ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี

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

กล่าวขวัญ ศรีสุข[1*], สาวินีย์ สีมาขันธ์[2], ปริยาภา เกตุกูล[1], พรสุดา กันแก้ว[1], เอกรัฐ ศรีสุข[3], กาญจนา หริ่มเพ็ง[4], เบญจวรรณ ชิวปรีชา[5], และคำรณ เลียดประถม[6]

[1]ภาควิชาชีวเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[2]โปรแกรมวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[3]ภาควิชาเคมี และศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[4]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[5]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[6]สำนักจัดการทรัพยากรป่าไม้ที่ ๙ (ชลบุรี)กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ทำการประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของพืชสมุนไพร 15 ชนิด จากโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี การประเมินฤทธิ์ต้านการอักเสบทำโดยวิเคราะห์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E_2 (prostaglandin E_2) ในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโพพอลิแซกคาไรด์ (lipopolysaccharide) ทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์แมคโครฟาจที่สัมผัสกับส่วนสกัดของพืชโดยวิธี MTT และตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการศึกษาพบว่าส่วนสกัดของพืชสมุนไพรที่ศึกษามีฤทธิ์ต้านอักเสบ ส่วนสกัดใบสาบแร้งสาบกามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบสูงที่สุด โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการต้านอักเสบและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดมีความสัมพันธ์ที่ต่ำ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าใบสาบแร้งสาบกาเป็นแหล่งของสารต้านอักเสบตามธรรมชาติที่ดี

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านอักเสบ, ไนตริกออกไซด์, พรอสตาแกลนดิน E_2, สารประกอบฟีนอล, พืชสมุนไพร

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

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 E_2 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 E_2, Phenolic compounds, Medicinal plants

1. บทนำ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลชีพ และสิ่งที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย อาการที่ปรากฏของการอักเสบ คือ ปวด บวม แดง และร้อน (Mequanint et al., 2011) กระบวนการอักเสบประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้เลือดมาเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังเนื้อเยื่อที่ถูกรุกรานเพิ่มมากขึ้นเพื่อกำจัดสิ่งเร้าที่ทำให้เกิดการอักเสบเหล่านี้ (Kumar et al., 2007) ในขณะที่มีปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบชนิดต่างๆ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และพรอสตาแกลนดิน E_2 (prostaglandins E_2) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นต้น (Van der Vilet, 2000; Jung et al., 2009) เพื่อช่วยในการกำจัดสิ่งรุกราน อย่างไรก็ตามการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้มีการทำลายเนื้อเยื่อ ปัจจุบันพบว่าการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบที่มากเกินไปหรือหลั่งเป็นระยะเวลาต่อเนื่องเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิวิทยาของโรคต่างๆ เช่น โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ภาวะช็อคจากการติดเชื้อ (Septic shock) โรคเบาหวาน และโรคอักเสบต่างๆ (Van der Vilet, 2000; Coleman, 2001; Guzik et al., 2003) การยับยั้งการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ที่มากเกินไปนี้เป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ ในปัจจุบันมีความพยายามในการค้นหาโมเลกุลสารจากธรรมชาติที่สามารถลดการผลิตสารสื่อกลางการอักเสบเหล่านี้ เพื่อนำไปสู่การผลิตยาต้านการอักเสบที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลข้างเคียงที่ต่ำ พืชเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ (Huang et al., 2006) และมีรายงานว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอักเสบจากธรรมชาติ เช่น *Sanguisorba officinalis*, *Lophatherum gracite*, *Scutellaria baicalensis* และ *Crotoxylum 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 ในป่าแห่งนี้มีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ถูกใช้ในตำรายาของหมอยาสมุนไพรพื้นบ้านในแถบจังหวัดจันทบุรี ดังนั้นเพื่อให้มีผลการวิจัยยืนยันคุณค่าของสมุนไพรและส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์พืชสมุนไพรเหล่านี้ จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาข้อมูลการใช้ประโยชน์จากพืช

