

ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี
Anti-inflammatory activity of some medicinal plants from Ban Ang-Ed official community forest,
Chantaburi Province

กล่าวขวัญ ศรีสุข¹, สาวินีย์ สีมาพันธ์², ปริยาภา เกตุกุล¹, พรสุดา กันแก้ว¹, เอกรัฐ ศรีสุข³,
กาญจนา หิริมเพ็ง⁴, เบญจวรรณ ชิวปรีชา⁵ และ คำรณ เลียดประดม⁶

¹ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²โปรแกรมวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

³ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

⁴ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

⁵ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

⁶สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ ๙ (ชลบุรี) กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอล และ ส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพร 15 ชนิด จากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ ทำโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E₂ (prostaglandin E₂) ในเซลล์ แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์ แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชโดยวิธี MTT และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดของพืชสมุนไพรที่ศึกษามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ส่วนสกัดใบสาบแร้งสาบกา มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ สูงที่สุด โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการต้านการอักเสบและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของ ส่วนสกัดมีความสัมพันธ์ที่ต่ำ ผลการศึกษาดังนี้แสดงให้เห็นว่าใบสาบแร้งสาบกาเป็นแหล่งของสารต้านการอักเสบตามธรรมชาติที่ดี

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านการอักเสบ / ไนตริกออกไซด์ / พรอสตาแกลนดิน E₂ / สารประกอบฟีนอล / พืชสมุนไพร

Abstract

The present study was performed to evaluate anti-inflammatory activity and total phenolic contents of ethanolic and water extracts of 15 medicinal plants from Ban Ang-Ed official community forest, Chantaburi Province. The anti-inflammatory activity was determined by measuring an inhibitory effect on nitric oxide and prostaglandin E₂ production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. The cell viability of macrophages exposed to the plant extracts was determined by MTT assay. Total phenolic contents were estimated by Folin-Ciocalteu method. The results show that anti-inflammatory activity was observed in the studied plant extracts. The extract from *Ageratum conyzoides* Linn leaves exhibited the highest anti-inflammatory activity with no significant cytotoxicity. Additionally, the correlation of anti-inflammatory activity and total phenolic contents of the extracts was low. These obtained results indicated that leaves of *A. conyzoides* are good sources of natural anti-inflammatory agents.

Keywords : Anti-inflammatory activity / Nitric oxide / Prostaglandin E₂ / Phenolic compounds / Medicinal plants

*Corresponding author. E-mail: klaokwan@buu.ac.th

1. บทนำ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ บวม แดง และร้อน (Mequanint *et al.*, 2011) กระบวนการอักเสบประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังเนื้อเยื่อที่ถูกกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น เพื่อกำจัดสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ (Kumar *et al.*, 2007) ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E₂ (prostaglandins E₂) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นต้น (Van der Vliet, 2000; Jung *et al.*, 2009) เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน อย่างไรก็ตามการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ ปัจจุบันพบว่าการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไป หรือหลังเป็นระยะเวลาต่อเนื่องเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิวิทยาของโรคต่างๆ เช่น โรคกระดูกและลำไส้อักเสบโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (Septic shock) โรคเบาหวาน และโรคอักเสบต่างๆ (Van der Vliet, 2000; Coleman, 2001; Guzik *et al.*, 2003) การยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E₂ ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลข้างเคียงที่ต่ำพืชมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ (Huang *et al.*, 2006) และมีรายงานว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอักเสบจากธรรมชาติเช่น *Sanguisorba officinalis*, *Lophatherum gracile*, *Scutellaria baicalensis* และ *Crotoxylyum formosum* เป็นต้น (Zhang *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2012; Ravipati *et al.*, 2012 และ Rodanant *et al.*, 2012)

โครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี เป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ถูกจัดตั้งขึ้นเพื่อการอนุรักษ์ และฟื้นฟูสภาพป่าไม้ในโครงการ สนับสนุนให้ชุมชนมีความเข้าใจ และรู้จักใช้ทรัพยากรธรรมชาติร่วมกันให้เกิดประโยชน์อย่างยั่งยืน ในป่าแห่งนี้มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกใช้ในตำรายาของหมอชาสมุนไพรพื้นบ้านในแถบจังหวัดจันทบุรี ดังนั้นเพื่อให้มีผลการวิจัยยืนยันคุณค่าของสมุนไพรและส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์พืชสมุนไพรเหล่านี้ จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรที่พบในพื้นที่โครงการป่าชุมชนฯ การวิจัยนี้มุ่งนำพืชสมุนไพรที่ใช้ในการแก้อาการไข้ บวม ผื่น และแการิดสีดวงทวาร ตามคำให้สัมภาษณ์ของหมอชาพื้นบ้านในท้องถิ่นมาศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในระดับหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรเหล่านี้ รวมทั้งทราบแหล่งของสารต้านอักเสบใหม่ที่อาจนำไปพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ จากการอักเสบต่อไป

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมส่วนผสมพืชสมุนไพร

สำรวจพืชสมุนไพรขณะเดินป่าในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรีกับหมอชาสมุนไพรพื้นบ้าน จำนวน 2 ท่าน คือ หมอสมชาย ใจสิทธิ์ และหมอประเทือง นิสัยชื่อ ในช่วงเดือนมิถุนายน และกันยายน 2555 เก็บพืชสมุนไพรจำนวน 15 ชนิด โดยเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้ไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดยอาจารย์เบญจวรรณ ชิวปริษา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ทำการสกัดส่วนของพืชสมุนไพรโดยนำพืชสมุนไพรที่ใช้ในทดสอบมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าพืชสมุนไพรแต่ละส่วนจะแห้ง จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ในการศึกษานี้ทำการสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล และน้ำร้อน

การสกัดด้วยน้ำร้อนโดยนำพืชสมุนไพรที่บดละเอียดใส่ในน้ำต้มเดือด ในอัตราส่วน 1:10 เช่นาน 30 นาที จากนั้นกรองส่วนสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 และนำกากพืชมาต้มซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง การเตรียมส่วนผสมเอทานอลของพืชสมุนไพรนำพืชสมุนไพรที่บดละเอียดแช่ใน 95 %เอทานอล ในอัตราส่วน 1:10เป็นเวลา 5 วัน กรองส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จากนั้นนำส่วนผงพืชสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมดมารวมกันและระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Srisook *et al.*, 2012) อดับที่ก้นน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสง

2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรที่

ความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากไนโตรที่เป็นผลิตภัณฑ์ของการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ที่มีความเสถียร การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนโตรที่โดยปฏิกิริยา Griess นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. C. Kim, Inha University College of Medicine, Republic of Korea เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM ที่มี 4 มิลลิโมลาร์ L-glutamine 25 มิลลิโมลาร์ D-glucose และ 1 มิลลิโมลาร์ sodium pyruvate (Gibco/Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) และบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารสกัด (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $13,700 \times g$ นาน 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Griess [1% N-(1-naphthyl)ethylene-diaminedihydrochloride และ 1% sulfanilamide ใน 5% phosphoric] จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 546 นาโนเมตร (Srisook *et al.*, 2011) หลังจากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของไนโตรที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนโตรไรต์ (NaNO_2) ที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ และคำนวณ%การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแต่ละส่วนในพืชแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ใช้สาร aminoguanidine เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2

เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสม (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $13,700 \times g$ นาน 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยชุดตรวจสอบ PGE_2 competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการทดสอบลงในไมโครเพลทที่เคลือบกันหลุมด้วย goat anti-mouse polyclonal antibody หลังจากนั้นเติม mouse anti- PGE_2 monoclonal antibody ลงในแต่ละหลุม และบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่เชื่อมกับเอนไซม์ horseradish peroxidase และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมซึบสเตรท (hydrogen peroxide และ tetramethylbenzidine) ผสมให้เข้ากันดี และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของพรอสตาแกลนดิน E_2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้จากกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่ทราบความเข้มข้น และใช้สารมาตรฐาน indomethacin เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2

