

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของแก่นจันทน์แดง

Study on Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of

Dracaena Loureiri Gagnep Stem Woods

ภรภัทร นิติวุฒิเดชา^{1*} และ ธีรทัศน์ สุดสาย²

Phonphat Nitiwuttidecha^{1*} and Teeratad Sudsai²

¹นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

²อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต
ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

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

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

*Corresponding author, E mail: pphonphat@gmail.com

บทคัดย่อ

แก่นจันทน์แดง (*Dracaena loureiri* Gagnep) ถูกใช้เป็นส่วนผสมในตำรับยาสามัญประจำบ้าน และยาแผนโบราณหลายตำรับเพื่อขับพิษและลดไข้ วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของสารสกัดแก่นจันทน์แดง โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบในหลอดทดลอง โดยนำสารสกัดแก่นจันทน์แดงด้วยเอทานอลมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) และทดสอบการยับยั้งไนตริกออกไซด์ (NO) ในเซลล์ RAW 264.7 ตามลำดับ พบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด และมีฤทธิ์ยับยั้ง NO มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.0 และ 24.6 µg/ml ตามลำดับ เมื่อนำส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมาทำการแยกสารเพื่อหาสารออกฤทธิ์ ได้สารบริสุทธิ์ คือ resveratrol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.3 µg/ml และยังพบว่าสาร resveratrol มีฤทธิ์ยับยั้ง (NO) ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.1 µg/ml จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า resveratrol ที่แยกได้จากแก่นจันทน์แดงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ ซึ่งสนับสนุนการให้ยาที่มีส่วนผสมของแก่นจันทน์แดงเป็นยารักษาโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระและการอักเสบ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: จันทน์แดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ไนตริกออกไซด์

Abstract

The stem woods of *Dracaena loureiri* Gagnep has been used as ingredient in various household remedies and Thai traditional medicine for detoxification and treatment of thirsty fever. The objectives of this study were to prepare antioxidant-rich fractions from stem wood extracts and evaluate their antioxidant and anti-inflammatory activities using various *in vitro* models. Antioxidant-rich fractions were extracted from ethanolic extract of *D. loureiri* by liquid-liquid extraction using hexane, dichloromethane, ethyl acetate and water, respectively. The extracts and its fractions were screened for their potential as antioxidant and anti-inflammatory activities by 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) assay and nitric oxide inhibitory activity using RAW 264.7 cell model, respectively. The ethyl acetate fraction showed highest antioxidant and nitric oxide inhibitory activity with IC₅₀ value of 15.0 and 24.6 µg/ml, respectively. The ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity among all of the fractions and it was selected for isolation due to its active compounds. Isolation of the ethyl acetate fraction of *D. loureiri* resulted in one compound, which was elucidated as resveratrol. Resveratrol showed antioxidant activity with IC₅₀ value of 6.3 µg/ml and it also exhibited the inhibitory activity against nitric oxide release with IC₅₀ value of 15.1 µg/ml. This study demonstrated that resveratrol found in *D. loureiri* are responsible for antioxidant and anti-inflammatory activity. The present study supports the traditional use of *D. loureiri* for treatment of fever which is related to the antioxidant and anti-inflammatory potential.

Keywords: *Dracaena loureiri*, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Nitric oxide

1. บทนำ

จันทน์แดง (*Dracaena loureiri* Gagnep.) พบมีการใช้มานาน อีกทั้งยังพบเป็นตัวยาในตำรับยาสมุนไพรอีกหลายตำรับ เช่น ยาจันทน์ลีลา ยาประสะจันทน์แดง ยาประสะเปราะใหญ่ ยามหานิลแห่งทองสำหรับแก้ไข้ และยาบำรุงโลหิต เป็นต้น (คณะอนุกรรมการพัฒนายาสมุนไพรแห่งชาติ, 2555)

จากรายงานการศึกษาปัจจุบันพบว่าจันทน์แดงยังมีฤทธิ์ ด้านมะเร็ง ด้านเชื้อรา ด้านเชื้อ HIV ด้านการอักเสบและลดไข้ (Reanmongkol et al., 2003; Bunluepuech and Tewtrakul, 2009) อย่างไรก็ตาม การทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการบวมที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคาร์จีแนน (Reanmongkol et al., 2003) แต่พบว่าสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยก

ได้จากแก่นจันทน์แดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์และการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ prostaglandin (กนกกรณ์ สวัสดิ์, 2544)

Nitric oxide (NO) จัดเป็นสารสื่อกลางการอักเสบที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ถูกสร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) จัดเป็น inducible enzyme ถูกชักนำให้สร้างขึ้นเป็นปริมาณมากจากสาร pro-inflammatory cytokine และ endotoxin NO มีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดขยายตัว เพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดการบวมในบริเวณที่มีการอักเสบ (Alderton et al., 2001) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ NO นับเป็นแนวทางสำคัญในการควบคุม

และบรรเทาอาการอักเสบ การใช้ยาหรือสารเคมีเพื่อยับยั้งการอักเสบแผนปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นยา กลุ่ม NSAIDs และ steroids ที่มีฤทธิ์ข้างเคียงและผลไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งราคายังค่อนข้างสูง

จากข้อมูลดังกล่าว จึงสนใจนำแก่นจันทน์มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO และต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการนำสารสกัดแก่นจันทน์แดงมาใช้เป็นส่วนผสมในการพัฒนาผลิตภัณฑ์แก้ปวด ต้านการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแก่นจันทน์แดง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นจันทน์แดง

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมสมุนไพรและการสกัดสารจากแก่นจันทน์แดง

แก่นจันทน์แดง ชื่อจากร้านเจริญสุข โฮสเทล อำเภอเมืองจังหวัดนครปฐม ตรวจสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นโดยการสังเกตลักษณะของขนาด รูปร่าง สี ร่องรอยบนพืช กลิ่น และรส ทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง นำมาบดหยาบ จากนั้น นำผงแก่นจันทน์แดง 400 g มาทำการสกัดแบบต่อเนื่องด้วย ethanol โดยวิธี reflux นำสารละลายที่ได้ไปทำการกรองเอาเศษสมุนไพรที่ติดออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นแยกตัวทำละลายออกโดยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัด แล้วจึงนำสารที่ได้มาสกัดแยกสารต่อด้วยวิธี liquid-liquid

extraction โดยใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water ตามลำดับ

3.2 การสกัดและการแยกองค์ประกอบทางเคมี

การสกัดแยกสารจากแก่นจันทน์แดงสกัดด้วย ethanol โดยวิธี liquid-liquid extraction ใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water จะได้สารสกัดส่วน hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water ตามลำดับ เก็บสารสกัดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดแก่นจันทน์แดงตลอดการศึกษาใช้เทคนิค bioassay guided isolation โดยใช้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นหลัก

3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

อนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm เมื่อ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง โดยทำการเจือจางตัวอย่างเป็น 7 ความเข้มข้น ได้แก่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 µg/ml โดยวิธี two-fold dilutions ใน 96-well plate ให้ได้ปริมาตรสารตัวอย่าง 100 µl เติมน้ำละลาย DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} M ปริมาณ 100 µl ลงใน well plate ที่ทำการทดลอง บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจวัดการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader โดยในการศึกษาใช้ butylated hydroxytoluene และ quercetin เป็นสารมาตรฐาน (Subhasree et al., 2009) การคำนวณ % การยับยั้งต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีดังนี้

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

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

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

สร้างกราฟระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 ครั้ง

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยวิธีการยับยั้งการหลั่ง NO โดยเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin ใน 96-well plates (เซลล์มีความเข้มข้น 1×10^5 cell/well) โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายเก่าออก เติม RPMI-1640 ที่มี lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml ลงไปหลุมละ 100 μ l จากนั้นเติมสารตัวอย่าง จำนวน 100 μ l นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การผลิต NO โดยเซลล์ RAW 264.7 แปรผันตรงกับเข้มข้นของไนไตรท์ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอก เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ของออกซิเดชัน NO ที่มีความเสถียรในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นหลังจาก 24 ชั่วโมง ดูด supernatant แต่ละหลุมมา 100 μ l ใส่ใน 96-well plates เติม Griess reagent หลุมละ 100 μ l วัดค่าดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ 570 nm การทดสอบใช้ L-nitro-arginine (L-NA: nitric oxide synthase inhibitor), indomthacin (non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs)) และ caffeic acid phenethyl ester (CAPE;

NFkB inhibitor) เป็นสารมาตรฐาน (Sudsai et al., 2013)

การคำนวณร้อยละการยับยั้งการหลั่ง NO ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B) / (A-C)] \times 100$$

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

สร้างกราฟระหว่าง % Inhibition และความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง NO ที่ 50% (IC_{50}) โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 ครั้ง

3.3.3 การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์

การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยใช้ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอ็นไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตของเซลล์ การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 well plate (1×10^5 cell/well) ในอาหาร RPMI-1640 และสารตัวอย่างแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และละลายผลึก formazan ด้วย DMSO จำนวน 100 μ l และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดย microplate reader (Sudsai et al., 2013) โดยแต่ละการทดลองทำซ้ำ 4 ครั้ง จากนั้นคำนวณความมีชีวิตของเซลล์ดังสมการ

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = (A/B) \times 100$$

โดยที่

$$A = \text{absorbance}_{\text{sample}}$$

$$B = \text{absorbance}_{\text{control}}$$

โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Sudsai et al., 2013)

3.4 สถิติและการแปลผล

ข้อมูลในการศึกษานำเสนอในค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Microsoft Excel, one-way analysis of variance (ANOVA) ร่วมกับ Dunnett's test โดยค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

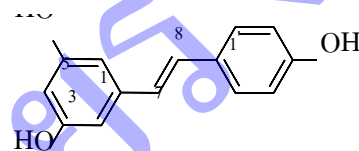
4. ผลการวิจัย

4.1 ผลการสกัดแยกสารออกฤทธิ์จากแก่นจันทน์แดง

จากการสกัดแก่นจันทน์แดงด้วย ethanol ได้สารสกัดน้ำหนัก 114.3 g คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบเท่ากับ 28.6 และเมื่อนำสารสกัด ethanol ปริมาณ 52 g มาทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water มีค่าร้อยละของน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบที่แยกจากสารสกัด ethanol ของแก่นจันทน์แดง เท่ากับ 7.1, 25.0, 36.9 และ 30.2 ตามลำดับ

ผลการแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นหลัก พบว่า ส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ IC_{50} เท่ากับ $15.0 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ และมีน้ำหนักสารสกัดสูงสุด จึงมีความเหมาะสมเบื้องต้นในการแยกหาสารออกฤทธิ์ จากการแยกส่วนสกัด ethyl acetate จำนวน 16.64 g ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดจำนวน 6 fraction ได้แก่

ส่วนสกัดย่อย ethyl acetate 1-6 ในการศึกษาครั้งนี้เลือกส่วนสกัดย่อย ethyl acetate 3 ($IC_{50} = 30.6 \mu\text{g/ml}$) มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อจนได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด ชื่อ DL1 น้ำหนักเท่ากับ 13.9 mg จากการศึกษาโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค $^1\text{H NMR}$ และเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาของ Chi et al. (2014) พบว่าสารบริสุทธิ์มีชื่อว่า resveratrol และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดง โครงสร้าง resveratrol ที่แยกจากแก่นจันทน์แดง

