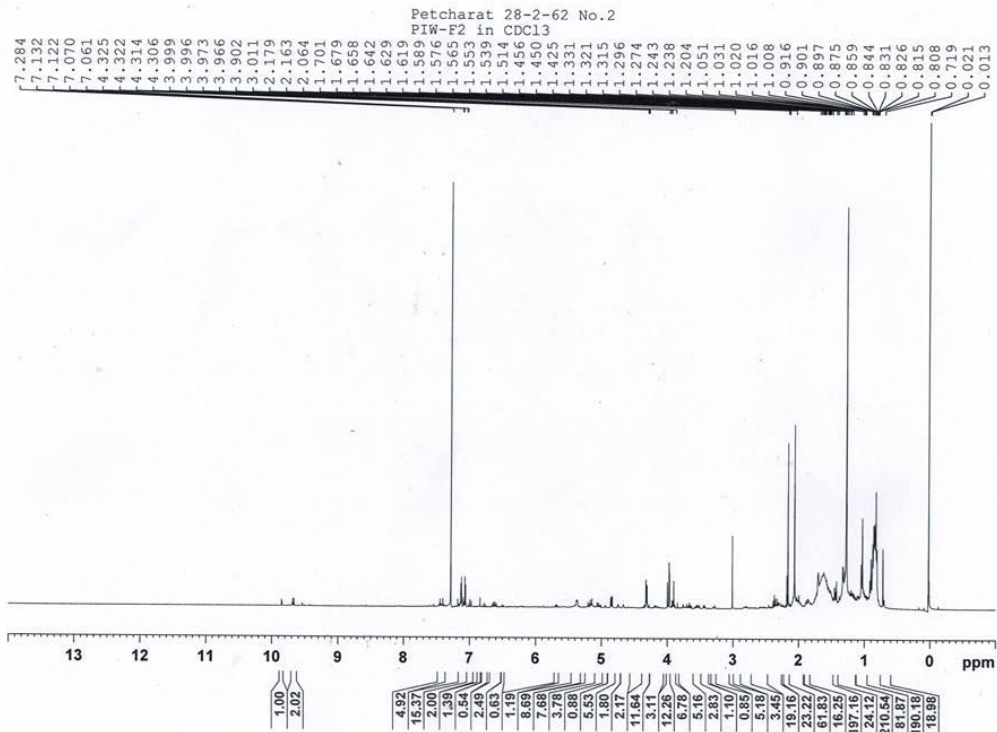
ส่วนสกัด 1-บิวทานอล



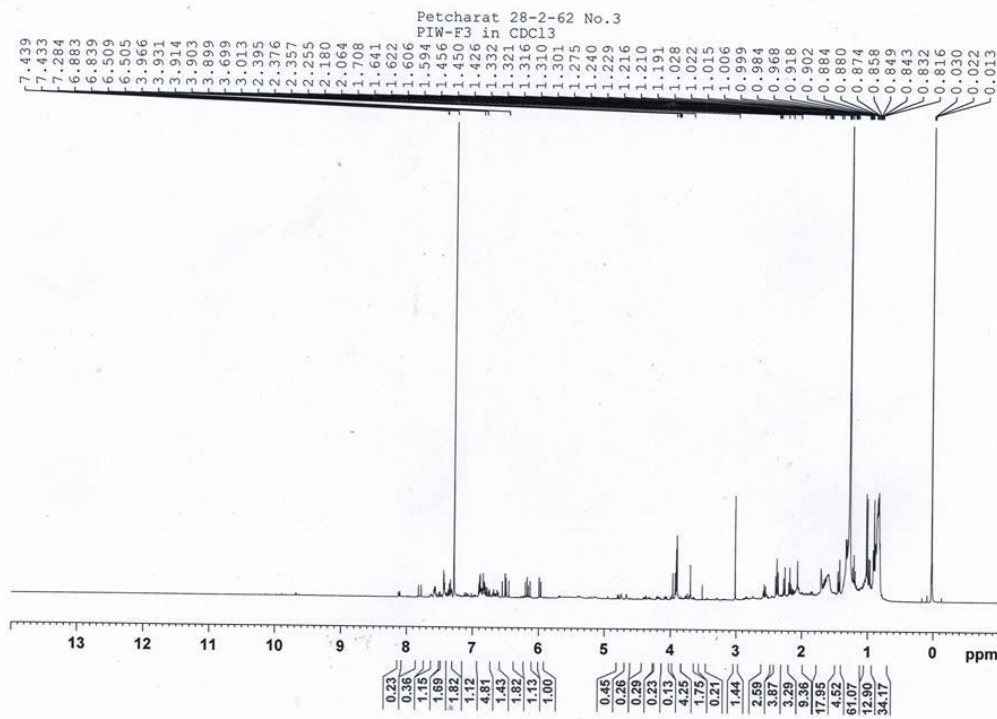
ส่วนสกัดน้ำ



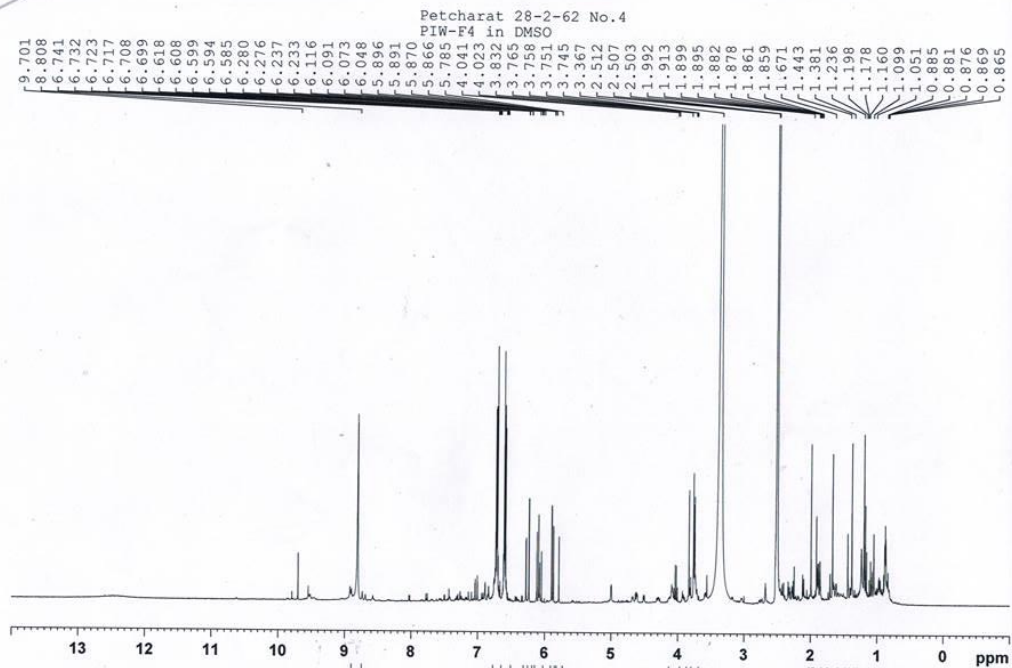
ส่วนสกัดย่อย F1



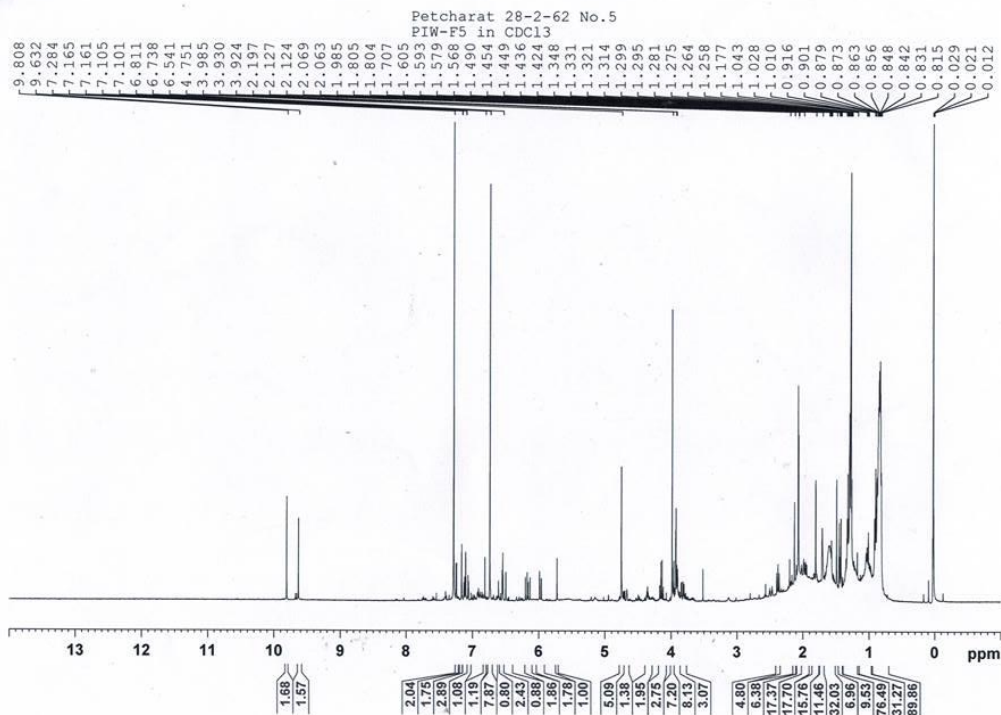