2.4 การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรั้งตัวของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์ การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม (1.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10% FBS-DMEM และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัด (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ LPS (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดย LPS ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มีสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายผลึก formazan ด้วย DMSO จำนวน 500 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Versamax, Molecular Devices, สหรัฐอเมริกา) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ดังสมการ % การมีชีวิตรอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ / ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม) $\times 100$ (Buapool *et al.*, 2013)

2.5 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทำตามวิธีของ กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2553) และเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยเติมสารละลายกรดแกลลิกหรือส่วนสกัดพืชสมุนไพร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 7% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม จากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกแสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ โดยการวิเคราะห์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis)

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบ

พืช	วงศ์	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	%ของน้ำหนักแห้ง		ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด)	
			ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ
เข็มป่า (<i>Ixoralobbia</i> King & Gamble)	Rubiaceae	ทั้งต้น	7.8	9.7	232.5±4.0	132.9±3.2
โกลนแดง (<i>Melastomasaiagonense</i> (Kuntze) Merr)	Melastomataceae	ราก	2.9	12.7	307.8±2.9	72.9±0.8
ขงโคป่า (<i>Bauhinia</i> sp.)	Leguminosae-Caesalpinioideae	ใบ	7.9	13.2	95.7±1.4	74.2±1.6
ตุ้ตื้น (<i>Helictereshisute</i> Lour)	Sterculiaceae	ราก	2.3	16.3	106.0±9.8	81.4±1.9
นระพูไทย หรือค่างควาดำ (<i>Taccachantrieri</i> Andr.)	Taccaceae	เหง้า	14.9	23.5	61.9±0.5	33.9±0.6
พนมสุวรรณค์ (<i>Clerodendrumpaniculatum</i> Linn)	Verbenaceae	ราก	2.9	6.3	58.2±0.8	18.7±0.3
พลับพล่า หรือไม้ตาย(<i>Microcostomentosa</i> Sm.)	Tiliaceae	ใบ	6.0	15.4	221.9±4.9	96.6±1.2
พังกแหใหญ่ (<i>Tremaorientalis</i> (L.) Yala)	Ulmaceae	เปลือกลำต้น	11.1	3.5	515.3±14.7	325.7±13.6
พินปลา (<i>Lisea umbellate</i> Merr)	Lauraceae	ใบ	6.6	7.4	213.5±6.4	206.6±5.7
มะเดื่อหอม (<i>Ficushirta</i> Vahl.)	Moraceae	ใบ	6.7	9.7	28.3±1.7	44.6±0.6
ไมยราบ (<i>Mimosa diplotricha</i> C. Wright ex Sauvalle)	Mimosaceae	ทั้งต้น	3.5	5.8	24.6±2.8	24.9±0.9
ระย่มน้อยดอกขาว (<i>Rauwolfia</i> sp.)	Apocynaceae	ราก	2.1	15.0	21.4±0.5	4.1±0.2
ราชดำ หรือพญาดาบหัก(<i>Bruceajavanica</i> (L.) Merr.)	Siamaroubaceae	ใบ	18.2	29.9	58.5±3.7	77.6±4.4
สาบแจ้งสามกา (<i>Ageratum conyzoides</i> Linn)	Asteraceae	ใบ	13.9	25.7	65.2±4.2	47.0±1.8
หัวเดียว (<i>Aglaonemanitidum</i> (Jack) Kunth)	Araceae	ต้น	10.9	37.6	123.0±2.1	17.8±0.7

