ฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของเหง้าว่านเปรี้ยว

Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of Isolated Compounds from Hexane Fraction of *Boesenbergia kingii* Rhizome

วศพล ฉัตรเกตุ[1] นันทพงศ์ ขำทอง[2] และ ธีรทัศน์ สุดสาย[2*]

Wasapon Chatgat[1], Nanthaphong Khamthong[2], and Teeratad Sudsai[2*]

[1]นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

[2]อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

[1]Graduate student in Master of Science in Oriental Medicine College, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000

[2]Lecturer in Master of Science in Oriental Medicine College, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000

[*]Corresponding author, E mail: teeratad_s@windowslive.com

บทคัดย่อ

ว่านเปรี้ยว (*Boesenbergia kingii* Mood & L.M. Prince) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในสกุล *Boesenbergia* โดยหมอพื้นบ้านของไทยใช้ว่านเปรี้ยวในการรักษาอาการลำไส้อักเสบ ลำไส้ใหญ่อักเสบ แผลร้อนในภายในปาก และฝี จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนสกัด chloroform มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและช่วยสมานแผล อย่างไรก็ตามไม่มีการรายงานสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด hexane ดังนั้นจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของเหง้าว่านเปรี้ยว โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกส่วนสกัด hexane ของเหง้าว่านเปรี้ยวด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี จากการแยกสารบริสุทธิ์ได้สารบริสุทธิ์กลุ่ม flavonoids 2 สาร ได้แก่ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**1**) และ 5-hydroxy-7-methoxyflavone (**2**) และ 1 สารผสมระหว่าง β-sitosterol (**3**) และ stigmasterol (**4**) พบว่าสารที่แยกได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ (IC_{50} มากกว่า 100 µM) แต่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.68, 28.33 และ 55.33 µM ตามลำดับ โดยไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 จากข้อมูลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าว่านเปรี้ยวมีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบสอดคล้องกับการใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบตามการใช้แบบพื้นบ้าน

คำสำคัญ: *ว่านเปรี้ยว, ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ไนตริกออกไซด์*

Abstract

The rhizome of *Boesenbergia kingii* Mood & L.M. Prince, a plant in genus *Boesenbergia*, has been used for treatment of infected inflammatory related ailments including inflammatory bowel disease, ulcerative colitis aphthous ulcer and abscess by Thai traditional healers. As a part of our study on anti-inflammatory agents from *B. kingii* rhizomes, it is indicated that the chloroform fraction of this plant possessed potent anti-inflammatory activity as well as wound healing activity. Due to these properties, *B. kingii* have gained attention as important sources for medicinal treatment. However, the studies investigating pharmacological properties of isolated compounds form hexane fraction of *B. kingii* on antioxidant and anti-inflammatory activities are still not reported. Therefore, this study was aimed to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds form hexane fraction of *B. kingii*. Isolation of the hexane fraction of *B. kingii* rhizomes afforded two known flavonoids, which were identified as 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**1**), 5-hydroxy-7-methoxyflavone (**2**), together with one mixture of β-sitosterol (**3**) and stigmasterol (**4**). These compounds showed no antioxidant activity (IC_{50} > 100 µM); however, they exhibited the high inhibitory activity against NO release with IC_{50} values of 17.68, 28.33 and 55.33 µM, respectively, which did not showed cytotoxic effects. This scientific investigation of anti-inflammatory activity of *B. kingii* rhizomes supports the Thai traditional uses for treatment of inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, aphthous ulcer and abscess.

Keywords: *Boesenbergia kingii, Anti-inflammatory activity, Antioxidant activity, Nitric oxide*

1. บทนำ

การอักเสบ (inflammation) เป็นกลไกการป้องกันสิ่งแปลกปลอมที่เกิดกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อของร่างกายที่ได้รับบาดเจ็บ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นออกจากร่างกาย ส่งเสริมเซลล์และเนื้อเยื่อให้เกิดการซ่อมแซม อย่างไรก็ตามการอักเสบที่มากเกินไปจากสารสื่อการอักเสบและอนุมูลอิสระ ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อในบริเวณที่บาดเจ็บทำงานผิดปกติไปได้มากกว่านั้นกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ เช่นโรคหัวใจและหลอดเลือด (cadiovascular diseases) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคเบาหวาน (diabetis) มะเร็ง (cancer) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (septic shock) โรคทางเดินอาหารอักเสบ (inflammatory bowel disease) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และโรคอักเสบต่างๆ (Aktan, 2004; Guzik et al., 2003; Van der vilet et al., 2000)