4.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดด้วย ethanol มีค่า IC_{50} เท่ากับ $49.3 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ และส่วนของสารสกัดที่แยกจากสารสกัดด้วย ethanol ของแก่นจันทน์แดงพบว่าส่วนสกัด hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water มีค่า IC_{50} เท่ากับ >100 , 54.4 ± 0.6 , 15.0 ± 0.9 และ $26.7 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นำส่วนสกัด ethyl acetate มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อย ethyl acetate 1-6 โดยนำ ethyl acetate 3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ คือ resveratrol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} เท่ากับ $6.3 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งมีฤทธิ์ที่ดีกว่า BHT ($22.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$) แต่ น้อยกว่า quercetin ($1.4 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการยับยั้ง NO ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากแก่นจันทน์แดง

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งได้ที่ 50% (IC ₅₀ ; n = 4)	ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (n = 4)	
ตัวอย่างทดสอบ	DPPH assay (µg/ml)	NO assay (µg/ml)	
		MTT assay (µg/ml)	
สารสกัดแก่นจันทน์แดงด้วย ethanol	49.3 ± 0.7	39.0 ± 1.6	>100
ส่วนสกัด hexane	>100	44.7 ± 0.8	>100
ส่วนสกัด dichloromethane	54.4 ± 0.6	27.6 ± 2.0**	≥100
ส่วนสกัด ethyl acetate	15.0 ± 0.9*	24.6 ± 1.1**	>100
ส่วนสกัด water	26.7 ± 1.1	95.7 ± 2.1	>100
Resveratrol (DL1)	6.3 ± 1.1*	15.1 ± 0.8**	100
BHT	22.6 ± 0.8	-	-
Quercetin	1.4 ± 0.4*	-	-
CAPE	-	2.0 ± 1.7**	≥100
L-NA	-	32.6 ± 1.8	>100
Indomethacin	-	33.8 ± 3.2	>100

=ไม่ได้ทำการทดสอบ, * = มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80%

* = ค่า IC₅₀ ของสารตัวอย่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

** = ค่า IC₅₀ ของสารตัวอย่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin

4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของแก่นจันทน์แดง

ผลการทดสอบการยับยั้งการผลิต NO ของสารสกัดจันทน์แดงด้วย ethanol มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 39.0 ± 1.6 µg/ml และส่วนสกัดที่แยกจากสารสกัด ethanol ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 44.7 ± 0.8, 27.6 ± 2.0, 24.6 ± 1.1 และ 95.7 ± 2.1 µg/ml ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวจึงนำส่วนสกัด ethyl acetate ของแก่นจันทน์แดงมาสกัดแยกและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ของส่วนสกัดย่อย ethyl acetate 3 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 7.8 µg/ml และพบว่า resveratrol ที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้ง NO มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.1 ± 0.8 µg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-NA, indomethacin และ CAPE ซึ่งมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 32.6 ± 1.8, 33.8 ± 3.2 และ 2.0 ± 1.7 µg/ml ตามลำดับ โดย resveratrol มีฤทธิ์ดีกว่า L-NA และ indomethacin

4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่าส่วนสกัด ethyl acetate ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ 100 µg/ml ในขณะที่ resveratrol แสดงความเป็นพิษ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

5. การอภิปรายผล

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในครั้งนี้ เลือกรทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) ด้วยวิธี DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร

ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนของสารสกัดที่แยกจากสารสกัดด้วย ethanol ของแก่นจันทน์แดงพบว่าส่วนสกัด hexane,

dichloromethane, ethyl acetate และ water มีค่า IC_{50} เท่ากับ >100 , 54.4 ± 0.6 , 15.0 ± 0.9 และ 26.7 ± 1.1 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งให้เห็นว่าส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด เมื่อนำมาแยกต่อยวเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนสกัดย่อย ethyl acetate 3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.6 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นนำมาทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อยววิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ คือ resveratrol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า BHT แต่น้อยกว่า quercetin เนื่องจาก resveratrol จัดอยู่ในกลุ่ม stilbenes ซึ่งโครงสร้างแตกต่างจาก quercetin ซึ่งเป็น flavonoid ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง อย่างไรก็ตาม สารทั้งสองชนิดจัดเป็นสารประกอบกลุ่ม polyphenol เมื่อให้อิเล็กตรอนในโครงสร้างแก่อนุมูลอิสระ เกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้างของสาร delocalization ทำให้โครงสร้างเสถียร ไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป

การทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบโดยอาศัย LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียกระตุ้นให้เซลล์ RAW 264.7 มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่าง ๆ รวมทั้ง NO โดย LPS จะกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีการแสดงออก โดยเฉพาะ iNOS gene ส่งผลให้มีการผลิต NO เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายเนื้อเยื่อปกติบริเวณใกล้เคียง พบว่า resveratrol มีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้สอดคล้องกับการศึกษาสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นจันทน์แดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในขบวนการสังเคราะห์และการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ prostaglandin (กน ก ภรณ์ สวัสดิ์, 2544) ซึ่งสาร resveratrol ที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้ง NO ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน L-NA และ indomethacin นอกจากนี้ การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้

100 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าส่วนสกัด ethyl acetate ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ resveratrol แสดงความเป็นพิษ ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ จากข้อมูลนี้ จึงชี้ให้เห็นถึงข้อควรระวังในการรับประทานแก่นจันทน์แดงในปริมาณมาก

6. บทสรุป

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของแก่นจันทน์แดง พบว่าส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ โดยมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ resveratrol ดังนั้นส่วนสกัด ethyl acetate จึงมีศักยภาพในการใช้เป็นส่วนผสมเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ โดยใช้ resveratrol เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพได้ อย่างไรก็ตามควรศึกษาหาสารสำคัญจากแก่นจันทน์แดงชนิดอื่นเพื่อใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมคุณภาพแก่นจันทน์แดงต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่สำหรับการทำวิจัย

8. เอกสารอ้างอิง

- กน ก ภรณ์ สวัสดิ์. (2544). สารยับยั้งไซโคลออกซิเจนเนส-2 จากแก่นจันทน์แดง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. คณะเภสัชศาสตร์ (เภสัชเวช) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คณะอนุกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ. (2555). คู่มือการใช้ยาจากสมุนไพรในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2555. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์
การเกษตรแห่งประเทศไทย.

Songklanakarin Journal of Science and
Technology. 35: 317-323.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G.
(2001). Nitric oxide synthases: structure,
function and inhibition. *Biochem Journal*.
57: 593-615.

Bunluepuech, K. and Tewtrakul, S. (2009). Anti-HIV-
1 integrase activity of Thai medicinal plants.
*Songklanakarin Journal of Science and
Technology* 31: 289-292.

Chi, X., Xing, Y., Xiao, Y., Dong, Q. and Hu, F.
(2014). Separation and purification of three
stilbenes from the radix of *Polygonum
cillinerve* (Nakai) by maroporous resin
column chromatography combined with
high-speed current chromatography.
Quimica Nova 37: 465-468

Reanmongkol, W., Subhadhirasakul, S., Bouking, P.
(2003). Antinociceptive and antipyretic
activities of extracts and fractions from
Dracaena loureiri in experimental animals.
*Songklanakarin Journal of Science and
Technology*. 25: 467-476.

Subhasree, B., Baskar, R., Keerthana, R. L., Susan, R.
L., Rajasekaran, P. (2009). Evaluation of
antioxidant potential in selected green leafy
vegetables. *Food Chemistry*. 115: 1213-
1220.

Sudsai, T., Wattanapiromsakul, C., Tewtrakul, S.
(2013). Inhibition of nitric oxide production
by compounds from *Boesenbergia longiflora*
using lipopolysaccharide-stimulated
RAW 264.7 macrophage cells.