ส่วนสกัดย่อย F2



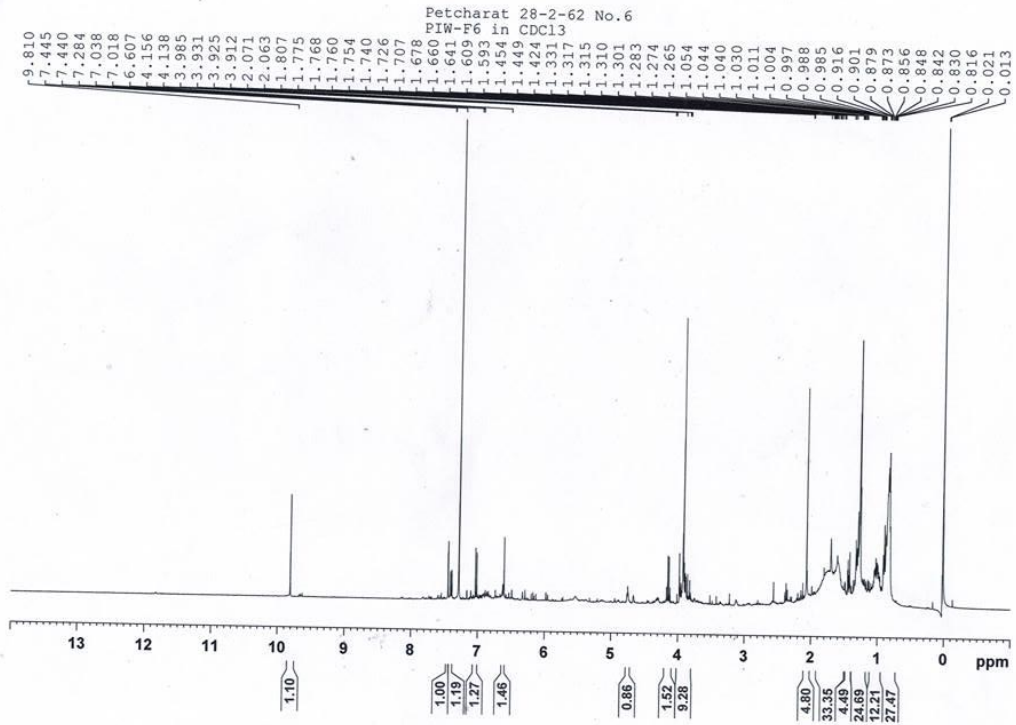
ส่วนสกัดย่อย F3



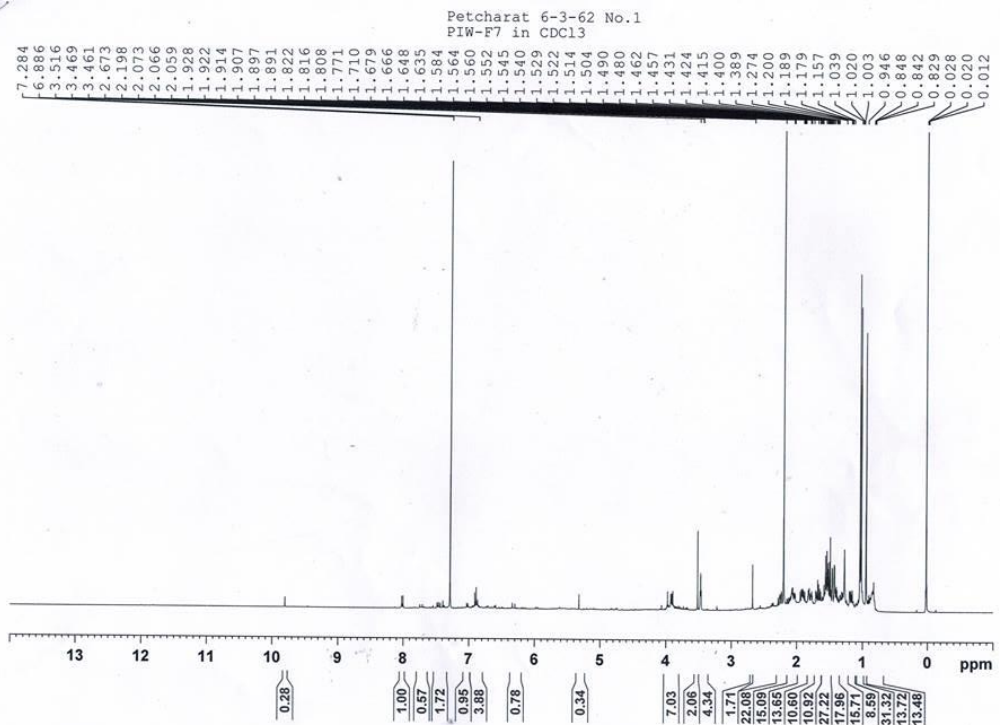
ส่วนสกัดย่อย F4



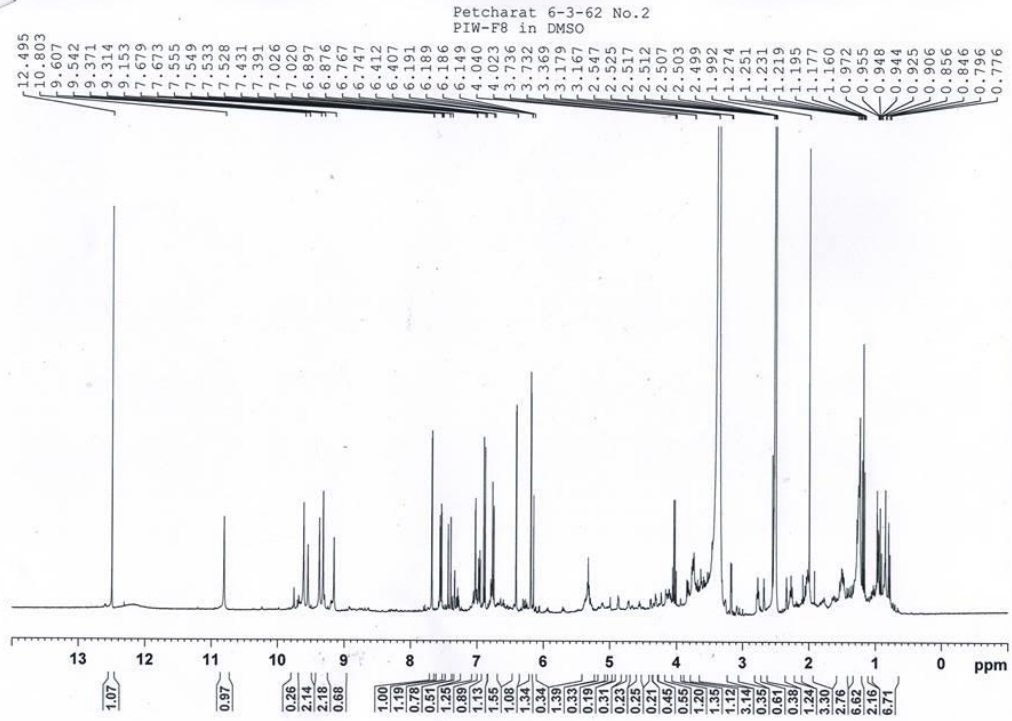