Nitric oxide (NO) จัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางการอักเสบ NO สังเคราะห์ขึ้นจาก L-arginine และโมเลกุลของออกซิเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) โดย NO ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการอักเสบ เช่น การขยายตัวของหลอดเลือดเมื่อเกิดการบาดเจ็บ ภาวะหัวใจขาดเลือด เกิดการอักเสบแบบฉับพลัน และเรื้อรัง (Libby, 2007; Zedler and Faist, 2006) โดย NO ที่เพิ่มมากกว่าปกติจะทำปฏิกริยากับ

superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) เกิดเป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) ที่มีฤทธิ์รุนแรงฆ่าจุลชีพได้และยังสามารถทำลายเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้ง NO เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ว่านเปรี้ยว (*Boesenbergia kingii* Mood & L.M. Prince) เป็นพืชชนิดหนึ่งในสกุล *Boesenbergia* วงศ์ Zingiberaceae มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย (Mood et al., 2013) และมีการใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาอาการลำไส้อักเสบ ลำไส้ใหญ่อักเสบ แผลร้อนในภายในปาก และฝี โดยหมอพื้นบ้านของไทย (Sudsai et al., 2013) จากการศึกษารายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านเปรี้ยว พบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบและการสมานแผลที่ดี โดยสารสำคัญที่พบจากส่วนสกัด chloroform ของว่านเปรี้ยวได้แก่สารในกลุ่ม diaryl-heptanoids, flavonoids, sterol และสารใหม่กลุ่ม sesquiterpene (Sudsai et al., 2014) มากกว่านั้นในปัจจุบันการค้นคว้าหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการอักเสบเพื่อนำไปสู่การพัฒนายาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลข้างเคียงที่ต่ำมีความจำเป็นอย่างมาก (Huang et al., 2006)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด hexane ของว่านเปรี้ยว เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากว่านเปรี้ยวในการป้องกันและรักษาโรค อันเนื่องมาจากการอักเสบตามการใช้แบบพื้นบ้านได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนสกัด hexane ของเหง้าว่านเปรี้ยว

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้าว่านเปรี้ยว

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี และอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบได้แก่อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 สารมาตรฐาน L-nitro-arginine (L-NA), caffeic acid phenethyl ester (CAPE), indomethacin, phosphate buffer saline (PBS), lipopolysaccharide (LPS) จาก *Escherichia coli*, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), สารเคมีต่างๆ ซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich (Missouri, USA), fetal calf serum (FCS) ซื้อจาก Gibco (California, USA) penicillin-streptomycin ซื้อมาจาก Invitrogen (California, USA) 96-Well microplates ซื้อจาก Thermo (Thermo Scientific, Chaina)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมสารสกัดจากเหง้าว่านเปรี้ยว

ส่วนสกัดเหง้าว่านเปรี้ยวชั้น ethanol ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. สุภิญญา ติ๋วตระกูล ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย โดยนำส่วนสกัด ethanol มาสกัดแยกส่วนใช้วิธีของเหลวสกัดด้วยของเหลว ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water จะได้ส่วนสกัด hexane, ส่วนสกัด dichloromethane, ส่วนสกัด ethyl acetate และส่วนสกัด water ตามลำดับ

3.2.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์

การหาสารสำคัญจากส่วนสกัด hexane ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 (IC_{50} เท่ากับ 3.98 µg/ml) ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่ silica gel chromatography และ preparative thin layer chromatography พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้เทคนิคสเปคโตรสโคปิก ^{1}H NMR (500 MHz, Varian, Germany)

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี DPPH scavenging assay โดยเตรียม stock solution ของตัวอย่างส่วนสกัดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml และสารบริสุทธิ์ 10 mM ในตัวทำละลาย DMSO หลังจากนั้นเจือจางตัวอย่างเป็น 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 50, 25, 12.5 และ 3.125 µM โดยเติมตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละ well ของ 96 wells plate หลังจากนั้นเติม 6×10^{-5} M DPPH ใน ethanol บริสุทธิ์ปริมาตร 100 µl แล้วบ่มในที่มืดอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจวัดการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างทดสอบที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader (Subhasree et al., 2009) ในการศึกษาใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) และ quercetin เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งและสร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}; n เท่ากับ 4) การคำนวณร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สามารถคำนวณได้ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