3. ผลและอภิปราย

ร้อยละของน้ำหนักแห้ง (% yield) ของส่วนสกัดพืชสมุนไพรทั้ง 15 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าส่วนสกัดน้ำของสมุนไพรทุกชนิด (3.5-37.6%) มีน้ำหนักแห้งสูงกว่าส่วนสกัดเอทานอล (2.1-18.2%) ยกเว้นส่วนสกัดเปลือกพังกาใหญ่ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Diaz *et al.* (2012) ที่รายงานว่าการศึกษาสกัดพืชสมุนไพรจีนบางชนิดด้วยน้ำร้อนให้น้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลาย 95% เอทานอล การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดจากพืชสมุนไพร เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลหลายชนิดแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านอักเสบได้ (Huang *et al.*, 2006; Himaya *et al.*, 2010) จากผลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก $y = 2.8422x + 0.0656$ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9993 พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดเอทานอลมีค่าระหว่าง 21.4 ± 0.5 ถึง 515.3 ± 14.7 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัดและปริมาณที่พบในส่วนสกัดน้ำคือ 4.1 ± 0.2 ถึง 325.7 ± 13.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดของสมุนไพรทั้ง 15 ชนิดพบว่าส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของเปลือกพังกาใหญ่มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลในพืชสมุนไพรชนิดเดียวกันพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากส่วนสกัดเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าในส่วนสกัดน้ำ ยกเว้น ใบมะเดื่อหอมและใบราชดัด ในขณะที่การศึกษาของ Zhang *et al.* (2011) Diaz *et al.* (2012) และ Ravipati *et al.* (2012) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพรจีนชนิดต่างๆ ด้วยน้ำและเอทานอลให้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ศึกษา

การศึกษาการต้านอักเสบของพืชสมุนไพรในครั้งนี้ใช้เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาให้เซลล์สัมผัสกับ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ถูกใช้เป็นตัวชี้วัดที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ การศึกษาต้นแบบการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Zhang *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2012; Ravipati *et al.*, 2012 และ Buapool *et al.*, 2013) จากการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพร พบว่าส่วนสกัดเอทานอลที่มี % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา (85.3 ± 2.4) ใบราชดัด (97.6 ± 5.5) และรากตังกูน (99.9 ± 2.4) และส่วนสกัดน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา (52.0 ± 4.6) ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่ aminoguanidine เป็นสารที่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไนตริกออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ $64.7 \pm 9.3\%$ ส่วนสกัดเอทานอลของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ซึ่งเป็นสารสื่อกลางการอักเสบชนิดสำคัญที่ถูกผลิตโดยเอนไซม์ COX-2 ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 สูงมากกว่า 90% ได้แก่ ใบสาบแร้งสาบกา ใบราชดัด เปลือกพังกาใหญ่ และรากตังกูน นอกจากนี้ยังใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ COX-2 คือ indomethacin ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ $97.2 \pm 0.2\%$ ส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นั่นคือเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเหล่านี้มี % ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 ยกเว้นส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด และรากตังกูน รวมทั้งส่วนสกัดน้ำของรากโคลงเคลง และใบมะเดื่อหอม ดังนั้นการที่เซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของใบสาบแร้งสาบกา มีปริมาณไนโตรเจนน้อยลง น่าจะเป็นผลมาจากส่วนสกัดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ไม่ได้เป็นผลจากการตายของเซลล์ เหมือนส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด และรากตังกูน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของทั้งส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอล พบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อย มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.1248 และ 0.2044 ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) ตามลำดับ แสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในส่วนสกัดน้ำ และส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรทั้ง 15 ชนิด อาจเป็นสารประกอบฟีนอลบางชนิดเป็นตัวออกฤทธิ์ หรือเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล ที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานว่าความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ไม่ได้แปรผันตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในส่วนสกัดของ *Sophora flavescens*, *Eucommia ulmoides*, *Baccharis genistelloides*, *Tinospora capillipes*, *Actinidia arguta* และ *Paris polyphylla* (Zhang *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2012 และ Ravipati *et al.*, 2012)

ตารางที่ 2 % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E₂ ของพืชสมุนไพร