ส่วนสกัดย่อย F5



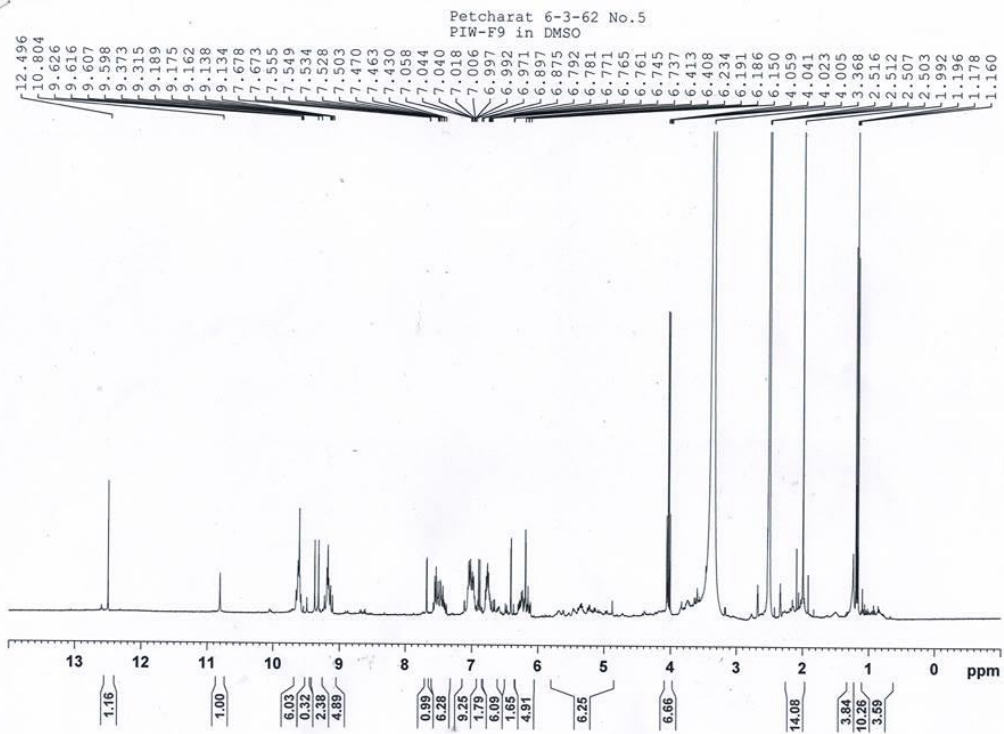
ส่วนสกัดย่อย F6



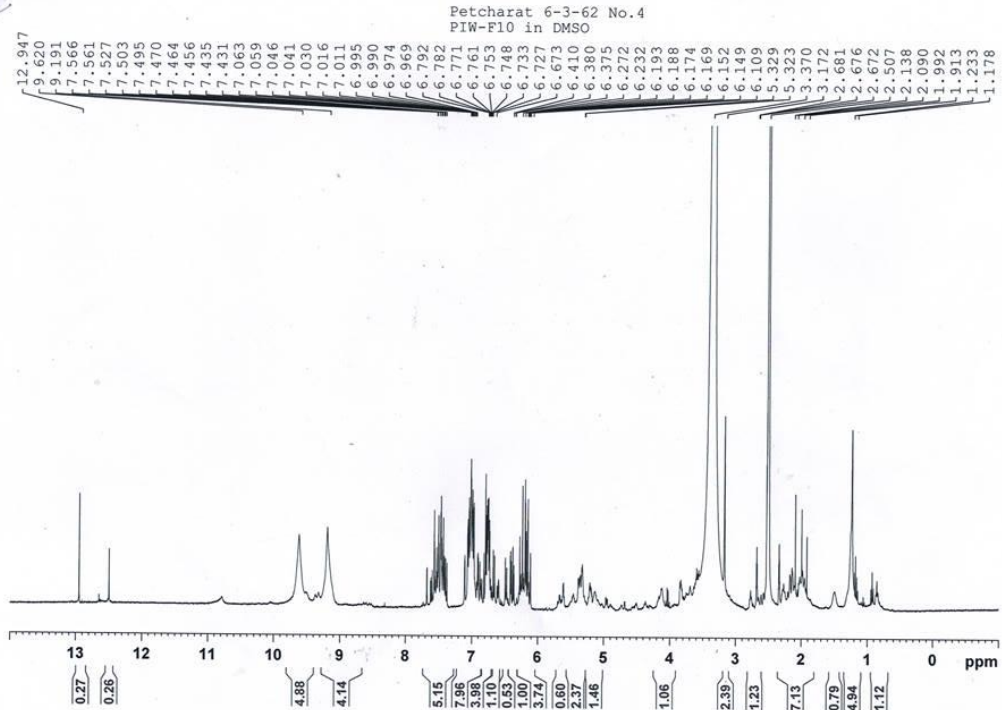
ส่วนสกัดย่อย F7



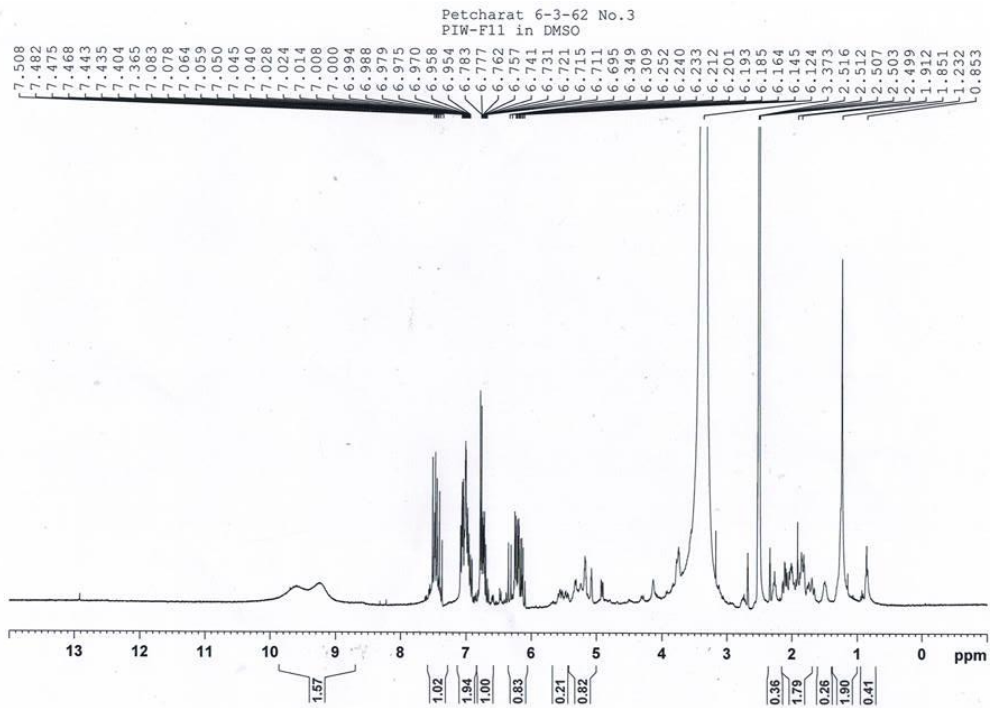
ส่วนสกัดย่อย F8



ส่วนสกัดย่อย F9

