

การคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรโดยวิธียับยั้ง
ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

นางสาวไพลิน สิทธิวิเชียรวงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-332-823-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SCREENING FOR BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM MEDICINAL
PLANTS BY INHIBITION OF CYCLIC-AMP PHOSPHODIESTERASE



วิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-332-823-8

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ไพลิน สิทธิวิเชียรวงศ์ : การคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรโดยวิธียับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (SCREENING FOR BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM MEDICINAL PLANTS BY INHIBITION OF CYCLIC-AMP PHOSPHODIESTERASE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อมร เพชรสม, อ. ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร. นาดยา งามโรจนวณิชย์ ; 85 หน้า , ISBN 974-332-823-8

ทำการคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ กวาวเครือแดง, กระชาย, กำลังพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, โศภิต, ตะโกนา, ม้ากระทืบโรง, ว่านชักมดลูก, ว่านร่อนทอง และฮ้อสะพายควาย โดยสกัดสารจากพืชสมุนไพรด้วยเอทานอล แล้วทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่า กวาวเครือแดง, กำลังพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร่อนทอง แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงกว่า 50% ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดเอทานอลมาแยกสกัดด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์อยู่ในส่วนสกัดเอทานอลและคลอโรฟอร์ม ได้เลือกส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) มาศึกษาต่อโดยแยกองค์ประกอบด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกได้ 9 ลำดับส่วน คือ B01 ถึง B09 แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ พบว่า ลำดับส่วน B02, B03, B04, B05, B06, B07, B08 และ B09 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสโดยมีความสามารถในการยับยั้งสูงกว่า 50% และพบว่ามีสารอย่างน้อย 1 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ซึ่งอยู่ในลำดับส่วน B02 คือ 3,5,7'-trihydroxy-4'-methoxyflavone ซึ่งแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 50.0% นอกจากนี้ได้นำสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ซึ่งเป็นไคโตนอยด์จำพวกแลบเดน, เคลอโรเดน และเซมบรานอยด์ และสารสังเคราะห์เลียนแบบเปล้าโนทอล ได้แก่อนุพันธ์ฟารินโซลและอนุพันธ์เจอร์รานีโอลซึ่งมีโครงสร้างเป็นไซเปิดมาทดสอบ พบว่าไคโตนอยด์ที่มีโครงสร้างเป็นเซมบรานอนด์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด ส่วนสารสังเคราะห์เลียนแบบเปล้าโนทอลที่มีโครงสร้างเป็นไซเปิดที่สันกว่าจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงกว่าสารที่มีโครงสร้างเป็นไซเปิดที่ยาวกว่า จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าโครงสร้างของตัวยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ดีจะต้องมีโครงสร้างบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ adenosine ในไซคลิก-เอเอ็มพี และมีการยับยั้งแบบแข่งขัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต ไพลิน สิทธิวิเชียรวงศ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อมร เพชรสม
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม นาดยา งามโรจนวณิชย์

3971280723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: CYCLIC-AMP PHOSPHODIESTERASE INHIBITORS / MEDICINAL PLANTS
PAILIN SITTIWICHEANWONG : SCREENING FOR BIOLOGICALLY ACTIVE
COMPOUNDS FROM MEDICINAL PLANTS BY INHIBITION OF CYCLIC-AMP
PHOSPHODIESTERASE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. AMORN PETSOM,
Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : NATTAYA NGAMROJNAWANICH, Ph.D. 85 pp.
ISBN 974-332-823-8

Ten medicinal plants : *Butea superba* Roxb., *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr., *Betula alnoides*, Buch Ham., *Myristica fragrans* Houtt., *Elephantopus scaber* Linn., *Diospyros rhodocalyx* Kruz., *Ficus pubigoza* Wall., *Circuma xanthorrhiza* Roxb., *Globba malaccensis* Bidl., and *Suregada multiflorum* (A. Juss) Bill, were screened for cyclic-AMP phosphodiesterase inhibitors. Five medicinal plants: *Butea superba* Roxb., *Betula alnoides*, Buch Ham., *Myristica fragrans* Houtt, *Ficus pubigoza* Wall. and *Globba malaccensis* (A.Juss) Bidl., showed inhibitory activity on cyclic-AMP phosphodiesterase. Ethanol extracts of five-medicinal plants were further fractionated into hexane and chloroform fractions and tested for their inhibitory activity. The ethanol crude and chloroform crude showed inhibitory activity on cyclic-AMP phosphodiesterase. Chloroform extract of *Butea superba* Roxb., was further fractionated by column chromatography into 9 fractions and tested for inhibitory effects. Fraction B02, B03, B04, B05, B06, B07, B08 and B09 showed more than 50% inhibitory activity on cyclic-AMP phosphodiesterase. Inhibitory substance in B02 was identified as a known 3,5,7'-trihydroxy-4'-methoxyflavone and the %Inhibition was 50.0%. The inhibitory activity of diterpenoids (labdane, clerodane and cembranoid) from *Croton oblongifolius*, had been tested. It was found that diterpenoids with cembranoid structure showed highest inhibitory activity on cyclic-AMP phosphodiesterase. The inhibitory activity of synthetic plauotol analog of geraniol derivatives and farnesol derivative was also investigated. It was found that the geraniol derivatives, which shorter open chain than farnesol derivatives, showed better inhibitory activity than farnesol derivatives. From this experiment, it was found that the structure of good cyclic-AMP phosphodiesterase inhibitors should have structures similar to adenosine moiety of cyclic-AMP and have of competitive properties.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....

ปีการศึกษา 2542.....

ลายมือชื่อนิสิต..... ปณิณ สิตทิวิชานวงศ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.พร พงษ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อ.นตยา งามโรจนวานิช



กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษา และ อาจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยพร ณ นคร รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพงษ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เรืองสำราญ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ริมพนิชยกิจ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณวณิภา นาคลดดา คุณปญฺฑทริก รุจิราภา คุณประวิทย์ สิงห์โตทอง และคุณ ชนิษฐา ดีประหลาด ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสรวตัวอย่างและให้ความช่วยเหลือตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ทดลองงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนิสิตสาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการศึกษาตามโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องที่ให้ความช่วยเหลือและ เป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ฎ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 วัตถุประสงค์.....	21
3.2 ความเป็นที่.....	22
3.3 สารตัวอย่าง.....	23
3.4 การสกัดสารจากสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ.....	24
3.5 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี	
ฟอสโฟไดเอสเอสเทอเรส.....	25
3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์.....	25
3.7 การเตรียมกราฟมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์.....	26
3.8 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเอสเทอเรส	
ของสารตัวอย่าง.....	26
3.8.1 ปฏิบัติการที่มีการเติมเอนไซม์.....	26
3.8.2 ปฏิบัติการที่ไม่มีการเติมเอนไซม์.....	26
3.9 การแปรผล.....	28
3.10 การหาค่า IC ₅₀	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเอสเทอเรส	
ของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน.....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การแยกองค์ประกอบจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง.....	34
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ สารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ (<i>Croton oblongifolius</i>).....	41
4.3.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของสารไดเทอร์พีนอยด์จากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่.....	41
4.3.2 ผลการหาค่า IC_{50} ของสารไดเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจาก เปลือกต้นเป้ง้าใหญ่และ positive control.....	43
4.4 ผลการทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ สารสังเคราะห์.....	51
4.4.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์.....	51
4.4.2 ผลการหาค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์ฟาร์นิซอล ซึ่งได้แก่ NW8 และ NW27.....	53
4.4.3 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของเจอร์รานีออลและสารอนุพันธ์.....	56
4.4.4 ผลการหาค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออล ซึ่งได้แก่ PE3, PE4 PE5, PE7 และ PE8.....	58
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	65
เอกสารอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้เขียน.....	84

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ยาที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์.....	6
2	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของพืชสมุนไพร.....	11
3	ตัวอย่างสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสพร้อมทั้ง แสดงค่า IC ₅₀	15
4	การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	25
5	น้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรที่นำมาทดสอบ.....	30
6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสมุนไพร และ positive control และ negative control.....	31
7	น้ำหนักของส่วนสกัดเฮกเซน และส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง, กำลังยาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร่อนทอง.....	32
8	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของส่วนสกัดเฮกเซน, ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม และส่วนสกัดเอทานอลของกวาวเครือแดง, กำลังยา เสือโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร่อนทอง.....	33
9	ผลการแยกสารจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดงด้วยคอลัมน์ โครมาโทกราฟี.....	35
10	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของลำดับส่วน ที่แยกได้จากคอลัมน์และสาร C32-33 ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml.....	39
11	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารไดเทอร์ปีนอยด์ ที่สกัดได้จากเปลือกต้นเปลือกใหญ่.....	42
12	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่ ได้แก่ CO1, CO3, CO4, CO8 และ CO 9.....	44
13	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของทีโอฟิลลีนและคาเฟอีน.....	45
14	ค่า IC ₅₀ ของสารไดเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่, คาเฟอีนและ ทีโอฟิลลีน.....	47

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า	
15	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสเปลาโนทอล, ฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ของฟาร์นิซอล.....	52
16	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารอนุพันธ์ฟาร์นิซอล คือ NW8 และ NW27.....	53
17	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารเจอรานีออล และสารอนุพันธ์.....	57
18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารอนุพันธ์เจอรานีออล ได้แก่ PE3, PE4, PE5, PE7 และ PE8	58
19	แสดงค่า IC ₅₀ ของเจอรานีออล และสารอนุพันธ์.....	61



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แผนภาพระบบคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	5
2 ขั้นตอนการวิจัยสมุนไพรแบบครบวงจร.....	6
3 การออกฤทธิ์ของโปรตีนฮอร์โมนผ่านไซคลิก-เอเอ็มพี	8
4 ปฏิกิริยาการสร้างไซคลิก-เอเอ็มพี โดยการสลาย ATP.....	9
5 สูตรโครงสร้างของ mangostanol, α -mangostin และ γ -mangostin ที่สกัดได้จาก เปลือกมังคุด.....	12
6 สูตรโครงสร้างของ Reticulol ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ <i>Streptomyces mobaraensis</i>	13
7 สูตรโครงสร้างของคาเฟอีน ทีโอฟิลลีน และทีโอโบรมีน.....	14
8 การวัดแอกติวิตีของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยวิธีกัมมันตภาพรังสี.....	18
9 การวัดแอกติวิตีของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยวิธีมาลาโคตกรีน.....	19
10 ขั้นตอนการสกัดสารจากสมุนไพรด้วยเอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม.....	24
11 ขั้นตอนโดยย่อของการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส.....	27
12 แสดง TLC ของลำดับส่วน B01 ถึง B09.....	36
13 สูตรโครงสร้างของสาร C32-33 [3,7,5'-trihydroxy-4'-methoxyflavone].....	37
14 แสดง TLC ของลำดับส่วน B02 และ C32-33.....	37
15 กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของ CO1, CO3, CO4, CO8 และ CO9.....	46
16 สูตรโครงสร้างของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่.....	49
17 สูตรโครงสร้างของเปลาโนทอลและฟาร์นิซอล.....	54
18 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ฟาร์นิซอล.....	55
19 กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออล ได้แก่ PE3, PE4, PE5, PE7 และ PE8.....	60
20 สูตรโครงสร้างของเจอร์รานีออลและสารอนุพันธ์ PE12.....	62
21 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออล ได้แก่ PE1, PE2, PE3, PE4, PE5 และ PE6.....	63
22 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออล ได้แก่ PE7, PE8, PE9, PE10 และ PE11	64

คำย่อ

°C	= องศาเซลเซียส
A	= Absorbance
ATP	= Adenosine triphosphate
5'-AMP	= Adenosine 5'-monophosphate
GDP	= Guanosine diphosphate
GTP	= Guanosine triphosphate
IC ₅₀	= Inhibition concentration 50%
MW	= molecular weight
P _i	= Inorganic phosphate
μg/ml	= microgram per milliliter
μl	= microliter
μM	= micromolar

บทที่ 1



บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงทำให้มีทรัพยากรธรรมชาติหลายชนิด พืชสมุนไพรในประเทศไทยก็มีมากมายหลายชนิดเช่นกันและได้มีการใช้มาตั้งแต่โบราณกาล และในปัจจุบันสมุนไพรได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก แต่ในการศึกษาสมุนไพร ถ้านำสารทุกชนิดที่พบในสมุนไพรมาศึกษาทุกตัวจะทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูงมาก อีกทั้งสารบางตัวอาจไม่ใช่สารออกฤทธิ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสมุนไพร ก่อน เพื่อที่จะคัดเลือกเฉพาะสารที่มีฤทธิ์มาทำการศึกษาและพัฒนาต่อไป ซึ่งวิธีการนี้สามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้มาก และทำให้ได้สารนำร่อง (Lead compound) ได้เร็วยิ่งขึ้น

การคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในพืชสมุนไพรสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ (Enzyme inhibitor screens), การคัดกรองโดยใช้จุลชีพขนาดเล็ก (Small organism screens) เช่น พลาสมาเรีย, แบคทีเรีย และรา การทดสอบในสัตว์ทดลอง (Animal Tests) และสังเกตพฤติกรรมสัตว์ เช่น ดูการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ หรือศึกษาระดับโคเลสเตอรอลที่ลดลง (Bu'Lock, Nisbet และ Winstanley, 1982) แต่การทดสอบในสัตว์มีข้อเสียหลายอย่างคือสารที่เหมาะสมกับการทดสอบต้องเป็นสารที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Purified) หรือกึ่งบริสุทธิ์ (Semi-purified) มาแล้ว เนื่องจากการตอบสนองของสัตว์ทดลองจะขึ้นกับความบริสุทธิ์ของสาร และหลีกเลี่ยงผลข้างเคียง (Side effects) ของสารเจือปนอื่น ๆ ที่ปนอยู่ในสารทดสอบ นอกจากนี้ยังมีค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลาในการทดสอบยาวนานอีกด้วย

เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้พัฒนาการตรวจกรองโดยใช้เอนไซม์ขึ้น โดยทำการคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์บางชนิด ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ วิธีนี้เริ่มต้นโดย Umezawa (1972) ซึ่งได้คัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically active compounds) จากสารเมแทบอลิซึมที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืชหรือสัตว์ได้ ข้อดีของการใช้เอนไซม์เป็นตัวคัดกรองคือ ควบคุมได้ง่าย ใช้เวลาในการทดสอบสั้น และสามารถ

ทดสอบสารตัวอย่างได้หลายชนิด จึงนิยมใช้เป็นวิธีในการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสาร การคัดกรองโดยใช้เอนไซม์นี้มีข้อเสียคือต้องทราบกลไกการทำงานของเอนไซม์โดยละเอียดก่อน

ในปี 1981 Nikaido และคณะ ได้เริ่มทำการคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพในสมุนไพรพื้นบ้านโดยดูความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ในการทดลองครั้งนั้นเลือกไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (Cyclic-AMP Phosphodiesterase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้คัดกรอง สารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจะแสดงฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง เนื่องจากว่าไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ที่สลายไซคลิก-เอเอ็มพี และ ไซคลิก-เอเอ็มพีทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ (second messenger) ของ neurotransmitters เช่น dopamine และ norepinephrine ถ้ามีการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจะทำให้ไซคลิก-เอเอ็มพีสูงขึ้น เสมือนว่า neurotransmitters เพิ่มขึ้น จึงกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางเพิ่มขึ้น (จุฑามณี สุทธิสีสังข์ และ รัชณี เมฆมณี, บรรณานุกรม, 2540)

สำหรับงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารที่สกัดได้จากสมุนไพร 10 ชนิด ที่นิยมใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ซึ่งได้แก่ กวาวเครือแดง, กระชาย, กำลังพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, โดไม่รู้ล้ม, ตะโกนา, ม้ากระทืบโรง, ว่านชักมดลูก, ว่านร้อนทอง และฮ่อสะพายควาย นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้วิธีการนี้ในการทดสอบสารสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่ และเปล้านินทอล (Plau-notol) ที่สกัดได้จากต้นเปลือกน้อย รวมทั้งสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงเปล้านินทอล ซึ่งได้แก่สารอนุพันธ์ของฟาร์นิซอล (Farnesol) และสารอนุพันธ์ของเจอร์รานีโอล (Geraniol) โดยทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสด้วยวิธีมาลาโคตกรีน เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว และยังมีหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ในพืชสมุนไพรไทยบางชนิด
2. เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในการคัดกรองสารสังเคราะห์เลียนแบบเปลาโนทอล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พบสมุนไพรชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส
2. ได้ทราบฤทธิ์ในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงเปลาโนทอล
3. ลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ เนื่องจากได้คัดกรองเฉพาะสารแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสมาทำการศึกษา

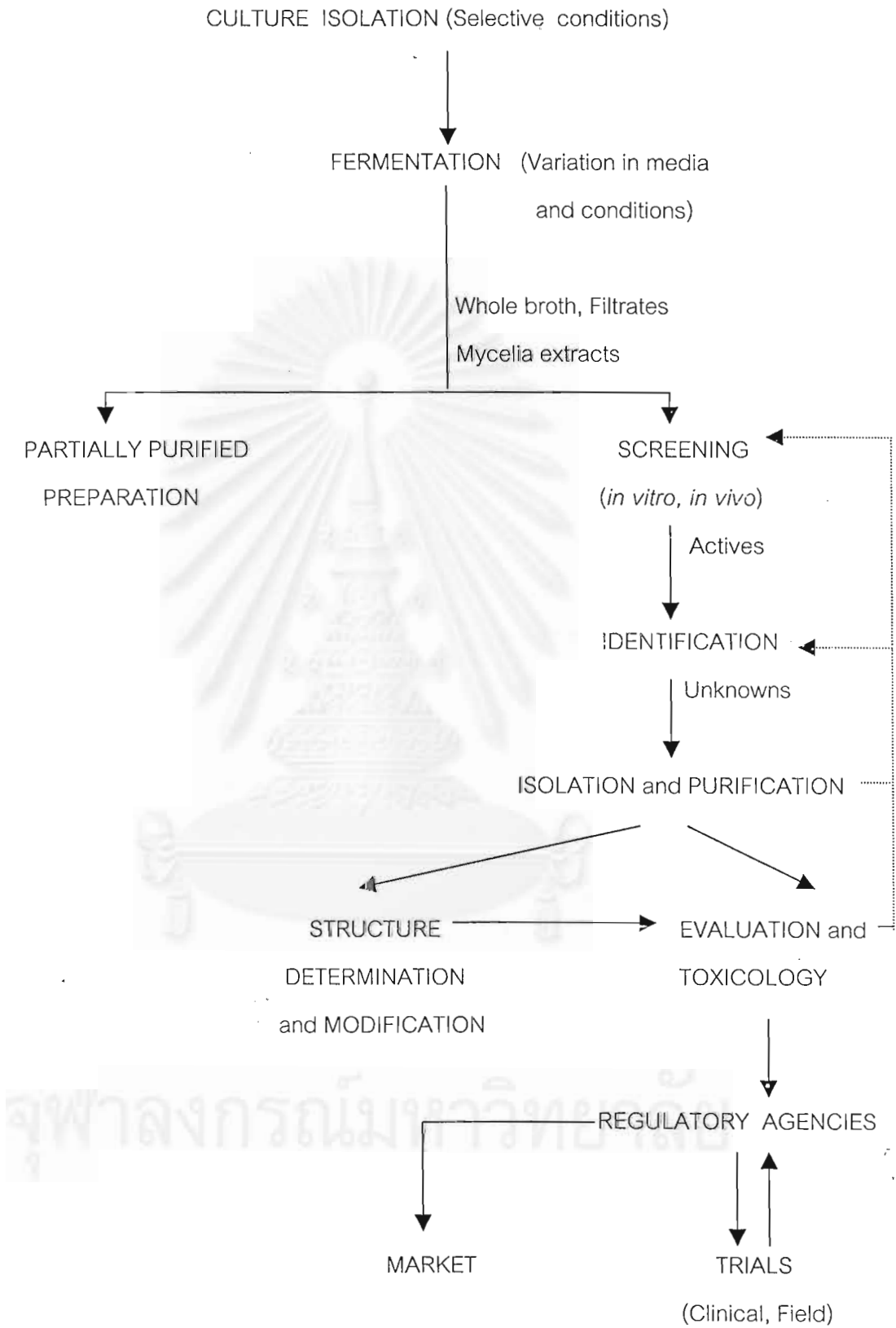
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biologically active compounds) คือสารเคมีที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแล้วไปมีผลต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ (ยอดหทัย เทพรานนท์; 2540) การคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธียับยั้งเอนไซม์ เริ่มต้นโดย Umezawa (1972) โดยเริ่มคัดกรองหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จากสารเมแทบอลิต์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ขั้นตอนการคัดกรองเป็นไปตามรูปที่ 1 และวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืชหรือสัตว์ได้ (Bu'Lock, และคณะ, 1982) ตัวยับยั้งเอนไซม์ (Enzyme inhibitors) ที่พบในธรรมชาตินั้นพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืช, เนื้อเยื่อสัตว์ หรือ จุลินทรีย์ ถ้าเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ที่ได้จากเนื้อเยื่อพืชหรือเนื้อเยื่อสัตว์ส่วนใหญ่จะเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ส่วนตัวยับยั้งเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นสารโมเลกุลเล็ก (Umezawa, 1972) ตัวอย่างของตัวยับยั้งเอนไซม์ที่พบในธรรมชาติ เช่น ตัวยับยั้งทริปซินและไคโมทริปซิน (Trypsin and Chymotrypsin Inhibitors) พบในไข่ขาวของสัตว์ปีก, แป้งข้าวสาลี, ข้าวไรน์, ข้าวบาร์เลย์, และหัวมันฝรั่ง (Kassell, 1970) ตัวยับยั้งไรโบนิวคลีเอสและดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease and Deoxyribonuclease Inhibitors) พบในเยื่อตับและต่อมไทมัส (Thymus gland) (Shapot และคณะ, 1971)

ตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะ (Specific enzyme inhibitors) มีประโยชน์ในการศึกษาทางชีวเคมีของโรคและหน้าที่ทางชีวภาพของเซลล์ ถ้าตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะทำให้อาการของโรคดีขึ้น หรือสามารถเปลี่ยนหน้าที่ทางชีวภาพของเซลล์ แสดงว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะ มีความสัมพันธ์ทางตรงหรือทางอ้อมกับโรคที่เกิด ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป จากหลักการข้างต้นนี้ ยังสามารถคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านการติดเชื้อจุลินทรีย์โดยคัดกรองหาตัวยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ หรืออาจคัดกรองหาสารมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยคัดกรองตัวยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Umezawa, 1972) นอกจากนี้ตัวยับยั้งเอนไซม์จำเพาะยังสามารถใช้เป็นยา, สารฆ่าแมลง และอาวุธเคมีได้อีกด้วย (Smith และ Wood, 1992) ตัวอย่างยาที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ที่จำเพาะดังแสดงในตารางที่ 1

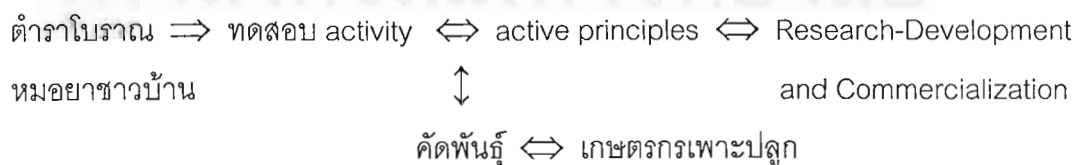


รูปที่ 1 แผนภาพระบบการคัดกรองสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ (BurLock, และคณะ, 1982)

ตารางที่ 1 ยาที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ (Smith และ Wood, 1992)

Drugs	Type of action	Enzyme	Medical use
Vinyl aminohexanoate	Inhibitor	GABA aminotransferase	Epilepsy
Edrophonium chloride	Inhibitor	Acetylcholine esterase	Myasthenia gravis
Demecarium bromide	Inhibitor	Acetylcholine esterase	Glaucoma
Methotrexate	Inhibitor	Dihydrofolate reductase	Cancer therapy
Pargyline HCl	Inhibitor	Monoamine oxidase	Antidepressant
Ethanol	Substrate	Alcohol dehydrogenase	Methanol poisoning

การศึกษาวิจัยในพืชสมุนไพรก็เช่นกัน ขั้นแรกต้องเริ่มต้นจากการคัดกรองดูว่าสมุนไพรชนิดนี้มีสารมีฤทธิ์ทางชีวภาพอยู่หรือไม่ ถ้ามีก็จะนำมาศึกษาต่อโดยการสกัดสารที่มีฤทธิ์ให้บริสุทธิ์ นำไปศึกษาโครงสร้าง ศึกษาทางพิษวิทยา (Toxicological studies) และศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological action) เลือกฤทธิ์ที่เด่นที่สุดของสารนั้น ๆ ออกมา แล้วนำไปศึกษาต่อทางคลินิก (Clinical studies) และเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics studies) (ยอดหทัย เทพรานนท์; 2540) ขั้นตอนการวิจัยสมุนไพรแบบครบวงจรเป็นไปตามรูปที่ 2

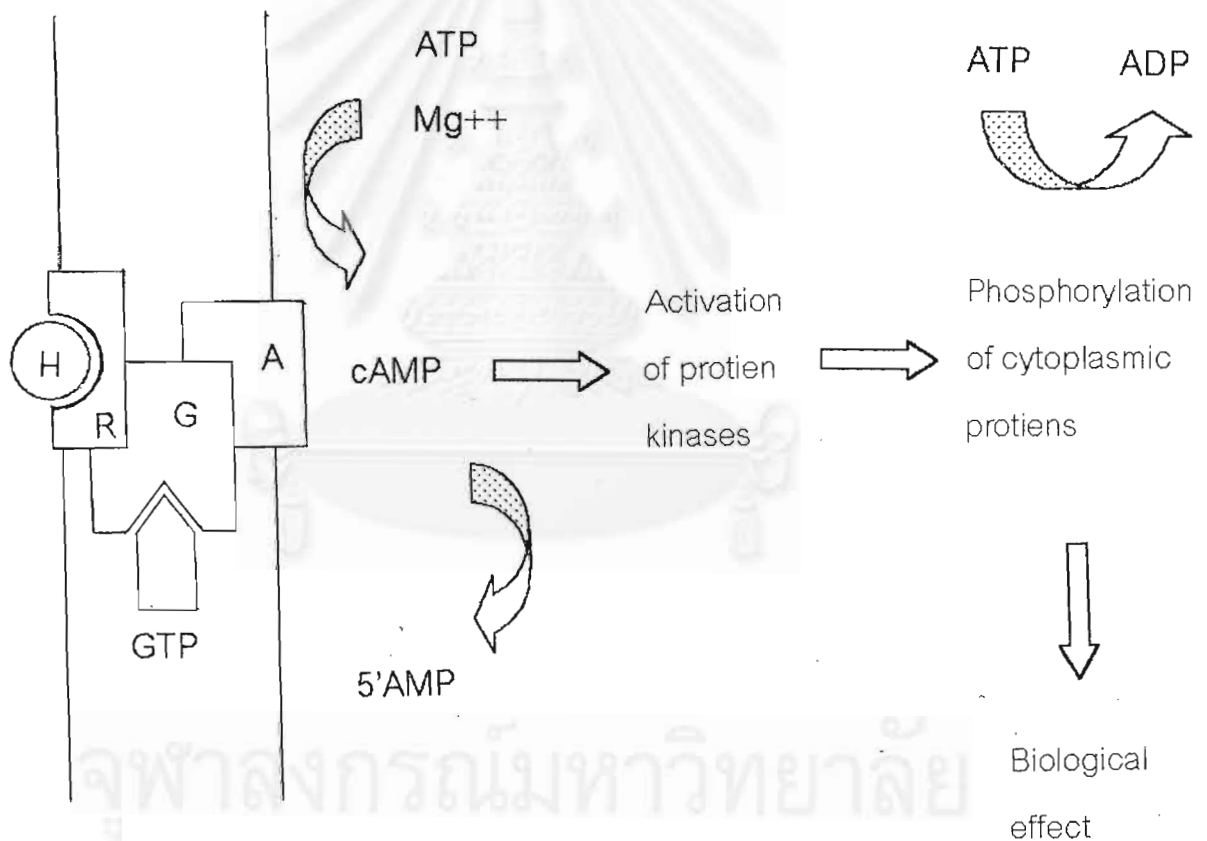


รูปที่ 2 ขั้นตอนการวิจัยสมุนไพรแบบครบวงจร (ยอดหทัย เทพรานนท์; 2540)

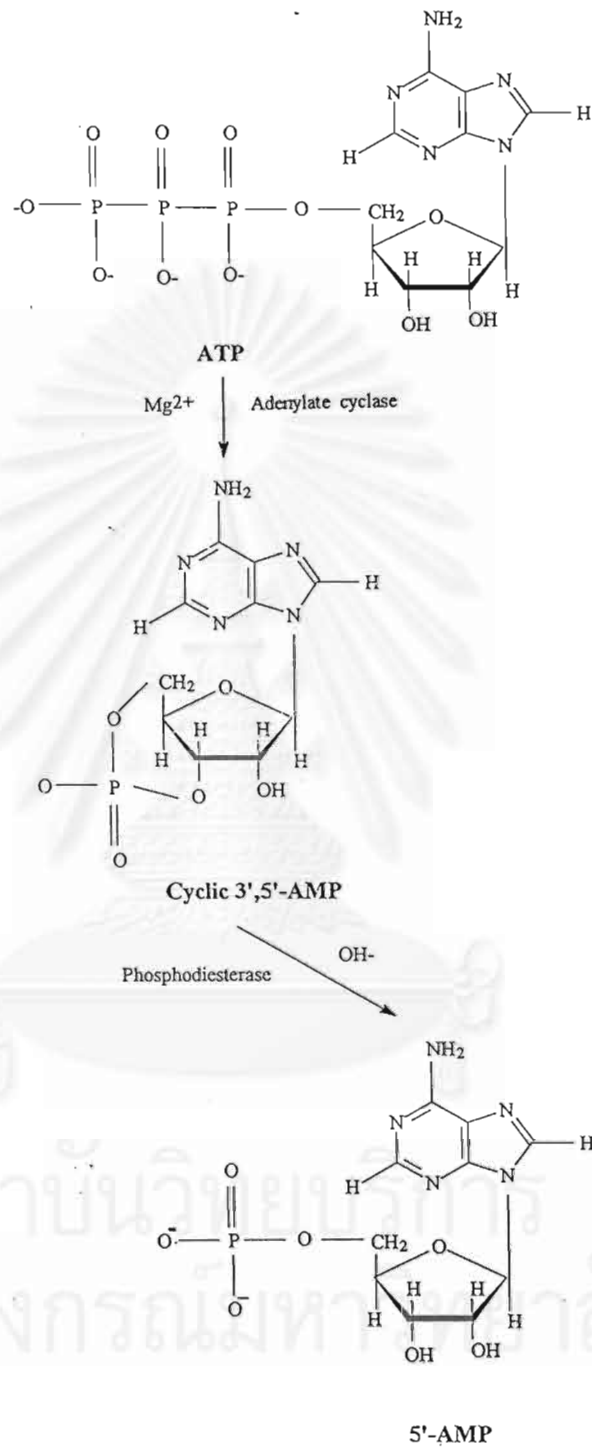
การคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ เป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร เนื่องจากควบคุมได้ง่าย ใช้เวลาในการทดสอบสั้น และสามารถทดสอบสารตัวอย่างได้หลายชนิด เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบอาจเตรียมจากอวัยวะของสัตว์ หรือซื้อจากตัวแทนจำหน่าย การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์สามารถวัดได้หลายวิธี เช่น วัดปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือจากปฏิกิริยา, วัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา หรือวัดส่วนประกอบที่ปล่อยออกมาจากสารตั้งต้น และจะต้องมี blank เพื่อจะหลีกเลี่ยงสารรบกวนที่อาจเกิดขึ้นในปฏิกิริยา ในสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบต้องระวังสารอื่น ๆ ที่ปนมาจะรบกวนปฏิกิริยา เช่น ในน้ำเลี้ยงเชื้อ (broth) ก่อนที่จะนำมาทดสอบ ควรทำลายสารรบกวนหรือเอนไซม์อื่น ๆ ที่อาจรบกวนปฏิกิริยาให้หมดไปก่อน การวัดความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ของสารที่ทดสอบจะวัดเป็นค่า IC_{50} (Inhibition concentration 50%) ค่า IC_{50} คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50% ค่า IC_{50} นี้ใช้เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร สารใดที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่า สารที่มีค่า IC_{50} สูงกว่า ซึ่งแสดงว่าใช้ความเข้มข้นน้อยกว่าก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50% เท่ากัน

ไซคลิก-เอเอ็มพี มีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึม รวมทั้งควบคุมระบบหัวใจและกล้ามเนื้อเรียบ, glycogenolysis, platelet aggregation, secretion และ lypolysis (Weishaar, Cain และ Bristol, 1985) บทบาทของไซคลิก-เอเอ็มพี (Cyclic AMP) ในร่างกายคือทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ ซึ่งเป็นตัวถ่ายทอดสัญญาณจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ ไซคลิก-เอเอ็มพีเกิดขึ้นเมื่อมีฮอร์โมนที่เป็นโปรตีน (เปปไทด์ หรือ เอมีน) ออกฤทธิ์โดยการจับกับตัวรับ (receptors) ที่อยู่บนเยื่อผนังเซลล์ และก่อให้เกิดกระบวนการตอบสนองของเซลล์ต่อฮอร์โมน โดยเซลล์จะสร้างตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิขึ้น ตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิที่เกิดขึ้นในเยื่อผนังเซลล์มีหลายชนิด ที่สำคัญ ได้แก่ ไซคลิก-เอเอ็มพี, ไซคลิก-จีเอ็มพี (cGMP), แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), อนุพันธ์ของ phospholipid (diacylglycerol และ inositol triphosphate) กลไกการสร้างไซคลิก-เอเอ็มพี เริ่มต้นเมื่อมีฮอร์โมนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นปฐมภูมิ (first messenger) (Robison, Butcher and Sutherland, 1971) มาจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ ตัวรับเข้าร่วมตัวกับโปรตีน G ทำให้โปรตีน G เปลี่ยนรูปร่างแล้วเข้าร่วมตัวกับโปรตีน GTP และปล่อย α -subunit ออกมาจับกับ adenylate cyclase ของเยื่อผนังเซลล์ ทำให้ adenylate cyclase ทำงานมากขึ้น จะเร่งให้เกิดการสลาย ATP โดยอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) เป็นตัวร่วม ได้เป็นไซคลิก-เอเอ็มพีขึ้นมา ไซคลิก-เอเอ็มพีที่เพิ่มขึ้นมานี้ทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ ไปออกฤทธิ์เร่งการทำงาน

ของ protein kinase ซึ่งทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เกิดปฏิกิริยา Phosphorylation ทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ กลไกการสร้างไซคลิก-เอเอ็มพี เกิดขึ้นตามรูปที่ 3 การตอบสนองของเซลล์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่เกิด phosphorylation, adenylate cyclase จะหมดฤทธิ์เมื่อ GTP ที่จับกับโปรตีน G ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น GDP ในทำนองเดียวกัน ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจะเร่งให้มีการสลายไซคลิก-เอเอ็มพี และหยุดการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนต่อเซลล์ (สุพรพิมพ์ เจียสกุล และคณะ, 2539)



รูปที่ 3 การออกฤทธิ์ของโปรตีนฮอร์โมนผ่าน ไซคลิก-เอเอ็มพี : H= hormone, R= receptor, G = G protein, A= adenylate cyclase (สุพรพิมพ์ เจียสกุล และคณะ, 2539)



รูปที่ 4 ปฏิกิริยาการสร้าง ไซคลิก-เอเอ็มพี โดยการสลาย ATP (Voet and Voet ,1990)

ถ้ามีตัวยับยั้งมายับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส จะทำให้ไซคลิก-เอเอ็มพีถูกสลายลดลง ความเข้มข้นของไซคลิก-เอเอ็มพีในเยื่อผนังเซลล์จึงเพิ่มสูงขึ้น ทำให้การตอบสนองต่อฮอร์โมนมีมากกว่าในกรณีที่ไม่มีตัวยับยั้ง ดังนั้นตัวยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส จึงมีฤทธิ์ในกระตุ้นการทำงานของเซลล์ (Smith and Wood, 1991) รูปที่ 4 แสดงปฏิกิริยาการสร้างไซคลิก-เอเอ็มพี โดยการสลาย ATP

เนื่องจากว่าไซคลิก-เอเอ็มพี ทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นทุติยภูมิ สารประกอบใดที่สามารถเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของไซคลิก-เอเอ็มพีได้ จะเป็นสารที่น่าสนใจศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ (Sakurai, และคณะ, 1992) Weinryb และคณะ (1981) รายงานว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของตัวยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึมของไซคลิก-เอเอ็มพี โดยหลักการนี้เราสามารถคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารที่ศึกษา โดยใช้ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เป็นเครื่องมือในการทดสอบ (Nikaido, และคณะ, 1981 ; Kusano, และคณะ, 1991 ; Weinryb, และคณะ, 1972)

ในปี ค.ศ. 1981 Nikaido และคณะได้ทำการคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในพืชสมุนไพรพื้นบ้าน 22 ชนิด โดยสกัดสมุนไพรด้วยน้ำร้อน ทำให้แห้งแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสด้วยวิธีกัมมันตภาพรังสี โดยติดฉลากไซคลิก-เอเอ็มพีด้วย ^3H พบว่ามีพืชสมุนไพร 22 ชนิดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสมากกว่า 30% ดังแสดงในตารางที่ 2 นำสมุนไพรทั้ง 22 ชนิด มาแยกสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้ 2 ส่วน คือส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม และส่วนที่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม นำทั้ง 2 ส่วนมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่าส่วนที่ละลายได้ในคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงกว่าส่วนที่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ซึ่งแสดงว่าตัวยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์

ตารางที่ 2 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของพืชสมุนไพร

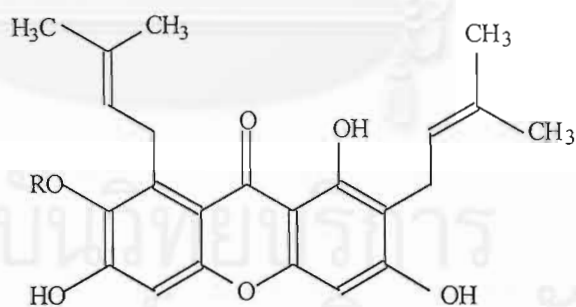
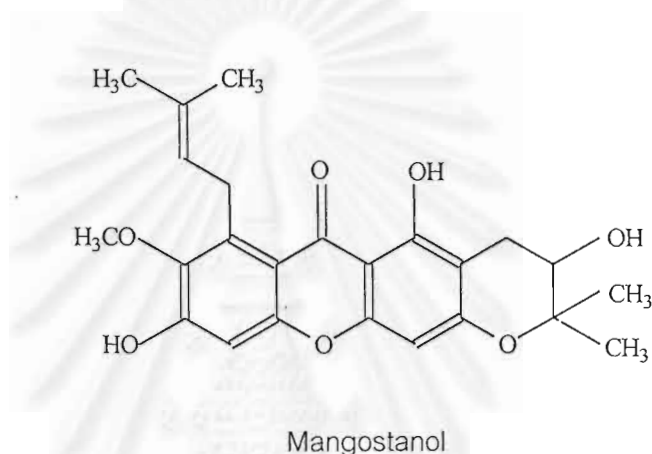
H₂O Ext. = สกัดสมุนไพรด้วยน้ำร้อน ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

CHCl₃ sol.= ส่วนที่ละลายในคลอโรฟอร์ม , CHCl₃ insol.= ส่วนที่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม

* ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (Nikaido และคณะ; 1981)

