

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล Croton

พืชในสกุล Croton อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีประมาณ 700 ชนิด พบได้ตามประเทศเขตร้อนและมีการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ และมีผู้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสกุล Croton ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ.1978 Luzbetak และคณะ พบ furanoid diterpene, (-)- hardwickiic acid และ แอลกอฮอล์โซียวาคือ 1-triacontanol จากส่วนสกัดเอทานอลของ *C. californicus* [8] และในปี ค.ศ.1979 Kitazawa และ Ogiso แยก diterpenelactones ได้ 2 ชนิด คือ plaunol A และ B anti-shay ulcer activity จาก *C. sublyratus* [9] และในปีต่อมาพบ furanoditerpenes 5 ชนิด ในกลุ่ม ent-clerodane คือ plaunol A, B, C, D และ E จากส่วนสกัดอะซิโตน [10]

ในปี ค.ศ.1981 Kitazawa และ Ogiso พบ ent-3 α -hydroxy-13-epimanol และ ent-16 β ,17-dihydroxykaurane จาก *C. sublyratus* [11] ต่อมาปี ค.ศ.1982 Silveira ทำการศึกษาแก่นของ *C. sonderianus* พบ Sonderianol (12-hydroxy-3-oxo-cleistanth-8, 11, 13, 15-tetraene) และ 3,4-seco-sonderianol (methyl-12-hydroxy-3,4-seco-cleistanth-8,11, 13, 15, 18 (4)-penten-3-oate) [12]

ปี ค.ศ.1989 James D. McChesney และ Edilberto R. Silveira พบ neo-clerodane diterpenes 2 ชนิด คือ 12-hydroxyhardwickiic acid และ sonderianial จากส่วนสกัดเฮกเซนของรากของ *C. sonderianus* [13]

ปี ค.ศ.1993 Cai, Chen และ Phillipson พบว่าส่วนสกัดคลอโรฟอร์มจากเปลือกของ *C. lechleri* มี 1, 3, 5-trimethoxybenzene, 2, 4, 6-trimethoxyphenol, 3, 4-dimethoxyphenol, 3, 4-dimethoxybenzyl alcohol, 4-hydroxyphenethyl alcohol และ acetate, sitosterol, sitosterol- β -D-glucopyranoside และ β -sitostenone รวมทั้งพบสารประกอบ clerodane อีก 2 ชนิด คือ crolechinol และ crolechinic acid [14]

2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb.

มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่มานาน โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอินเดีย ส่วนในประเทศไทย โสภณ เรืองสำราญ และคณะได้ทำการศึกษาเปล้าใหญ่จากหลายพื้นที่พบสารประกอบ diterpenoid ใหม่ ๆ ที่สามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ clerodane, labdane, cembrane, halimane และ isopimarane diterpenoids ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีที่พบในเปล้าใหญ่ แสดงรายละเอียดได้ดังต่อไปนี้และสูตรโครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 2

ในปี ค.ศ.1968 Rao และคณะพบ diterpene alcohol, oblongifoliol ร่วมกับ β -sitosterol จากเปลือกของเปล้าใหญ่ [18] ต่อมาในปี 1969 Aiyar และ Seshadri พบ deoxyoblongifoliol จากเปลือกของเปล้าใหญ่ [15]

ปี ค.ศ.1970 Aiyar และ Seshadri พบโครงสร้างของ oblongifolic acid สารประกอบที่สำคัญ คือ (+)-isopimara-7(8), 15-diene-19-oic acid [11]

ในปี ค.ศ.1971 Aiyar และ Seshadri พบ 3 องค์ประกอบจากเปลือก คือ ent-isopimara-7, 15-diene / 19-hydroxy-ent-isopimara-7, -15-diene / ent-isopimara-7, 15-diene-19-aldehyde [17] และในปีเดียวกันได้แยกสาร oblongifoliol และ deoxyoblongifoliol ที่พบมาก่อน นั้น คือ ent-isopimara-7, 15-diene-3 β , 19-diol และ ent-isopimara-7, 15-diene-3 β -ol และพบ acetyl aleuritolic acid, 3 β -acetoxy-olean-14 (15)-ene-28-oic acid จากเปลือกของเปล้าใหญ่ [20,22]

ปี ค.ศ.1972 Aiyar และ Seshadri พบ ent-15, 16-epoxy-3, 11, 13(16), 14-clerodatetraen-19-oic acid ให้ trivial name ว่า 11-dehydro (-)-hardwickiic acid และ (-)-hardwickiic acid [23] และในปีเดียวกันมีการศึกษาส่วนต่าง ๆ ในเปล้าใหญ่ เช่น เปลือกกราก เนื้อไม้และใบ พบว่ามีสารประกอบเหมือนกับส่วนที่ได้จากเปลือกไม้แต่มีปริมาณน้อยกว่า อีกทั้งใบยังให้แว็กซ์ด้วย [24]

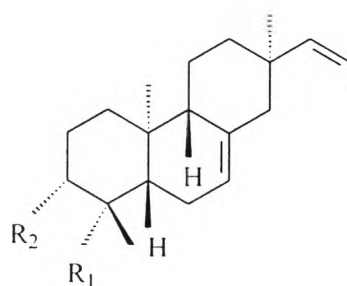
ในปี ค.ศ.1998 Sophon Roengsumran และคณะพบ cembranoids 2 ชนิด คือ crotocebraneic acid และ neocrotocebraneic acid จากเปลือกต้นของ *C.oblongifolius* [21] ต่อมาในปี ค.ศ.1999 พบ labdane diterpene compounds 4 ชนิด คือ labda-7,12(E),14-triene , labda-7,12(E),14-triene-17-ol , labda-7,12(E),14-triene-17-al และ labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid ซึ่งสารเหล่านี้นำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งได้ผลดี โดยเฉพาะ labda 7,12(E), 14-triene-17-al และพบ cembranoid diterpene ชนิดใหม่ คือ neocrotocebranal จาก *C. oblongifolius* ซึ่งให้ผลยับยั้ง platelet aggregation และแสดง cytotoxicity against P-388 cell line ในหลอดทดลอง [19]

ตารางที่ 1 สารประกอบไดเทอร์ปีนอยด์จากต้นเปล้าใหญ่

| Organic compounds | Location | Reference |
|---------------------------------------|-------------------|-----------|
| Oblongifoliol | India | [18] |
| 19-Deoxyoblongifoliol | India | [15] |
| Oblongifolic acid | India | [16] |
| Ent-isopimara-7,15-diene | India | [17] |
| 3-Deoxyoblongifoliol | India | [17] |
| Ent-isopimara-7,15-diene-19-aldehyde | India | [17] |
| Acetyl aleuritolic acid | India | [20] |
| 19-Hydroxy-ent-isopimara-7,15-diene | India | [17] |
| Labda-7,12(E),14-diene | Prachaubkhirikhan | [19] |
| Labda-7,12(E),14-triene-17-al | Prachaubkhirikhan | [19] |
| Labda-7,12(E),14-triene-17-ol | Prachaubkhirikhan | [19] |
| Labda-7,12(E),14-triene-17-oic acid | Prachaubkhirikhan | [19] |
| Crotoembraneic acid | Petchaboon | [3,21] |
| Neocrotoembraneic acid | Nakonratchasima | [3,21] |
| Crotohalimaneic acid | Kanchanaburi | [3,21] |
| Benzoyl crotohalimaneic acid | Nakonratchasima | [3,21] |
| Crovatin | Kanchanaburi | [3] |
| Isokolavenol | Kanchanaburi | [3] |
| Nidorellol | Loei, Sakornakorn | [3] |
| Poilaneic acid | Chaingmai | [3] |
| Hardwickiic acid | India, Chonburi | [3,5,20] |
| 11-Dehydrohardwickiic acid | Udonthani | [20] |
| Labda-7,13(Z)-diene-17,12-olide | India | [5] |
| Labda-7,13(Z)-diene-17,12-olide-5-ol | Udonthani | [5] |
| (-)-20-Benzyloxyhardwickiic acid | Udonthani | [5] |
| (-)-Pimara-9(11),15-diene-19-oic acid | Uttaradit | [6] |
| (-)-Pimara-9(11),15-diene-19-ol | Uttaradit | [6] |

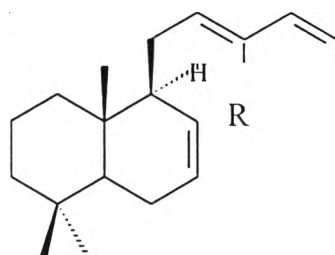
| Organic compounds | Location | Reference |
|---|-----------|-----------|
| (2E,7E,11E)-1-Isoprppyl-1,4-dihydroxy-4,8-dimethylcyclotetradeca-2,7,11-triene-12-carboxylic acid | Uttaradit | [6] |
| Methyl-15,16-epoxy-12-oxo-3,13(16),14-clerodatriene-20,19-olide-17-oate | Loei | [6] |
| 3-Acetoxy-labda-8(17),12(E)-triene-2-ol | Loei | [7] |
| 2-Acetoxy-labda-8(17),12(E)-triene-3-ol | Loei | [7] |
| Labda-8(17),12(E)-triene-2,3-diol | Loei | [7] |

Isopimarane Group [15,16,17,18]



| R ₁ | R ₂ | | |
|--------------------|----------------|---|--|
| CH ₂ OH | OH | : | Oblongifoliol |
| CH ₃ | OH | : | Deoxyoblongifoliol |
| COOH | H | : | Oblongifolie acid |
| OH | H | : | <i>ent</i> -isopimara-7,15-diene-3,19-diol |
| CH ₃ | H | : | <i>ent</i> -isopimara-7,15-diene |

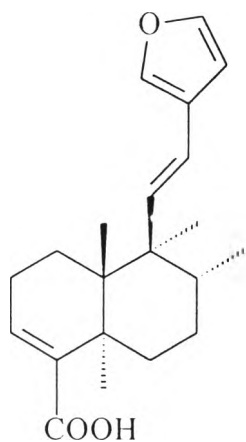
Labdane Group [19]



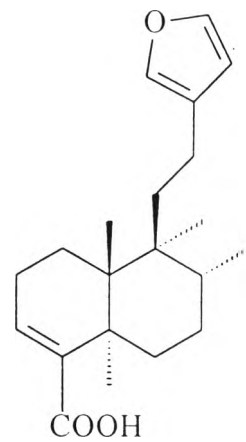
| R | | |
|--------------------|---|------------------------------------|
| CH ₃ | : | Labda-7,12(E),14-diene |
| CHO | : | Labda-7,12(E),14-diene-17-al |
| CH ₂ OH | : | Labda-7,12(E),14-diene-17-ol |
| COOH | : | Labda-7,12(E),14-diene-17-oic-acid |

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของไดเทอร์ปีนอยด์ที่พบจากต้นเปล้าใหญ่

Clerodane Group [3,5,20]

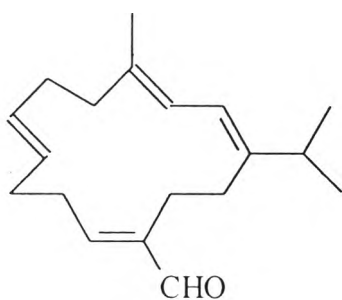


11-dehydro-(-)-hardwickiic acid

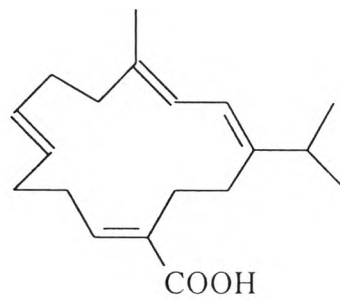


(-)-hardwickiic acid

Cembrane Group [3,21]

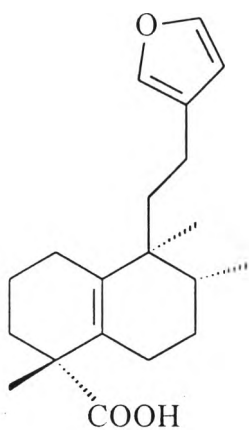


Neocrotocembranal

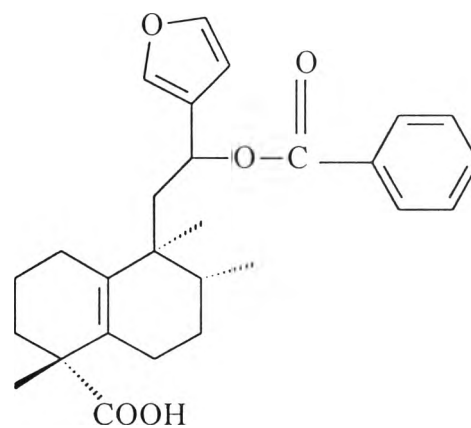


neocrotocembraneic acid

Halimane Group [3,21]



Crotohalimaneic acid



benzoyl crotohalimaneic acid

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของไดเทอร์ปีนอยด์ที่พบจากต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในพืช

เก๊าท์ (Gout) เป็นโรคที่เกิดจากการที่มีกรดยูริกในเลือดสูงกว่าปกติ (มากกว่า 7 มิลลิกรัม ต่อเดซิลิตร) กรดยูริกที่มีมากเกินไปนี้เมื่อละลายจนอิ่มตัวในซีรัม แล้วที่เหลือจะตกตะกอนรูปเข็ม ของ monosodium urate monohydrate ซึ่งเรียกว่า tophi อาจพบอยู่บริเวณตามข้อต่อ, กระดูกอ่อน, เอ็นหรืออยู่ในเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อมีมากขึ้นก็จะถูกกำจัดโดยเม็ดเลือดขาวพวก polymorphonuclear leukocytes จะทำลาย (phagocytize) และปล่อย lysosomal enzyme ออกมา ดังนั้นจึงทำให้บริเวณดังกล่าวเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน สาเหตุเกิดจากการที่บริโภคอาหารที่มีปริมาณพิวรีนสูง หรือมีการสังเคราะห์พิวรีนมากเกินไปจากกระบวนการ enzymatic degradation ของเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย [25]

สารกลุ่มแซนทีนซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ของกลุ่มพิวรีน มีความสำคัญต่อพืชและสัตว์ในรูปแบบส เช่น อะดีนีนและกัวนีน เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นตัวถ่ายทอดสารพันธุกรรมและมักเป็นโคเอนไซม์ จึงมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาสำคัญภายในเซลล์ เช่น ปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟต

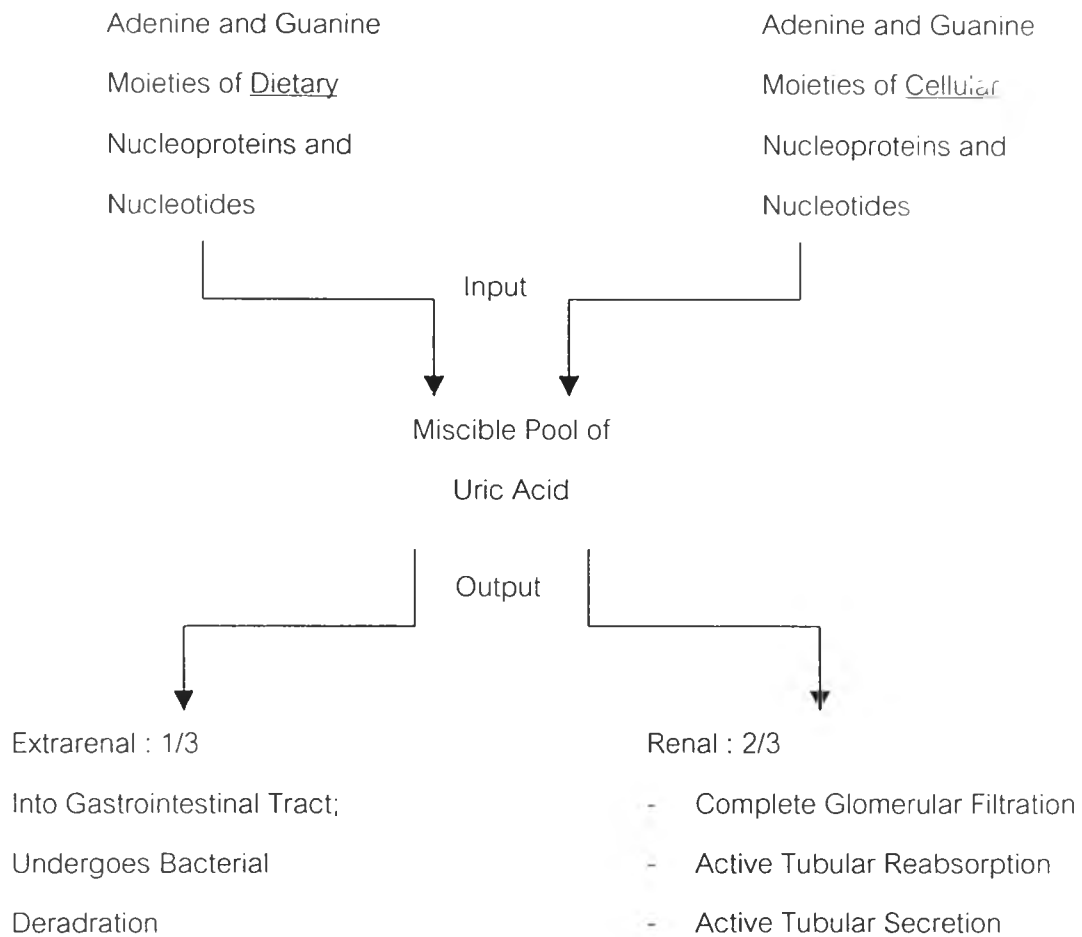
แซนทีนออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพิวรีนมีหน้าที่เปลี่ยนไฮโปแซนทีน ให้เป็นแซนทีนและจากแซนทีนให้เป็นกรดยูริก (แผนภาพที่ 2)

กรดยูริกเป็นสารที่สังเคราะห์มาจากพิวรีน(อะดีนีนและกัวนีน) พิวรีนได้มาจากกระบวนการ enzymatic degradation ของเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย และจากอาหารที่รับประทานเข้าไป ในคนปกติจะสามารถสังเคราะห์กรดยูริกได้ประมาณวันละ 600-700 มิลลิกรัม และถ้ารวมทั้งที่ได้รับจากอาหารจะเป็นวันละ 1200 มิลลิกรัม

กรดยูริกจะขับออกนอกร่างกายได้ 2 ทางคือ (แผนภาพที่ 1)

1. Renal excretion ประมาณ 2/3 – 3/4 ของกรดยูริกในร่างกายจะถูกขับออกมาทางปัสสาวะโดยมันจะถูกกรองผ่าน glomerulus ได้ทั้งหมดแต่ถูกดูดกลับไปประมาณ 98% ที่ proximal tubule และจากนั้นจะถูกขับออกมาอีกครั้งที่ distal tubule เกือบทั้งหมด
2. Extrarenal uric acid disposal ในคนปกติจะมีกรดยูริกประมาณวันละประมาณ 800 มิลลิกรัม ถูกขับเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร ผสมกับน้ำย่อยและถูกทำลายโดยแบคทีเรียในลำไส้

แผนภาพที่ 1 แสดงแหล่งที่มาและการขับถ่ายกรดยูริกในคน



กรดยูริกในร่างกายคนจะเพิ่มได้มากกว่าปกติได้ 2 ทางคือ

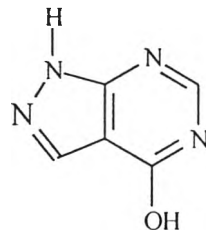
1. Increased production ประมาณ 25-30% ของผู้ป่วยโรคเก๊าท์จะมีกรดยูริกในพลาสมาสูงกว่าปกติ เนื่องจากมีการสังเคราะห์ purine มากเกินไปทำให้มีผลกระทบต่อถึงการสร้างกรดยูริกให้สูงตามด้วย และอีกประมาณ 10% ของผู้ป่วยเกิดจาก myeloproliferative disorder ซึ่งมีการทำลายเซลล์ในร่างกายเป็นจำนวนมากทำให้ turnover rate ของ nucleic acids เพิ่มขึ้นและการสร้างกรดยูริกจะเพิ่มขึ้นด้วย
2. Diminished renal excretion กรดยูริกในพลาสมาอาจสูงขึ้นเนื่องจากมีการขับถ่ายทางปัสสาวะลดลง ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ผู้ป่วยเป็นโรคไตเรื้อรังหรืออื่นๆ การขับถ่ายกรดยูริกทางลำไส้ (Intestinal uricolysis) จะเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นการชดเชยแต่ไม่เพียงพอที่จะรักษาระดับของกรดยูริกในร่างกายให้ปกติได้

การให้ยารักษาผู้ป่วยโรคเก๊าท์ทำได้ดังนี้

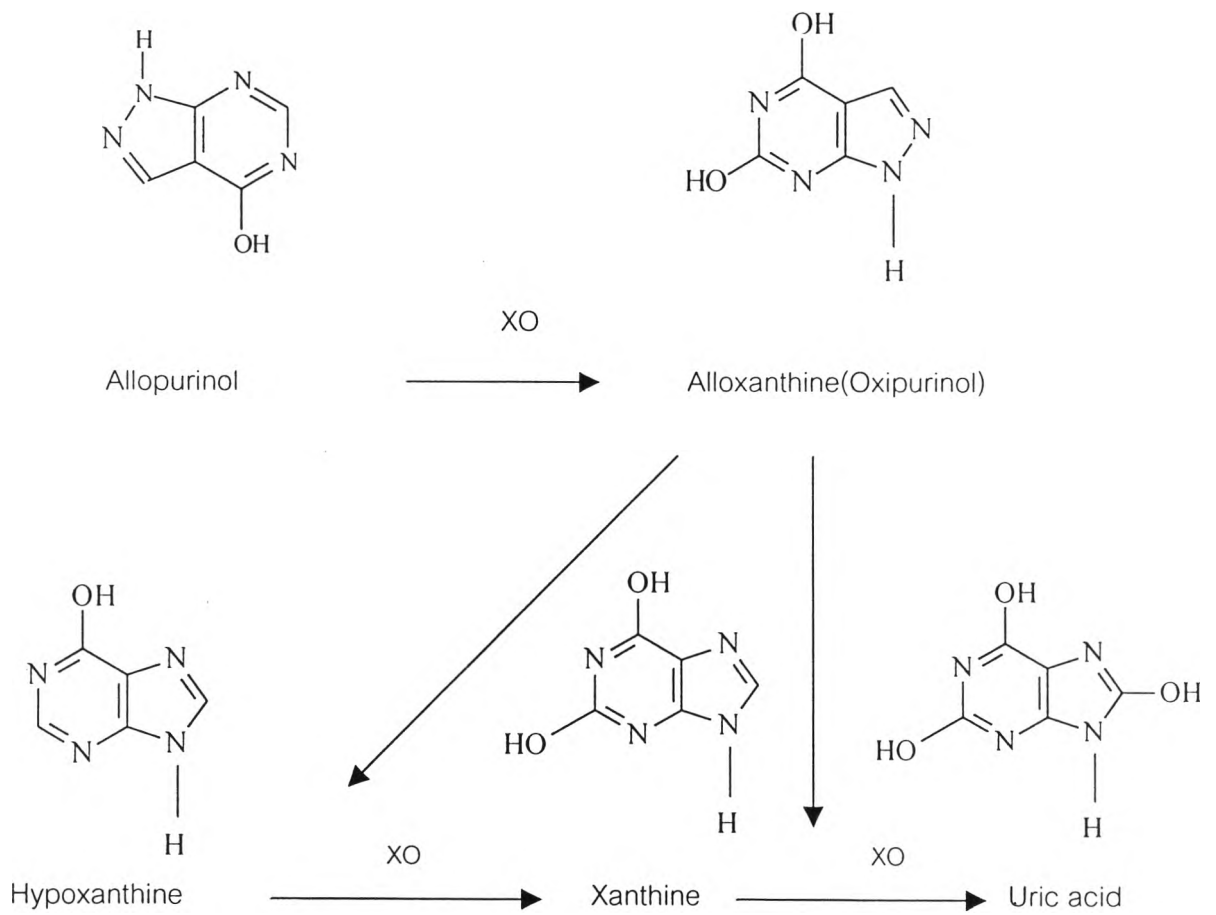
- Acute attack ในขณะที่เกิดอาการของโรคซึ่งมีอาการอักเสบ ปวด บวมอย่างรุนแรง ยาที่ใช้ได้ผลดีที่สุดคือ colchicine ส่วนพวก phenylbutazone, oxyphenbutazone, indomethacin และ corticosteroid ก็อาจใช้ได้ผลดีเช่นกัน
- Management between attacks ในช่วงที่ปราศจากอาการของโรคนิยมใช้ colchicine ร่วมกับ uricosuric drug หรือ allopurinol เพื่อลดระดับกรดยูริกในซีรัม ช่วย mobilize และลดการสร้าง tophi

ยาที่ใช้รักษาโรคเก๊าท์ในปัจจุบันเช่น

- Colchicine เป็นแอลคาลอยด์ที่แยกได้จากเมล็ดและหัวของพืช *Colchicum autumnale* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Liliaceae มีฤทธิ์ลดการอักเสบในโรคเก๊าท์ โดยไม่ลดระดับยูริก โดยการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบใน acute gouty arthritis อย่างเฉพาะเจาะจง ยับยั้ง migration ของ polymorphonuclear leukocyte ซึ่งจะไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบ
- Allopurinol เป็นยาที่ลดการสร้างกรดยูริกด้วยการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสที่ขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์กรดยูริกดังแสดงในแผนภาพที่ 2 เมื่อ Allopurinol เข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนเป็น Alloxanthine (Oxipurinol) โดยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ซึ่ง metabolite ที่เกิดขึ้นและตัว Allopurinol จะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ผลที่เกิดขึ้นพบว่าปริมาณของกรดยูริกและสารยูเรตลดลง ในขณะที่จะเพิ่มปริมาณของสารที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ แซนทีนและไฮโปแซนทีน การสะสมของผลึกยูเรตในเนื้อเยื่อลดลง ยับยั้งการเกิดนิ่วในไต [26]



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ Allopurinol



* XO= Xanthine Oxidase Enzyme

แผนภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงการออกฤทธิ์ของตัวยับยั้งแซนทีนออกซิเดส

โดยหลักการนี้จึงนำมาศึกษาสารจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส ฤทธิ์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสที่มีการศึกษามาแล้ว แสดงรายละเอียดได้ดังต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1983 Noro และคณะ พบว่าสารประกอบ apigenin และ luteolin จากยอดและดอกของ *Daphne genwa* Sieb. et Zucc. ในวงศ์ Thymeliaceae แสดงฤทธิ์ยับยั้งแซนทีน ออกซิเดสที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 7.4 และ 5.9 μM ตามลำดับ [27]