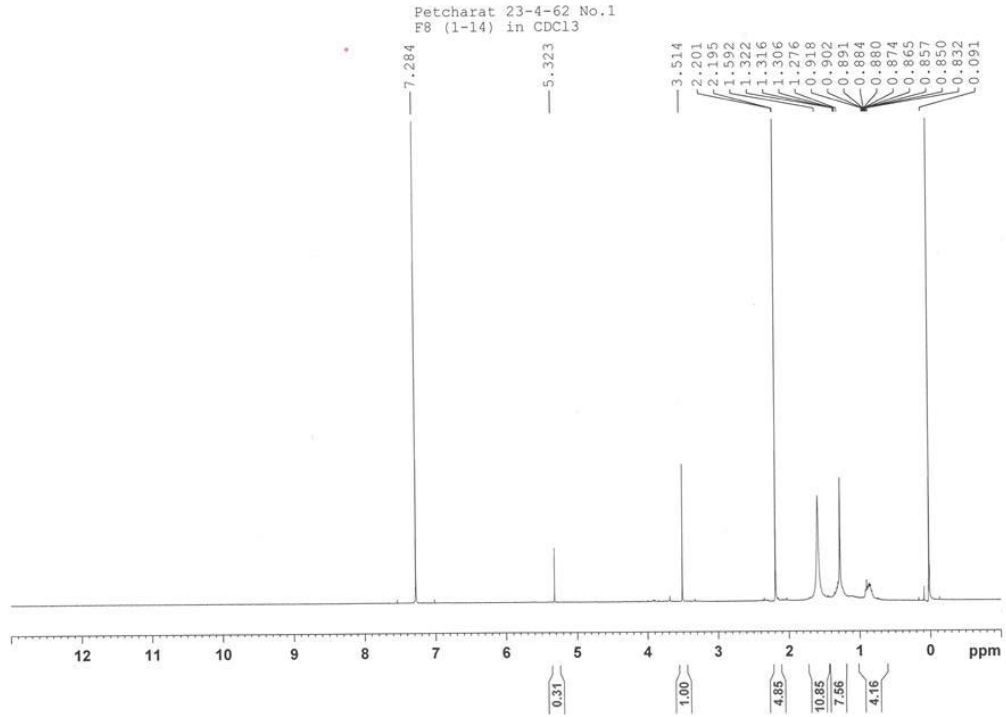


ส่วนสกัดย่อย F10



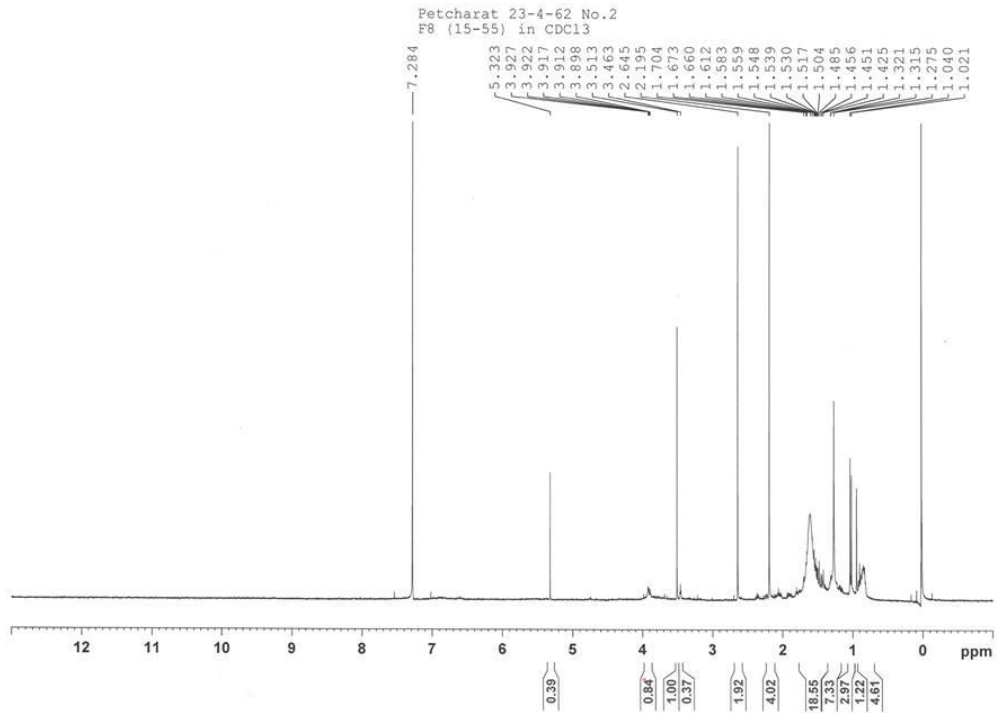
ส่วนสกัดย่อย F11

F8.1

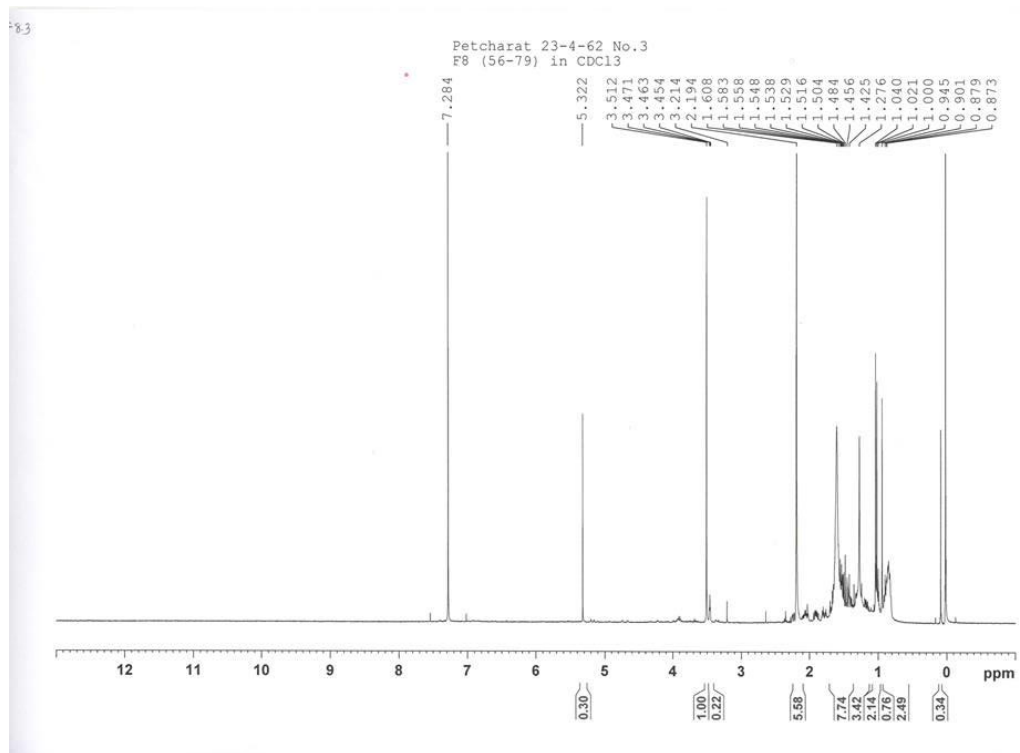


ส่วนสกัดย่อย F8.1 (แฟลชคอลัมน์)