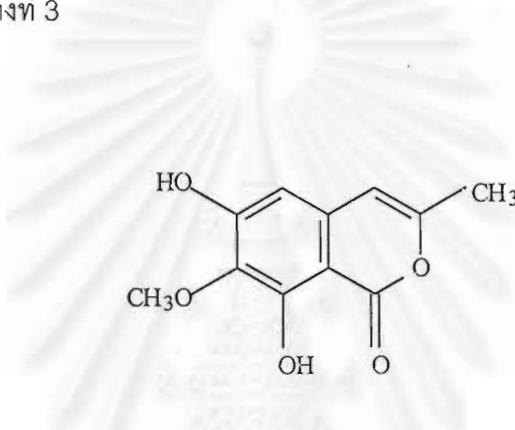
Samples		%Inhibition (100 µg/ml.)			
Plant name	part	H ₂ O Ext.		CHCl ₃	CHCl ₃
		I	II	sol.	insol.
<i>Iris florentina</i>	Rhizome	44.3	46.6	77.3	-*
<i>Polygala tenuifolia</i>	Radix	52.5	43.4	84.4	36.9
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Radix	45.5	72.1	72.4	34.8
<i>Nepeta japonica</i>	Herb	31.6	65.1	67.0	-*
<i>Cassia obtusifolia</i>	Seed	38.2	61.7	88.1	-*
<i>Daphne genkwa</i>	Flower-bud	51.0	66.9	70.4	44.2
<i>Carthamus tinctorius</i>	Flower	30.8	39.0	11.7	-*
<i>Bupleurum falcatum</i>	Radix	38.1	43.1	74.1	-*
<i>Asiasarum sieboldi</i>	Radix	34.4	37.5	63.3	-*
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Fruit	36.2	51.5	-*	-*
<i>Fraxinus bungeana</i>	Bark	54.4	60.0	26.6	0.07
<i>Citrus reticulata</i>	Immature-peel	43.3	40.9	81.4	-*
<i>Nuphar japonicum</i>	Radix	51.6	57.9	60.1	40.7
<i>Inula britannica</i>	Flower	84.9	38.2	11.5	0.01
<i>Amomum costatum</i>	Fruit	42.7	37.5	67.0	0.03
<i>Perilla frutescens</i>	Herb	30.4	42.3	62.6	0.07
<i>Areca catechu</i>	Peel	33.8	31.8	78.6	26.8
<i>Aralia elata</i>	Root-bark	39.2	47.9	67.4	-*
<i>Phyllostachys nigra</i>	Cortex	61.7	63.2	78.4	47.7
<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	Rhizome	48.0	47.1	94.5	-*
<i>Caesalpinia sappan</i>	Wood	68.8	59.2	85.7	61.1
<i>Forsythia suspensa</i>	fruit	44.7	34.6	56.3	37.3

ในปี ค.ศ. 1996 Chairungsrilerd และคณะได้ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสาร prenyl xanthone ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana*) ได้แก่ mangostanol, α -mangostin และ γ -mangostin โครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 5 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสโดยวิธีมาลาโคตกรีน พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 47, 24 และ 50 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างของ mangostanol, α -mangostin และ γ -mangostin ที่สกัดได้จากเปลือกมังคุด (Chairungsrilerd, 1996)

นอกจากจะมีผู้คัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ในพืชสมุนไพรแล้ว Furutani และคณะ (1975) ยังได้ทำการคัดกรองสารมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อรา actinomycetes ที่พบในดินประมาณ 1% สร้างสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส หนึ่งในจำนวนนั้นคือ reticulol (6,8-Dihydroxy-7-methoxy-3-methylisocoumarine) ที่สร้างจาก *Streptomyces mobaraensis* สายพันธุ์ MD611-C6 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 41 ไมโครโมลาร์ สูตรโครงสร้างของ reticulol ดังแสดงในรูปที่ 6 ตัวอย่างสารอื่น ๆ ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ดังแสดงใน ตารางที่ 3

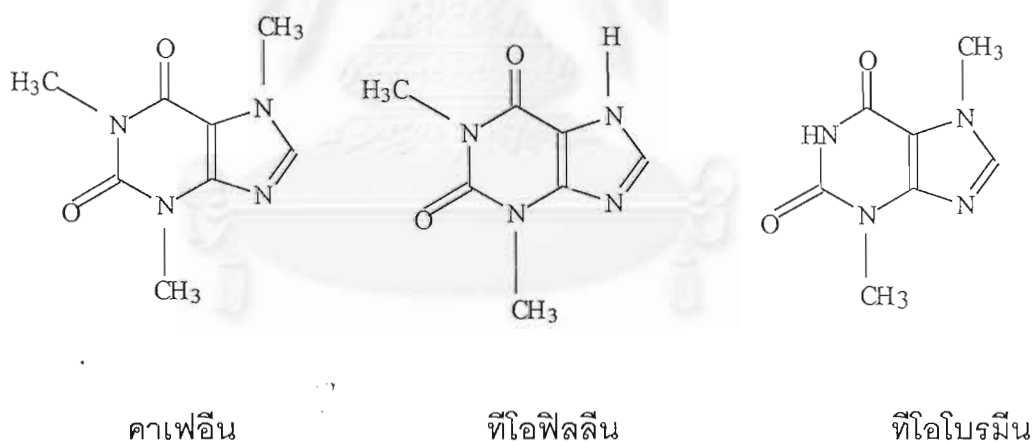


รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของ Reticulol ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces mobaraensis* (Furutani และคณะ, 1975)

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการศึกษากลไกของสารต่อการทำงานของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสเป็นการทดสอบขั้นพื้นฐาน โดยคัดกรองเฉพาะสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เนื่องจากไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสทำหน้าที่สลายไซคลิก-เอเอ็มพี และไซคลิก-เอเอ็มพีเป็นตัวสื่อสารภายในเซลล์ชั้นหุติยภูมิของ neurotransmitters สารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส จะทำให้ปริมาณไซคลิก-เอเอ็มพีเพิ่มขึ้น ไซคลิก-เอเอ็มพีที่เพิ่มขึ้นมานี้ เสมือนหนึ่งว่าปริมาณของ neurotransmitters เพิ่มขึ้น จึงมีผลทำให้กระตุ้นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางเพิ่มขึ้น ดังนั้นสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจึงมีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง (จุฑามณี สุทธิสีสังข์ และ รัชณี เมฆมณี, บรรณาธิการ, 2540)

สารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางโดยการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสอาทิเช่น

สารกลุ่มแซนทีน (xanthine) ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ (alkaloid) ของกลุ่มพิวรีน (purine) แอลคาลอยด์กลุ่มนี้มีความสำคัญต่อพืชและสัตว์ในรูปเบส (base) เช่น อะดีนีน (adenine) และ กัวนีน (guanine) เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นตัวถ่ายทอดสารพันธุกรรมและมักเป็น โคเอนไซม์ จึงมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาสำคัญภายในเซลล์ เช่น ปฏิกิริยาการเติมหมู่ ฟอสเฟต (phosphorylation) โครงสร้างหลักของพิวรีนประกอบด้วย pyrimidine ring จับกับ imidazole ring คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของอนุพันธ์แซนทีน คือกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง เพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (positive inotrope) ตัวอย่างของสารแซนทีน ได้แก่ คาเฟอีน (caffeine = 1,3,7-trimethylxanthine), ทีโอฟีลลีน (theophylline = 1,3-dimethylxanthine) และทีโอโบรมีน (theobromine = 3,7-dimethylxanthine) สูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงสูตรโครงสร้างของคาเฟอีน ทีโอฟีลลีน และทีโอโบรมีน

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสารแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พร้อมทั้งแสดงค่า IC_{50}

Samples	IC_{50} ($\times 10^{-5}$ M)	References
Papaverine	3.0	Chairungsrilerd, และคณะ, 1996 Furutani, และคณะ, 1975 Inoue, และคณะ, 1995 Kusano, และคณะ, 1991
Theophylline	28	Furutani, และคณะ, 1975
Cerveratrum alkaloids สกัดจากหัว ใต้ดินของ <i>Fritillaria persica</i> ได้แก่ Compound 1 ($C_{27}H_{49}NO_2$) Compound 2 ($C_{27}H_{45}NO_2$) Compound 3 ($C_{33}H_{55}NO_7$) Compound 5 ($C_{33}H_{55}NO_7$)	24.7 8.8 12.7 18.3	Ori, และคณะ, 1992
Iodochlorhydroxyquin	15	Weinryb, และคณะ, 1972
Aminopyrin	58	
Phenylbutazone	11	
Bunamidine	4.4	
Pyrvinium pamoate	0.8	
Diazepam	3.3	
Chlordiazepoxide	11	
Meclizine	24	
Chloramphenicol	3.0	
Dipyridamole	0.4	
Tetracyclin	34	
Acenocoumarol	12	
Diphenylhydantoin	48	
Phenacemide	30	
Amitriptyline	46	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Samples	IC ₅₀ (×10 ⁻⁵ M)	References
สาร Flavonoids สกัดจากรากของ Licorice ได้แก่ Isoliquiritigenin-4'-O-apioglucoside Isoliquiritigenin Liquiritigenin Glabridin Licoricidin Licoarylcoumarin Glycycoumarin Glycyrol Licoricone	171 18 108 8.2 4.9 1.0 0.7 4.4 2.3	Kusano, และคณะ, 1991
สาร Steroidal saponins จากรากของ <i>Smilax riparia</i> ได้แก่ Compound 1 (C ₃₉ H ₆₄ O ₁₂) Compound 2 สาร Steroidal saponins จากรากของ <i>Smilax china</i> ได้แก่ Compound 3 (C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁) Compound 4 (C ₅₂ H ₈₆ O ₂₂) Compound 5 (C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆) Compound 6 (C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇)	10.2 5.5 4.7 29.4 33.3 9.3	Sashida, และคณะ, 1992
สาร Steroidal saponins จากลำต้นใต้ดิน ของ <i>Smilax sieboldii</i> ได้แก่ Compound 1 (C ₄₄ H ₇₀ O ₁₈) Compound 2 (C ₃₈ H ₆₀ O ₁₃) Compound 6 (C ₄₄ H ₇₂ O ₁₇)	8.3 3.4 3.2	Kubo, และคณะ, 1992

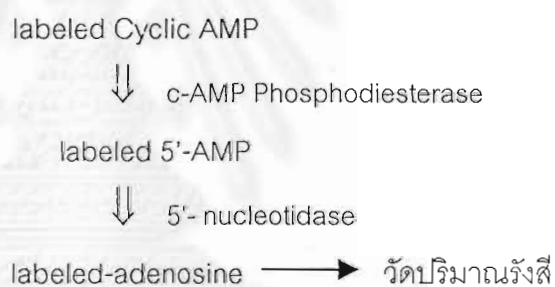
ตารางที่ 3 (ต่อ)

Samples	IC ₅₀ (×10 ⁻⁵ M)	References
สาร Steroidal alkaloids สกัดจากหน่อ ของ <i>Fritillaria persica</i> ได้แก่		
Compound 2 (C ₂₇ H ₄₁ NO ₃)	10.6	Ori, และคณะ, 1992
Compound 3 (C ₂₇ H ₄₁ NO ₃)	67.9	
Compound 4 (C ₂₇ H ₄₁ NO ₃)	21.4	
Compound 5 (C ₃₃ H ₅₁ NO ₈)	17.1	
สาร Steroidal saponin จากหน่อของ <i>Dichelostemma multiflorum</i> ได้แก่		
Compound 1 (C ₄₀ H ₆₄ O ₁₃)	20.6	Inoue, และคณะ, 1995
Compound 1b	76.2	
Compound 2	11.8	
Compound 2a	10.0	
Compound 3	12.3	
Compound 4	11.4	
Compound 5 (C ₅₀ H ₈₂ O ₂₂)	15.4	

การวัดแอกติวิตีของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

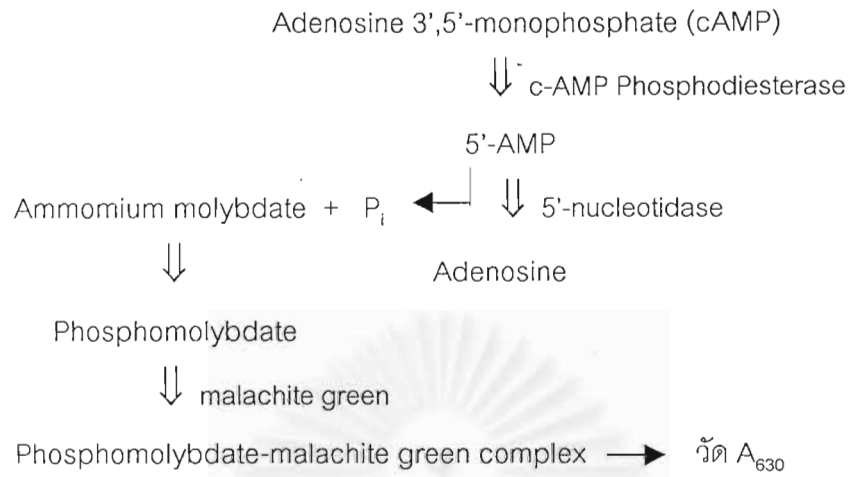
การวัดแอกติวิตีของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสทำได้ 2 วิธี คือ

1. วิธีกัมมันตภาพรังสี (Radioactive methods) โดยติดตามไซคลิก-เอเอ็มพีซึ่งเป็นสารตั้งต้นด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (labeled c-AMP) ปฏิกริยาเริ่มต้นเมื่อเติมไซคลิก-เอเอ็มพีลงไป ในปฏิกริยา ขั้นตอนปฏิกริยาเป็นไปตามรูปที่ 8 ได้ผลิตภัณฑ์คือ labeled-adenosine เมื่อปฏิกริยาสิ้นสุดลง แยกไซคลิก-เอเอ็มพีที่เหลือจากปฏิกริยาโดยใช้เรซินที่เหมาะสมเป็นตัวดูดซับ วัดปริมาณรังสีของ labeled-adenosine โดยเครื่อง Liquid scintillation counter วิธีที่นิยมใช้ เช่น วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Thompson และ Brooker (Weinryb และคณะ, 1972 ; Nikaido และคณะ, 1981) ซึ่งจะติดตามไซคลิก-เอเอ็มพี ด้วย ^3H หรือติดตามด้วย ^{14}C (Furutani, และคณะ, 1975)



รูปที่ 8 การวัดแอกติวิตีของ ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยวิธีกัมมันตภาพรังสี

2. วิธีมาลาโคตกรีน (Malachite green Method) (Chairungsrierd และคณะ, 1996; Chan, Delfert และ Jonger, 1986; Lanzetta และคณะ, 1979) วัดปริมาณฟอสเฟตอินทรีย์ (Inorganic Phosphate, P_i) ที่ปล่อยออกจาก 5'-AMP โดยไซคลิก-เอเอ็มพีซึ่งเป็นสารตั้งต้น ถูกสลายโดยไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ได้ 5'-AMP และถูกสลายต่อโดย 5'-nucleotidase ได้ adenosine และปล่อยฟอสเฟตอินทรีย์ออกมา ฟอสเฟตอินทรีย์ที่อยู่ในปฏิกริยาจะเข้าร่วมตัวกับแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate) และมาลาโคตกรีน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ฟอสโฟโมลิบเดต-มาลาโคตกรีน (Phosphomolybdate-malachite green Complex) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ปฏิกริยาเกิดตามรูปที่ 9



รูปที่ 9 การวัดแอกติวิตีของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยวิธีมาลาโคตกรีน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ (Umezawa, 1972)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์สามารถคำนวณได้จากปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ หรือจากปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา ถ้าคำนวณจากปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาคำนวณได้ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

กำหนดให้

a = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดในปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวยับยั้ง

b = ผลิตภัณฑ์ที่เกิดในปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้ง

ถ้าคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ คำนวณได้โดย

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(c-a)-(c-b)}{c-a} \times 100$$

กำหนดให้

a = สารตั้งต้นที่เหลือในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์

b = สารตั้งต้นที่เหลือในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์และตัวยับยั้ง

c = สารตั้งต้นที่เหลือในปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์และไม่มีตัวยับยั้ง

โดยปกติจะนิยมคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา แต่ถ้าในปฏิกิริยาสารตั้งต้นถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ไม่ถึง 1.0 % ก็คำนวณจากปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือแทน

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 ครุภัณฑ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ของบริษัท Memmert
3. เครื่องผสม (Mixer) รุ่น Vortex-Genie 2
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-Meter) ของบริษัท Metrohm รุ่น 620
5. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) ของบริษัท Mettler Toledo รุ่น AB 204
6. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) RE 52 ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น

3.2 เคมีภัณฑ์

1. Ammonium molybdate ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
2. Adenosine 3',5'-monophosphate (c-AMP) Sodium salt. ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. cAMP Phosphodiesterase (bovine heart) ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) anhydrous ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. Chloroform ชั้นอุตสาหกรรม ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น
6. Dimethyl sulfoxide ของบริษัท Fluka Chemika
7. Ethyl alcohol ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
8. 6 normal Hydrochloric acid ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
9. Hexane ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
10. Magnesium chloride hexahydrate ของบริษัท J.T.Barker Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Malachite green (Brilliant green) ของบริษัท Tokyo Kasei Kogyo ประเทศญี่ปุ่น
12. Methyl alcohol ชั้นอุตสาหกรรม ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น
13. 5'-nucleotidase (*Crotualus atrox venon*) ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. Polyvinyl alcohol ของบริษัท Metro Company Limited
15. Silica gel 60 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
16. Sodium citrate dihydrate ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน
17. Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมัน
18. Theophylline (1,3-dimethylxanthine) anhydrous ของบริษัท Sigma Chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน

3.3 สารตัวอย่าง

1. สมุนไพรซื้อจากร้านเวชพงษ์ไอสถ กรุงเทพมหานคร (มกราคม 2542)
2. สารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณประวิทย์ สิงห์โตทอง (2542)
3. เจอรานีฮอล และสารอนุพันธ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณปณตริก รุจิรภา (2541)
4. ฟาร์นีสอล และสารอนุพันธ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณวณิภา นาคลดดา (2542)

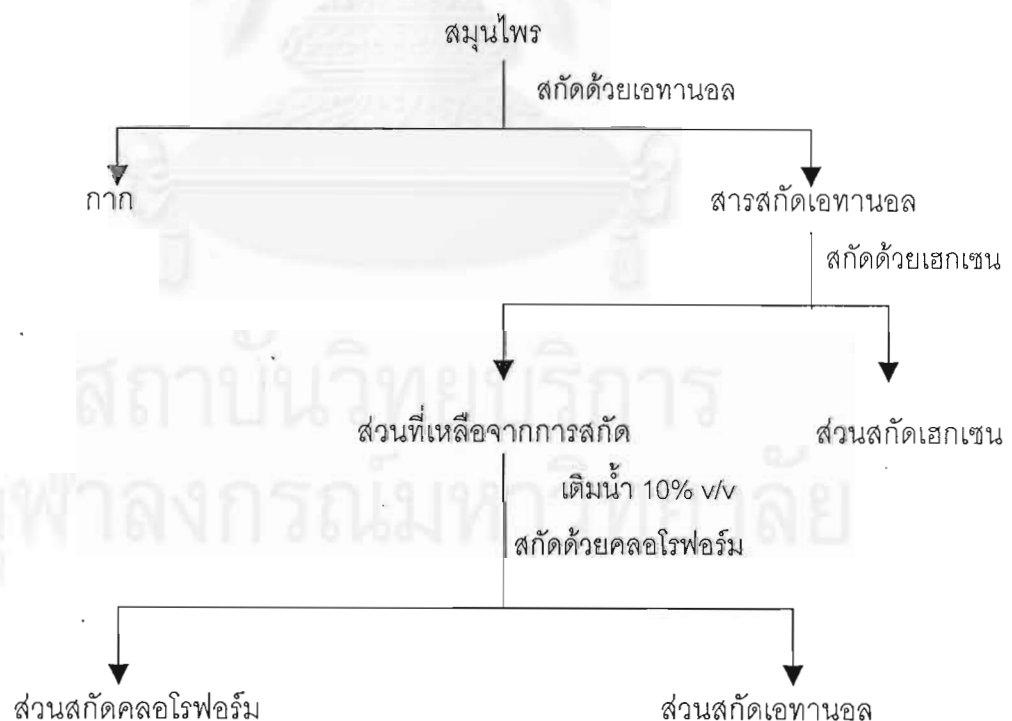


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

3.4 การสกัดสารจากสมุนไพรที่ต้องการทดสอบ

นำสมุนไพรที่จะทดสอบ ได้แก่ กระชาย, กวาวเครือแดง, กำลังพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, โศภิตไม้, ตะโกนา, ม้ากระทืบโรง, ว่านชักมดลูก, ว่านร้อนทอง และฮ้อสะพายควาย ล้างให้สะอาดแล้วผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่เอทานอลทิ้งไว้ประมาณ 24-36 ชั่วโมง กรองเอาส่วนน้ำใสมาระเหยเอทานอลออกให้หมด จะได้สารสกัดเอทานอล (ethanol extract) นำสารสกัดเอทานอลที่ได้มาแยกสกัดต่อด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ระเหยเฮกเซนออกให้หมด โดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จะได้ส่วนสกัดเฮกเซน (hexane crude) นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาเติมน้ำปราศจากไอออนประมาณ 10%v/v นำมาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 ระเหยคลอโรฟอร์มออกให้หมด จะได้ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม (chloroform crude) นำส่วนที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มาระเหยน้ำและเอทานอลออกให้หมด จะได้ส่วนสกัดเอทานอล (ethanol crude) ขั้นตอนการสกัดเป็นไปตามรูปที่ 10



