ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาด

Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Isolated Flavonoids from *Blumea balsamifera* Leaves

ปรวุฒิ เมืองอู่[1*] นันทพงศ์ ขำทอง[2] และธีรทัศน์ สุดสาย[2]

Porawut Muang-ou[1*] Nanthaphong Khamthong[2] and Teeratad Sudsai[2]

[1*]*นักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกมหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[2]*อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิตถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

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

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

[*]*Corresponding author, E mail: stoneheng300@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ใบหนาด (*Blumea balsamifera* (L.) DC) ในทางการแพทย์แผนไทยใช้เป็นพืชสมุนไพรในการรักษาโรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน โรคเหน็บชา โรคไขข้อ และอาการปวดเอว ซึ่งในงานวิจัยใบหนาดถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบเพื่อสนับสนุนการใช้ดังกล่าว โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบหนาด จากการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และการยับยั้ง nitric oxide (NO) จากการศึกษาพบว่าส่วนสกัด ethyl acetate ของใบหนาดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่ดีโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.6 และ 21.6 µg/ml ตามลำดับ เมื่อแยกสารจากส่วนสกัด ethyl acetate ได้สารบริสุทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ 5 สาร ได้แก่ ombuin (**1**), dihydroquercetin-4′-methylether (**2**), rhamnetin (**3**), luteolin (**4**) และ 5,7,3′,5′-tetrahydroxyflavanone (**5**) โดยพบว่าสาร **4** ที่แยกได้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีที่สุด (IC_{50} = 10.74 µM) ตามด้วยสาร **3** (IC_{50}=13.59 µM), **5** (IC_{50}= 34.99 µM), **1** (IC_{50}= 44.32 µM) และ **2** (IC_{50}=48.09 µM) ตามลำดับ จากข้อมูลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด ethyl acetate และสารบริสุทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาดมีคุณสมบัติต้านการอักเสบโดยยับยั้ง NO และอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: *ใบหนาด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฟลาโวนอยด์*

Abstract

The leaves of *Blumea balsamifera* (L.) DC that have been traditionally used for treatment of inflammatory related diseases were carried out to investigate for antioxidant and anti-inflammatory activities in order to support the traditional use. The inhibitory activity of extract and compounds isolated from *B. balsamifera* against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and nitric oxide (NO) was evaluated. The present study has demonstrated that the ethyl acetate fraction of *B. balsamifera* possesses potent antioxidant and anti-inflammatory activities with IC_{50} of 5.6 and 21.6 µg/ml, respectively. Extraction of the ethyl acetate fraction of *B. balsamifera* has isolated five known flavonoids, which were identified as (**1**) ombuin, (**2**) dihydroquercetin-4′-methylether, (**3**) rhamnetin, (**4**)luteolin and (**5**) 5,7,3′,5′-tetrahydroxyflavanone. Compound **4** exhibited the highest inhibitory activity against NO release with an (IC_{50} value of 10.74 µM), followed by **3** (IC_{50} = 13.59 µM), **5** (IC_{50} = 34.99 µM), **1** (IC_{50} = 44.32 µM) and **2** (IC_{50} = 48.09 µM) respectively. This study demonstrated that the ethyl acetate fraction and its isolated flavonoids exert potential anti-inflammatory property through NO inhibition and antioxidant effect.

Keywords:*Blumeabalsamifera, Anti-inflammatory activity, Anti-oxidant activity, Flavonoids*