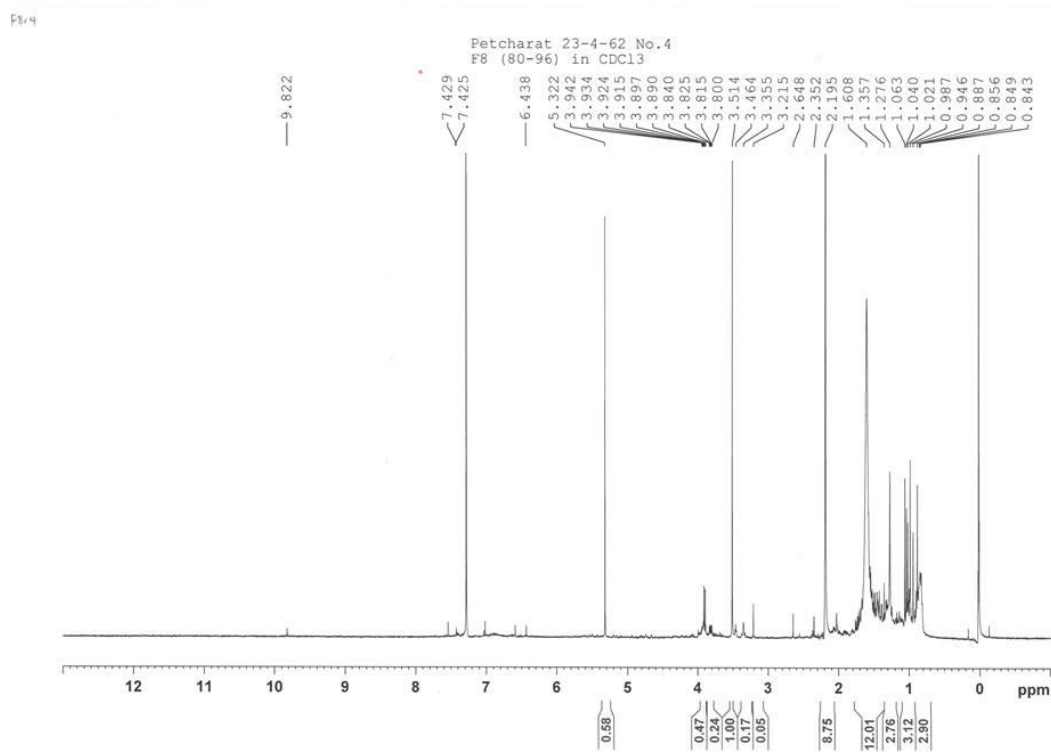
2



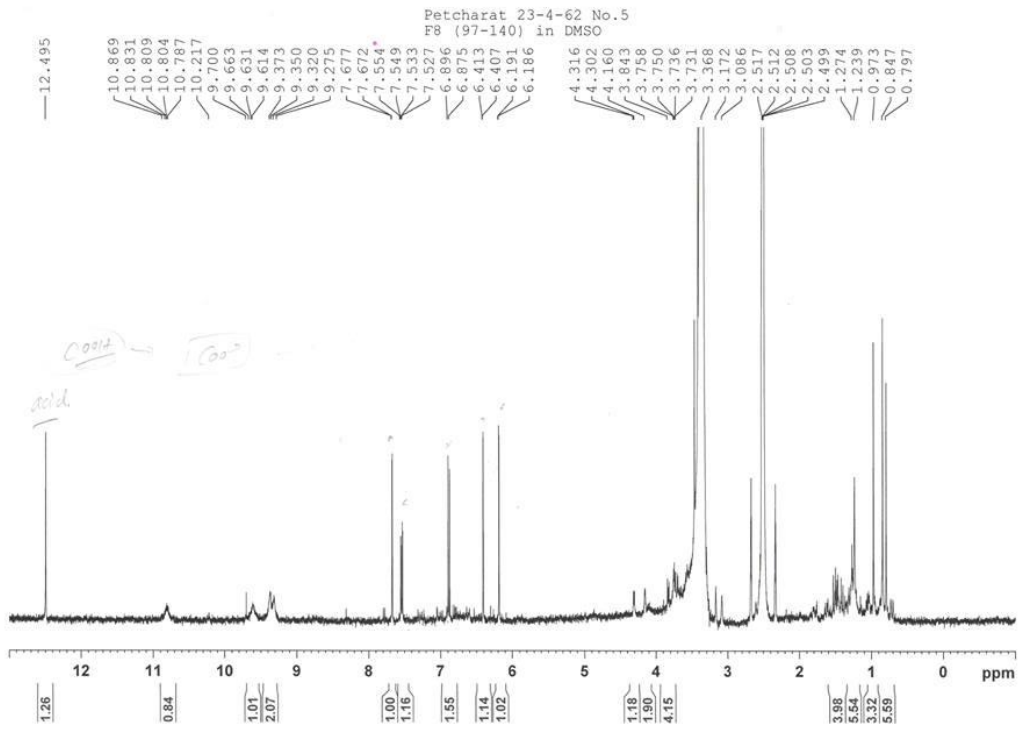
ส่วนสกัดย่อย F8.2 (แฟลชคอลัมน์)



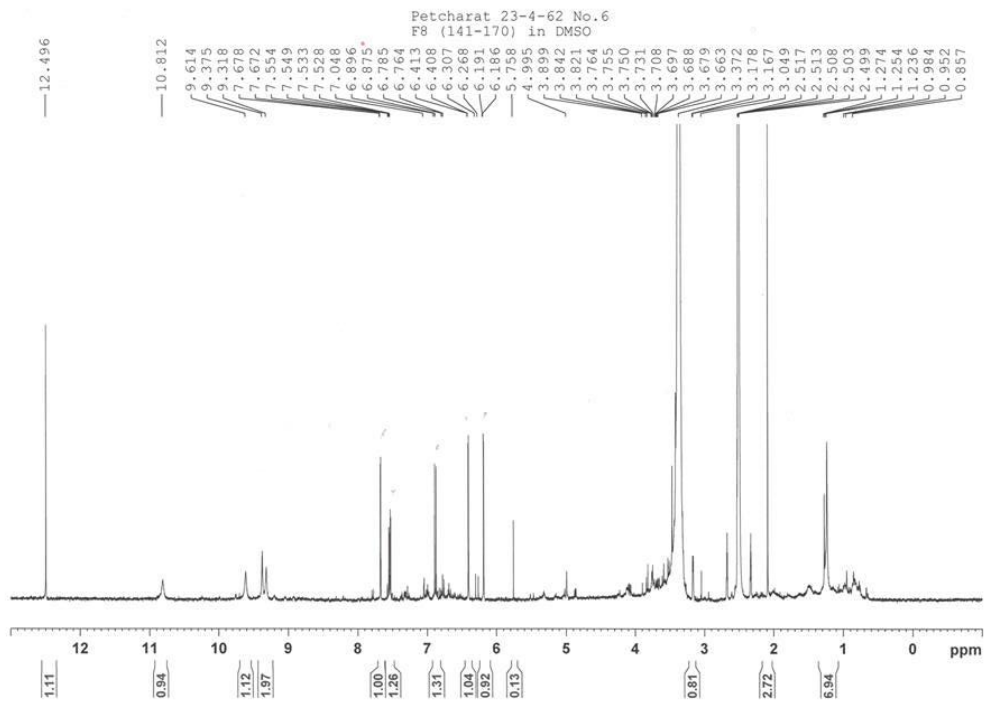
ส่วนสกัดย่อย F8.3 (แฟลชคอลัมน์)



ส่วนสกัดย่อย F8.4 (แฟลชคอลัมน์)

