

การคัดกรองสมุนไพรล้านนาที่มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ ผ่านการขจัดอนุมูลอิสระ

Screening of Lanna Medicinal Plants with Anti-inflammatory Property Assessed by Free Radical Scavenging Activities

เฉลิมพงษ์ แสนจุม¹, สรinya ชัดชุมแสง¹, สุนีย์ จันทร์สกา¹, โมตรี สุทธิจิตต์², ไชยวัฒน์ ไชยสุต¹

Chalermpong Saenjum¹, Sarinya Kadchumsang¹, Sunee Chansakaow¹, Maitree Suttajit², Chaiyavat Chaiyasut¹

¹สายวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

²สำนักวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

Received: 21 May 2007

Accepted: 24 August 2007

Abstracts

Lanna is the northern eight provinces of Thailand. Several Lanna medicinal plants have potential for use by traditional practitioners for a long time without the scientific support data. Therefore, it is worthy to study the inflammatory property via free radical scavenging of such plants. Four kinds of Lanna medicinal plants, *Caesalpinia sappan* L., *Leea rubra* Blume ex Spreng., *Vernonia volkamerifolia* Wall.ex DC., and *Schleichera oleosa* Merr. were extracted with ethanol by soxhlet's apparatus to give the ethanolic extracts. The extracts were studied for free radical scavenging activity by ABTS^{•+} decolorizing assay, scavenging effect on superoxide anion and nitric oxide. *Leea rubra* Blume ex Spreng. exhibited the highest ABTS^{•+} scavenging activity with the Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) = 0.6100 g L-ascorbic acid/g of extract and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) = 0.9540 g trolox/g of extract. *Caesalpinia sappan* L. showed the highest superoxide anion scavenging activity with an EC₅₀ value of 4.51 µg/ml, which is comparable to the activity of L-ascorbic acid (EC₅₀ = 8.83 µg/ml). Furthermore, it exhibited the highest nitric oxide scavenging activity with EC₅₀ value of 0.61 µg/ml. The activity was comparable to curcumin with an EC₅₀ value of 1.05 µg/ml. The medicinal plant extracts showed a concentration dependent antiradical activity. The extract with highest activity will be further studied for use as an active ingredient in Medical Spa products or anti-inflammation products.

Keywords: Lanna medicinal plants, Anti-inflammation, Free radical, Superoxide anion, Nitric oxide

*ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้: ไชยวัฒน์ ไชยสุต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โทรศัพท์ 053-944340 โทรสาร 053-944340,

email: Chaiyavat@pharmacy.cmu.ac.th

บทคัดย่อ

ดินแดนล้านนา ครอบคลุมพื้นที่ 8 จังหวัด ในภาคเหนือของประเทศไทย สมุนไพรล้านนาถูกใช้รักษาอาการเจ็บป่วยโดยหมอพื้นบ้านล้านนาสืบทอดต่อกันมาเป็นระยะเวลาอันยาวนานโดยที่ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รองรับ สมุนไพรล้านนาจึงน่าสนใจในการนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบผ่านการจัดอนุมูลอิสระ โดยสมุนไพรล้านนาจำนวน 4 ชนิดประกอบด้วยฟาง เชียงแตงม้า มะโห้โตนและมะโห้โง่นำมาสกัดด้วยเอทานอลโดยใช้วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง หลังจากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}, superoxide anion และ nitric oxide พบว่า สารสกัดเชียงแตงม้ามีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} สูงที่สุดโดยมีค่า Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) = 0.6100 กรัม L-ascorbic acid/กรัมสารสกัด และ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) = 0.9540 กรัม trolox/กรัมสารสกัด สารสกัดฟางมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion สูงที่สุดโดยมีค่า EC₅₀ = 4.51 µg/ml และมีความสามารถสูงกว่าสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ที่มีค่า EC₅₀ = 8.83 µg/ml นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดฟางมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide สูงที่สุดโดยมีค่า EC₅₀ = 0.61 µg/ml และมีความสามารถสูงกว่าสารมาตรฐาน curcumin ที่มีค่า EC₅₀ = 1.05 µg/ml. ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะใช้สารสกัดจากสมุนไพรสำหรับเตรียมเป็นตำรับเพื่อใช้ในสปาหรือการบำบัดอาการอักเสบกล้ามเนื้อ