---

1. บทนำ

หนาด หรือหนาดใหญ่ (*Blumea balsamifera* (L.) DC) เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น จีน มาเลเซีย ไทย เวียดนาม และ ฟิลิปปินส์ ใบหนาดมีสรรพคุณเป็นยาห้ามเลือด ยาบำรุงหลังคลอด รักษาโรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน โรคเหน็บชา โรคไขข้อ ขับลม แก้จุกเสียดแน่นเฟ้อ เป็นต้น อีกทั้งใบหนาดยังเป็นส่วนประกอบในตำรับยาจีน ซึ่งปรากฏในใบสั่งยาของจีนมาหลายศตวรรษ (Pang et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของใบหนาดมากมายเช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ช่วยเกิดการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด ฤทธิ์ยับยั้งปรสิตในเลือด และฤทธิ์ช่วยสมานแผล มากกว่านั้นจากการศึกษารายงานวิจัยเบื้องต้นพบว่าสารสำคัญกลุ่ม เซสควิเทอร์ปีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ที่พบในใบของหนาดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี (Chen et al., 2010) ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่แยกได้จากใบหนาดที่ปลูกในประเทศไทย เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบหนาดสำหรับเตรียมผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในอนาคต

Nitric oxide (NO) มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ สร้างโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ เช่น แมคโครฟาจ นิวโทรฟิล และเซลล์อื่น ๆ เพื่อกำจัดจุลชีพและสิ่งแปลกปลอมในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ NO มีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด เพิ่มการซึมผ่านของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดอาการบวมในบริเวณอักเสบ อย่างไรก็ตาม เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสามารถผลิตทั้ง NO และอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (super oxide radical) ในกระบวนการอักเสบ ภายใต้ภาวะนี้ NO และ super oxide radical อาจทำปฏิกิริยาร่วมกันเกิด peroxynitrite ($ONOO^-$) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารออกซิไดซ์ที่รุนแรงและสามารถออกซิไดซ์กลูตาไทโอนได้โดยตรง จะนำมาสู่ปฏิกิริยา nitrosylation ซึ่งสามารถ

เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและยับยั้งการทำงานปกติภายในเซลล์ (Korhonen et al., 2005; Mandade et al., 2011) การผลิต NO ที่มากเกินพอเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคได้หลายชนิด เช่น โรคทางเดินอาหารอักเสบ (inflammatory bowel disease) โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคหัวใจและหลอดเลือด (cadiovascular diseases) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (septic shock) โรคเบาหวาน (diabetis) โรคมะเร็ง (cancer) และโรคอักเสบต่าง ๆ (Tewtrakul et al., 2009; Min et. al. 2009) ซึ่งการคิดค้นหาสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่มีผลยับยั้ง NO ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจสารกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ที่แยกได้จากใบหนาดที่ปลูกในประเทศไทยในการยับยั้ง NO และอนุมูลอิสระ เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัด และเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบจากใบหนาด

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบของสารสกัดจากใบหนาด
2. เพื่อแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบจากใบหนาด

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1การเตรียมสารสกัดจากใบหนาด

ใบหนาดที่ใช้ในการศึกษา เก็บจากสวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2556 นำใบสดมาล้างทำความสะอาดและนำไปอบที่อุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง จนกระทั่งแห้งสนิท นำใบแห้ง (1.0 kg) มาบดเป็นผงหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้า นำผงใบหนาดมาสกัดด้วย ethanol ปริมาณ 3 l ด้วยวิธีสกัดแบบต่อเนื่องโดยการ reflux เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สกัดซ้ำ 4 ครั้ง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 รวมสารสกัดทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบสุญญากาศ หลังจากได้สารสกัดหยาบเก็บในภาชนะปิดสนิทที่ 4 °C สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

3.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากใบหนาด

นำสารสกัดหยาดด้วย ethanol มาทำการสกัดแยกส่วนด้วยการสกัดแยกส่วนแบบ liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายดังนี้ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water ได้สารส่วนสกัด hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ water ตามลำดับ การแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาดตลอดการศึกษาใช้เทคนิค bioassay-guided isolation โดยใช้ฤทธิ์การยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW264.7 เป็นหลัก จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ จึงนำส่วนสกัดหยาบที่ได้ไปแยกสาร กลุ่มฟลาโวนอยด์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีได้แก่ silica gel column chromatography และ thin layer chromatography และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้เทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR)ได้แก่ ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR

3.3การประเมินผลทางชีวภาพ

3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay ดัดแปลงจากวิธีการการศึกษาของ