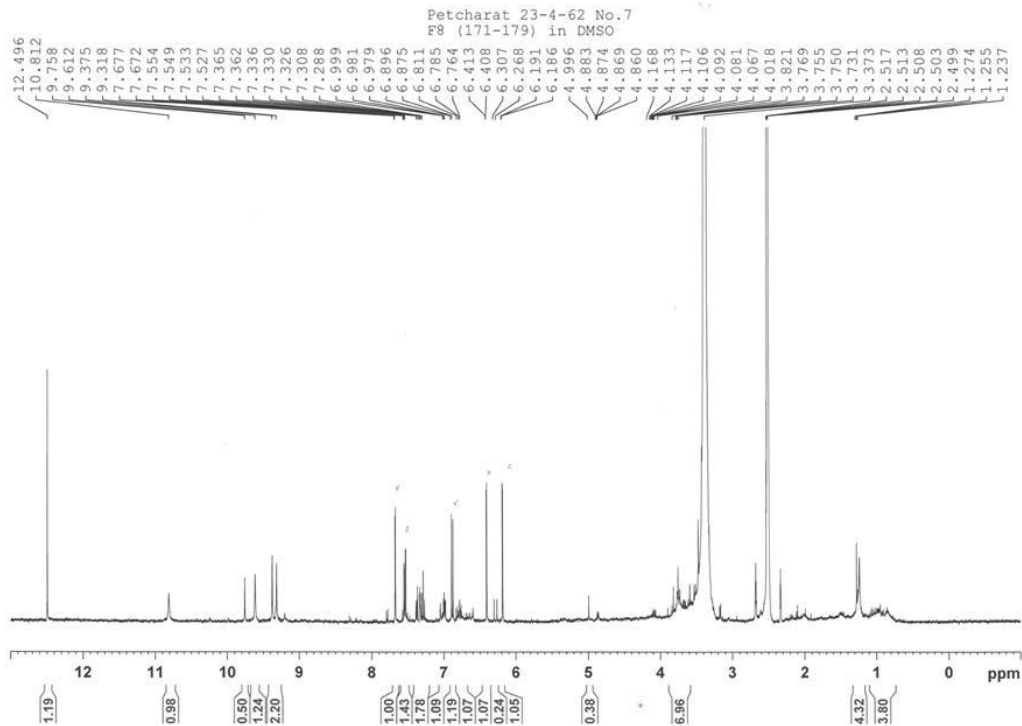


ส่วนสกัดย่อย F8.5 (แฟลชคอลัมน์)



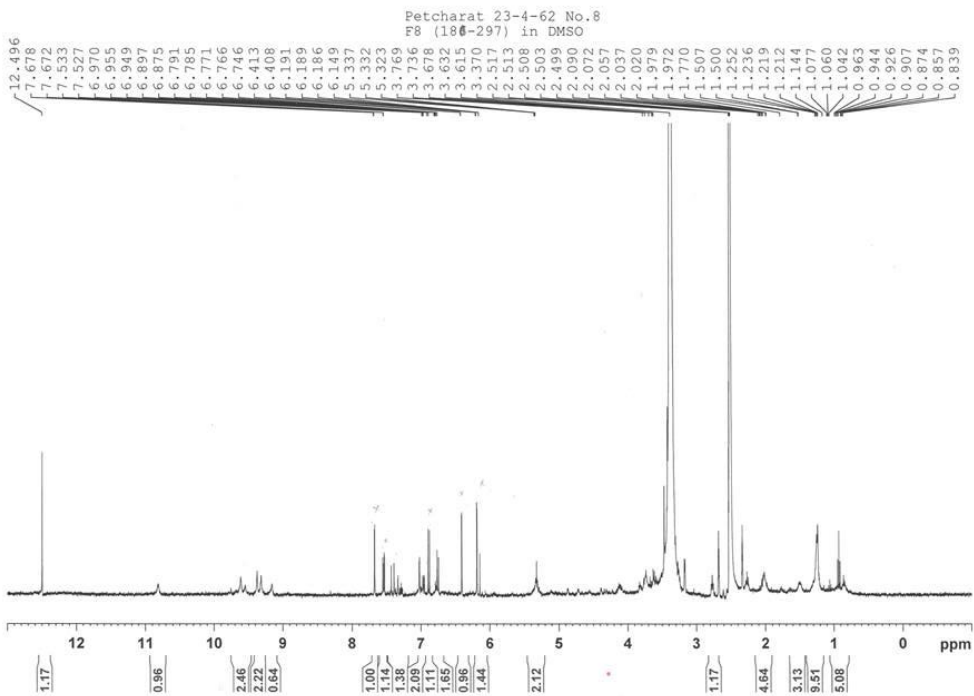
ส่วนสกัดย่อย F8.6 (แฟลชคอลัมน์)

F8.7

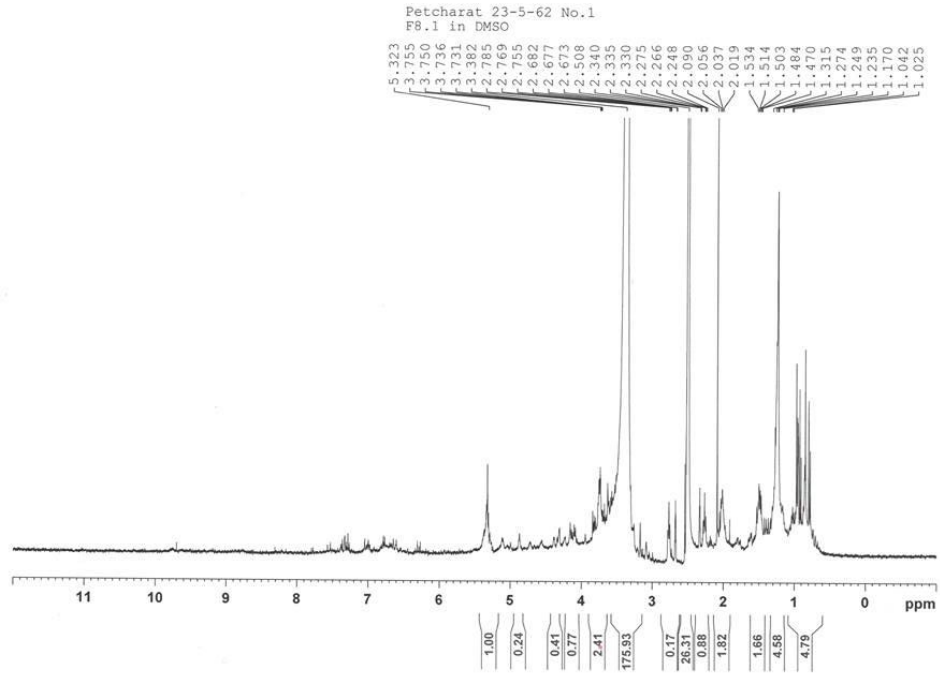


ส่วนสกัดย่อย F8.7 (แฟลชคอลัมน์)