สมุนไพรที่พบในพื้นที่โครงการป่าชุมชนฯ การวิจัยนี้มุ่งนำพืชสมุนไพรที่ถูกใช้ในการแก้อาการไข้ บวม ฝี และแก้ริดสีดวงทวาร ตามคำให้สัมภาษณ์ของหมอยาพื้นบ้านในท้องถิ่นมาศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบในระดับหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ช่วยสนับสนุนการใช้สมุนไพรเหล่านี้ รวมทั้งทราบแหล่งของสารต้านอักเสบใหม่ที่อาจนำไปพัฒนาเป็นยาต้นแบบรักษาโรคต่างๆ จากการอักเสบต่อไป

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมส่วนสกัดพืชสมุนไพร

สำรวจพืชสมุนไพรขณะเดินป่าในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด (มูลนิธิชัยพัฒนา) จังหวัดจันทบุรีกับหมอสมุนไพรพื้นบ้าน จำนวน 2 ท่าน คือ หมอสมชาย ใจสิทธิ์ และหมอประเทือง นิสัยซื่อ ในช่วงเดือนมิถุนายน และกันยายน 2555 เก็บพืชสมุนไพรจำนวน 15 ชนิด โดยเก็บรักษาตัวอย่างพรรณไม้ไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดย อาจารย์เบญจวรรณ ชิวปรีชา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทำการสกัดส่วนของพืชสมุนไพรโดยนำพืชสมุนไพรที่ใช้ในทดสอบมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกว่าพืชสมุนไพรแต่ละส่วนจะแห้ง จากนั้นนำไปบดเป็นผงให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ในการศึกษานี้ทำการสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอล และน้ำร้อน

การสกัดด้วยน้ำร้อน โดยนำพืชสมุนไพรที่บดละเอียดใส่ในน้ำต้มเดือด ในอัตราส่วน 1:10 แช่นาน 30 นาที จากนั้นกรองส่วนสกัดน้ำด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 และนำกากพืชมาต้มซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ได้ไปทำการระเหยน้ำออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและเครื่องทำแห้งเยือกแข็ง การเตรียมส่วนสกัดเอทานอลของพืชสมุนไพรนำพืชสมุนไพรที่บดละเอียดแช่ใน 95 %เอทานอล ในอัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 5 วัน กรองส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จากนั้นนำส่วนผงพืชสกัดด้วยเอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำส่วนสกัดเอทานอลที่ได้ทั้งหมดมารวมกันและระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Srisook et al., 2012) จดบันทึกน้ำหนักที่ได้ทั้งหมด เก็บส่วนสกัดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้โดนแสง

2.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์

ความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นดัชนีที่บ่งบอกปริมาณการผลิตไนตริกออกไซด์ เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ของการออกซิเดชันไนตริกออกไซด์ที่มีความเสถียร การวิเคราะห์ความเข้มข้นของไนไตรท์โดยปฏิกิริยา Griess นำเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. C. Kim, Inha University College of Medicine, Republic of Korea เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5X10^5$ 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 13,700x*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) หลังจากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) ที่ความเข้มข้น 0-50 ไมโครโมลาร์ และคำนวณ % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารสกัดแต่ละส่วนในพืชแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่สัมผัสกับ LPS เพียงอย่างเดียว ใช้สาร aminoguanidine เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2

เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนสกัด (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาวะที่มีหรือไม่มี LPS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,700g นาน 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณพรอสตาแกลนดิน E_2 โดยชุดตรวจสอบ PGE_2 competitive enzyme immunoassay kit (R&D system, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากการทดสอบลงในไมโครเพลทที่เคลือบก้นหลุมด้วย

goat anti-mouse polyclonal antibody หลังจากนั้นเติม mouse anti-PGE_2 monoclonal antibody ลงในแต่ละหลุม และบ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมพรอสตาแกลนดิน E_2ที่เชื่อมกับเอนไซม์ horseradish peroxidase และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมซับสเตรท (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) เป็นสารที่ถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและเกิดการรีดักชันของ MTT ได้ผลผลิตเป็น formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนความมีชีวิตรอดของเซลล์ การทดสอบความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม ($1.5X10^5$ 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 นาโนเมตร โดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Versamax, Molecuar Devices, สหรัฐอเมริกา) จากนั้นคำนวณความมีชีวิตรอดของเซลล์ดังสมการ % การมีชีวิตรอดของเซลล์ = (ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ทดสอบ / ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมเซลล์ควบคุม) X 100 (Buapool et al., 2013)