Subhasree et al. (2009)โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดและสารบริสุทธิ์ 10 mg/ml และ 10 µM ตามลำดับใน absolute ethanol หลังจากนั้นทำการเจือจางเป็น 7 ความเข้มข้นได้แก่ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.12 µg/ml หรือ µM โดยวิธี two-fold dilutions หลังจากนั้นเติมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาณ 100 µl ลงในแต่ละ well แล้วเติม 6×10^{-5} M DPPH ใน absolute ethanol ลงไป 100 µl แล้วบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ตรวจวัดการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย microplate reader ในการศึกษาใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) และ quercetin เป็นสารมาตรฐาน

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

$$A_{ctr} = \text{control - control blank}$$

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

สร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ที่ 50% (IC_{50}; n = 4)

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการยับยั้งการหลั่ง NO ในเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำด้วย lipopolysacharide (LPS) ใช้วิธีการที่รายงานโดย Sudsai et al. (2013) เตรียมตัวอย่างสารสกัดและสารบริสุทธิ์ 10 mg/ml และ 10 µM ตามลำดับ ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) มาทดสอบในเซลล์ RAW264.7 โดยเลี้ยงเซลล์ใน 96 well plate ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal calf serum, 1% penicillin-streptomycin โดยบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้าง cell ด้วย PBS solution เติม อาหาร RPMI-1640 ที่ มี lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ ml ปริมาตร100 µl ลงในแต่ละ well เติมตัวอย่างลงไปปริมาตร 100 µl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3, 10, 30 และ 100 µg/ml สำหรับสารสกัด และ 3, 10, 30 และ 100 µM สำหรับสารบริสุทธิ์และสารมาตรฐาน ในการศึกษาใช้ L-nitro-arginine (L-NA; NO synthase inhibitor) , caffeic acid phenethyl ester (CAPE; nuclear factor kappa B (NF-κB) inhibitor) และ indomethacin (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) เป็นสารมาตรฐาน แล้วบ่มเซลล์ใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณ NO ที่เซลล์สร้างขึ้นในอาหาร RPMI-1640 โดยดูดอาหารในชุดที่ทำการศึกษาปริมาณ 100 µl ทำปฏิกิริยากับ Griess reagent ปริมาณ 100 µl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งดังสมการ

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

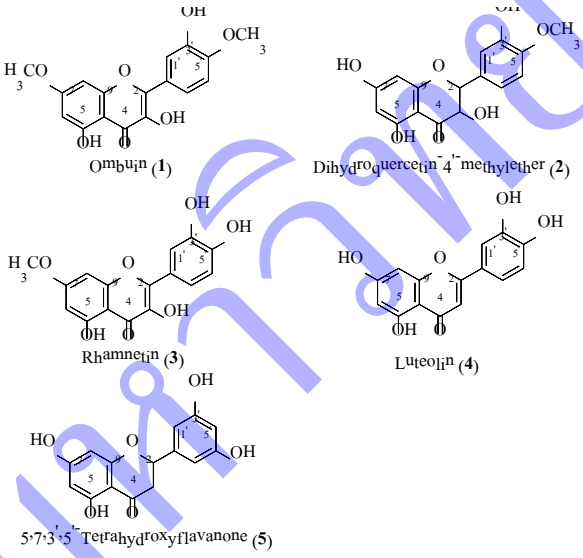
A-C: Nitrite concentration; A: LPS (+), sample (-);
B: LPS (+), sample (+); C: LPS (-), sample (-)

สร้างกราฟระหว่างร้อยละการยับยั้งและความเข้มข้นของตัวอย่างเพื่อหาค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้ง NO ได้ที่ 50% (IC_{50} ; n = 4)

3.3.3 Cytotoxicity test

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ด้วยวิธี 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) assay โดย

หลักการการศึกษาจะอาศัยเอนไซม์ภายใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิตรีดิวส์ MTT ที่เป็นสารสีเหลืองเป็นผลึก formazan สีม่วง หลังจากทำการทดสอบสารตัวอย่างกับเซลล์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3, 10, 30 และ 100 µg/ml สำหรับสารสกัด และ 3, 10, 30 และ 100 µM สำหรับสารบริสุทธิ์และสารมาตรฐานใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (10 µl, 5 mg/ml) ลงไปในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่ 37 °C ดูดสารละลายทิ้งไปแล้วเติม DMSO 100 µl เพื่อละลายผลึก แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader โดยสารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80% เมื่อเทียบกับกลุ่ม control (n = 4) (Sudsai et al., 2013)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกจากใบหนาด

4. ผลการวิจัย

4.1 การสกัดและการแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาด

การสกัดใบหนาดด้วยตัวทำละลาย ethanol ได้สารสกัดหยาบน้ำหนัก 167.2 g คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบเท่ากับ 16.72 และเมื่อนำสารสกัดหยาบใบหนาดปริมาณ 78.45 g มาทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย hexane, dichloromethane, ethyl acetate, และ water มีค่าร้อยละของน้ำหนักของส่วนสกัด เท่ากับ 28.3, 15.9, 8.9 และ 42.8 ตามลำดับ โดยพบว่าส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบที่ดีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.6 และ 21.6 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นำสารสกัดดังกล่าวมาแยกหาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ต่อไป

นำส่วนสกัด ethyl acetate (8.2 g) มาแยกสารบริสุทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค silica gel column chromatography มี silica gel $^{60}F_{254}$ เป็นเฟสคงที่ และมีตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แก่ dichloromethane (100%), dichloromethane: ethyl acetate (80:20, 50:50, 20:80%), ethyl acetate (100%), ethyl acetate: methanol (80: 20, 50: 50, 20: 80%) และ methanol (100%) ตามลำดับ จากการแยกสารสกัดดังกล่าวได้ส่วนสกัดย่อยทั้งหมดจำนวน 9 ส่วน (A1- 9) นำส่วนสกัดย่อยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดีจนได้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 5 สาร (ภาพที่ 1)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าสารบริสุทธิ์ทั้ง 5 สารเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีชื่อว่า ombuin (**1**) 0.7 mg, dihydroquercetin-4′-methylether (**2**) 1 mg, rhamnetin (**3**) 2.1 mg, luteolin (**4**) 1 mg และ 5,7,3′,5′-tetrahydroxyflavanone (**5**) 3.8 mg โดยข้อมูล ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ของสาร **1** สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย Swaminathan et al. (2014), สาร **2** สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย Algabr et al., (2015),

สาร **3** และ **4** สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย Saewan et al. (2011) และสาร **5** สอดคล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย Nessa et al. (2004) อย่างไรก็ตามสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากส่วนสกัด ethyl acetate ทั้ง 5 สาร พบว่าเป็นสารที่เคยมีการงานในต้นหนาดมาก่อน

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการยับยั้ง NO ของสารสกัดและกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาด

ตัวอย่างทดสอบ	ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งได้ที่ 50% (IC_{50}; n=4)		ความมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ 50% (LC_{50}; n = 4)
สารสกัดหยาบ	DPPH assay (µg/ml)	NO assay (µg/ml)	MTT assay (µg/ml)
สารสกัดหยาบใบหนาดด้วย ethanol	45.8 ± 1.5	29.7 ± 0.3	>100
ส่วนสกัดด้วย hexane	>100	39.0 ± 1.4	>100
ส่วนสกัดด้วย dichloromethane	24.7 ± 2.1	13.1 ± 0.7	>100
ส่วนสกัดด้วย ethyl acetate	5.6 ± 0.8	21.6 ± 0.2	>100
ส่วนสกัดด้วย water	53.8 ± 1.2	42.7 ± 0.8	>100
สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารมาตรฐาน	DPPH assay (µM)	NO assay (µM)	MTT assay (µM)
Ombuin (**1**)	>100	44.32 ± 2.9	>100
Dihydroquercetin-4′-methylether (**2**)	21.78 ± 1.17*	48.09 ± 0.69	>100
Rhamnetin (**3**)	>100	13.59 ± 2.9**	>100
Luteolin (**4**)	>100	10.74 ± 0.11**	>100
5,7,3′,5′-Tetrahydroxyflavanone (**5**)	>100	34.99 ± 0.80	>100
BHT	61.72 ± 1.38	-	-
Quercetin	4.18 ± 0.06	-	-
CAPE	-	1.87 ± 0.06**	□100
L-NA	-	70.63 ± 0.93	>100
Indomethacin	-	28.94 ± 1.2	>100