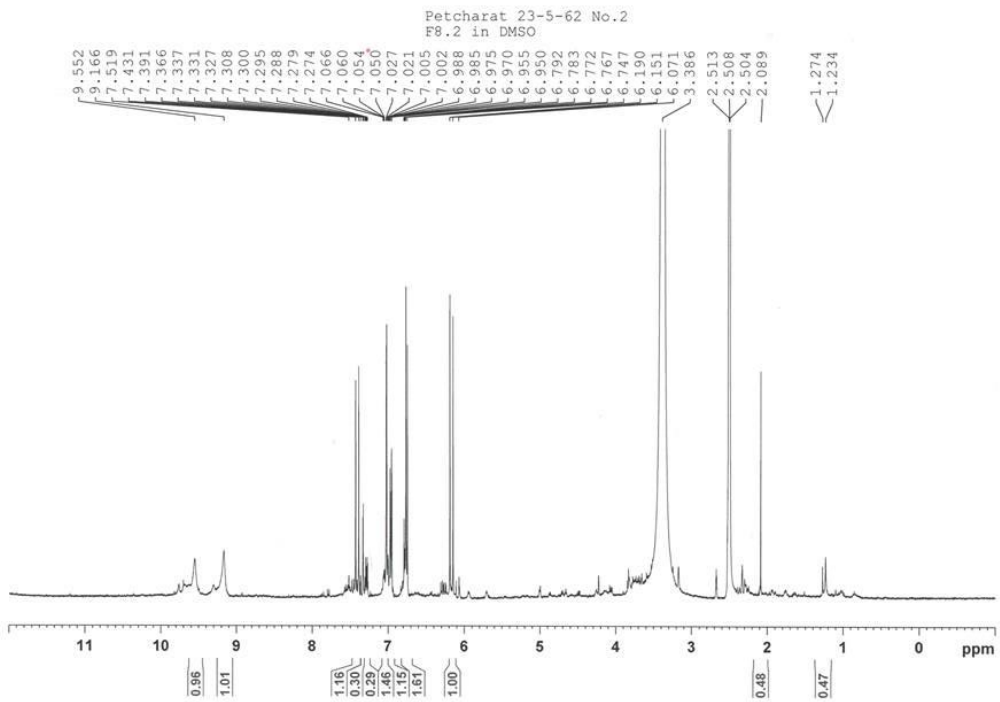
F8.8



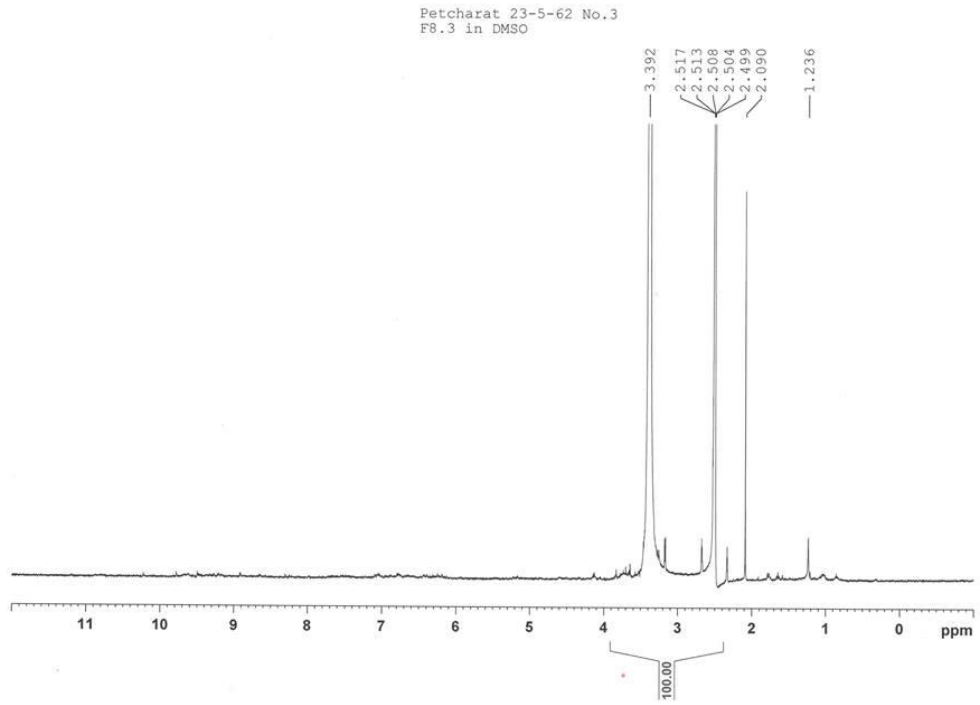
ส่วนสกัดย่อย F8.8 (แฟลชคอลัมน์)



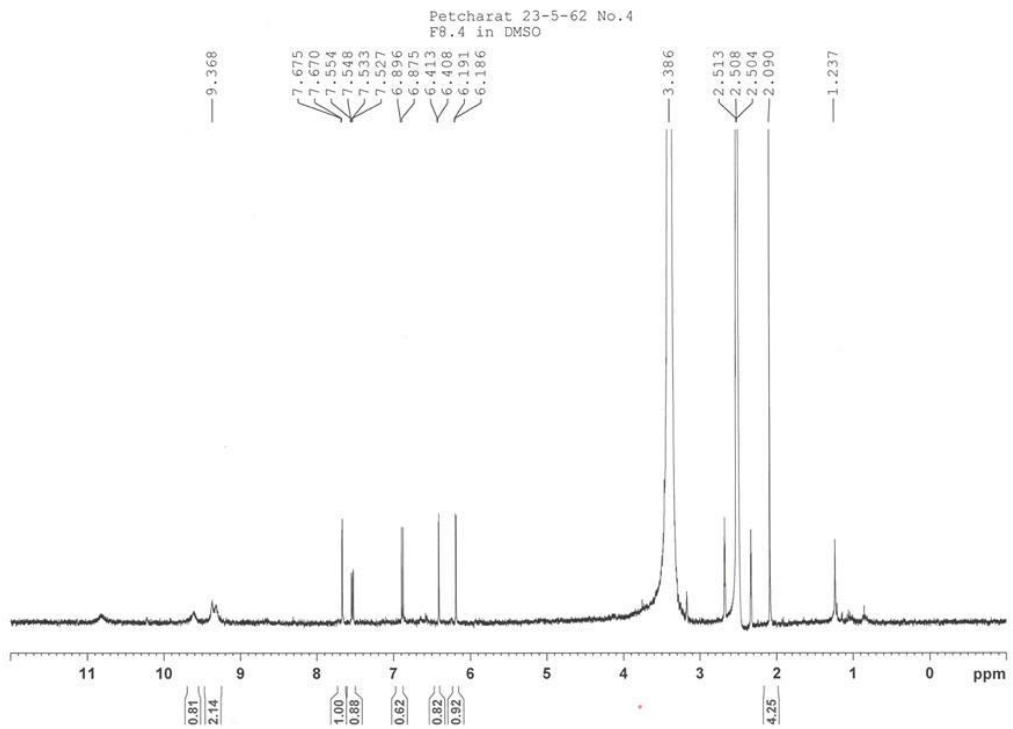
ส่วนสกัดย่อย F8.1 (Sephadex LH 20)



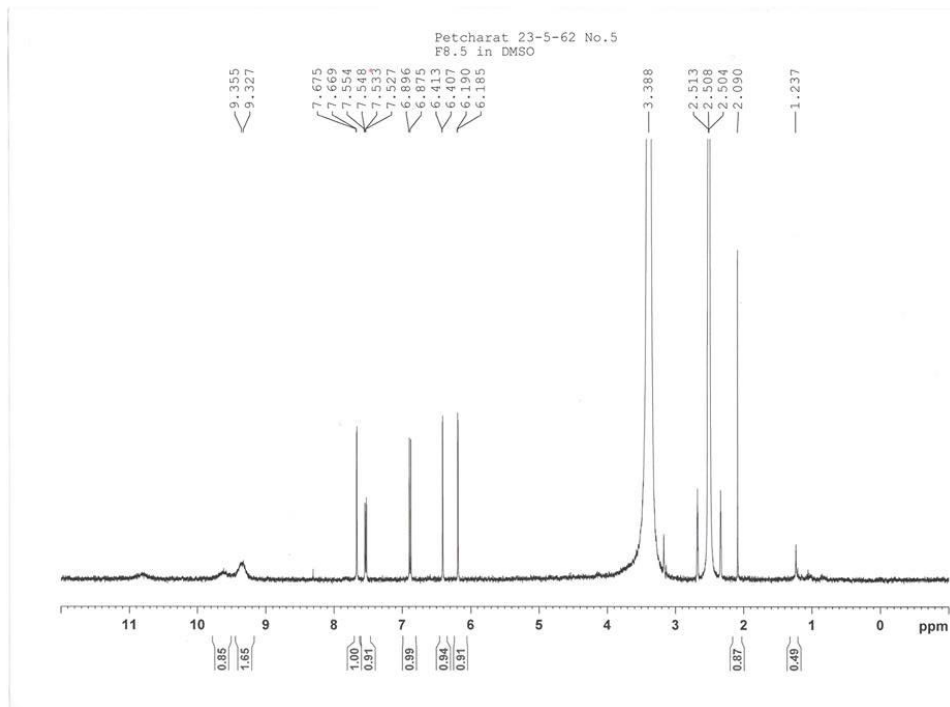
ส่วนสกัดย่อย F8.2 (Sephadex LH 20)