รูปที่ 10 ขั้นตอนการสกัดสารจากสมุนไพรด้วยเอทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์ม

3.5 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ละลายสารสกัดจากสมุนไพรที่ได้จากข้อ 3.4 และสารตัวอย่างอื่น ๆ ที่ต้องการทดสอบใน 1% ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide:DMSO) ในน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นนี้ไม่ใช่ความเข้มข้นสุดท้าย เนื่องจากเมื่อมีการเติมสารละลาย เอนไซม์แล้วความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะลดลงเหลือ 200 $\mu\text{g/ml}$

3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอนินทรีย์

สารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอนินทรีย์ (Inorganic phosphate; P_i) เตรียมโดยนำ สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เจือจางให้ มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอนินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ P_i (μM)	ปริมาณของ P_i 100 μM ที่ใช้ (μl)	น้ำปราศจากไอออน (μl)
Blank	0	1,000
0	0	1,000
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600

3.7 การเตรียมกราฟมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์

นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 3.6 มาวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตโดยวิธีมาลาโคตกรีน โดยบ่มสารละลายที่ได้ในข้อ 3.6 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมรีเอเจนท์ผสมหลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 25% โซเดียมซิติเรทในน้ำปราศจากไอออน หลอดละ 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟอสเฟตอินทรีย์และค่าการดูดกลืนแสง

3.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารตัวอย่าง

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 3.5 มาทำการทดสอบ สารตัวอย่าง 1 ชนิด แบ่งทำเป็น 2 หลอดทดลองคือ หลอดทดลองที่มีการเติมเอนไซม์ (+enz) และ หลอดทดลองที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (-enz.) สารตัวอย่าง 1 ชนิด ทำซ้ำ 2 ครั้ง ดังนี้

3.8.1 ปฏิกริยาที่มีการเติมเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์ 400 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 3.5 ลงไป 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติม 10 มิลลิโมลาร์ไซคลิก-เอเอ็มพี 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มต่อที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมรีเอเจนท์ผสม 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 25% โซเดียมซิติเรทในน้ำปราศจากไอออน 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

3.8.2 ปฏิกริยาที่ไม่มีการเติมเอนไซม์

นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 3.5 มา 500 ไมโครลิตร เติม Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, pH 7.4 ลงไป 400 ไมโครลิตร และ น้ำปราศจากไอออน 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมรีเอเจนท์ผสม 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 25% โซเดียมซิติเรทในน้ำปราศจากไอออน 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ positive control และ negative control โดยทดสอบควบคู่ไปกับการทดสอบสารตัวอย่าง โดยใช้ คาเฟอีน หรือทีโอฟิลลีน ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ และ 1% ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ในน้ำปราศจาก ไอออน เป็น positive control และ negative control ตามลำดับ

ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส สรุปโดยย่อแสดงในรูปที่ 11

รูปที่ 11 ขั้นตอนโดยย่อของการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

Without enzyme

Sample solⁿ 500 μl

+ 10 mM Tris-HCl 400 μl

+ H₂O 100 μl

reagent mixture

1 ml

25% sodium citrate

200 μl

0 นาที

5 นาที

10 นาที

With enzyme

Enzyme solⁿ

400 μl

Sample solⁿ

500 μl

10 mM cAMP

100 μl

reagent mixture

1 ml

25% sodium citrate

200 μl

0 นาที

5 นาที

10 นาที

15 นาที

20 นาที

3.9 การแปลผล

นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากปฏิกิริยาที่เติมเอนไซม์และปฏิกิริยาที่ไม่เติมเอนไซม์มาคำนวณตามสูตร ดังนี้

$$A_{630} \text{ of samples} = A_{630} (+enz) - A_{630} (-enz)$$

นำค่าการดูดกลืนแสงที่คำนวณได้ มาอ่านค่าความเข้มข้นฟอสเฟตอินทรีย์จากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (% Inhibition) ได้ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(a-b) \times 100}{a}$$

กำหนดให้

a = ความเข้มข้นของฟอสเฟตอินทรีย์จากปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวยับยั้ง

b = ความเข้มข้นของฟอสเฟตอินทรีย์จากปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้ง

3.10 การหาค่า IC₅₀

3.10.1 เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 100, 200, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ นำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในแต่ละความเข้มข้น คำนวณ % Inhibition

3.10.2 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และ % Inhibition (แกน y) ลากเส้นจากแกน y ที่ความเข้มข้น 50% ตัดเส้นกราฟและตัดแกน x อ่านความเข้มข้นจากแกน x จะได้ค่า IC₅₀ ของสารตัวอย่างนั้น ๆ

หมายเหตุ : สามารถหาค่า IC₅₀ ได้เฉพาะสารที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเท่านั้น ส่วน crude นั้นไม่สามารถหาค่านี้ได้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารสกัดจากสมุนไพรพื้นบ้าน

โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ สมุนไพรที่ผู้วิจัยสกัดเอง และสารไดเทอร์พีนอยด์ที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว สกัดได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่โดยประวิทย์ สิงห์โตทอง (2542)

4.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้าน

เมื่อนำสมุนไพรพื้นบ้านดังกล่าวมาสกัดด้วยเอทานอล แล้วระเหยเอทานอลให้แห้ง ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5 จากนั้นนำสารสกัดเอทานอลที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยเตรียมสารสกัดเอทานอลให้มีความเข้มข้น 200 µg/ml ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 โดยมีคาเฟอีนและทีโอฟิลลีนเป็น positive control และมี 1% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ในน้ำปราศจากไอออน เป็น negative control ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 น้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักของสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรที่นำมาทดสอบ

รายชื่อสมุนไพร	น้ำหนักเริ่มต้น ของสมุนไพร (กรัม)	น้ำหนักของ สารสกัด เอทานอล (กรัม)
กวาวเครือแดง [<i>Butea superba</i> Roxb.]	8.8	0.47
กระชาย [<i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schltr.]	12.3	0.24
กำลังพลูเสือโคร่ง [<i>Betula alnoides</i> , Buch Ham.]	14.3	0.24
จันทน์เทศ [<i>Myristica fragrans</i> Houtt.]	15.5	0.60
ไต่ไม่รู้ล้ม [<i>Elephantopus scaber</i> Linn.]	11.4	0.19
ตะโกนา [<i>Diospyros rhodocalyx</i> Kurz.]	13.5	0.16
น้ำกระเทียมโรง [<i>Ficus pubigoza</i> Wall.]	13.3	0.28
ว่านชักมดลูก [<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.]	13.1	0.48
ว่านร้อนทอง [<i>Globba malaccensis</i> Ridl.]	12.6	0.22
ฮ่อสะพายควาย [<i>Suregada multiflorum</i> (A. Juss.) Bill.]	14.2	0.19

ตารางที่ 6 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสมุนไพร, positive control และ negative control

ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$		
	I	II	ค่าเฉลี่ย
กวาวเครือแดง	84.6	84.6	84.6
กระชาย	0.0	0.0	0.0
กำลังพลูเสื่อโคร่ง	87.5	90.0	88.8
จันทน์เทศ	75.0	75.0	75.0
โตไม้ขี้ส้ม	20.5	17.0	18.8
ตะโกนา	5.0	0.0	2.5
ม้ากระทืบโรง	100	100	100
ว่านขี้กมดลูก	21.2	28.8	25.0
ว่านร้อนทอง	87.5	85	86.3
ฮ่อสะพายควาย	27.7	27.7	27.7

Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) %Inhibition = 29.1

Negative control : 1% DMSO %Inhibition = 0

พิจารณาศามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสมุนไพร (ตารางที่ 6) กับทีโอฟิลลีนและคาเฟอีน ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ เท่ากัน พบว่ามีสมุนไพร 5 ชนิดคือ กวาวเครือแดง, กำลังพลูเสื่อโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร้อนทอง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงกว่าทีโอฟิลลีนและคาเฟอีน นั่นคือองค์ประกอบชนิดหนึ่งชนิดใดหรือมากกว่าในพืชสมุนไพรเหล่านี้มีผลในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้สดชื่น กระปรี้กระเปร่า เช่นเดียวกับคาเฟอีนและทีโอฟิลลีน จากการศึกษาข้อมูลทางสมุนไพรไทยพบว่า กวาวเครือแดงมีสรรพคุณบำรุงกำลัง ทำให้ร่างกายสดชื่น (วิทย์ เทียงบุญธรรม, 2531) กำลังพลูเสื่อโคร่งและม้ากระทืบโรง มีสรรพคุณบำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อย ปวดหลัง ปวดเอว (พดุมอาจารย์วิพุธโยคะ และ สุวัตร์ ตั้งจิตจรเจริญ, 2540; สุนทรี่สิงหนุตตรา, 2535) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอส

เทอร์ส ส่วนกระชาย, โดไม่รู้ล้ม, ตะโกนา, ว่านชักมดลูก และฮ้อสะพายควาย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์สน้อยกว่าที่โอฟิลลีนและคาเฟอีน อาจเนื่องจากองค์ประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านี้ไม่มีฤทธิ์หรือมีฤทธิ์น้อยในการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งไม่สอดคล้องกับสรรพคุณที่กล่าวอ้างในตำราสมุนไพรโบราณมากนัก

จากผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์สของสารสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 6 สามารถคัดกรองพืชที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์สสูงได้ 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ กวาวเครือแดง, กำลังพลูเสื่อไคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร้อนทอง

ในการศึกษาต่อไปเพื่อให้ทราบว่าสารแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์สในพืชสมุนไพรเหล่านี้อยู่ในส่วนใด จึงทำการสกัดสารสกัดเอทานอลด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 แล้วจึงนำสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์ส โดยเตรียมส่วนสกัดเฮกเซน, ส่วนสกัดเอทานอล และส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของสมุนไพรให้มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์ส ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 น้ำหนักของส่วนสกัดเฮกเซน และส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง, กำลังพลูเสื่อไคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร้อนทอง

สมุนไพร	น้ำหนักของ ส่วนสกัดเฮกเซน (กรัม)	น้ำหนักของ ส่วนสกัด คลอโรฟอร์ม (กรัม)	น้ำหนักของ ส่วนสกัดเอทานอล (กรัม)
กวาวเครือแดง	0.09	0.09	0.28
กำลังพลูเสื่อไคร่ง	0.12	0.06	0.06
จันทน์เทศ	0.44	0.09	0.04
ม้ากระทืบโรง	0.10	0.05	0.05
ว่านร้อนทอง	0.12	0.14	0.14

ตารางที่ 8 เปรอ์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของส่วนสกัดเฮกเซน, ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม และส่วนสกัดเอทานอล ของกวาวเครือแดง, กำลั้งพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และว่านร่อนทอง ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สมุนไพร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น 200µg/ml								
	ส่วนสกัดเฮกเซน			ส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม			ส่วนสกัดเอทานอล		
	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย
กวาวเครือแดง	16.6	8.3	12.5	70.8	70.8	70.8	75.0	79.2	77.1
กำลั้งพญาเสือโคร่ง	43.4	52.7	48.1	74.6	63.8	69.2	100	100	100
จันทน์เทศ	8.3	8.3	8.3	62.5	66.5	64.5	75.0	66.6	70.8
ม้ากระทืบโรง	17.7	24.6	21.2	84.6	80.7	82.7	100	100	100
ว่านร่อนทอง	7.7	7.7	7.7	69.2	69.2	69.2	83.3	87.5	85.4

Positive control : theophylline (200 µg/ml) % Inhibition = 35.6%

Negative control :1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าสารแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของกวาวเครือแดง กำลั้งพญาเสือโคร่ง จันทน์เทศ ม้ากระทืบโรง และว่านร่อนทอง อยู่ในส่วนสกัดคลอโรฟอร์มและส่วนสกัดเอทานอล เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูง ในส่วนสกัดเฮกเซนของสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดนั้นสารจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสค่อนข้างต่ำ ยกเว้นส่วนสกัดเฮกเซนของกำลั้งพญาเสือโคร่งที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสค่อนข้างสูง ดังนั้นสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในสมุนไพรเหล่านี้ จึงอยู่ในส่วนสกัดเอทานอลและคลอโรฟอร์ม

เนื่องจากกวาวเครือแดงเป็นพืชที่มีผู้ให้ความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสรรพคุณในการบำรุงกำลัง ทำให้ร่างกายสดชื่น กระปรี้กระเปร่า และช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศในผู้ชาย จึงเลือกกวาวเครือแดงมาศึกษาเพิ่มเติม โดยจะใช้ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์เป็นสิ่งที่ชี้นำในการศึกษาสารแสดงฤทธิ์ในกวาวเครือแดง

4.2 การแยกองค์ประกอบจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง

ปัจจุบันได้มีการศึกษากวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) กันอย่างกว้างขวาง จนกระทั่งค้นพบ phytoestrogens ในกวาวเครือขาว ซึ่งออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ทำให้เซลล์บริเวณหน้าอกขยายตัว สะโพกผาย ทำให้ผิวพรรณดีขึ้น ส่วนกวาวเครือแดงมีสรรพคุณในการบำรุงกำลัง ช่วยเพิ่มสมรรถภาพทางเพศในผู้ชาย (วิชัย เชิดชีวิตศาสตร์, 2542) ซึ่งมีผู้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบ้างแล้ว (ธนาริป์ รักศิลป์, 2538) แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของกวาวเครือแดง โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

จากการศึกษาเบื้องต้นแสดงว่าฤทธิ์ในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของกวาวเครือแดงอยู่ในส่วนสกัดเอทานอลและคลอโรฟอร์ม จึงนำส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดงน้ำหนัก 1.26 กรัม มาแยกองค์ประกอบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอลัมน์เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลสูง 36 เซนติเมตร เป็นตัวดูดซับ ซะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเมทานอลในคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:15) และเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลขึ้นเรื่อย ๆ เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 30 มิลลิลิตร ทดสอบลำดับส่วนที่เก็บได้ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ได้สารจากการเก็บลำดับส่วนทั้งหมด 9 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 9 พร้อมทั้งน้ำหนักของแต่ละลำดับส่วน ดังนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการแยกสารจากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ชื่อลำดับส่วน	น้ำหนักลำดับส่วน (มิลลิกรัม)	ลักษณะสาร
6.25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	1-4	B 01	51.2	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	5-13	B 02	217.5	น้ำมันสีเหลืองอมน้ำตาล
	14-24	B 03	126.8	น้ำมันสีเหลืองอมส้ม
	25-40	B 04	284.7	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	41-63	B 05	167.7	น้ำมันสีเหลือง
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	64-97	B 06	130.9	น้ำมันสีน้ำตาล
30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	98-168	B 07	305.9	น้ำมันสีเหลือง
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	169-197	B 08	121.6	น้ำมันสีน้ำตาล
100% เมทานอล	198-210	B 09	210.4	น้ำมันสีน้ำตาล

ลำดับส่วน B01 มีค่า Rf เท่ากับ 0.54 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B02 มีค่า Rf เท่ากับ 0.51 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B03 มีค่า Rf เท่ากับ 0.44 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B04 มีค่า Rf เท่ากับ 0.36 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B05 มีค่า Rf เท่ากับ 0.31 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

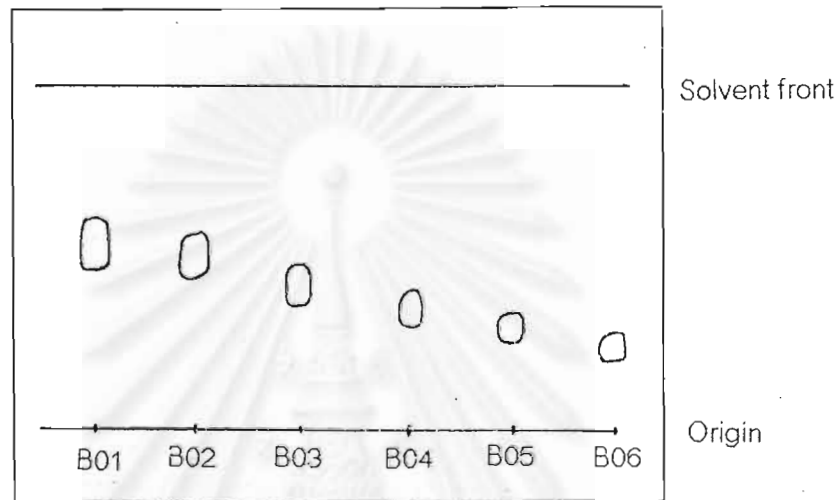
ลำดับส่วน B06 มีค่า Rf เท่ากับ 0.25 (ซีลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) หรือ มีค่า Rf เท่ากับ 0.76 (ซีลิกาเจล: 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B07 มีค่า Rf เท่ากับ 0.65 (ซีลิกาเจล: 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

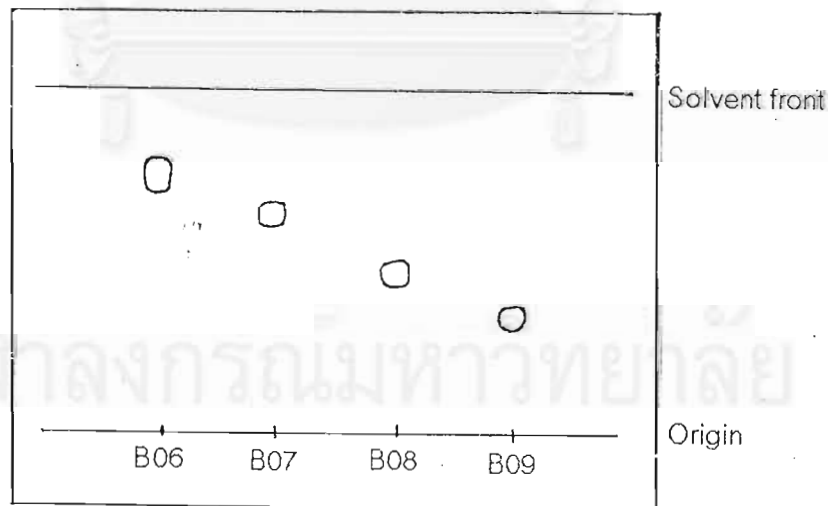
ลำดับส่วน B08 มีค่า Rf เท่ากับ 0.46 (ซีลีกาเจล: 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

ลำดับส่วน B09 มีค่า Rf เท่ากับ 0.34 (ซีลีกาเจล: 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

รูปที่ 12 TLC ของลำดับส่วน B01 ถึง B09



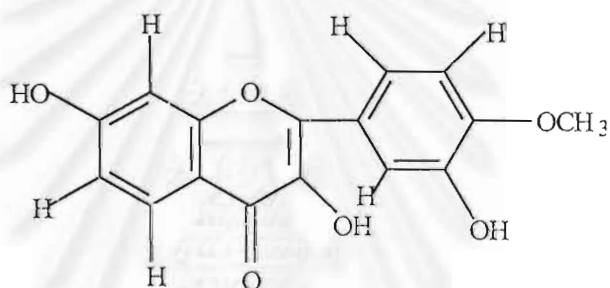
TLC ของ B01, B02, B03, B04, B05 และ B06 (ซีลีกาเจล :10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)