คำสำคัญ: สมุนไพรล้านนา ด้านการอักเสบ อนุมูลอิสระ ซุปเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์

บทนำ

การอักเสบเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อนที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับอันตราย โดยพบว่าเกิดกระบวนการทั้งใน cellular phase และ fluid phase เป็นผลให้มีการขยายตัวของหลอดเลือดและทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวจากหลอดเลือดเข้าสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้มีอาการบวมเกิดขึ้น เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนตัวออกจากหลอดเลือดไปสู่บริเวณอักเสบ และมี phagocytic activity พร้อมทั้งหลั่งสารสื่อกลางต่างๆ ที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อออกมา และทำให้เกิดการอักเสบเพิ่มมากขึ้น สารสื่อกลางต่างๆ ที่หลั่งออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาตอบสนองที่ซับซ้อนนี้ ได้แก่ serotonin, histamine, chemotactic factor ต่างๆ, leukotrienes และ prostaglandins นอกจากนี้ยังมี lysosomal enzymes ถูกหลั่งออกมาจากเม็ดเลือดขาวระหว่างการเกิด phagocytic activity นอกจากนี้ histamine ยังเป็นสารสื่อกลางที่พบในช่วงแรกของกระบวนการอักเสบ ถึงแม้ว่าจะมี H₁-histamine

receptor antagonists หลายชนิด แต่พบว่าสารเหล่านี้ออกฤทธิ์ด้านปรากฏการณ์ที่เกิดกับหลอดเลือดในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นในเวลาสั้นๆ เท่านั้น ส่วน bradykinins และ serotonin ก็มีบทบาทในการทำให้เกิดการอักเสบเช่นกัน (Fantone and Ward, 1999) สารสื่อกลางทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอีกชนิดหนึ่งคือ prostaglandins ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการเปลี่ยนจาก arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพการอักเสบและอาการไข้ โดยมีหลักฐานพบว่าเซลล์มีการหลั่ง prostaglandins เมื่อเซลล์ได้รับอันตรายหรือบาดเจ็บ (Mitchell and Contran, 2003)

สารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นสารที่มีอะตอม หมู่แทนที่อะตอม หรือโมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน กับสารอินทรีย์และเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น กรดไขมัน กรดนิวคลีอิก

โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ถูกทำลาย หรือบาดเจ็บก่อให้เกิดโรคและพยาธิสภาพต่างๆ ตามมา เช่น มะเร็ง ความเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อต่างๆ เป็นต้น (Freeman and Crapo, 1982)

nitric oxide (NO) เป็นอนุมูลที่ถูกสร้างขึ้นในร่างกายจาก L-arginine โดยใช้เอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) และมีการหลั่งจาก macrophage ในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ มีหลักฐานการวิจัยพบว่า NO สามารถกระตุ้นเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้าง prostaglandins และยังพบว่าสามารถกระตุ้นการผลิต interleukin-1 (IL-1) และ tumor necrosis factor (TNF) (Weinberg, 1999) ซึ่งเป็น cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในการอักเสบอีกด้วย NO ทำให้ดีเอ็นเอได้รับอันตรายโดยเฉพาะในภาวะที่มีออกซิเจนโดยทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น N_2O_3 แล้วเข้าทำลายดีเอ็นเอโดยการเกิดปฏิกิริยา deamination อนุมูลอิสระ superoxide anion ($O_2^\cdot$) เกิดจากการเติมอิเล็กตรอนให้แก่ O_2 โดยพบว่าอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดขึ้นในร่างกายจากการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเกิดจากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์บางชนิดในตับจากกระบวนการกำจัดสารแปลกปลอม อนุมูลอิสระ superoxide anion โดยพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการชราภาพ (aging) (Fridovich, 1995) อนุมูลอิสระ nitric oxide สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ superoxide anion เกิดเป็นอนุมูลอิสระ peroxynitrite (ONOO $^\cdot$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายมากกว่า nitric oxide และ superoxide anion มีการศึกษาพบว่าอนุมูลอิสระ peroxynitrite สามารถทำลายดีเอ็นเอได้มากกว่า nitric oxide ในความเข้มข้นที่เท่ากัน โดยพบว่า nitric oxide สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ adenine, guanine และ cytosine ส่วน peroxynitrite สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ guanine เพียงอย่างเดียว โดยทำปฏิกิริยาแบบ oxidation และ nitration ได้ผลิตภัณฑ์เป็น 8-oxodGua และ 8-nitroGua และยังสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นน้ำตาลของดีเอ็นเอทำให้เกิด strand break ได้ (Poli, 2002)

ในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับรักษาอาการที่เกิดจากการอักเสบหลายชนิดรวมทั้งในการแพทย์พื้นบ้านล้านนาก็ได้มีการนำสมุนไพรมาใช้รักษาอาการที่เกิดขึ้นจากการอักเสบ เช่น ปวดกล้ามเนื้อ, ริดสีดวงทวาร เป็นต้น จึงได้ทำการสำรวจตำรับยาสมุนไพรล้านนาที่ใช้รักษาอาการริดสีดวงจากหมอพื้นบ้านล้านนา ทำการคัดเลือกสมุนไพรที่มีการใช้บ่อยและใช้ได้ผลดีในตำรับยาสมุนไพรล้านนาจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ผาง (*Caesalpinia sappan* L.) มะโจ๊ก หรือ ตะคร้อ (*Schleichera oles* Merr.) มะโหกโตน (*Vernonia volkamerifolia* Wall.ex DC) และ เชื่องช้างม้า (*Leea rubra* Blume ex Spreng.) เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติด้านการอักเสบโดยการขจัดอนุมูลอิสระ 3 วิธีคือ ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ABTS $^{+}$, superoxide anion และ nitric oxide

วัสดุและอุปกรณ์

Absolute Ethanol, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), Ethyl acetate, Sodium hydroxide, Reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide dinucleotide (NADH), Phenazin methosulfate (PMS), Nitroblue tetrazolium (NBT), Ethylene diamine tetra acetate (EDTA), Sodium nitroprusside (SNP), Sulphanilamide, Naphthylethylenediamine dihydrochloride, Curcumin, L-ascorbic acid (Vitamine C), DL-alpha-tocopherol (Vitamine E), UV/VIS Spectrophotometer Jasco model 7800, Microcentrifuge, pH meter, Ultrasonic bath, Vortex mixer, Automatic micropipette, เครื่องชั่งชนิดละเอียด และกระดาษกรอง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

นำสมุนไพรที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ 4 ชนิด ได้แก่ ฝรั่ง มะโจ๊ก มะโห้โตนและเชียงช้างมาซึ่งเก็บจากอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2548 ทุกชนิดใช้ส่วนของเปลือกและเนื้อไม้ พืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด เก็บตัวอย่างเพื่อทำเป็นตัวอย่างพืชแห้ง (herbarium specimen) และทำการตรวจพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรโดยเทียบกับตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และได้รับการตรวจพิสูจน์โดยนักพฤกษศาสตร์ตัวอย่างสมุนไพรที่เก็บมาถูกนำไปลดขนาดและนำมาอบให้แห้ง หลังจากนั้นบดให้ละเอียด นำผงพืช 500 กรัม มาทำการสกัดด้วย 95% เอทานอลโดยใช้ชุดสกัดแบบต่อเนื่อง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลมาระเหยภายใต้ความดันต่ำแล้วนำสารสกัดด้วยเอทานอลที่เข้มข้นไปทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze drier

2. การหาค่าการวัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}

(Peerachan, 2003)

ABTS^{•+} เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ ABTS ด้วย potassium persulfate เตรียมโดยละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 7 mM หลังจากนั้นเติม potassium persulfate 2.5 mM ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองให้เจือจางสารละลาย ABTS^{•+} ด้วยน้ำกลั่น ให้มีค่าการดูดกลืนแสง 0.7-0.75 ที่ความยาวคลื่น 734 nm ได้เป็น ABTS^{•+} working solution การทดสอบทำได้โดยการผสมสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (vitamin C) และ trolox แล้วแปลผลออกมาเป็นค่า vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) และ trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

3. การหาค่าการวัดอนุมูลอิสระ superoxide anion

(Nakayawa and Yokozawa, 2002)

อนุมูลอิสระ superoxide anion เตรียมขึ้นโดยใช้ระบบ phenazine methosulfate (PMS) และ reduced β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) โดยการเกิดออกซิเดชันของ NADH ด้วย PMS และวิเคราะห์โดยอาศัยการเกิดรีดักชันของ nitroblue tetrazolium (NBT) วิธีทดสอบทำได้โดยการผสมสารละลาย NADH ความเข้มข้น 78 μ M กับสารละลาย NBT ความเข้มข้น 50 μ M ใน phosphate buffer saline (pH 7.4) จากนั้นเติมสารมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ และเติมสารละลาย PMS ความเข้มข้น 10 μ M เพื่อเริ่มปฏิกิริยา และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid แล้วแปลผลออกมาเป็นค่า 50% effective concentration (EC₅₀)

4. การหาค่าการวัดอนุมูลอิสระ nitric oxide

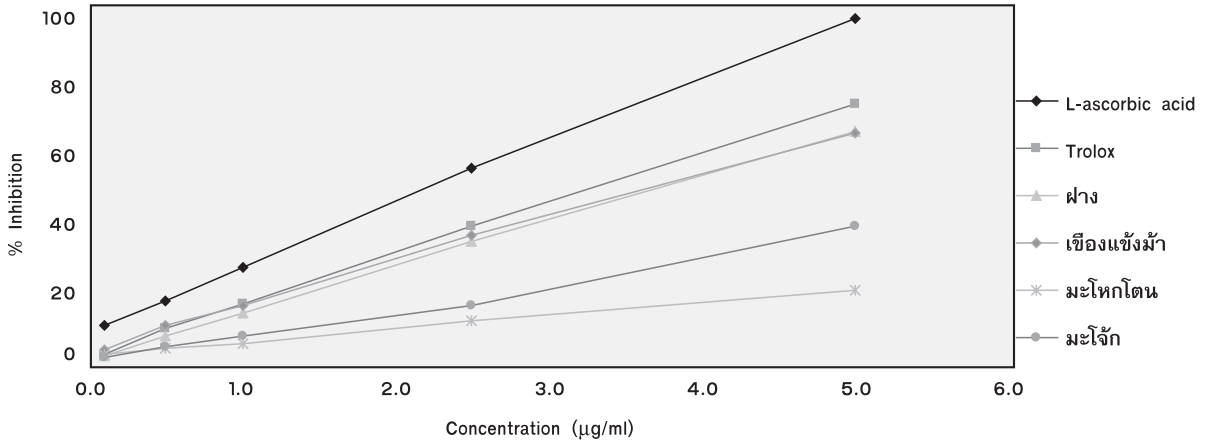
(Sreejayan and Rao, 1997)

อนุมูลอิสระ nitric oxide เตรียมขึ้นโดยใช้ sodium nitroprusside (SNP) และวิเคราะห์โดยใช้ Griess reagent ซึ่งประกอบด้วย 1% sulfanilamide และ 0.1% naphthylethylenediaminedihydrochloride ใน 2% H₃PO₄ การทดสอบเริ่มจากเตรียมสารละลาย SNP ความเข้มข้น 100 mM ใน Phosphate buffer saline (pH 7.4) หลังจากนั้นบ่มสารละลาย SNP กับสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติม Griess reagent ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน curcumin แล้วแปลผลออกมาเป็นค่า EC₅₀

ผลการทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระจำเป็นต้องทดสอบด้วยหลายวิธีเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่สนับสนุนซึ่งกันและกัน ดังนั้นการศึกษาค้างนี้จึงเลือกทำการทดสอบฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระจำนวน 3 วิธีคือ ฤทธิ์ขจัด