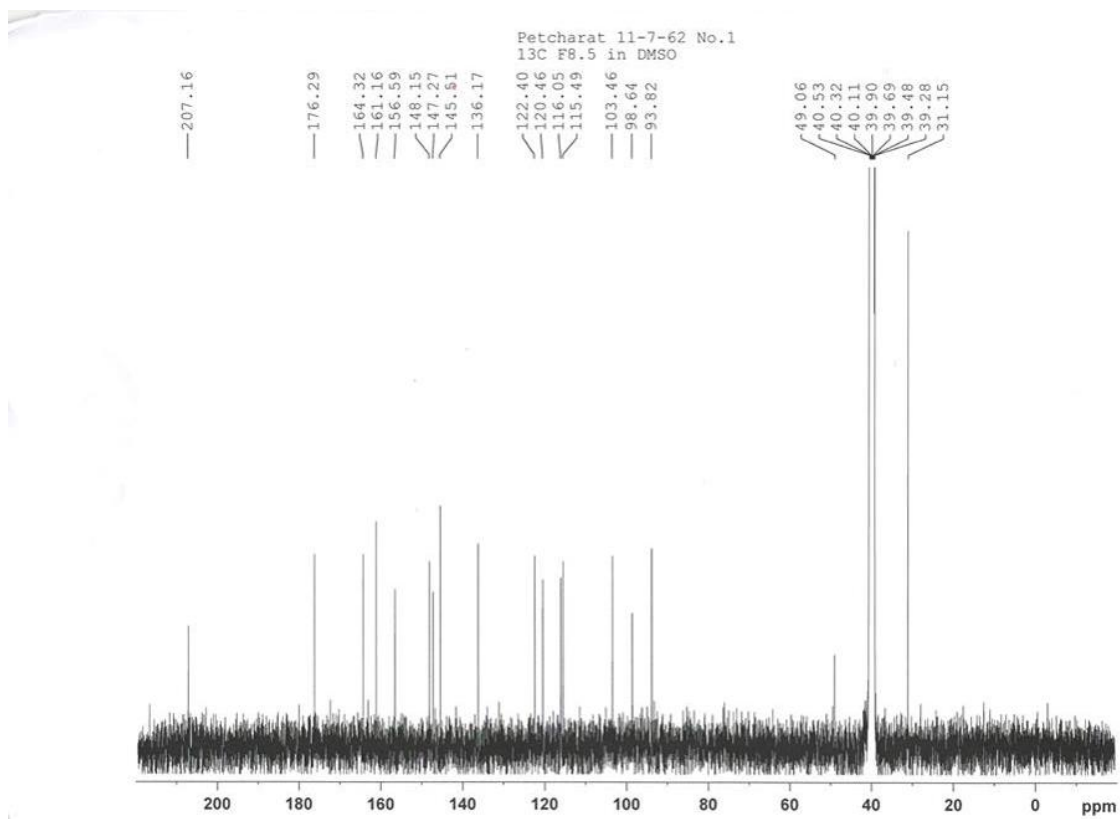
ส่วนสกัดย่อย F8.3 (Sephadex LH 20)



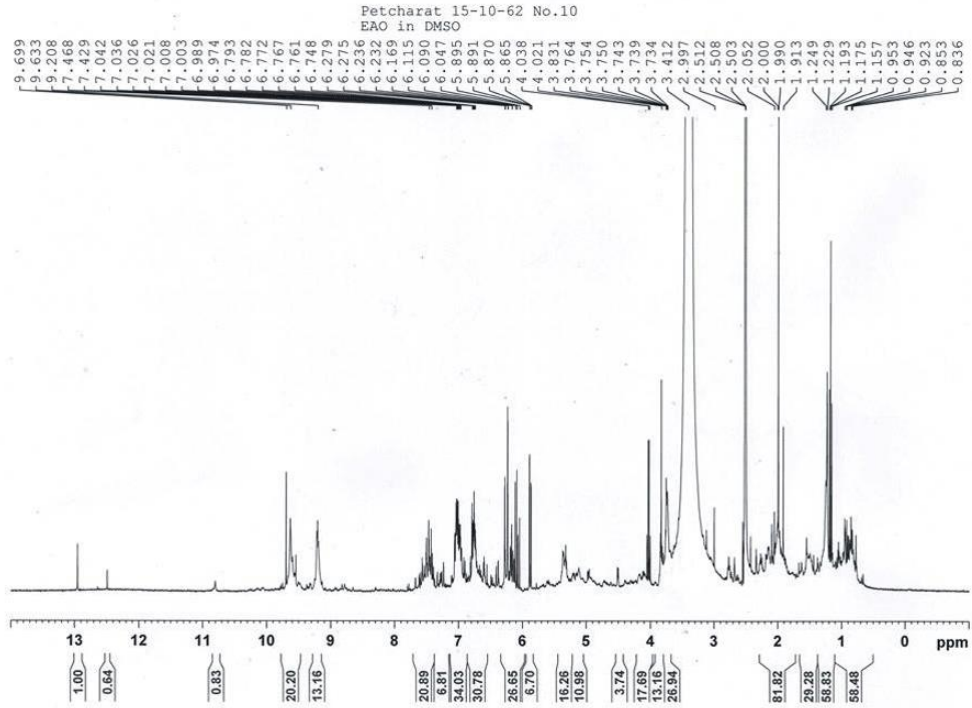
ส่วนสกัดย่อย F8.4 (Sephadex LH 20)



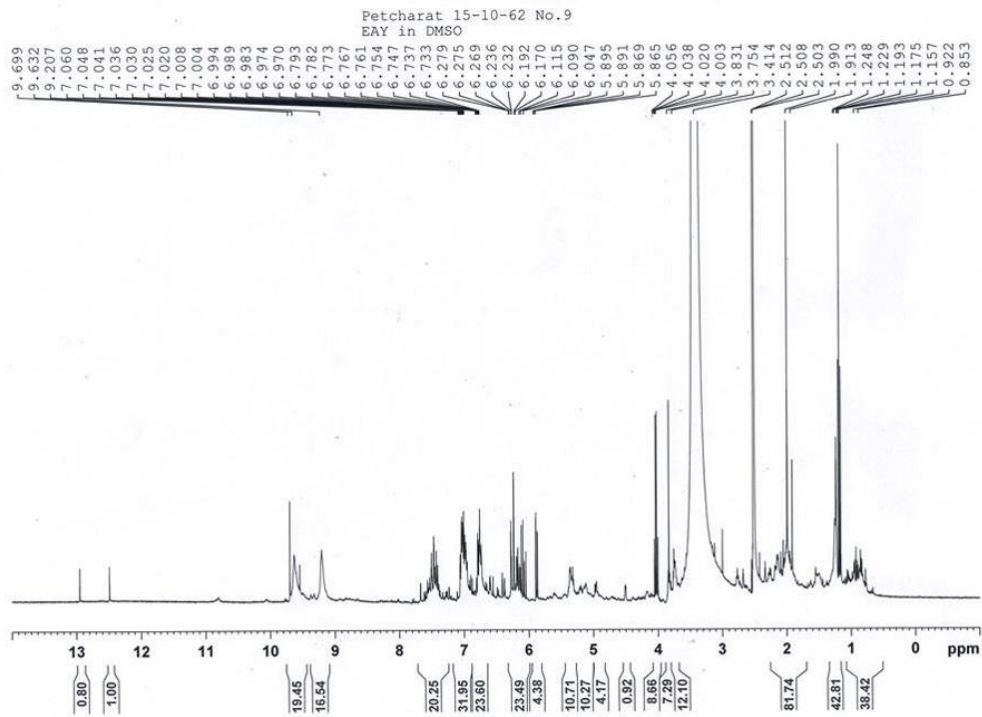
ส่วนสกัดย่อย F8.5 (Sephadex LH 20)



สเปกตรัมของ C-NMR ของส่วนสกัดย่อย F8.5 (Sephadex LH 20)



ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตใบชาขลุ้ใบแก่



ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตตใบชาขลุ้ใบอ่อน