โดยที่

$$A_{control} = \text{Absorbance}_{control} - \text{Absorbance}_{control\ blank}$$

$$A_{sample} = \text{Absorbance}_{sample} - \text{Absorbance}_{sample\ blank}$$

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 ที่มีส่วนประกอบของ 10% fetal bovine serum (FBS) 100 unit/ml, 1% penicillin 100 µg/ml และ streptomycin 25 µg/ml ในตู้ CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% อุณหภูมิ 37 °C และทำการ subcultured ทุก 2 วัน รอจนได้ปริมาณเซลล์หนาแน่นร้อยละ 80 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาการยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย LPS

เลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 wells plate (cell มีความเข้มข้น 1×10^5 cells/well) โดยบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cell ด้วย PBS solution เติมอาหาร RPMI ที่ประกอบด้วย 100 ng/ml LPS ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมของชุดทดสอบเติม test sample ลงไป 100 µl incubate cells ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยในการศึกษาใช้ CAPE, L-NA และ indomethacin เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ

ตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมมา 100 µl ใส่ใน 96 well plate เติม griess reagent แต่ละหลุม 100 µl แล้วตรวจวัดปริมาณ NO ที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader (Sudsai et al., 2013) นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งและสร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่

สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% (IC_{50}; n เท่ากับ 4) การคำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO ดังนี้

% Inhibition = [(A-B) / (A-C)] × 100

โดยที่

A-C : nitrite concentration; A : LPS (+), sample (-),

B : LPS (+), sample (+), C : LPS (-), sample (-)

3.2.5 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ใช้วิธี MTT assay โดยอาศัยเอนไซม์ภายใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวส์ MTT สารสีเหลืองเป็นผลึก formazan สีม่วง โดยหลังจากทำการทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ RAW 264.7 ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT (10 µl, 5 mg/ml) ในแต่ละ wells แล้วบ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติม DMSO 100 µl เพื่อละลายผลึก formazan แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (n เท่ากับ 4) (Sudsai et al., 2013)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลค่า IC_{50} ของตัวอย่างทั้งหมดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งการสร้าง NO จะแสดงในรูปของค่า mean ± S.E.M. โดยวิเคราะห์ความแตกต่างค่า IC_{50} ของตัวอย่างด้วยวิธี ANOVA ร่วมกับ dunnett's test ที่ความเชื่อมั่น 95% โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel (Sudsai et al., 2014)

4. ผลการวิจัย

4.1 การแยกสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยว

ส่วนสกัด hexane มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง NO (IC_{50} เท่ากับ 3.98 µg/ml) ปริมาณ 30 g แยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี มี silica gel (750 g) เป็นวัฏภาคคงที่ ตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane, hexane : dichloromethane (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8), dichloromethane, dichloromethane : ethyl acetate (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8), ethyl acetate, ethyl acetate : methanol (9:1, 9:2, 9:5) และ methanol จะได้ส่วนสกัด H1-H9 จากนั้นนำ H4 มาแยกต่อโดยวิธีการตกผลึก จะได้ 1 สารผสมระหว่าง **3** และ **4** มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ปริมาณ 11.8 mg จากนั้นนำส่วนที่ไม่ตกผลึกมาทำการแยกต่อด้วย silica gel chromatography ตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane, hexane : dichloromethane (8:2, 7:3, 5:5, 4:6, 2:8), dichloromethane, dichloromethane : ethyl acetate (8:2, 7:3, 5:5, 4:6, 2:8), ethyl acetate, ethyl acetate : methanol (8:2, 7:3, 5:5, 4:6, 2:8) และ methanol จะได้ส่วนสกัด H41-H48 นำ H42 แยกต่อด้วย silica gel chromatography ตัวทำละลายที่ใช้ hexane : dichloromethane (8:2) จะได้สารบริสุทธิ์ **1** และ **2** มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ปริมาณ 32 และ 23 mg ตามลำดับ

นำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมี โดยเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR สเปกตรัมของสาร **1** และ **2** จากรายงานการวิจัยของ Sutthanut et al. (2007) ในขณะที่สารผสมระหว่าง **3** และ **4** เปรียบเทียบข้อมูลจากการรายงานวิจัยของ Chaturvedula and Prakash, (2012)

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการยับยั้งการหลั่ง NO ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยว

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งได้ที่ 50% (IC_{50})		ความเป็นพิษต่อเซลล์
ส่วนสกัด	DPPH assay (µg/ml)	NO assay (µg/ml)	MTT assay (µg/ml)
Hexane fraction	373.81 ± 10.15	3.98 ± 0.09	≥30
Dichloromethane fraction	63.02 ± 5.60	3.92 ± 0.19	≥10
Ethyl acetate fraction	53.63 ± 1.64	1.24 ± 0.06	≥10
Water fraction	341.11 ± 15.40	35.12 ± 3.71	≥100
สารบริสุทธิ์และสารมาตรฐาน	DPPH assay (µM)	NO assay (µM)	MTT assay (µM)
5-Hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**1**)	>100	17.68 ± 1.59*	>100
5-Hydroxy-7-methoxyflavone (**2**)	>100	28.33 ± 1.45*	>100
β-Sitosterol (**3**) + Stigmasterol (**4**)	>100	55.33 ± 2.33	>100
BHT	61.72 ± 1.38	-	-
Quercetin	4.18 ± 0.06	-	-
CAPE	-	3.38 ± 0.2*	≥30
L-NA	-	59.42 ± 5.54	>100
Indomethacin	-	36.68 ± 3.20	>100

- หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ, [a] หมายถึง มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80%

* หมายถึง ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin

4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยว

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส่วนสกัดเหง้าว่านเปรี้ยวจากชั้น ethanol ในส่วนสกัดต่างๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่แตกต่างกัน จากตารางที่ 1 พบว่าส่วนสกัด hexane มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างต่ำ (IC_{50} เท่ากับ 373.81 µg/ml) มากกว่านั้นสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำ (IC_{50} มากกว่า 100 µM) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานที่ใช้ BHT และ quercetin โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 61.72 และ 4.18 µM ตามลำดับ

4.3 การยับยั้งการสร้าง NO ของสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยว

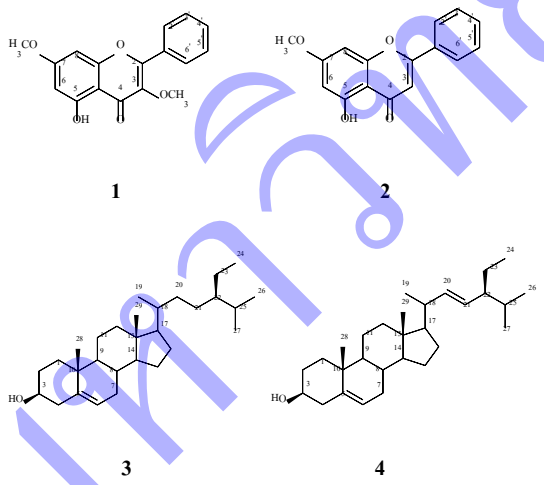
สารบริสุทธิ์ที่ได้จากเหง้าว่านเปรี้ยวเมื่อนำมาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 พบว่าสาร **1** มีฤทธิ์ยับยั้ง NO ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 17.68 µM ตามด้วยสาร **2** และ สารผสมระหว่าง **3** และ **4** โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.33 และ 55.33 µM ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO จากเซลล์ RAW 264.7 ได้แก่ CAPE, indomethacin และ L-NA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.38, 36.68 และ 59.42 µM ตามลำดับ

4.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยว

จากการทดสอบพบว่าสารบริสุทธิ์ **1**, **2** และสารผสมระหว่าง **3** และ **4** ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ในขณะที่สารมาตรฐาน CAPE พบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ที่ความเข้มข้น 30 และ 100 µM

5. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าสารในกลุ่มของ flavonoids **1**, **2** และ sterol ที่เป็นสารผสมระหว่าง **3** และ **4** ที่แยกได้จากส่วนสกัด hexane ของเหง้าว่านเปรี้ยว (รูปที่ 1) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากเหง้าว่านเปรี้ยวพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำ ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็น



1 **2**

3 **4**

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่แยกจากเหง้าว่านเปรี้ยว ได้แก่ 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**1**), 5-hydroxy-7-methoxyflavone (**2**) และ สารผสมระหว่าง β-sitosterol (**3**) และ stigmasterol (**4**)

การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระภายนอกเซลล์ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด hexane และ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ไม่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้ อย่างไรก็ตาม Sudsai et al. (2013) พบว่าส่วนสกัด hexane จากเหง้าว่านเปรี้ยวมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โดยอาจเกิดผ่านกลไกยับยั้งการกระตุ้นเอนไซม์ catalase และ glutathione peroxidase เป็นต้น ดังนั้นสารบริสุทธิ์ที่แยกจากส่วนสกัด hexane อาจมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระผ่านกลไกภายในเซลล์ ซึ่งจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

สารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้าว่านเปรี้ยวพบว่ามีฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ดี เมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน indomethacin พบว่าสาร **1** และ **2** มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p< 0.05$ จากผลการศึกษาที่ได้สาร **1** และ **2** อาจยับยั้งเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ทำให้เกิดกระบวนการสร้าง NO และ PGE_2 ที่เป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการอักเสบภายในเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ (Salvemini et al., 1993)

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ แสดงให้เห็นว่าว่านเปรี้ยวเป็นพืชสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการอักเสบที่ดี โดยมีสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง NO ซึ่งอาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ iNOS อย่างไรก็ตาม การศึกษาการยับยั้ง PGE_2 และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ iNOS และ COX-2 ในระดับโมเลกุล เพื่อยืนยันกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญในการต้านการอักเสบยังคงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาสารสกัดหรือสารสำคัญจากว่านเปรี้ยวเป็นยาต้านการอักเสบในอนาคต

6. บทสรุป

จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด hexane จากเหง้าว่านเปรี้ยวเป็นแหล่งใหม่ของสารกลุ่ม flavonoids และ sterol ซึ่งไม่มีการรายงานมาก่อน มากกว่านั้นพบว่าสาร 5-hydroxy-3,7-dimethoxy-flavone (**1**), 5-hydroxy-7-methoxyflavone (**2**) และสารผสมระหว่าง β-sitosterol (**3**) และ stigmasterol (**4**) มีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบที่ดี ดังนั้นข้อมูลต้านการอักเสบของว่านเปรี้ยวจากการศึกษานี้สนับสนุนการใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบตามการใช้แบบพื้นบ้าน

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุภิญญา ติ๋วตระกูล ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ ที่อนุเคราะห์สารสกัดเหง้าว่านเปรี้ยว ขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

8. เอกสารอ้างอิง

Aktan, F. (2004). iNOS-mediated Nitric Oxide Production and Its Regulation. *Life Sciences*, 75, 639-653.

Chaturvedula, V.S.P. and Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β-Sitosterol from the Dichloromethane Extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9), 239-242.

Guzik, T.J., Korbut, R. and Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric Oxide and Superoxide in Inflammation and Immune Regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 469-487.

Huang, W.H., Lee, A.R. and Yang, C.H. (2006). Antioxidative and Anti-inflammatory Activities of Polyhydroxy Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 70, 2371-2380.

Libby, P. (2007). Inflammatory Mechanisms: the Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*, 65(12), 140-146.

Mood, J.D., Prince, L.M., Veldkamp, J.F. and Dey, S. (2013). The History and Identity of *Boesenbergia longiflora* (Zingiberaceae) and Descriptions of Five Related New Taxa. *The Gardens bulletin, Singapore*, 65(1), 47-95.

Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J., Seibert, K., Currie, M.G. and Needleman, P. (1993). Nitric Oxide Activates Cyclooxygenase Enzymes. *National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7240-7244.

Subhasree, B., Baskar, R., Keerthana, R.L., Susan, R.L. and Rajasekaran, P. (2009). Evaluation of Antioxidant Potential in Selected Green Leafy Vegetables. *Food Chemistry*, 115, 1213-1220.

Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Nakpheng, T. and Tewtrakul, S. (2013). Evaluation of the Wound Healing Property of *Boesenbergia longiflora* Rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 223-231.

Sudsai, T., Prabpai, S., Kongsaeree, P., Wattanapiromsakul, C. and Tewtrakul, S.

(2014). Anti-inflammatory Activity of Compounds from *Boesenbergia longiflora* Rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology*, 154, 453-461.

Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C. and Jay, M. (2007). Simultaneous Identification and Quantitation of 11 Flavonoid Constituents in *Kaempferia parviflora* by Gaschromatography. *Journal of Chromatography A*, 1143, 227-233.

Van der Vliet, A., Eiserich, J.P. and Cross, C.E. (2000). Nitric Oxide a Proinflammatory Mediator in Lung Disease. *Respiratory Research*, 1, 67-72.

Zedler, S. and Faist, E. (2006). The Impact of Endogenous Triggers on Trauma-associated Inflammation. *Current Opinion in Critical Care*, 12, 595-60.

มหาวิทยาลัยรังสิต