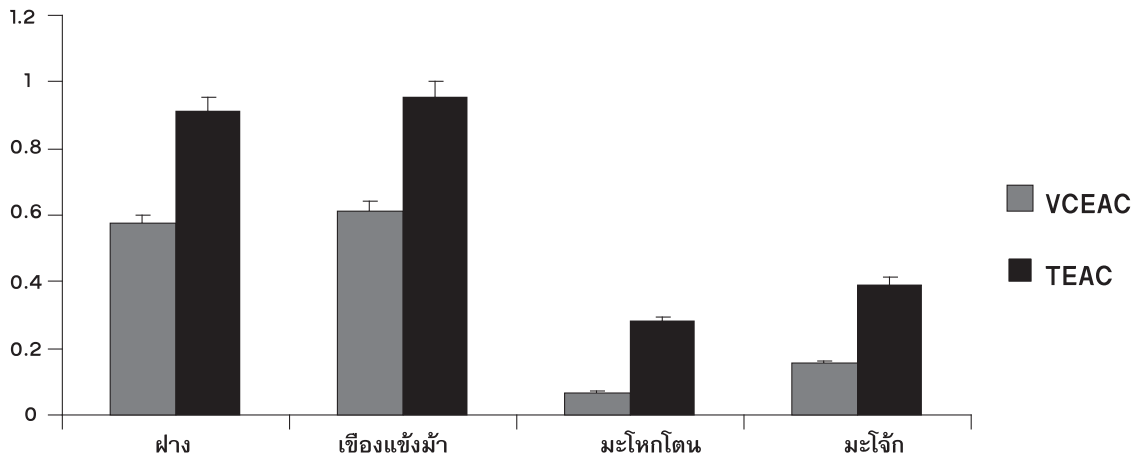
อนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$, ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ของสารสกัด

ตารางที่ 1 แสดงค่า Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) และ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ของสารสกัดสมุนไพร

สารสกัด	VCEAC	TEAC
	กรัม L-ascorbic acid/กรัมของสารสกัด	กรัม trolox/กรัมของสารสกัด
ผาง	0.5740 ± 0.01	0.9100 ± 0.01
เชือกแข้งม้า	0.6100 ± 0.01	0.9540 ± 0.01
มะโทกโดน	0.0660 ± 0.01	0.2800 ± 0.01
มะโจ๊ก	0.1560 ± 0.01	0.3920 ± 0.01

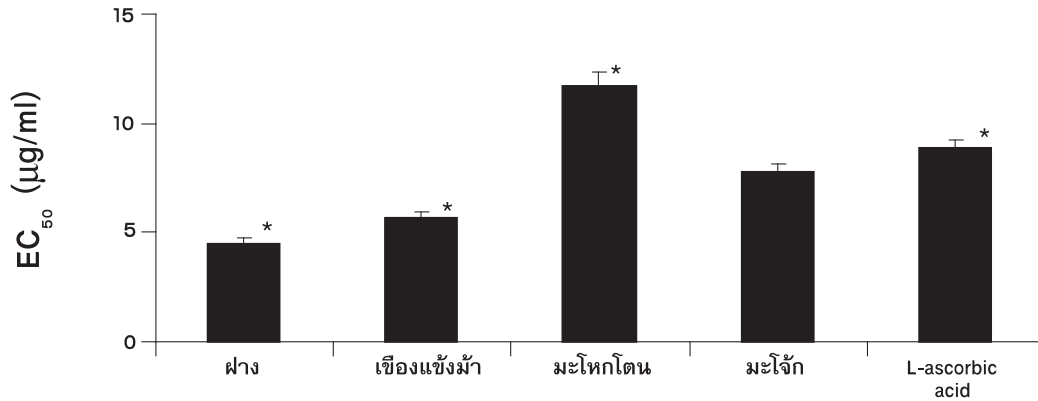


รูปที่ 2 แสดงค่า VCEAC และ TEAC ของสารสกัดสมุนไพร

จากรูปที่ 1 แสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ของสารสกัดสมุนไพรพบว่าฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งผลการทดลองที่ได้คำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid และ trolox ในรูป Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) และ Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) ซึ่งแสดงถึงสารสกัด 1 กรัมมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ เทียบเท่ากับน้ำหนัก (กรัม) ของสารมาตรฐาน พบว่าเชิงช้างม้ามีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ สูงที่สุด มีค่า VCEAC= 0.6100 และ TEAC=0.9540 รองลงมาคือ ฝรั่ง มะโจ๊ก