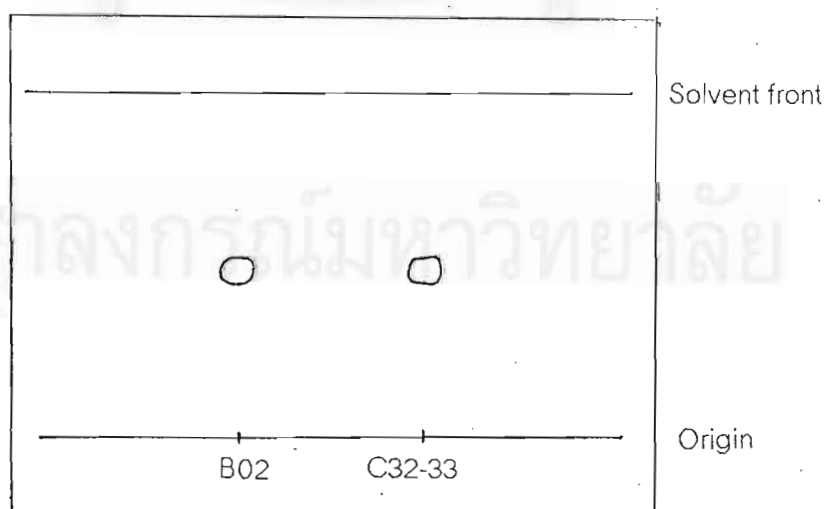
TLC ของ B06, B07, B08 และ B09 (ซีลีกาเจล : 30 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

เปรียบเทียบสารผสมที่แยกได้จากคอลัมน์กับสาร C32-33 [3,7,5'-trihydroxy-4'-methoxyflavon(4'-methoxyfisetin) หรือ 2-(5-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one] สูตรโครงสร้างของสาร C32-33 แสดงในรูปที่ 13 ซึ่งแยกได้จากสารสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดงโดยธนาธิป รักศิลาปี (2538) ด้วยแผ่น TLC พบว่า ในลำดับส่วน B02 มีจุดตรงกับสาร C32-33 (รูปที่ 14) ทำให้ทราบว่าในลำดับส่วน B02 มีสาร C32-33 เป็นสารหนึ่งทีแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

รูปที่ 13 สูตรโครงสร้างของสาร C32-33 (ธนาธิป รักศิลาปี, 2538)

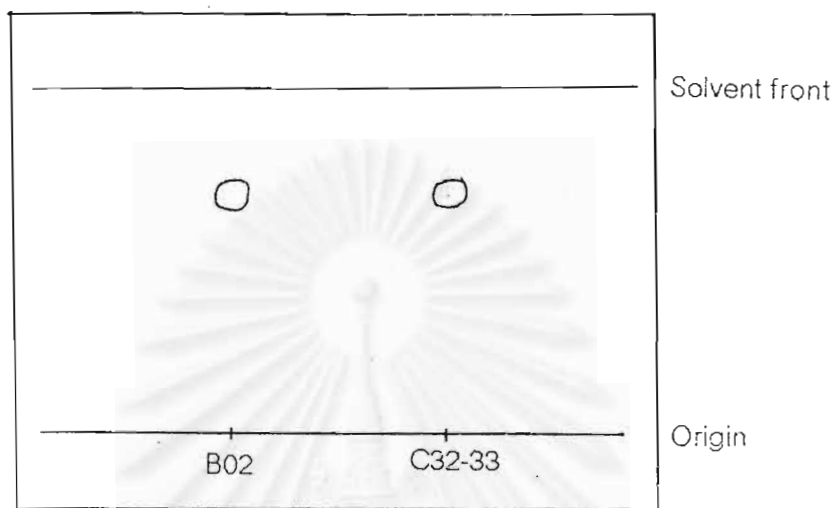


รูปที่ 14 แสดง TLC ของลำดับส่วน B02 และ C32-33

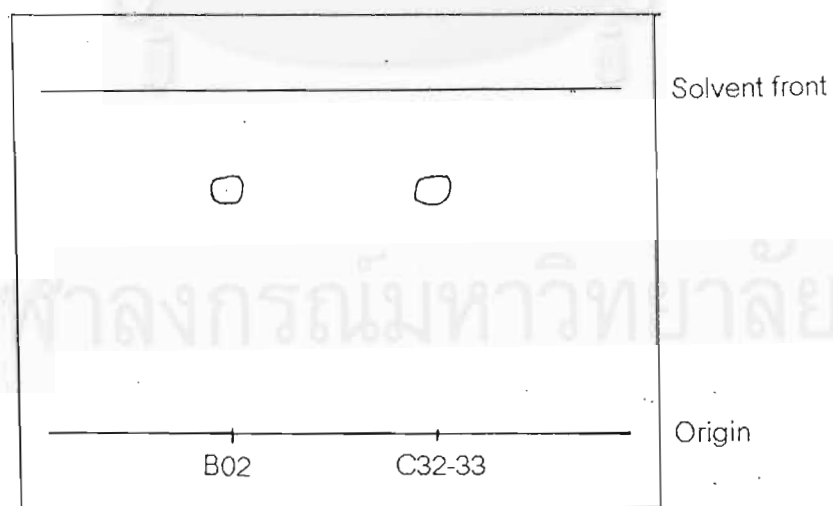


$R_f = 0.51$ ซิลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม

รูปที่ 14 TLC ของลำดับส่วน B02 และ C32-33 (ต่อ)



Rf = 0.69 ซิลิกาเจล : 6.25% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท



Rf = 0.72 ซิลิกาเจล : 40% เฮกเซนในอะซิโตน

นำลำดับส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ของส่วนสกัดคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 9) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยเตรียมลำดับส่วนให้มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของลำดับส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์และสาร C32-33 ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

ลำดับส่วน	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$		
	I	II	ค่าเฉลี่ย
B 01	29.7	27.0	28.4
B 02	56.7	54.0	55.4
B 03	72.8	72.8	72.8
B 04	72.8	67.6	70.2
B 05	62.2	56.7	59.7
B 06	78.4	75.7	77.1
B 07	67.6	59.4	63.5
B 08	83.8	81.1	82.5
B 09	72.8	78.4	75.6
C32-33*	45.8	54.2	50.0

* สาร C32-33 คือ 3,7,5'-trihydroxy-4'-methoxyflavone แยกได้จากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดงโดยชนาธิป รักคิลป์ (2538)

Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) % Inhibition = 33.3%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 10 ในลำดับส่วน B01 ถูกชะออกมาลำดับแรก เนื่องจากมีสภาพขั้วต่ำที่สุด พิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่ามีค่าต่ำที่สุด

แสดงว่ามีฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสน้อยที่สุด ในลำดับส่วนต่อมาจะมีสภาพข้อเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากถูกชะด้วยสารละลายเมทานอลในคลอโรฟอร์มที่มีเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลสูงขึ้นตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่าสารที่มีสภาพข้อสูง จะยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาข้างต้นนี้ เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง ซึ่งทำให้ทราบว่า มีสารอย่างน้อย 1 ชนิดในกวาวเครือแดง คือ C32-33 ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสส่วนในลำดับส่วนอื่นยังไม่มีการศึกษาต่อ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*)

เนื่องจากสมุนไพรมันที่ใช้ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสข้างต้น เป็นสมุนไพรมันที่ใช้เป็นยารักษาอาการ และแสดงฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส จึงต้องการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในพืชสมุนไพรมันชนิดอื่นที่ไม่ใช่เป็นยารักษาอาการ โดยนำสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ซึ่งเป็นสารจำพวกไดเทอร์พีนอยด์ สกัดแยกโดยประวิทย์ สิงห์โตทอง (2542) นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟ- ไดเอสเทอเรส

4.3.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของสารไดเทอร์พีนอยด์จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

สารไดเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ที่ซึ่งสกัดแยกโดย ประวิทย์ สิงห์โตทอง (2542) เป็นสารไดเทอร์พีนอยด์จำพวกแลบเดน (labdane) ได้แก่ CO1, เคลอโรเดน (clerodane) ได้แก่ CO2, CO3 และ CO4, และเซมบรานอยด์ (cembranoid) ได้แก่ CO5, CO6 และ CO7 นำสารไดเทอร์พีนอยด์มาเตรียมให้มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 หาค่าความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ได้ผลดังตารางที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารไดเทอร์พีนอยด์ ที่สกัดได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

Samples	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น					
	200 µg/ml			1,000 µg/ml		
	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย
CO1	35.9	40.5	38.2	69.8	63.4	66.6
CO2	0.0	0.0	0.0	7.7	5.6	6.7
CO3	0.0	0.0	0.0	40.0	46.6	43.3
CO4	46.4	53.6	50.0	—*	—*	—*
CO5	50.0	50.0	50.0	—*	—*	—*
CO6	53.6	53.6	53.6	—*	—*	—*
CO7	78.6	78.6	78.6	—*	—*	—*

* ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นนั้น ๆ

Positive control : theophylline (200 µg/ml) % Inhibition = 36.0%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 11 เลือก CO1, CO4, CO5, CO6 และ CO7 มาแปรความเข้มข้น เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เนื่องจากทำการทดสอบเบื้องต้นแล้วพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 50% ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสดังแสดงในตารางที่ 12 และทำการหาค่า IC_{50} ของคาเฟอีนและทีโอฟิลลีนซึ่งเป็น positive control ควบคุมไปด้วย ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของคาเฟอีนและทีโอฟิลลีนดังแสดงในตารางที่ 13

ส่วน CO2 และ CO3 ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส จึงเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1,000 µg/ml ซึ่งพบว่ามีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ต่ำกว่า 50% ซึ่งถือว่าไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

4.3.2 ผลการหา IC_{50} ของสารไดเทอร์พินอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ และ positive control

จากข้อมูลในตารางที่ 11 คัดเลือกสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่คือ CO1, CO4, CO5, CO6 และ CO7 มาแปรความเข้มข้นเพื่อหาค่า IC_{50} เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงกว่า 50 % เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 12 พร้อมกันนี้ได้ทำการหาค่า IC_{50} ของ positive control คือคาเฟอีนและทีโอฟิลลีน โดยหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอส-โฟไดเอสเทอเรส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 13



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารไดเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่ ได้แก่ CO1, CO4, CO5, CO6 และ CO7

ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		I	II	เฉลี่ย
CO1	100	40.0	33.3	36.7
	200	53.3	53.3	53.3
	500	66.6	60.6	63.6
CO4	50	0.0	0.0	0.0
	100	13.1	17.4	15.3
	200	50.0	50.0	50.0
CO5	100	13.0	17.4	15.2
	200	50.0	50.0	50.0
	300	82.6	82.6	82.6
CO6	50	30.4	30.4	30.4
	100	39.1	47.8	43.5
	200	82.6	82.6	82.6
CO7	50	53.6	42.8	48.2
	100	67.8	53.6	60.7
	200	78.6	78.6	78.6

Positive control : theophylline (1 mg/ml) % Inhibition = 60.0%

Negative control :1% DMSO % Inhibition = 0

ตารางที่ 13 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ
ทีโอฟิลลีนและคาเฟอีน
ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

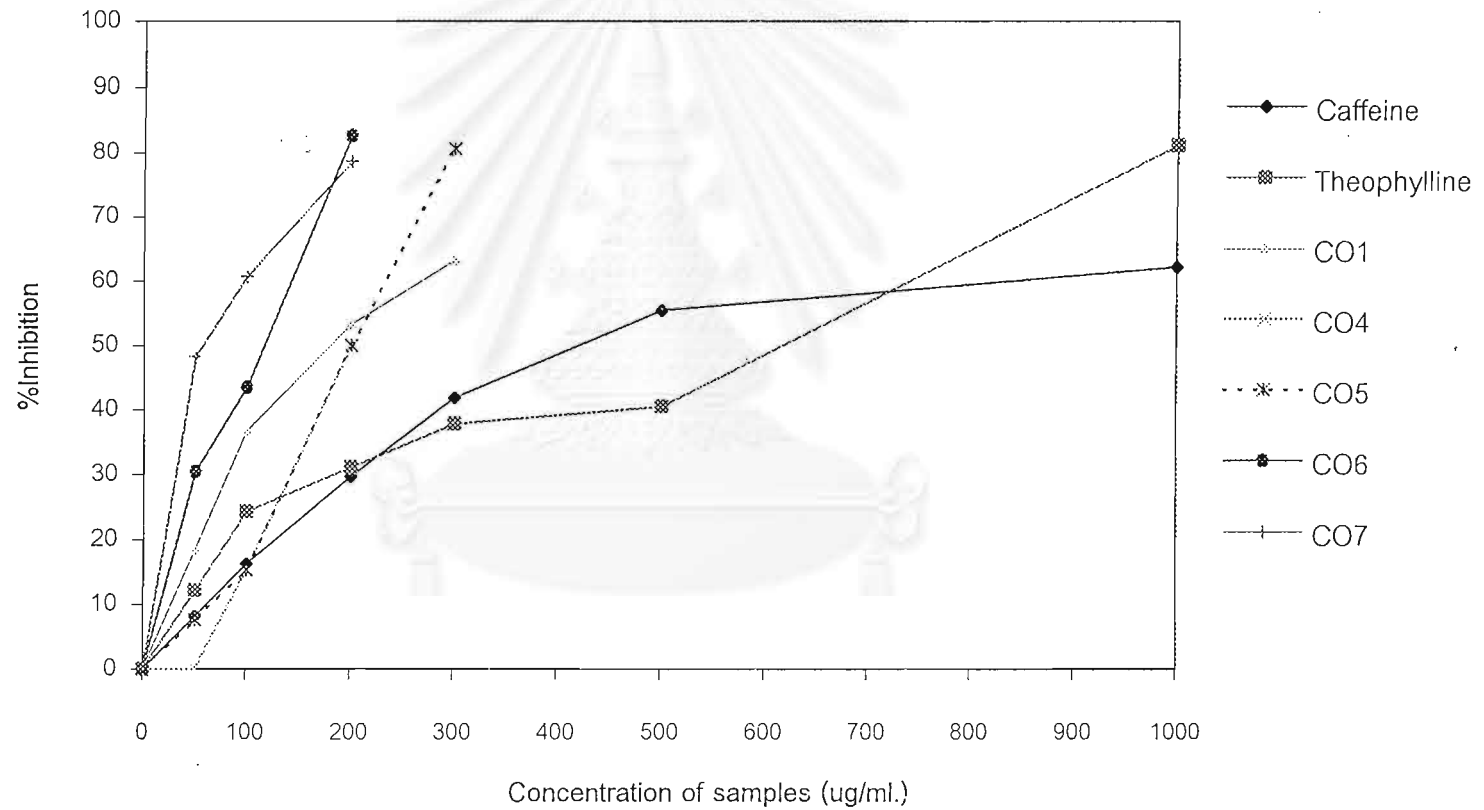
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง					
	ทีโอฟิลลีน			คาเฟอีน		
	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย
100	24.3	24.3	24.3	12.8	19.6	16.2
200	29.7	32.4	31.1	25.6	33.8	29.7
300	40.2	35.4	37.8	43.2	40.5	41.9
500	43.2	37.8	40.5	59.4	51.4	55.4
1,000	81.1	81.1	81.1	62.2	62.2	62.2

Negative control :1% DMSO % Inhibition = 0

นำค่าที่ได้ในตารางที่ 12 และตารางที่ 13 ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง
ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้น ได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of Caffeine, Theophylline and CO Samples on
cAMP Phosphodiesterase



รูปที่ 15 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่, คาเฟอีน และทีโอฟิลลีน

จากกราฟรูปที่ 15 อ่านค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 50% จะได้ค่า IC_{50} ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเป๊าะใหญ่, คาเฟอีนและทีโอฟิลลีน ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า IC_{50} ของสารไดเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเป๊าะใหญ่, คาเฟอีนและทีโอฟิลลีน

Samples	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Theophylline	615
Caffeine	420
CO 1	300
CO 2	>1,000
CO 3	>1,000
CO 4	200
CO 5	200
CO 6	162
CO 7	57

จากตารางที่ 14 ค่า IC_{50} ของคาเฟอีนและทีโอฟิลลีน พบว่าคาเฟอีนมีค่า IC_{50} ต่ำกว่าทีโอฟิลลีน ซึ่งหมายความว่าคาเฟอีนความเข้มข้น 420 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการทำงานของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ 50 % ในขณะที่ทีโอฟิลลีนต้องใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 615 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งสูงกว่าคาเฟอีนจึงจะสามารถยับยั้งการทำงานของไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ 50 % เท่ากัน สอดคล้องกับวีณา จิรัจฉริยากุล (2534) รายงานไว้ว่าคาเฟอีนมีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาทส่วนกลางมากกว่าทีโอฟิลลีน

จากรูปที่ 16 แสดงสูตรโครงสร้างของไดเทอร์พีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ ซึ่งเป็นสารไดเทอร์พีนอยด์จำพวกแลบเดน (CO1), เคลอโรเดน (CO2, CO3 และ CO4) และ เชมบรานอยด์ (CO5, CO6 และ CO7) จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่าสารไดเทอร์พีนอยด์จำพวกแชมบรานอยด์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (IC_{50} ของ CO5, CO6 และ CO7 เท่ากับ 200, 162 และ 57 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ)

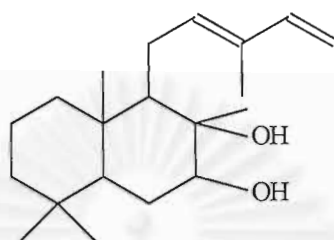
สารไดเทอร์พีนอยด์จำพวกเคลอโรเดน ซึ่งได้แก่ CO2, CO3 และ CO4 พิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่า CO4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุดซึ่งเท่ากับ 200 $\mu\text{mg/ml}$ CO2 และ CO3 ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ส่วน CO1 ซึ่งเป็นไดเทอร์พีนอยด์จำพวกแลบเดนนั้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 300 $\mu\text{mg/ml}$

สารไดเทอร์พีนอยด์จำพวกแชมบรานอยด์ ซึ่งได้แก่ CO5, CO6 และ CO7 พิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่า CO7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ซึ่งเท่ากับ 57 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน CO5 และ CO6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสต่ำกว่า ซึ่งเท่ากับ 200 และ 162 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ จากสูตรโครงสร้างของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ CO5 และ CO6 เป็นไอโซเมอร์กัน และแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสเหมือนกัน

ตัวยับยั้งที่สามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ดีนั้น จะต้องมีโครงสร้างบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ adenosine ในไซคลิก-เอเอ็มพี และจะแย่งไซคลิก-เอเอ็มพีจับกับเอนไซม์ ซึ่งเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) จากรูปที่ 16 จะเห็นว่าโครงสร้างของ CO1 และ CO4 มีบางส่วนที่คล้ายคลึงกับไซคลิก-เอเอ็มพี และสามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ส่วน CO2 มีโครงสร้างเป็น acetal ซึ่งมีโมเลกุลของออกซิเจนประกอบอยู่ จึงไม่สามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้

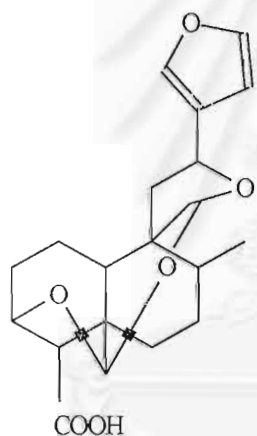
รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างของไดเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (ประวิทย์ สิงห์โตทอง; 2541)

ไดเทอร์ปีนอยด์จำพวกแลบเดน

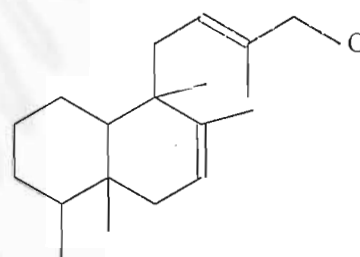


CO1 ($C_{20}H_{34}O_2$ MW = 306)

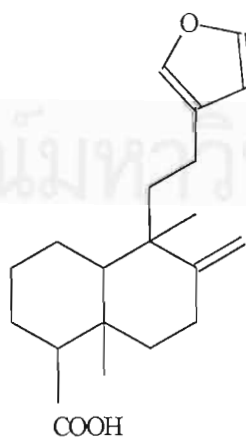
ไดเทอร์ปีนอยด์จำพวกเคลอโรเดน



CO2 ($C_{21}H_{26}O_6$ MW = 374)