-=ไม่ได้ทำการทดสอบ, □ = มีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 80%

*= ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

**= ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ $p< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน indomethacin

4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาด

ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบหนาดด้วย ethanol มีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.8 µg/ml และส่วนสกัด hexane, dichloromethane, ethyl acetate, และ water มีค่า IC_{50} เท่ากับ >100, 24.7, 5.6 และ 53.8 µg/ml ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ในส่วนสกัดนี้ พบว่าสาร **2** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.78 µM ซึ่งมีฤทธิ์น้อยกว่า quercetin (4.18 µM) แต่มีฤทธิ์ที่ดีกว่า BHT (61.72 µM) อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

4.3 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดและสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาด

การยับยั้งการหลั่ง NO ของสารสกัดหยาบใบหนาดด้วย ethanol มีค่า IC_{50} เท่ากับ 29.7 µg/ml และส่วนสกัดที่แยกจากสารสกัด ethanol ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, และ water มีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.0, 13.1, 21.6 และ 42.7 µg/ml ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อแยกส่วนสกัด ethyl acetate ได้สารบริสุทธิ์ **4** ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 10.74 µM ตามด้วย สาร 3, 5, 1 และ 2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.59, 34.99, 44.32 และ 48.09 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน CAPE, L-NA และ indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.87, 70.63 และ 28.94 µM ตามลำดับ พบว่า **3** และ**4** มีฤทธิ์ดีกว่า L-NA และ indomethacin อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$ มากกว่านั้น จากการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นพบว่าส่วนสกัดหยาบ ethyl acetate และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้

5. การอภิปรายผล

การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบหนาดโดยอาศัยฤทธิ์ต้านการอักเสบชี้นำจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าส่วนสกัด ethyl acetate ที่แยกได้จากสารสกัดใบหนาดด้วย ethanol มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (IC_{50} = 21.6 ug/ml) และ ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} = 5.6 ug/ml) ที่ดี ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีศักยภาพสูงเหมาะสมสำหรับการนำมาแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ดังกล่าว จากการแยกสารสำคัญโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง NO โดยไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์คือสาร**4** (IC_{50} = 10.74 uM) สาร **4** มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีกว่าสารมาตรฐาน L-NA (IC_{50} = 70.63 uM) ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ในขั้นตอนสังเคราะห์ NO จาก L-arginine นอกจากนี้สาร **4** มีฤทธิ์ที่ดีกว่า indomethacin (IC_{50} = 28.94 uM) ซึ่งเป็นยาต้านอักเสบกลุ่ม NSAIDs ที่มีกลไกลดการอักเสบโดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase 2 (COX-2) ในการสังเคราะห์ prostaglandin E_2 (PGE_2) นอกจากนี้การศึกษาสามารถแยกสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีจากส่วนสกัด ethyl acetate คือ สาร **2** (IC_{50} = 21.78 uM) จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าสาร **2** มีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT (IC_{50} = 61.72 uM) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Saewan et al., 2011)

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากใบหนาด โดยสาร **2** สามารถต้านอนุมูลอิสระและ สาร **4** สารรถยับยั้ง NO ที่เกิดขึ้นระหว่างการอักเสบ ซึ่งอนุมูลอิสระสามารถกระตุ้นให้เกิดเพิ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหลายชนิด รวมถึง iNOS และ COX-2 ส่งผลให้เพิ่มการสร้างสารสื่อการอักเสบ NO และ PGE_2 ตามลำดับ โดยเกิดผ่านกลไกการกระตุ้น NF-κB ซึ่งเป็น transcription factor ของยีน iNOS และ COX-2 จากรายงานวิจัยของ Li et al. (2012) พบว่าสาร **4** สามารถยับยั้งการอักเสบโดยออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS และ COX-2 และยังสามารถยับยั้ง NF-κB ได้ แสดงให้เห็นว่าสาร **2** และ **4** มีศักยภาพสามารถนำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบหนาดเพื่อผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบต่อไปในอนาคต

6. บทสรุป

สารสกัดและสารบริสุทธิ์กลุ่มฟลาโวนอยด์จากใบหนาดมีคุณสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระและ NO ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดการอักเสบและส่งเสริมการทำลายเนื้อเยื่อในบริเวณที่เกิดการอักเสบเพิ่มขึ้นโดยมี

สาร **2** และ **4** เป็นสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของ iNOS หรือ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ ดังนั้นสาร **2** และ **4** จึงเหมาะสมเป็นสารมาตรฐานสำหรับการพัฒนาสารสกัดจากใบหนาดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์และวิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออกที่อนุเคราะห์อุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ทำการวิจัย

8. เอกสารอ้างอิง

Algabr, M., Hammoud, L., Aissaoui, H., Mekkiou, R., Seghiri, R., Boumaza, O., Benayache, S., and Benayache, F. (2015). Flavonoids from *Pulicaria jaubertii* (Asteraceae) from Yemen. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 6 (6) :1237-1240.

Chen, M., Oin, J.J., Fu, J.J., Liu, X.H., Zhang, W.D., and Jin, H. Z. (2010). Blumeaenes A-J, sesquiterpenoid esters from *Blumea balsamifera* with NO inhibitory activity. Planta Medica. 76:897-902.

Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. Current Drug Targets-Inflammation and Allergy. 4: 471-479.

Li, Y.C., Yeh, C.H., Yang, M.L., and Kuan, Y.H. (2012). Luteolin suppresses inflammatory mediator expression by blocking the Akt/ NFκB pathway in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. . Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine doi: 10. 1155/ 2012/ 383608.

Mandade, R., Sreenivas, S. A., and Choudhury, A. (2011). Radical scavenging and antioxidant activity of *Carthamus tinctorius* extracts. Free Radicals and Antioxidants. 1:87-93.

Min, H.Y., Kim, M.S., Jang, D.S., Park, E. J., Seo, E.K., and Lee, S.K. (2009). Suppression of lipopolysaccharide-stimulated inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by a novel humulene derivative in macrophage cells. International Immunopharmacology. 9:844-849.

Nessa, F., Ismail, Z., and Mohamed, N. (2004). Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. Journal of Food Chemistry. 88:243-252.

Pang, Y., Wang, D.,Fan, X., Yu, F., Hu, X., Wang, K., and Yuan, L. (2014). *Blumea balsamifera*-a phytochemical and pharmacological review. Molecules. 19:9453-9477.

Saewan, N., Koysomboon, S., and Chantrapromma, K. (2011). Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera DC*. Journal of Medicinal Plants Research. 5:1018-1025.

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., and Tewtrakul, S. (2013). Inhibition of nitric oxide production by compounds from *Boesenbergia longiflora* using lipopolysaccharide-stimulated RAW 264. 7 macrophage cells. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 35(3):317-323.

Swaminathan, M., Chee, F.C., Chin, S.P., Buckle, M.J.C., Rahman, N.A., Doughty, S.W., and Chung, L.Y. (2014). Flavonoids with M1 muscarinic acetylcholine receptor binding activity. Molecules. 19(7):338-948.

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., and Cheenpracha, S. (2009). Anti-inflammatory effects of compounds from *Kaempferia parviflora* and *Boesenbergia pandurata*. Food Chemistry. 115:534-538.

มหาวิทยาลัยรังสิต