พืช	% ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์		% ยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E ₂	% ความมีชีวิตรอดของเซลล์	
	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ
เข็มป่า	29.6±12.1	7.4±7.4	89.0±7.2	103.0±6.6	101.2±11.4
โคลงเคลง	30.2±8.7	15.4±2.4	45.3±3.6	88.7±2.4	73.3±0.7
ชงโคป่า	16.1±3.3	-1.3±4.1	36.3±29.2	94.1±1.8	88.8±12.2
ดิงดูตัน	99.9±2.4	19.9±4.8	95.7±4.4	55.3±2.3	84.2±6.4
เนระพูสีไทย หรือค่างคาวดำ	23.5±10.6	17.1±4.6	70.8±9.4	91.2±4.7	89.9±4.8
พนมสวรรค์	26.6±0.9	10.9±2.7	79.9±8.5	98.3±10.8	80.0±6.4
พลับพลา หรือไม้ลาย	18.6±3.0	21.0±4.3	65.0±10.6	97.6±6.9	84.5±2.5
พังแหรใหญ่	19.0±9.5	-13.4±9.0	91.2±8.9	100.5±2.7	99.6±11.3
ฟันปลา	21.1±6.5	17.9±5.9	80.9±7.9	100.8±2.8	87.9±5.5
มะเดื่อหอม	42.6±6.5	26.3±6.2	45.0±39.1	89.1±4.3	69.3±2.8
ไมยราบ	46.2±8.9	7.0±1.7	39.7±3.3	92.5±1.2	85.3±2.3
ระย่มน้อยดอกขาว	29.8±2.7	8.5±5.3	42.4±21.2	92.9±4.8	90.3±2.7
ราชดัด หรือพญาดาบหัก	97.6±5.5	14.8±5.0	91.2±8.9	4.1±0.9	86.5±9.5
สาบแรังสาบกา	85.3±2.4	52.0±4.6	90.1±8.7	102.2±1.0	94.7±5.2
หัวเดี๋ยว	17.5±3.1	21.8±3.7	72.3±10.2	103.6±10.7	85.5±6.3
Aminoguanidine (50 µM)	64.7±9.3		-	91.7±7.8	
Indomethacin (10 µM)	-		97.2±0.2	94.2±9.4	

4. บทสรุป

จากผลการวิจัยทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดพืชสมุนไพรในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ศึกษาในครั้งนี้ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบที่ดีที่สุด ได้แก่ส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำจากใบสาบแรังสาบกา ผลการศึกษาที่ได้นี้จะ เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ใบสาบแรังสาบกาในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในใบสาบแรังสาบกาที่อาจนำไปใช้พัฒนาเป็นยาด้านอักเสบชนิดใหม่ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี (PERCH-CIC) ขอขอบคุณโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรี ในการอนุเคราะห์พืชสมุนไพร

6. เอกสารอ้างอิง

กล่าวขวัญ ศรีสุข, ปรีดาวรรณ สาลี, เยาวลักษณ์ เจริญสุข และ เอกรัฐ ศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย, (ฉบับพิเศษ), 143-150.

Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 4, 495-504.

- Coleman, J.W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1, 1397-1406.
- Diaz, P., Jeong, S.C., Lee, S., Khoo, C., Koyyalamudi, S.R. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7, 26.
- Guzik, T.J., Korbust, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.
- Himaya, S.W.A., Ryu, B., Qian, Z.J., Kim, S.K. (2010). Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30, 68-75.
- Huang, W. H.; Lee, A. R.; Yang, C. H. (2006). Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 70, 2371-2380
- Jung, H.W., Seo, U.K., Kim, J.H., Leem, K.H., Park, Y.K. (2009). Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF- κ B signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 313-319.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N. (2007). *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). United States of America, Elsevier Saunders.
- Mequanint, W., Makonnen, E., Urga, K. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimum lamifolium* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 32-36.
- Ravipati, A.S., Zhang, L., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Bartlett, J., et al. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 173.
- Rodanant, P., Surarit, R., Srichan, R., Korsuwanwong, S. (2012). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of some Thai medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 4063-4068.
- Srisook, K., Palachot, M., Mongkol, N., Srisook, E., Sarapusit, S. (2011). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cissus quadrangularis* Linn may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1008-1014
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., Srisook, E. (2012) Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 4077-4081.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Cross, C.E. (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease?. *Respiratory Research*, 1, 67-72.
- Zhang, L., Anjaneya, S.R., Sundar, R.K., Sang, C.J., Narsimha, T.S., John, B., et al. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12361-12367.