2.5 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมทำตามวิธีของ กล่าวขวัญ ศรีสุข และคณะ (2553) และเปรียบเทียบกับกรดแกลลิก โดยเติมสารละลายกรดแกลลิกหรือส่วนสกัดพืชสมุนไพร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย 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 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในรูปมิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยการวิเคราะห์แบบถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพร และส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบ

พืช	วงศ์	ส่วนที่ใช้ทดสอบ	% ของน้ำหนักแห้ง		ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด)	
			ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ	ส่วนสกัดเอทานอล	ส่วนสกัดน้ำ
เข็มป่า (*Ixoralobbii* King & Gamble)	Rubiaceae	ทั้งต้น	7.8	9.7	232.5±4.0	132.9±3.2
โคลงเคลง (*Melastomasaigonense* (Kuntze) Merr)	Melastomataceae	ราก	2.9	12.7	307.8±2.9	72.9±0.8
ชงโคป่า (*Bauhinia* sp.)	Leguminosae-Caesalpinioideae	ใบ	7.9	13.2	95.7 ± 1.4	74.2 ± 1.6
ดีงูต้น (*Helictereshisute*Lour)	Sterculiaceae	ราก	2.3	16.3	106.0 ± 9.8	81.4 ± 1.9
เนระพูสีไทย หรือค้างคาวดำ (*Taccachantrieri* Andr.)	Taccaceae	เหง้า	14.9	23.5	61.9 ± 0.5	33.9 ± 0.6
พนมสวรรค์ (*Clerodendrumpaniculatum* Linn)	Verbenaceae	ราก	2.9	6.3	58.2 ± 0.8	18.7 ± 0.3
พลับพลา หรือไม้ลาย (*Microcostomentosa* Sm.)	Tiliaceae	ใบ	6.0	15.4	221.9 ± 4.9	96.6 ± 1.2
พังแหรใหญ่ (*Tremaorientalis* (L.) Yala)	Ulmaceae	เปลือกลำต้น	11.1	3.5	515.3±14.7	325.7±13.6
ฟันปลา (*Litsea umbellata* Merr)	Lauraceae	ใบ	6.6	7.4	213.5±6.4	206.6±5.7
มะเดื่อหอม (*Ficushirta*Vahl,)	Moraceae	ใบ	6.7	9.7	28.3 ± 1.7	44.6 ± 0.6
ไมยราบ (*Mimosa diplotricha* C. Wright ex Sauvalle)	Mimosaceae	ทั้งต้น	3.5	5.8	24.6 ± 2.8	24.9 ± 0.9
ระย่อมน้อยดอกขาว (*Rauvolfia* sp.)	Apocynaceae	ราก	2.1	15.0	21.4 ± 0.5	4.1 ± 0.2
ราชดัด หรือพญาดาบหัก (*Bruceajavanica* (L.) Merr.)	Siamaroubaceae	ใบ	18.2	29.9	58.5±3.7	77.6±4.4
สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* Linn)	Asteraceae	ใบ	13.9	25.7	65.2±4.2	47.0±1.8
หัวเดียว (*Aglaonemanitidum* (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 %) ยกเว้นส่วนสกัดเปลือกพังแหรใหญ่ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Diaz et al. (2012) ที่รายงานว่าการสกัดพืชสมุนไพรจีนบางชนิดด้วยน้ำร้อนให้น้ำหนักแห้งสูงกว่าการสกัดด้วยสารละลาย 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 $\pm$ 0.5 ถึง 515.3$\pm$14.7 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด และปริมาณที่พบในส่วนสกัดน้ำคือ 4.1 $\pm$ 0.2 ถึง 325.7$\pm$13.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมของส่วนสกัด ส่วนสกัดของสมุนไพรทั้ง 15 ชนิด พบว่าส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำของเปลือกพังแหรใหญ่มีปริมาณฟีนอลรวมสูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของส่วนสกัดน้ำและเอทานอลในพืชสมุนไพรชนิดเดียวกัน พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมจากส่วนสกัดเอทานอลมีปริมาณสูงกว่าในส่วนสกัดน้ำ ยกเว้น ใบมะเดื่อหอมและใบราชดัด ในขณะที่การศึกษาของ Zhang et al. (2011) Diaz et al. (2012) และ Ravipati et al. (2012) พบว่าการสกัดสารประกอบฟีนอลรวมในพืชสมุนไพรจีนชนิดต่างๆ ด้วยน้ำและเอทานอลให้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ศึกษา