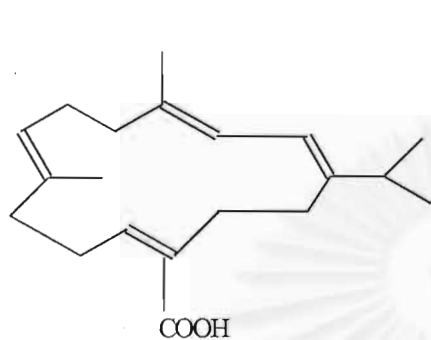
CO3 ($C_{20}H_{34}O$ MW = 282)



CO4 ($C_{20}H_{28}O_3$ MW = 316)

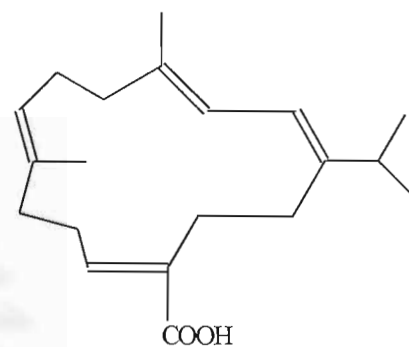
รูปที่ 16 สูตรโครงสร้างของไดเทอร์ปีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (ต่อ)

ไดเทอร์ปีนอยด์จำพวกเซมบรานอยด์



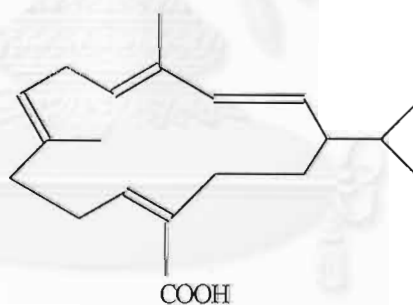
CO5 ($C_{20}H_{30}O_2$ MW = 302)

Crotocebraneic acid



CO6 ($C_{20}H_{30}O_2$ MW = 302)

Neocrotocebraneic acid



CO7 ($C_{20}H_{30}O_2$ MW = 302)

Poilaneic acid

4.4 การทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ สารสังเคราะห์

สารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสนี้เป็น สารสังเคราะห์ที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงเปลาโนทอลที่สกัดได้จากต้นเปล้าน้อย (*Croton sublylalus* Kurz) เพื่อศึกษาถึงโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปจากสารตั้งต้นเดิมนั้นจะมีผลต่อฤทธิ์ การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสอย่างไร สารสังเคราะห์ที่นำมาทดสอบ ได้แก่

1. ฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา alkylation, decarboxylation และ reduction โดยวงนิภา นาคลดดา (2542)
2. เจอวานิออลและสารอนุพันธ์ สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา alkylation, decarboxylation และ reduction โดยปฐนทริก รุจิราภา (2541)

4.4.1 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ ฟาร์นิซอล และสารอนุพันธ์

ทำการเตรียมฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ซึ่งได้จากคุณวงนิภา นาคลดดา ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 200 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ผลปรากฏว่าฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ค่อนข้างต่ำ จึงเพิ่มความเข้มข้นของฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์เป็น 400 $\mu\text{g/ml}$ ค่าเฉลี่ยของ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ดังแสดงในตารางที่ 15 ในครั้งนี้ได้ทดสอบ ฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเปลาโนทอลควบคู่ไปด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเปลลานโทล, ฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ของ ฟาร์นิซอล ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สารตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น					
	200 $\mu\text{g/ml}$			400 $\mu\text{g/ml}$		
	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย
Farnesol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NW 1	6.6	6.6	6.6	13.8	6.9	10.4
NW 2	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9	3.5
NW 3	0.0	6.6	3.3	24.1	24.1	24.1
NW 4	0.0	0.0	0.0	17.2	13.8	15.5
NW 5	14.6	16.0	15.3	20.0	20.0	20.0
NW 6	22.3	22.3	22.3	24.1	29.1	26.6
NW 7	0.0	0.0	0.0	8.3	8.3	8.3
NW 8	20.0	16.6	18.3	37.4	35.0	36.2
NW 24	16.6	17.8	17.2	16.6	23.0	19.8
NW 25	5.8	5.8	5.8	17.2	17.2	17.2
NW 26	5.8	0.0	2.9	13.3	17.7	15.5
NW 27	17.6	20.6	19.1	34.5	37.9	36.2
NW 28	11.8	11.8	11.8	14.6	16.4	15.5
Plaunotol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) % Inhibition = 38.5%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มนี้แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสต่ำ จึงเลือกเพียง NW 8 และ NW 27 มาแปรความเข้มข้นเป็น 100, 200, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสนำมาเขียนกราฟเพื่อ

หาค่า IC_{50} เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นได้ทดสอบที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ แล้วพบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสใกล้เคียง 50%

4.4.2 ผลการหาค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์ของฟาร์นิซอล ซึ่งได้แก่ NW 8 และ NW 27

เตรียม NW 8 และ NW 27 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100, 200, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ได้ผลตามตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารอนุพันธ์ของฟาร์นิซอล NW 8 และ NW 27 ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น $\mu\text{g/ml}$.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		I	II	เฉลี่ย
NW8	100	20.6	17.2	18.9
	200	31.2	31.2	31.2
	300	34.1	39.5	36.8
	500	38.4	42.6	40.5
	1,00	43.5	45.3	44.4
NW27	100	28.1	25.9	27.0
	200	33.3	37.5	35.4
	300	42.2	44.2	43.2
	500	45.5	46.6	46.1
	1,000	47.3	47.3	47.3

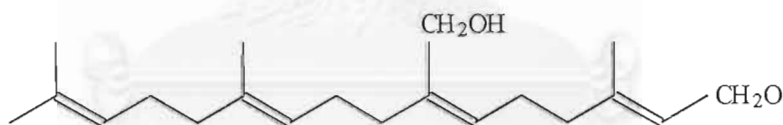
Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) % Inhibition = 33.3%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

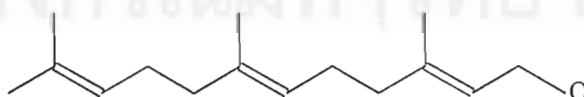
จากตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่าทั้ง NW 8 และ NW 27 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ต่ำกว่า 50% ดังนั้นค่า IC_{50} ของ NW 8 และ NW 27 จึงมากกว่า 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์อื่น ๆ มีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งถือว่าสารกลุ่มนี้รวมทั้งฟาร์นิซอลไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส แสดงว่าสารกลุ่มนี้ไม่แสดงฤทธิ์กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของเปลาโนทอล และฟาร์นิซอล พบว่าสารทั้ง 2 ชนิด ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (%Inhibition มีค่าเท่ากับ 0%) (ตารางที่ 15) ถ้าพิจารณาจากสูตรโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิด (รูปที่ 17) พบว่ามีโครงสร้างเป็นโซ่เปิด โดย ฟาร์นิซอล มีโครงสร้างเป็นโซ่เปิดที่สั้นกว่าเปลาโนทอล ซึ่งโครงสร้างที่เป็นโซ่เปิดนี้ไม่มีส่วนคล้ายคลึงกับโครงสร้างของ adenosine จึงอาจไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

รูปที่ 17 แสดงสูตรโครงสร้างของเปลาโนทอล และฟาร์นิซอล

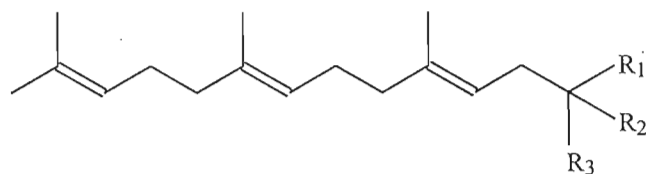


เปลาโนทอล (Ogiso, และคณะ, 1978)



ฟาร์นิซอล

รูปที่ 18 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ฟาร์นิซอล (วณิภา นาคลดตา; 2542)



Farnesyl group

	R ₁	R ₂	R ₃	MW
NW 1	CHOHCH ₃	CHOHCH ₃	H	308
NW 2	CH ₂ OH	CHOHCH ₃	H	294
NW 3	CH ₂ OH	CH ₂ OH	H	280
NW 4	CH ₂ OH	CH ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	324
NW 5	CH ₂ OH	CH ₂ OH	(CH ₂) ₃ OH	338
NW 6	CH ₂ OH	CH ₂ OH	(CH ₂) ₄ OH	352
NW 7	CH ₂ OH	CH ₂ OH	(CH ₂) ₅ OH	366
NW 8	CH ₂ OH	CH ₂ OH	(CH ₂) ₆ OH	380
NW 24	CH ₂ OH	(CH ₂) ₂ OH	CHOHCH ₃	338
NW 25	CH ₂ OH	(CH ₂) ₃ OH	CHOHCH ₃	352
NW 26	CH ₂ OH	(CH ₂) ₄ OH	CHOHCH ₃	366
NW 27	CH ₂ OH	(CH ₂) ₅ OH	CHOHCH ₃	380
NW 28	CH ₂ OH	(CH ₂) ₆ OH	CHOHCH ₃	394

จากรูปที่ 18 สูตรโครงสร้างของอนุพันธ์ของฟาร์นิซอลที่มีการแทนที่หมู่ต่าง ๆ ที่ตำแหน่ง R₁, R₂ และ R₃ และพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (ตารางที่ 15) พบว่าไม่มีโครงสร้างแบบใดที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส อาจเนื่องจากว่าโครงสร้างของอนุพันธ์ฟาร์นิซอลเป็นโซ่เปิดที่ยาวเกินไป ไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

4.4.3 ผลการคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของ เจอรานีโอลและสารอนุพันธ์

ทำการเตรียมเจอรานีโอล และสารอนุพันธ์ ได้แก่ PE1, PE2, PE3, PE4, PE5, PE6, PE7, PE8, PE9, PE10, PE11 และ PE12 ซึ่งได้จากคุณปณฺฑกร รุจิราภา ให้มีความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ ตามวิธีในบทที่ 3 ข้อ 3.5 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ปรากฏว่าเจอรานีโอล และสารอนุพันธ์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสค่อนข้างต่ำ จึงเพิ่มความเข้มข้นของสารตัวอย่างเป็น 400 $\mu\text{g/ml}$ ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเจอรานีโอล และสารอนุพันธ์ดังแสดงในตารางที่ 17



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเจอรานีออล และสารอนุพันธ์

ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สารตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น					
	200 $\mu\text{g/ml}$			400 $\mu\text{g/ml}$		
	I	II	เฉลี่ย	I	II	เฉลี่ย
เจอรานีออล	-*	-*	-*	22.2	18.5	20.4
PE 1	27.6	27.6	27.6	29.4	32.3	30.9
PE 2	29.4	23.5	26.5	27.1	31.5	29.3
PE 3	14.5	19.9	17.2	34.5	34.5	34.5
PE 4	17.6	11.8	14.7	34.5	31.0	32.8
PE 5	14.6	21.0	17.8	34.5	31.0	32.8
PE 6	17.2	17.2	17.2	25.9	22.0	24.0
PE 7	14.8	22.2	18.5	46.3	39.9	43.1
PE 8	25.6	25.6	25.6	44.8	44.8	44.8
PE 9	22.2	22.2	22.2	26.9	23.1	25.0
PE 10	-*	-*	-*	6.9	10.3	8.6
PE 11	-*	-*	-*	0.0	0.0	0.0
PE 12	-*	-*	-*	20.6	26.0	23.3

* ไม่ได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นนั้น

Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) % Inhibition = 36.7%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 17 เลือก PE 3, PE 4, PE 5, PE 7 และ PE 8 มาแปรความเข้มข้นเป็น 100, 200, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไปเขียนกราฟเพื่อหาค่า IC_{50} เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นได้ทดสอบที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ แล้วพบว่ามีการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสใกล้เคียง 50%

4.4.4 ผลการหาค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์ของ เจอรานีออล ซึ่งได้แก่ PE3, PE4, PE5, PE7 และ PE8

เตรียม PE3, PE4, PE5, PE7 และ PE8 ให้มีความเข้มข้นเป็น 100, 200, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารอนุพันธ์ของ เจอรานีออล คือ PE3, PE4, PE5, PE7 และ PE8 ทดสอบการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส 2 ครั้ง (I และ II)

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		I	II	เฉลี่ย
PE3	100	0.0	0.0	0.0
	200	14.9	20.7	17.8
	300	20.5	22.3	21.4
	500	36.5	44.3	40.4
	1,000	60.0	60.0	60.0
PE4	100	0.0	5.0	2.5
	200	10.0	15.0	12.5
	300	20.0	20.0	20.0
	500	35.0	30.0	32.5
	1,000	55.0	60.0	57.5
PE5	100	10.0	10.0	10.0
	200	10.0	15.0	12.5
	300	19.1	24.3	21.7
	500	34.5	30.5	32.5
	1,000	36.1	43.3	39.7

ตารางที่ 18(ต่อ)

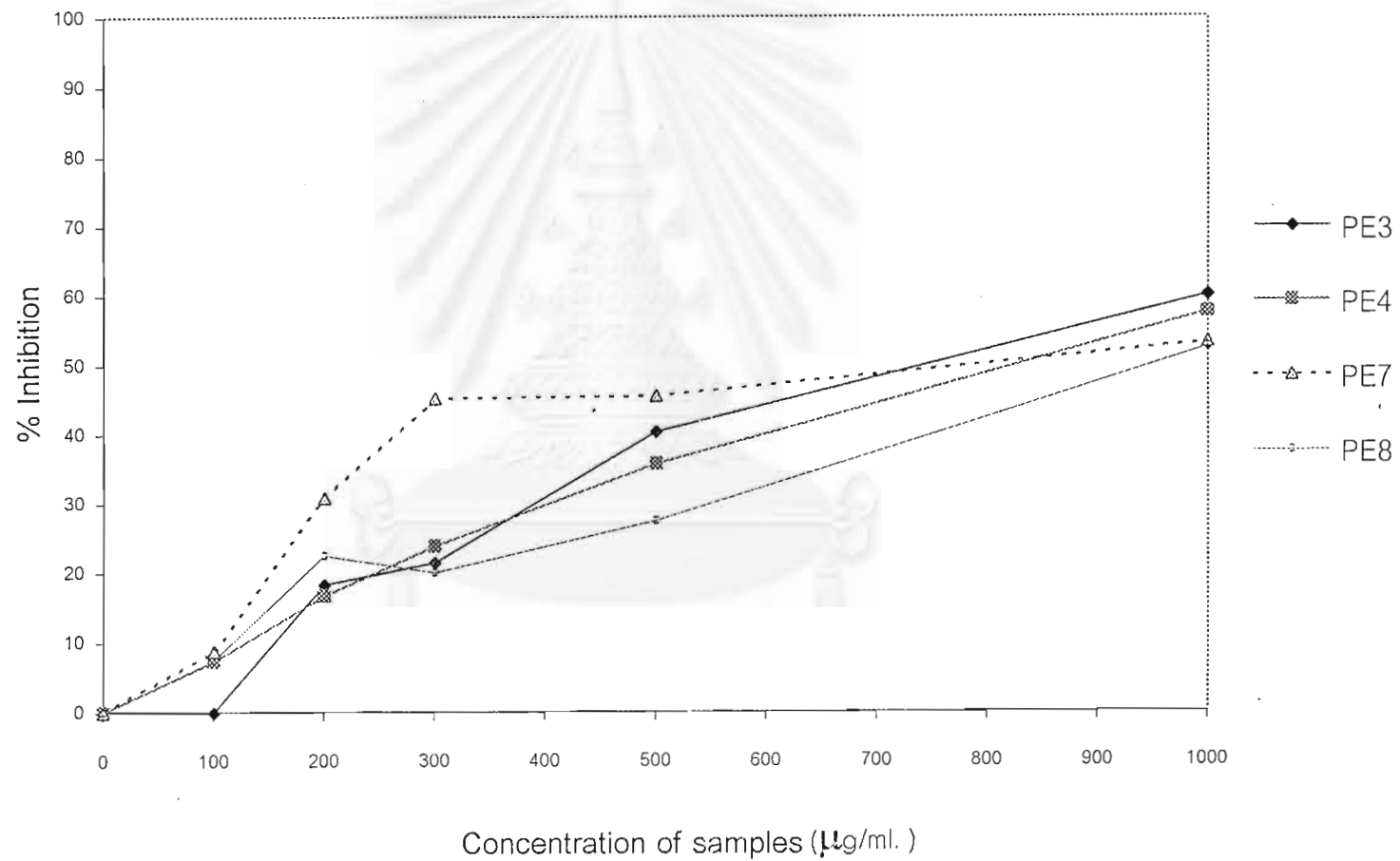
สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml.}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		I	II	เฉลี่ย
PE7	100	2.8	2.8	2.8
	200	26.3	22.8	24.6
	300	40.4	40.4	40.4
	500	45.6	45.6	45.6
	1,000	51.0	55.4	53.2
PE8	100	10.0	5.0	7.5
	200	26.0	19.0	22.5
	300	15.0	25.0	20.0
	500	25.0	30.0	27.5
	1,000	54.0	51.0	52.5

Positive control : theophylline (200 $\mu\text{g/ml}$) % Inhibition = 29.7%

Negative control : 1% DMSO % Inhibition = 0

จากตารางที่ 18 พบว่า PE5 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าเท่ากับ 39.7% ซึ่งมีค่าไม่ถึง 50% แสดงว่า PE5 นั้นไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ส่วนสารอนุพันธ์ของเจอรานีออล อื่น ๆ นั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากตารางที่ 18 ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสและความเข้มข้น (รูปที่ 19) เพื่อหาค่า IC_{50} ค่า IC_{50} ของเจอรานีออลและสารอนุพันธ์ดังแสดงในตารางที่ 19

Effects of PE Samples on cAMP Phosphodiesterase



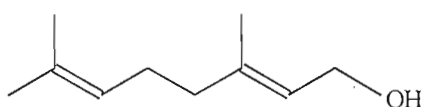
รูปที่ 19 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์ของ เจอราโนอล ได้แก่ PE 3, PE 4, PE 5, PE 7 และ PE 8

ตารางที่ 19 แสดงค่า IC_{50} ของ เจอรานีอออล และอนุพันธ์

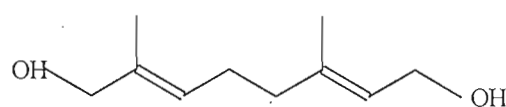
Samples	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
เจอรานีอออล	>1,000
PE 1	>1,000
PE 2	>1,000
PE 3	899
PE 4	848
PE 5	>1,000
PE 6	>1,000
PE 7	815
PE 8	954
PE 9	>1,000
PE 10	>1,000
PE 11	>1,000
PE 12	>1,000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 สูตรโครงสร้างของเจอร์รานีออลและ geranyl diol



เจอร์รานีออล (MW=154.25)



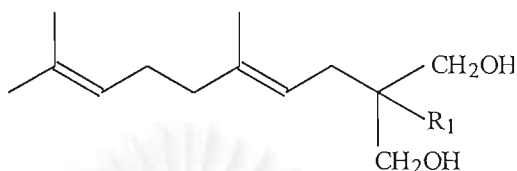
Geranyl diol (PE12, MW = 170)
(ปฏิกิริยา รุจิราภา; 2541)

เปรียบเทียบผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเจอร์รานีออลและ PE 12 พิจารณาจากสูตรโครงสร้างของเจอร์รานีออลและ PE12 (geranyl diol) (รูปที่ 20) พบว่า PE 12 มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ 2 หมู่จับอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 10 ส่วนเจอร์รานีออลนั้นมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ 1 หมู่ จับอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (ตารางที่ 17) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน และทั้งเจอร์รานีออล และ PE12 นั้นไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสเหมือนกัน (ค่า IC_{50} ของ เจอร์รานีออล และ PE12 มากกว่า $1,000 \mu\text{g/ml}$) (ตารางที่ 19) แสดงว่าจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นมานั้นไม่มีผลต่อการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

ถ้าแบ่งกลุ่มของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออลตามสูตรโครงสร้าง จะแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีการแทนที่หมู่ $-(CH_2)_n\text{-OH}$ ในตำแหน่ง R_1 ได้แก่ , PE 2, PE 3, PE 4, PE 5 และ PE 6 (รูปที่ 21) และกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีการแทนที่หมู่ $-(CH_2)_n\text{-OH}$ ในตำแหน่ง R_2 ได้แก่ PE 7, PE 8, PE 9, PE 10 และ PE 11 (รูปที่ 22) เปรียบเทียบค่า IC_{50} (ตารางที่ 19) ของสารทั้ง 2 กลุ่มพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์ เจอรานีออล ได้แก่ PE1, PE 2, PE 3, PE 4, PE 5 และ PE 6 (ปริญญานิพนธ์ รุจิราภา; 2541)