และมะโหกโตนตามลำดับ

จากรูปที่ 2 เชิงช้างม้า และฝรั่งมีฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid และ trolox เพราะเชิงช้างม้า และฝรั่งมีค่า VCEAC และ TEAC ที่สูงกว่า 0.50 ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion ทำการทดสอบโดยใช้ระบบ PMS-NADH โดยวัดค่าการเกิดรีดักชันของ NBT ซึ่งค่าความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion แสดงออกมาในรูปของ 50% effective concentration (EC_{50}) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid



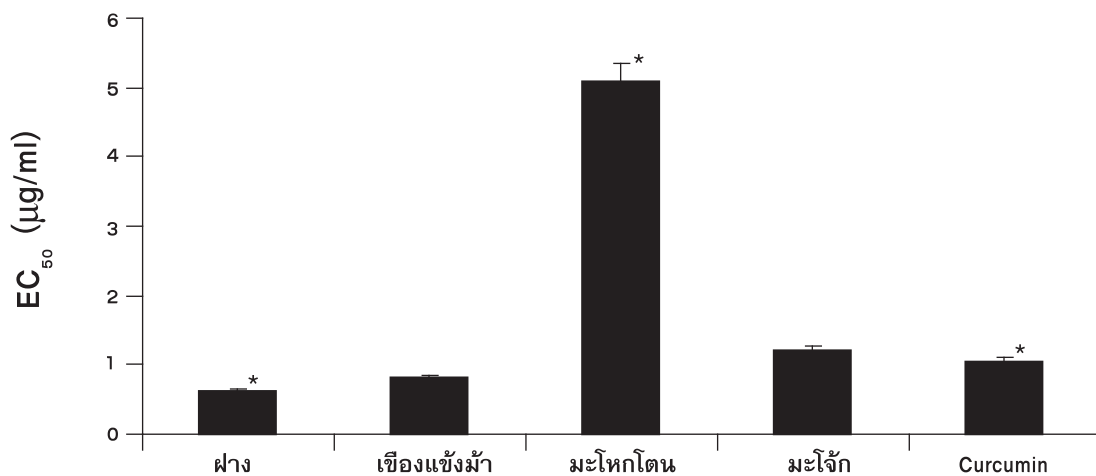
รูปที่ 3 แสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion ของสารสกัดสมุนไพร

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.1$)

จากรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าฟางมีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion สูงที่สุดโดยมีค่า $EC_{50} = 4.51 \mu\text{g/ml}$ รองลงมาคือเชือกขี้ม้า ($EC_{50} = 5.63 \mu\text{g/ml}$) มะโจ๊ก ($EC_{50} = 7.73 \mu\text{g/ml}$) และมะโหด ($EC_{50} = 11.74 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าฟางและเชือกขี้ม้ามี่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion

สูงกว่าสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ($EC_{50} = 8.83 \mu\text{g/ml}$)

ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีระหว่าง nitrite กับ Griess reagent แสดงความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide โดยการเปรียบเทียบกับค่า EC_{50} สารมาตรฐาน curcumin ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide ของสารสกัดสมุนไพร

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 90 เปอร์เซนต์ ($p \leq 0.1$)

จากรูปที่ 5 แสดงว่าฝางมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide สูงที่สุด โดยมีค่า $EC_{50} = 0.61 \mu\text{g/ml}$ รองลงมาคือเชือกแห้งม้า ($EC_{50} = 0.81 \mu\text{g/ml}$) มะโจ๊ก ($EC_{50} = 1.21 \mu\text{g/ml}$) และมะโห้โดน ($EC_{50} = 5.09 \mu\text{g/ml}$) ตามลำดับ พบว่าฝางและเชือกแห้งม้ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide สูงกว่าสารมาตรฐาน curcumin ($EC_{50} = 1.05 \mu\text{g/ml}$)