การศึกษาการต้านอักเสบของพืชสมุนไพรในครั้งนี้ใช้เซลล์แมคโครฟาจหนู RAW 264.7 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา ให้เซลล์สัมผัสกับ LPS ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการหลั่งสารสื่อกลางการอักเสบต่างๆ รวมทั้งไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E_2 ดังนั้นการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ และพรอสตาแกลนดิน E_2 ถูกใช้เป็นดัชนีที่แสดงถึงความสามารถในการลดการอักเสบของสารทดสอบ การศึกษาต้นแบบการตอบสนองต่อการอักเสบของเซลล์แมคโครฟาจนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Zhang et al., 2011; Diaz et al., 2012; Ravipati et al.,2012 และ Buapool et al., 2013) จากการทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของส่วนสกัดของพืชสมุนไพร พบว่าส่วนสกัดเอทานอลทมี % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา (85.3$\pm$2.4) ใบราชดัด (97.6$\pm$5.5) และรากดีงูต้น (99.9$\pm$2.4) และส่วนสกัดน้ำที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์สูงคือ ใบสาบแร้งสาบกา (52.0$\pm$4.6) ดังแสดงในตารางที่ 2 ในขณะที่ aminoguanidine เป็นสารที่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ iNOS ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไนตริกออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ได้ 64.7$\pm$9.3 % ส่วนสกัดเอทานอลของสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ซึ่งเป็นสารสื่อกลางการอักเสบชนิดสำคัญที่ถูกผลิตโดยเอนไซม์ COX-2 ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 สูงมากกว่า 90 % ได้แก่ ใบสาบแร้งสาบกา ใบราชดัด เปลือกพังแหรใหญ่ และรากดีงูต้น นอกจากนี้ยังใช้ตัวยับยั้งเอนไซม์ COX-2 คือ indomethacin ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการผลิตพรอสตาแกลนดิน E_2 ได้ 97.2$\pm$0.2 % ส่วนสกัดน้ำและส่วนสกัดเอทานอลของพืชส่วนใหญ่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ นั่นคือเซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดเหล่านี้มี % ความมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่า 80 ยกเว้นส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด และรากดีงูต้น รวมทั้งส่วนสกัดน้ำของรากโคลงเคลง และใบมะเดื่อหอม ดังนั้นการที่เซลล์ที่สัมผัสกับส่วนสกัดของใบสาบแร้งสาบกา มีปริมาณไนไตรท์น้อยลง น่าจะเป็นผลมาจากส่วนสกัดสามารถยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ ไม่ได้เป็นผลจากการตายของเซลล์เหมือนส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด และรากดีงูต้น

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

ตารางที่ 2 % การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์และพรอสตาแกลนดิน E_2 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
ดีงูต้น	99.9±2.4	19.9±4.8	95.7±4.4	55.3±2.3	84.2±6.4
เนระพูสีไทย หรือค้างคาวดำ	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
ระย่อมน้อยดอกขาว	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
สาบแร้งสาบกา	85.3±2.4	52.0±4.6	90.1±8.7	102.2±1.0	94.7±5.2
หัวเดียว	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

จากผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดพืชสมุนไพรในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดที่ศึกษาในครั้งนี้ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการอักเสบที่ดีที่สุด ได้แก่ส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดน้ำจากใบสาบแร้งสาบกา ผลการศึกษาที่ได้นี้จะเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ใบสาบแร้งสาบกาในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาแยกสารที่ออกฤทธิ์ต้านอักเสบในใบสำมะง่าที่อาจนำไปใช้พัฒนาเป็นยาต้านอักเสบชนิดใหม่ในอนาคต

5. กิติกรรมประกาศ

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 *Plucheaindica* leaves in macrophages RAW 264.7and 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. (212).Antioxidant and anti-inflammatory activities ofselected medicinal plants and fungi containingphenolic and flavonoid compounds.*Chinese Medicine*, *7*, 26.

Guzik, T.J., Korbut, 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, *Stichopusjaponicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway inmurine 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 *Scutellariabaicalensis*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 *Panaxnotoginseng*attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response via blocking of NF-kB 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 *Ocimumlamiifolium* 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 *Cissusquadrangularis* Linn may be invoved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF-kB 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 *Plucheaindica*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.