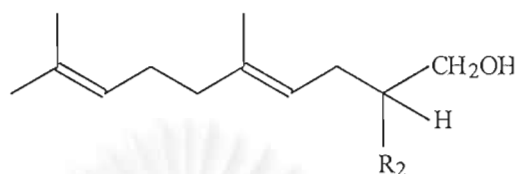


	R ₁	MW
PE 1	H	212
PE 2	(CH ₂) ₂ OH	256
PE 3	(CH ₂) ₃ OH	270
PE 4	(CH ₂) ₄ OH	284
PE 5	(CH ₂) ₅ OH	298
PE 6	(CH ₂) ₆ OH	312

จากโครงสร้างของสารอนุพันธ์เจอรานีออลที่แสดงในรูปที่ 21 ซึ่งได้แก่ PE 2, PE 3, PE 4, PE 5 และ PE 6 พิจารณาที่ตำแหน่ง R₁ ของ PE2 มีหมู่ -CH₂- อยู่ 2 หมู่ และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง PE 6 มีหมู่ -CH₂- อยู่ 6 หมู่ การเพิ่มขึ้นของหมู่ -CH₂- ที่ตำแหน่ง R₁ นี้ไม่มีผลต่อการยับยั้ง เอนไซม์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 สูตรโครงสร้างของสารอนุพันธ์เจอร์รานีออล ได้แก่ PE7, PE8, PE9, PE10 และ PE11 (ปูลนทริก รุจิราภา; 2541)



	R ₂	MW
PE 7	(CH ₂) ₂ OH	226
PE 8	(CH ₂) ₃ OH	240
PE 9	(CH ₂) ₄ OH	254
PE 10	(CH ₂) ₅ OH	268
PE 11	(CH ₂) ₆ OH	282

เปรียบเทียบผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสารในกลุ่มที่ 2 ซึ่ง ได้แก่ PE 7, PE 8, PE 9, PE 10 และ PE 11 (ตารางที่ 17) พบว่า PE 7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุด ส่วน PE 8, PE 9, PE 10 และ PE 11 จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งลดลงตามลำดับ ถ้าพิจารณาจากสูตรโครงสร้าง (รูปที่ 22) พบว่าที่ตำแหน่ง R₂ ของ PE 7 มีหมู่ -CH₂- อยู่ 2 หมู่ PE 8 มีหมู่ -CH₂- อยู่ 3 หมู่ และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง PE 11 ซึ่งมีหมู่ -CH₂- อยู่ 6 หมู่ จำนวนหมู่ของ -CH₂- ที่เพิ่มขึ้นทำให้โมเลกุลของ PE ใหญ่ขึ้น จึงไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้งเอนไซม์

เช่นเดียวกับกรณีของอนุพันธ์ฟารินิซอล อนุพันธ์เจอร์รานีออลไม่มีส่วนคล้ายคลึงกับ adenosine จึงไม่สามารถเข้าแข่งขันแย่งที่จับกับ adenosine ได้ จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้น้อย หรือไม่ก็มีฤทธิ์เลยในสารบางตัว ดังนั้นจากสูตรโครงสร้างของสารอาจคาดเดาได้ว่าสารประกอบดังกล่าวน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสหรือไม่

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรทั้ง 10 ชนิด โดยนำสารสกัดเอทานอลของสมุนไพรมาทำการทดสอบ พบว่ามีสมุนไพร 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าที่โอฟิลลีนที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 6) ได้แก่ กวาวเครือแดง, กำลังพญาเสือโคร่ง, จันทน์เทศ, ม้ากระทืบโรง และ ว่านร้อนทอง สรรพคุณของสมุนไพรทั้ง 10 ชนิดแสดงในภาคผนวก 5 นำสมุนไพรทั้ง 5 ชนิดมาทำให้กึ่งบริสุทธิ์ด้วย คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่าส่วนที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสอยู่ในส่วนสกัดเอทานอลและคลอโรฟอร์ม โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส สูงกว่าที่โอฟิลลีน ในส่วนสกัดเฮกเซนนั้นจะมีความสามารถในการยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสน้อยกว่า (ตารางที่ 8) ดังนั้นถ้าต้องการศึกษาสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสในพืชสมุนไพรเหล่านี้ ควรศึกษาในส่วนสกัดเอทานอลและคลอโรฟอร์ม

2 ผลการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส โดยคัดเลือกสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสมา 1 ชนิด สำหรับการทดลองนี้เลือกกวาวเครือแดง เนื่องจากกวาวเครือแดงมีสรรพคุณในการบำรุงกำลัง และเพิ่มสมรรถภาพทางเพศในผู้ชาย แต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของกวาวเครือแดง โดยนำสารสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดงมาแยกองค์ประกอบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ปรากฏว่าแยกได้ทั้งหมด 9 ลำดับส่วน คือ B01, B02, B03, B04, B05, B06, B07, B08 และ B09 (ตารางที่ 9) เมื่อตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง เปรียบเทียบกับสาร C32-33 (3,7,5'-trihydroxy-4'-methoxyflavon) สกัดได้จากส่วนสกัดคลอโรฟอร์มของกวาวเครือแดง (ธนาธิป รักศิลป์, 2538) พบว่า ลำดับส่วนที่ B02 มีจุดตรงกับสาร C32-33 (ค่า Rf เท่ากับ 0.51 ในซิลิกาเจล: 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ตามลำดับ, ค่า Rf เท่ากับ 0.69 ในซิลิกาเจล : 6.25% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท, ค่า Rf 0.72 และ

0.72 ในซิลิกาเจล : 40% เฮกเซนในอะซิโตน) (รูปที่ 12) เมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารทั้ง 9 ลำดับส่วน พบว่าลำดับส่วน B01 มีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสต่ำที่สุด (ตารางที่ 10) ลำดับส่วน B08 แสดงฤทธิ์ยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด ในลำดับส่วน B01 ถูกชะออกมาลำดับแรก เนื่องจากมีสภาพขั้วต่ำที่สุด พิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่ามีค่าต่ำที่สุด ในลำดับส่วนต่อมาจะมีสภาพขั้วเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากถูกชะด้วยสารละลายเมทานอลในคลอโรฟอร์มที่มีเปอร์เซ็นต์ของเมทานอลสูงขึ้นไปตามลำดับ ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารที่มีสภาพขั้วสูงขึ้นไปจะแสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้เพิ่มขึ้น

3. เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของปลาในทอล และสารสังเคราะห์เลียนแบบปลาในทอล ซึ่งได้แก่ เจอรานีออล และสารอนุพันธ์ และฟาร์นิซอล และสารอนุพันธ์ พบว่าสารอนุพันธ์เจอรานีออล ซึ่งได้แก่ PE3, PE4 PE7 และ PE8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (ค่า IC_{50} เท่ากับ 899, 848, 815 และ 954 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) ส่วนปลาในทอล, ฟาร์นิซอล และสารอนุพันธ์ทุกตัวไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (ค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ทุกตัว) พิจารณาจากสูตรโครงสร้างพบว่า ปลาในทอลมีโครงสร้างเป็นไซเปิดที่ยาวที่สุด (รูปที่ 17) รองลงมาคือ ฟาร์นิซอล และสารอนุพันธ์ (รูปที่ 18) ส่วนเจอรานีออลและสารอนุพันธ์มีโครงสร้างเป็นไซเปิดที่สั้นที่สุด (รูปที่ 20, 21 และ 22) แสดงว่าโครงสร้างไซเปิดที่ยาวเกินไปจะไม่เหมาะสมกับการยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

4. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

4.1 โครงสร้างสารที่สามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ดีจะต้องมีโครงสร้างบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ adenosine ในไซคลิก-เอเอ็มพี และแย่งไซคลิก-เอเอ็มพีจับกับเอนไซม์ ซึ่งการยับยั้งนี้เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition)

4.2 เปรียบเทียบผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของสาร 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเจอรานีออล และอนุพันธ์ (PE 1 ถึง PE 12), กลุ่ม ฟาร์นิซอล และอนุพันธ์ (NW 1 ถึง

NW 8 และ NW 24 ถึง NW 28) และสารไดเทอร์พินอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ พบว่า สารไดเทอร์พินอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสมากกว่าสารกลุ่มเจอร์รานีออล และสารกลุ่มฟาร์นิซอล เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้างพบว่า สารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ เป็นสารไดเทอร์พินอยด์จำพวกแลบเดน, เคลอโรเดน และ เซมบรานอยด์ (รูปที่ 16) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างบางส่วนคล้ายคลึงกับ adenosine ที่อยู่ในไซคลิก-เอเอ็มพี ส่วนสารกลุ่มเจอร์รานีออลและสารอนุพันธ์ และฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์มีโครงสร้างเป็นไซเปิด (รูปที่ 17-22) ซึ่งไม่มีส่วนที่คล้ายคลึงกับ adenosine ในไซคลิก-เอเอ็มพี จึงไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้ง ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

4.3 เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสารไดเทอร์พินอยด์ที่สกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ ซึ่งเป็นไดเทอร์พินอยด์จำพวกแลบเดน, เคลอโรเดน และ เซมบรานอยด์ พิจารณาจากค่า IC_{50} (ตารางที่ 14) ของไดเทอร์พินอยด์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า ไดเทอร์พินอยด์จำพวกเซมบรานอยด์ มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แสดงว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสูงที่สุด จากรูปที่ 16 จะเห็นว่าโครงสร้างของ CO1 และ CO4 มีบางส่วนที่คล้ายคลึงกับ ไซคลิก-เอเอ็มพี และสามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ส่วน CO2 มีโครงสร้างเป็น acetal ซึ่งมีโมเลกุลของออกซิเจนประกอบอยู่ จึงไม่สามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้

4.4 เปรียบเทียบผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของเจอร์รานีออล กับ ฟาร์นิซอล ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเจอร์รานีออลสามารถยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรสได้ 20.3% สูงกว่าฟาร์นิซอล ซึ่งไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส และพิจารณาจากค่า IC_{50} ของสารอนุพันธ์ของ เจอร์รานีออล (ตารางที่ 18) กับสารอนุพันธ์ของฟาร์นิซอล พบว่าสารอนุพันธ์ของเจอร์รานีออล ได้แก่ PE3, PE4, PE7 และ PE8 แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ส่วนฟาร์นิซอลและสารอนุพันธ์ทุกตัว ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ถ้าพิจารณาจากสูตรโครงสร้างจะเห็นว่าเจอร์รานีออลมีโครงสร้างเป็นไซเปิด (รูปที่ 21 และ 22) ซึ่งจะสั้นกว่าโครงสร้างของฟาร์นิซอล (รูปที่ 17) ดังนั้นไซเปิดที่ยาวกว่าจะทำให้ไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้งเอนไซม์

4.5 เปรียบเทียบผลการยับยั้งไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ของสารอนุพันธ์ เจอรานีออล ได้แก่ PE7, PE8, PE9, PE10 และ PE11 พบว่า PE7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งสูงสุด (% Inhibition เท่ากับ 45.1%) ส่วน PE8, PE9, PE10 และ PE11 จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งลดลงมาตามลำดับ (% Inhibition เท่ากับ 44.8, 25.0, 8.6 และ 0% ตามลำดับ) . ถ้าพิจารณาจากโครงสร้าง (รูปที่ 22) พบว่าที่ตำแหน่ง R_2 ของ PE7 มีหมู่ $-CH_2-$ อยู่ 2 หมู่ PE8 มีหมู่ $-CH_3-$ อยู่ 3 หมู่ และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึง PE11 ซึ่งมีหมู่ $-CH_2-$ อยู่ 6 หมู่ จำนวนหมู่ของ $-CH_2-$ ที่เพิ่มขึ้น ทำให้โมเลกุลของ PE ใหญ่ขึ้น จึงไม่เหมาะสมที่จะเข้าไปยับยั้งเอนไซม์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ก้าวไปกับสมุนไพรม. เล่มที่ 2. โครงการสมุนไพรมเพื่อการพึ่งตนเอง. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพรม คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.
- จุฑามณี สุทธิศรีสังข์ และ รัชณี เมฆมณี, บรรณาธิการ. 2540. เภสัชวิทยา เล่ม 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. นิเวศมิตการพิมพ์.
- เชษฐา พยากรณ์. 2525. สมุนไพรมในชีวิตประจำวัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์เชษฐา.
- ธนาธิป รักศิลป์. 2538. องค์ประกอบทางเคมีในหัวกวาวแดง *Butea superba* Roxb. วิทยานิพนธ์
- ปริญญาหมาบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประวิทย์ สิงห์โตทอง. 2542. เคมีของของเหมบรรณอยด. วิทยานิพนธ์ปริญญาหมาบัณฑิต
- ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปุ่นทริก รุจิราภา. 2541. การสังเคราะห์เลียนแบบเปลวในทอลจากเจอร์รานีออล. วิทยานิพนธ์
- ปริญญาหมาบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พดุมอาจารย์วิพูโยคะ และ สุวัตร ดั่งจิตจรเจริญ. 2540. เพชรน้ำเอก กรุยอดตำหรับยาสมุนไพรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. สุวีริยาสาส์น.
- พเยาว์ เหมือนวงศัญญาตี. 2529. ตำรววิทยาศาสตร์สมุนไพรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์การพิมพ์พลชัย.
- ยอดนทัย เทพรานนท์. ความก้าวหน้าในการวิจัยสมุนไพรมไทยแบบครบวงจร. ในรายงานการ
- สัมมนาทางวิชาการสมุนไพรมไทย. 23-25 มกราคม 2540 ณ โรงแรมเจริญธานีปรีนเชล
- จังหวัดขอนแก่น
- ลีนา ผู้พัฒนพงศ์ และ ธวัชชัย วงศประเสริฐ. 2530. สมุนไพรมไทย ตอนที่ 5. พิมพ์ครั้งที่ 1. (ม. ป. ท.)
- วณิภา นาคลดดา. 2542. การสังเคราะห์เลียนแบบเปลวในทอลจากฟาร์นีซอล. วิทยานิพนธ์
- ปริญญาดุษฎีบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิทย์ เทียงบูรณธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรมไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส.พรีนดิง เฮ้าส์.
- วิชัย เชิดชูศาสตร์. 2542. กวาวเครือขาวและกวาวเครือแดง. ในการประชุมวิชาการประจำปี
- 2542 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 22-23 มีนาคม 2542 ณ อาคาร
- แถบ นีละนิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

- วีณา จิรัจฉิยากุล, บรรณาธิการ. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วันดี กฤษณพันธ์. 2539. สมุนไพรพัดประโยชน์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สมิง ศรีพลอย. 2535. สรรพคุณสมุนไพรไทย. ชุดสารน่ารู้. พี. เอส. กรุ๊ป.
- สวนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี. พิมพ์ครั้งที่ 1. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์.
- สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. 2528. (การปิโตรเลียมแห่งประเทศไทยจัดพิมพ์เนื่องในโอกาสที่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เสด็จพระราชดำเนินมาทรงเปิด).
- เสงี่ยม พงษ์บุญรอด. 2493. ไม้เทศ เมืองไทย สรรพคุณของยาเทศและยาไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. ม.ป.ท.
- สุนทรี สิงหนุตตรา. 2535. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. พิมพ์ครั้งที่ 1. คุณ 39.
- สุพรพิมพ์ เจียสกุล, กนกวรรณ ตีลกสกุลชัย, วัฒนา วัฒนาภา และ ชัยเลิศ. 2539. สรีรวิทยา 1, ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล. เรือนแก้วการพิมพ์.

ภาษาอังกฤษ

- Bu'Lock, J. D., Nisbet, L. T. and Winstanley, D. J. 1982. Bioactive Microbial Products: Search and Discovery. Whitstable Litho. p 70-76.
- Chairungsrilerd, N., Takeuchi, K., Ohizumi, Y., Nozoe, S. and Ohta, T. 1996. Mangostanol, A Prenyl Xanthone from *Garcinia mangostana*. Phytochemistry 43(5) : 1099-1102.
- Chan, K. M., Delfert, D. and Junger, D. 1986. A Direct Colorimetric Assay for Ca²⁺ Stimulated ATPase Activity. Analytical Biochemistry 157 : 375-380.
- Furutani, Y., Shimada, M., Hamada, M. Takeuchi, T. and Umezawa, H. 1975. Reticulol, An Inhibitor of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Phosphodiesterase. The Journal of Antibiotics. 28(7) : 558-560.

- Inoue, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. 1995. Steroidal Saponins from the Tubers of *Dichelostemma multiflorum* and their Inhibitory Activity on Cyclic-AMP Phosphodiesterase. Phytochemistry 39(5) : 1103-1110.
- Kassel, B. 1970. Naturally Occurring Inhibitors of Proteolytic Enzymes. Method Enzymology 19: 839.
- Kubo, S., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. 1992. Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Smilax sieboldii*. Phytochemistry 31(7) : 2445-2450.
- Kusano, A., Nikaido, T., Kuge, T., Ohmoto, T., Monache, G. D., Botta, B., Botta, M. and Saitoh, T. 1991. Inhibition of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase by Flavonoids from Licorice Roots and 4-Arylcoumarins. Chem. Pharm. Bull. 39(4) : 930-933.
- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. and Candia, O. A. 1979. An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate. Analytical Biochemistry 100: 95-97.
- Nikaido, T., Ohmoto, T., Noguchi, H., Kinoshita, T., Saitoh, H. and Sankawa, U. 1981. Inhibitors of Cyclic AMP Phosphodiesterase in Medicinal Plants. Planta Medica 43: 18-23.
- Ogiso, A., Kitazawa, E., Mikuriya, I. and Promdej, C. 1978. Isolation and Structure of Antipeptic Ulcer Diterpene from Thai Medicinal Plant. Chem. Pharm. Bull. 26 (10):3117-3123.
- Ori, K., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. 1992. Cerveratrum Alkaloids from Bulbs of *Fritillaria persica*. Phytochemistry 31(10) : 3605-3607.
- Ori, K., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. 1992. Steroidal Alkaloids from Bulbs of *Fritillaria persica*. Phytochemistry 31(12) : 4337-4341.
- Robison, G. A., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. 1971. Cyclic AMP. Academic Press. p: 30-33.