วิจารณ์และสรุปผล

สารสกัดเชือกแห้งม้ามีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ สูงที่สุด สารสกัดฝางมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ nitric oxide สูงที่สุด

Badami และคณะ (2003) ได้ทำการวิจัยพบว่าสารสำคัญในฝางประกอบด้วยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก และสเตียรอยด์ สารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ Brazilin ซึ่งเป็นสารสีแดง อาจเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวทำให้ฝางมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ nitric oxide ที่ดี ยังมีข้อมูลสนับสนุนจากการวิจัยของ Bae และคณะ (2005) ซึ่งพบว่า brazilin มีความสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide จาก macrophage cells ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide (LPS) และยับยั้ง iNOS protein และ mRNA expression ของ RAW264.7 macrophage cells ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide

Saha และคณะ (2004) ได้ศึกษาพบว่า สารสกัดเชือกแห้งม้ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid, quercetin และ BHT และยังพบว่าเชือกแห้งม้ามีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid และ trolox มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion และ nitric oxide ที่ดี แสดงว่าสารสำคัญในเชือกแห้งม้ามีคุณสมบัติที่ดีในการกำจัดอนุมูลอิสระ

สำหรับมะโห้โดน และมะโจ๊กมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$ ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid และ trolox และฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ superoxide anion ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid และมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ nitric oxide ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน curcumin

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดฝาง และเชือกแห้งม้ามีคุณสมบัติกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^{+}$, superoxide anion และ nitric oxide ที่ดี และสมมุติฐานของการเกิดการอักเสบพบว่าในร่างกายจะมีการผลิตอนุมูลอิสระ nitric oxide และ superoxide anion เพิ่มขึ้นบริเวณที่มีการอักเสบ ดังนั้นสารสกัดฝางและเชือกแห้งม้าจึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบผ่านกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระกลุ่มนี้ และต่อไปจะได้ทำการศึกษาวิจัยฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ prostaglandins ซึ่งเป็นสารเหนียวนำทางเคมีที่ก่อให้เกิดการอักเสบ

เอกสารอ้างอิง

- Badami S, Moorkoth S, Rai SR, Kannan E, Bhojraj S. 2003. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. *Biol Pharm Bull* 26 (11): 1534-1537.
- Bae I, Min H, Han A, et al. 2005. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW264.7 macrophage cells. *Eur J Pharmacol* 513(3): 237-242.
- Fantone JC, Ward PA. 1999. Inflammation. *Pathology* 3rd. 36-75.
- Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47 (5): 412-426.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Mitchell RN, Contran RS. 2003. Acute and chronic inflammation. *Robbins Basic Pathology* 7th. 33-59.
- Murphy MP. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochemica et Biophysica Acta* 1411: 401-414.
- Nakayawa T, Yokozawa T. 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem Toxicol* 40: 1745-1750.
- Poli G. 2002. Reactive oxygen and nitrogen in inflammation. *Free Radic Bio Med* 33: 301-302.
- Ravishankara MN, Shrivastava N, Padh H, Rajani M. 2002. Evaluation of antioxidant properties of root bark of *Hemidesmus indica* R. Br. (Anantmul). *Phytomedicine* 9: 153-160.
- Saha K, Lajis NH, Israf DA, Hamzah AS, Khozirah S, Khamis S, Syahida A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 92: 263-267.
- Peerachan S. 2006. Factors affecting antioxidant capacity and polyphenol content of lactic acid beverages fermented with *Lactobacillus* spp. and *Phyllanthus emblica* Linn. Graduated school, Chiang Mai university.
- Sreejayan N, Rao MN. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 49: 105-107.
- Weinberg JB. 1999. Nitric oxide and inflammation in autoimmune disorders. In Laskin JD, Laskin DL ed. *Cellular and Molecular Biology of Nitric oxide*. New York, NY. Marcel Dekker Press. 199-224.