ในปี ค.ศ. 1987 Schmeda-Hirschmann และคณะ พบว่า สารประกอบของ *Eugenia uniflora* ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของปารากวัย คือ myricetin, quercetin และ quercitrin แสดงฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสที่ 96, 86 และ 85 % มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2, 3 และ 15 $\mu g/ml$ ตามลำดับ [28]

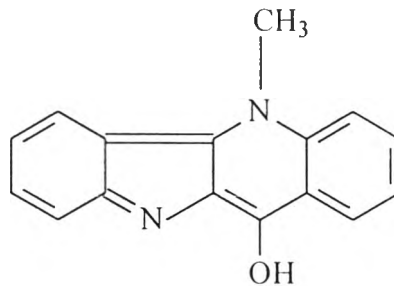
ในปี ค.ศ.1991 Costantino และคณะ ศึกษาสารประกอบ anthocyanins และส่วน polyphenols จากพืชในสกุล *Ribes*, *Rubus* และ *Vaccinium* เช่น *Ribes nigrum* (black current), *Ribes rubrum* (red current), *Rubus idaeus* (red raspberry), *Rubus occidentalis* (black raspberry), *Rubus fruticosus* (blackberry) และ *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) แล้วพบว่า *Ribes nigrum* และ *Rubus occidentalis* แสดงฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.18 และ 1.012 $\mu g/ml$ ตามลำดับ [29] และในปีเดียวกัน Theouloz และคณะ มีการศึกษาพืชในสกุล *Legradia*, *Luma*, *Amomyrtus*, *Myrceugenia*, *Blepharocalyx* และ *Myrcianthus* จำนวน 21 ชนิด ที่พบในประเทศแถบทวีปอเมริกาใต้ ไม่พบว่า มีพืชชนิดใดที่มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ [30]

ในปี ค.ศ.1995 Gonzalez และคณะ มีการศึกษาพืชในวงศ์ Celastraceae และ Lamiaceae พบว่าสารสกัดเอธานอลของ *Hyptis obtusiflora* Presl ex Benth และ *Hyptis lantanaefolia* Poit. ซึ่งอยู่ในวงศ์ Lamiaceae แสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ 40 % ที่ความเข้มข้นของสาร 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [31]

ในปี ค.ศ. 1998 Cos และคณะ ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในการยับยั้งแซนทีนออกซิเดส พบว่า สาร baicelin, kaempferol, morin และ isorhamnetin มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ดีกว่าฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.79, 1.06, 10.10 และ 2.51 μM ตามลำดับ [32]

ในปี ค.ศ. 1999 Owen และคณะ พบพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ 86.33 % ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ *Larix laricina* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Pinaceae [33] และในปีเดียวกัน Kong และคณะ พบ *Brandisia hancei* ในวงศ์ Scrophulariaceae ซึ่งให้สารประกอบ Luteolin และ Isoacteoside ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.83 และ 45.48 μM ตามลำดับ [34]

ในปี ค.ศ. 2000 Cimanga และคณะ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสจาก *Cryptolepis sanguinolenta* (Lindl.) Schlechter ในวงศ์ Periplocaceae ซึ่งเป็นพืชในแถบแอฟริกา พบว่า สารสกัดจากรากพืชนี้คือ 11-hydroxycryptolepine ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ชนิดหนึ่ง แสดงฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 32.3 mM [35] สูตรโครงสร้างของสารนี้ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของ 11-Hydroxycryptolepine

ในปี ค.ศ. 2001 Vivot และคณะ ได้ทำการศึกษาส่วนสกัดเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเอธานอล ของ *Inga verna* subsp. *Affinis* ในวงศ์ Fabaceae ซึ่งเป็นพืชในทวีปอเมริกาใต้ แล้วนำส่วนสกัดเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส พบว่า ส่วนสกัดเอธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 27.3 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ [36]