- Sakurai, H. , Nikaido, T., Ohmoto, T., Ikeya, Y. and Mitsuhashi, H. 1992. Inhibitors of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Phosphodiesterase from *Schisandra chinensis* and the Structure Activity Relationship of Lignans. Chem. Pharm. Bull. 40(5) : 1191-1195.
- Sashida, Y., Kubo, S., Mimaki, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T. 1992. Steroidal Saponins from *Smilax riparia* and *S. china*. Phytochemistry 31(7) : 2439-2443.
- Shapot, U. S., Chudinova, I. A., Krechetowa, G. D. and Pushkina, I. 1971. Nuclease Inhibitor from the Nuclear Sap of Liver and Hepatoma Cells. FEBS. Lett. 13: 13-18.
- Smith, C. A. and Wood, E. J. 1992. Molecular and Cell Biochemistry : Cell Biology. Chapman & Hall. p: 209-212.
- Umezawa, H. 1972. Enzyme Inhibitors of Microbial Origin. University of Tokyo Press. p: 1-14.
- Voet, D. and Voet, J. G. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons. p 1-20.
- Weinryb, I., Chasin, M., Free, C. A., Harris, D. N., Golenberg, H., Michel, I. M. , Paik, V. S., Phillips, M., Samaniego, S. and Hess, S. M. 1972. Effects of Therapeutic Agents on Cyclic AMP Metabolism *In Vitro.* J. of Pharmaceutical Science 16 (10): 1556-1567.
- Weishaar, R. E., Cain, M. H. and Bristol, J. A., 1985. A New Generation of Phosphodiesterase Inhibitors : Multiple Molecular Forms of Phosphodiesterase and the Potential for Drug Selectivity. J. of Medicinal Chemistry 28(5):537-545.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 การเตรียมเอนไซม์และสารตั้งต้น

1. การเตรียมไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์ 0.30 units/ml
ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์ น้ำหนักแห้ง 1 มิลลิกรัม เท่ากับ 0.23 units
ละลายไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอร์ 13 มิลลิกรัม ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl
buffer, pH 7.4 จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย แบ่งใส่หลอด appendorp หลอดละ 0.5
มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 0°C

2. การเตรียม 5'-nucleotidase 13.4 units/ml
5'-nucleotidase น้ำหนักแห้ง 1 มิลลิกรัม เท่ากับ 33 units
ละลาย 5'-nucleotidase 4 มิลลิกรัม ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer, pH 7.4
จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย แบ่งใส่หลอด appendorp หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่ 0°C

3. การเตรียมไซคลิก-เอเอ็มพี ความเข้มข้น 10 mM
ละลายไซคลิก-เอเอ็มพี (MW= 352.1) 35.12 มิลลิกรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 10
มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย แบ่งใส่หลอด appendorp หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 0°C

4. การเตรียมสารละลายเอนไซม์

สารละลายเอนไซม์: ใน 1 หลอดทดลองประกอบด้วย

MgCl ₂	40 μ l
0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.4	80 μ l
ไซคลิก-เอเอ็มพี ฟอสโฟไดเอสเทอเรส	50 μ l
5'-nucleotidase	50 μ l
น้ำปราศจากไอออน	180 μ l

หมายเหตุ: สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมเสร็จแล้ว ถ้ายังไม่นำไปทดสอบต้องเก็บไว้ที่ 0^oซ และขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์และสารตั้งต้น ต้องเตรียมที่ 0^oซ เสมอ เพื่อป้องกันเอนไซม์และสารตั้งต้นเสียสภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 2 การเตรียมสารละลาย

1. Polyvinyl alcohol (PVA)

ละลายผง PVA 2.32 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนต้มเดือดจำนวน 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2. การเตรียมสารละลายมาลาโคตกรีน (Malachite green solution)

ละลายมาลาโคตกรีน (malachite green, brilliant green) 0.0812 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ละลาย $MgCl_2$ 0.495 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 50 มิลลิลิตร

4. การเตรียม Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, pH 7.4.

ละลาย Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 0.6057 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 10 ml. ปรับ pH ด้วย 1 โมลาร์ HCl ให้เท่ากับ 7.4

5. การเตรียม Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, pH 7.4

นำ 0.5 โมลาร์ Tris-HCl มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH ให้เป็น 7.4

6. การเตรียมสารละลาย 25% โซเดียมซิเตรต

ละลายโซเดียมซิเตรต 25 กรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7. การเตรียมสารละลาย Ammonium molybdate

ละลาย ammonium molybdate 5.72 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริก(HCl) ความเข้มข้น 6 นอร์มอล จำนวน 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

8. การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์

ละลาย NaH_2PO_4 13.8 มิลลิกรัม ในน้ำปราศจากไอออนจำนวน 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตอินทรีย์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นำมาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นเป็น 100 ไมโครโมลาร์ แล้วนำมาใช้เป็นสารละลายมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์

9. การเตรียมรีเอเจนท์ผสม

นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1,2 และ 7 มาผสมกันตามอัตราส่วนดังนี้

Malachite green : PVA : Ammonium molybdate : น้ำปราศจากไอออน เท่ากับ 2:1:1:2

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง

หมายเหตุ : เตรียมสารละลายด้วยน้ำปราศจากไอออนเท่านั้น เครื่องแก้วที่ใช้ในการทดลองต้องล้าง ด้วยน้ำปราศจากไอออนเสมอ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของฟอสเฟตอินทรีย์

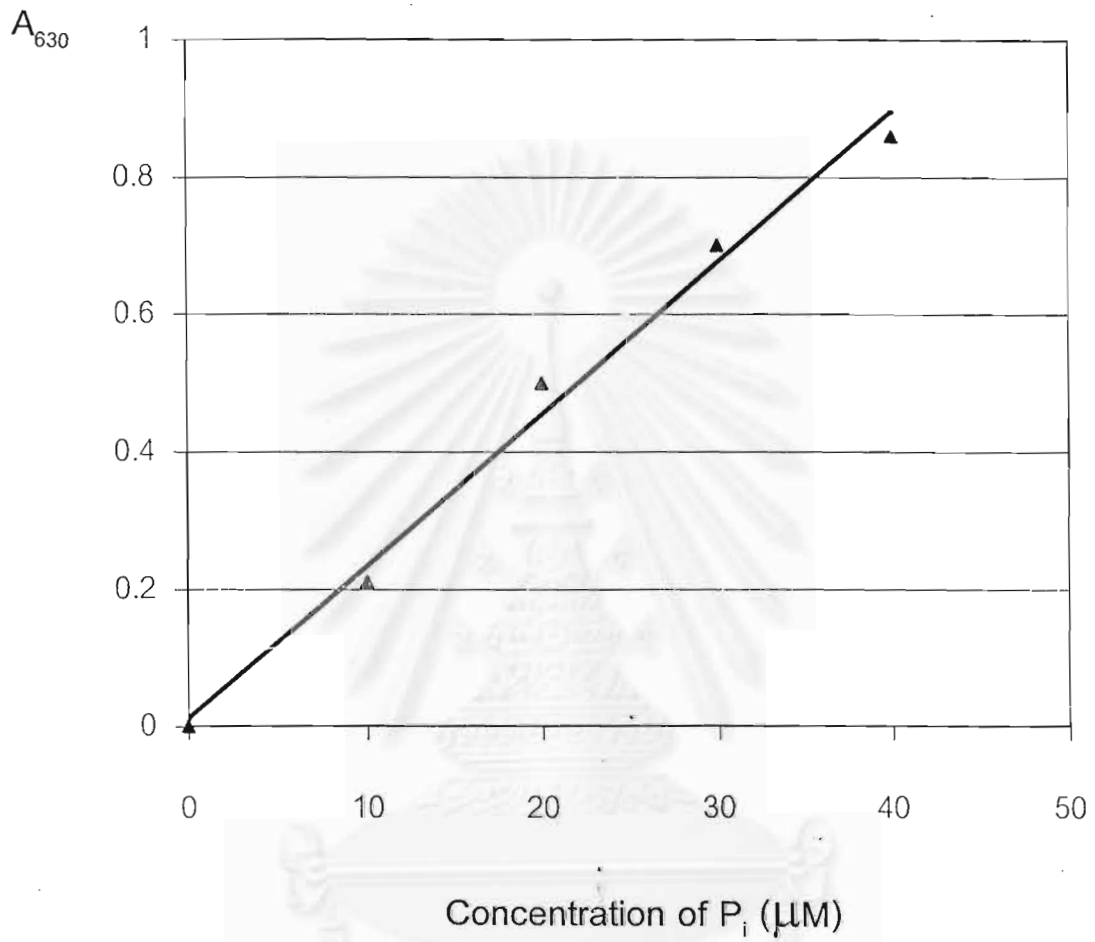
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 3 การเตรียมสารตัวอย่าง

1. ละลายสารตัวอย่างในไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. เมื่อต้องการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ให้นำสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 1 มาเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้มีความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ ความเข้มข้นนี้ไม่ใช่ความเข้มข้นสุดท้าย เนื่องจากเมื่อมีการเติมสารละลายเอนไซม์แล้ว สารตัวอย่างจะมีความเข้มข้นเป็น 200 $\mu\text{g/ml}$

หมายเหตุ : ความเข้มข้นของไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ที่ใช้ละลายสารตัวอย่างไม่ควรเกิน 2%

ภาคผนวก 4 กราฟมาตรฐานฟอสเฟตอินทรีย์



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก 5 สรรพคุณสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบ

กวางเครือแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Butea superba* (Roxb.)

วงศ์ : *Papilionaceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : จอมทอง โป้ตะกู ตานจอมทอง ตานเครือ

สรรพคุณ : หัว – เป็นยาทำให้สุขภาพร่างกายเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และจะทำให้เกิดกำลัง บำรุงเนื้อให้เต่งตึงขึ้น ใช้เพิ่มสมรรถภาพทางเพศในผู้ชาย ลด vasodilator มีฤทธิ์ทำให้กระชับกระฉง

เปลือก – ใช้เป็นยาแก้พิษงู (วิชัย เชิดชีวิตศาสตร์, 2542; วิทย์ เทียงบุญธรรม, 2531)

กระชาย

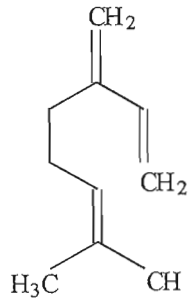
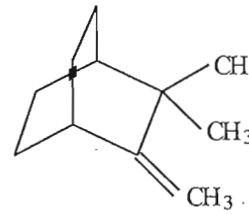
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr.

วงศ์ : *Zingiberaceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : กะแอน ระแอน ชิงทราย ว่านพระอาทิตย์ เป้าะสี่

กระชายนิยมใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องแกงโดยเฉพาะใช้ดับคาวเนื้อและปลา และยังนำไปใช้เป็นยาหรือส่วนผสมของยาอีกด้วย กระชายเป็นพืชล้มลุก มีลำต้นอยู่ใต้ดินเรียกว่าเหง้า มีรากเป็นกระจุก เป็นที่สะสมอาหาร เนื้อในรากมีสีเหลือง มีกลิ่นหอม

สรรพคุณ : กระชายเป็นพืชที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยเช่นเดียวกับเครื่องเทศชนิดอื่น ๆ แต่ในเหง้ามีน้ำมันหอมระเหยอยู่ในปริมาณน้อยเพียง 0.08% สารสำคัญในรากและเหง้ากระชายได้แก่ ไพนีน (pinene), แคมฟีน (camphene), ทูจีน (thujene), บอร์นีออล (borneol), เมอร์ซีน (myrcene), ลิโมนีน (limonene) และการบูร เป็นต้น รากและเหง้ากระชายใช้เป็นยาแก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยขับลม แก้บิด มูกเลือด ขับปัสสาวะ เป็นยาให้ภายนอกรักษาโรคซึ่กลาก น้ำมันหอมระเหยช่วยทำให้กระเพาะอาหารและลำไส้เคลื่อนไหวได้ดีขึ้น และช่วยเจริญอาหาร (ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 2; สมิง ศรีพลอย, 2535; สุนทรี่ สิงหนุตตรา, 2535; วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

 β -myrcene

Camphene

สารในกระชาย

กำลังพลญาเสือโคร่ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Betula alnoides*, Buch Ham.

วงศ์ : *Betulaceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : กำลังเสือโคร่ง

สรรพคุณ : เปลือกต้น - มีกลิ่นน้ำมันหอมระเหย ใช้ต้มน้ำบำบัดอาการปวดเมื่อยเส้นเอ็นทั่วร่างกาย แก้ปวดหลังปวดเอว ทำให้เส้นเอ็นแข็งแรง ช่วยชำระล้างไตให้สะอาด บำรุงกองธาตุให้เป็นปกติ เจริญอาหาร ขับลมในลำไส้ บำบัดอาการผู้ป่วยเป็นโรคเกี่ยวกับมดลูกของผู้หญิงไม่สมบูรณ์ มดลูกชอกช้ำ อักเสบเนื่องจากการกระทบกระเทือนแท้งบุตร มดลูกไม่แข็งแรงให้หายเป็นปกติ (พจนานุกรมยิวพฤษโยคะ และ สุวัตร์ ตั้งจิตเรจริญ, 2540; สอนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ ; สุนทรี สิงหนุตตรา, 2535)

จันทน์เทศ

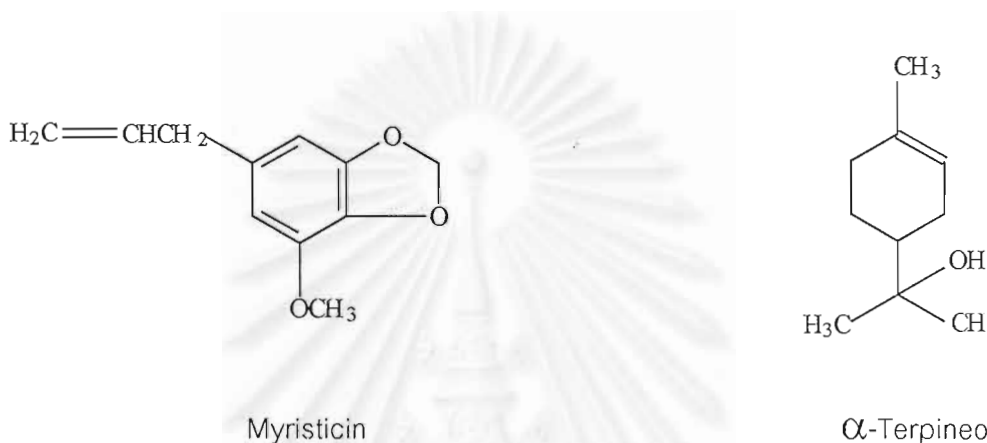
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Myristica fragrans* Houtt.

วงศ์ : *Myristicaceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : จันทน์บ้าน

ในลูกจันทน์เทศและดอกจันทน์เทศ ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยและน้ำมันชนิดระเหยยาก (fixed oil) น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่ประกอบด้วย แคมเฟน (camphene), ไพนีน (pinene), เจอรานีออล, บอร์นีออล (borneol), ไลนาลูออล (linalool), เทอพินีนออล (terpineol)

และ เมอริสตีซิน (myristicin) เป็นต้น ส่วนน้ำมันระเหยยากประกอบด้วยกรดเมอริสติก (myristic acid) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ของกรดลอริก (lauric acid), กรดปาล์มิติก (palmetic acid), และกรดสเตียริก (stearic acid) เป็นต้น เมื่อนำเมล็ดมากลั่นด้วยไอน้ำจะได้ น้ำมันจันทน์เทศ (myristica oil)



สารในจันทน์เทศ

สรรพคุณ : ผล - ให้ myristica oil ซึ่งเป็น volatile oil ที่ประกอบด้วย myristicin และ safrole นิยมใช้เป็นตัวแต่งกลิ่นอาหารจำพวกเนื้อ ชุป ขนมหวาน ใช้เป็นยาขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ ถ้ารับประทาน myristicin ในขนาดมากพอจะทำให้เกิดอาการเคลิ้มฝัน การกินลูกจันทน์ในขนาดมากกว่า 5 กรัม จะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน มึนงง หัวใจเต้นผิดปกติ อาจถึงตายได้

ดอก - ใช้เป็นเครื่องเทศและขับลม น้ำมันลูกจันทน์เทศและดอกจันทน์มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำและ ตัวอ่อนของแมลงได้

แก่น - แก้ไข้ บำรุงตับ ปอด หัวใจ และน้ำดี

ราก - ขับลม แต่งกลิ่น เครื่องเทศ เจริญอาหาร

เมล็ด - ขับลม แก้ท้องขึ้น ท้องอืด ท้องเฟ้อ เป็นเครื่องเทศ เจริญอาหาร (สวนสมุนไพรรสมเด็จพรเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, 2528 ; สุนทรী สิงหนุตตรา, 2535; วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

โตไม่รู้ล้ม

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Elephantopus scaber* Linn.

วงศ์ : *Compositae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : หญ้าสามสิบสองราก, หญ้าไฟนกคุ้ม, หญ้าปราบ, หญ้ากราบ, หนาดผา

สรรพคุณ : มีรสขื่น ใช้ทั้งต้นสด แก้ปัสสาวะพิการ และบำรุงความกำหนัด ทั้งต้นต้มรับประทาน
ต่างน้ำแก้ไข้จับสั่นหรือมาลาเรีย รับประทานแก้ไข้ บางตำรากล่าวว่า แก้กษัย บำรุง
กำลัง ขับปัสสาวะ แก้ไข้ ขับพยาธิไส้เดือน แก้กามโรค แก้อักเสบ ห้ามเลือดกำเดา
แก้ดีซ่าน นิ่ว บิด เหน็บชา ท้องมาน ฝีฝักบัว (เชษฐา พยากรณ์, 2525; พงศมาจารย์
วิพุธโยคะ และ สุวัตร์ ตั้งจิตจรเจริญ, 2540; สมิง ศรีพลอย, 2535; สุนทรี สิงหนุตรา,
2535)

ตะโกนา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diospyros rhodocalyx* Kruz.

วงศ์ : *Ebenaceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : โก นมวัว มะโก มะถ่าน ไฟผี

สรรพคุณ : ต้น – กินเป็นยาบำรุงธาตุ บำรุงกำลัง บำรุงความกำหนัด กระตุ้นร่างกายและแก้โรค
กามตายด้าน
ผล – มีแทนนิน (tannin) มีรสฝาด เผื่อนขม กินแก้ท้องร่วง ตกเลือด แก้มวน แก้กษัย
ขับพยาธิและแก้ฝีเน่าเปื่อย (พจนานุกรมวิพุธโยคะ และ สุวัตร์ ตั้งจิตจรเจริญ, 2540 ;
ลีนา ผู้พิพัฒน์พงศ์ , 2530; สมิง ศรีพลอย)

ม้ากระทืบโรง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ficus pubigoza* Wall.

วงศ์ : *Maraceae*

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : ม้าทลายโรง

สรรพคุณ : ใช้เนื้อไม้ทำยาตองหรือต้มน้ำกิน แก้ปวดหลัง ปวดเอว บำรุงกำลัง บำรุงโลหิต (พจนานุกรม
จารย์วิพุธโยคะ และ สุวัตร์ ตั้งจิตจรเจริญ, 2540)

ว่านชักมดลูก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Curcuma xanthorriza* Roxb.-

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : ว่านทรหด

สรรพคุณ : ใช้ส่วนเหง้าเป็นยาบีบมดลูก ทำให้มดลูกเข้าอู่เร็วหลังจากคลอดบุตร ทำให้ประจำเดือนมาปกติ ขับประจำเดือนในกรณีที่ประจำเดือนมาไม่ปกติ รักษาโรคมดลูกพิการ ปวดบวม แก้วปวดมดลูก แก้วริดสีดวงทวาร แก้วไส้เลื่อน ขับเลือด ขับลม ขับน้ำคาวปลา แก้วโรคลม รักษาอาการอาหารไม่ย่อย (สวนสมุนไพรรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี, 2528 ; สมิง ศรีพลอย, 2535; สุนทรี สิงหนุตตรา, 2535)

ว่านร้อนทอง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Globba malaccensis* Ridl.

วงศ์ : Zingiberaceae

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : ว่านน้ำทอง ว่านขอทอง ร้อนทอง

สรรพคุณ : หัวมีรสปร่า ใช้เป็นยารักษาพิษฝี พิษงู พิษตะขาบ พิษแมงป่อง และยังใช้เป็นยาสมานคุณธาตุ รักษาอาการท้องเสีย รักษาโรคบิด มูกเลือด รักษาอาการอุจจาระหยาบและรักษาพิษชาง โดยมากมักจะใช้ร่วมกับว่านกีบแรด (วิทย์ เทียงบุญธรรม, 2531; สมิง ศรีพลอย, 2535; เสงี่ยม พงษ์บุญรอด, 2493)

ฮ้อสะพายควาย

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Suregada multiflorum* (A. Juss.) Bill.

วงศ์ : Euphorbiaceae

ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ : ชันทองพยับบาท มะดูก หมากดูด กระดูก ยายปลวก ขนุนดง ขอบนานั่ง ชันชสกร ช้องรำพัน สลอดน้ำ ชันทอง ข้าวตาก ขุนทอง คุณทอง โจ่ง ดูกไทร ดูกไม้ เหมอดโรด ป่าข้าหมอง ยางลอก มะดูกดง มะดูกเลื่อม เหล่ปอ

สรรพคุณ : เปลือก - ฤทธิ์ทำให้เห็งอกแข็งแรง เป็นยาถ่ายรักษาโรคตับพิการ แก้โรคผิวหนัง แก้ประดง
แก้พิษในกระดูก
เนื้อไม้ - มีรสเมาเบื่อ แก้ลมพิษ แก้ไข้ แก้กามโรค (สวนสมุนไพรมสมเด็จพระเทพ
รัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี, 2528 ; สมิง ศรีพลอย, 2535)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวไพลิน สิทธิวิเชียรวงศ์ เกิดเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2517 ที่อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 ได้รับทุนผลิตและพัฒนาอาจารย์ (U.D.C.) ในปีการศึกษา 2540-2541 และทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัยในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย