



องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของ สารสกัดแมงลักคา

ประไพ วงศ์สินคองมัน^{1*}
จารย์ บันสิทธิ์¹
ธนวัฒน์ ทองจีน²
พนัสตา อิศรางกูร ณ อยุธยา³
ปราณี ขวลิตรำรง⁵

อภิรักษ์ ตักดีเพชร¹
สมชาย แสนหลวงอินทร์¹
มาลินี จิตตกานต์พิชัย³
นพมาศ สุนทรเจริญนนท์⁴

¹สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000

²ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดพิษณุโลก 65000

³สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000

⁴คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

⁵สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000

*ผู้รับผิดชอบบทความ: prapai.w@dmisc.mail.go.th

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคา [*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Lamiaceae] มีฤทธิ์ยับยั้ง Flu A เท่ากับ 55.62% และ 80.28% ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มก/มล ตามลำดับ และสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 ได้ 90% ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีรายงานการวิจัยด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแมงลักคา พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อริบ (HSV), *Salmonella*, *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum* แต่ยังไม่มียานการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ ดังนั้น สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคาจึงถูกนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว โดยศึกษาการแยกสารจนได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโคปีและเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัย พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 3 ชนิด เป็นสารกลุ่มกรดฟีนอลิก คือ 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid (1), rosmarinic acid (2) และ caffeic acid (3) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง พบว่าสาร 1-3 มีฤทธิ์ยับยั้ง Flu A เท่ากับ 55.63%, 76.81% และ 34.78% ที่ความเข้มข้น 5, 2.5 และ 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 เท่ากับ 90%, 96.9%, 34.37% ที่ความเข้มข้น 6, 6 และ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น สารทั้งสามชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจึงใช้เป็นสารเทียบเพื่อควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดน้ำแมงลักคาได้

คำสำคัญ : แมงลักคา, สารสกัดน้ำ, กรดฟีนอลิก, ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

ภูมิหลังและเหตุผล

แมงลักคาเป็นพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Lamiaceae (Labiatae)¹ และมีชื่อเรียกตามท้องถิ่น ได้แก่ กะเพราผี การา แมงลักป่า^{1,2} ชื่ออังกฤษ ได้แก่ chan^{3,4}, pignut^{3,4}, wild spikenard^{3,5} แมงลักคาจัดเป็นไม้ล้มลุก อายุปีเดียว สูงได้ถึง 1.5 เมตร มีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นและกิ่งเป็นสี่เหลี่ยม ผิวมีขนทั่วไป ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปไข่ถึงไข่กลับ ปลายแหลมหรือมน โคนมนหรือเว้ารูปหัวใจ ขอบหยัก ดอกสีม่วง ออกรวมกันเป็นช่อสั้นตามง่ามใบใกล้ปลายกิ่งหรือที่ยอด ผลแบบแห้งไม่แตก เมล็ดมีเยื่อหุ้ม ถูน้ำจะพองเป็นเมือกใส^{6,7} แมงลักคามีรายงานการใช้ประโยชน์พื้นบ้านที่หลากหลาย เช่น ยอดอ่อนช่วยแต่งกลิ่นและรสหรือใช้เป็นยาพอก⁸ ใบหรือปลายยอดใช้รักษาโรคผิวหนัง รวมทั้งอาการปวดข้อ ปวดศีรษะ ปวดท้อง^{3,9} ทั้งต้นต้มน้ำดื่มรักษาอาการปวดกระเพาะอาหาร ปวดบิด อาเจียน ท้องผูก ปวดท้องประจำเดือน รักษาหวัด ไข้ ไข้หวัดใหญ่ มาเลเรีย ไข้เหลือง ช่วยขับลม ขับเสมหะ หรือผสมน้ำอาบเพื่อรักษาอาการอัมพฤกษ์หรืออัมพาต โรคแผลพุพองรวมทั้งโรคผิวหนัง รักษาเมะเร็งและเนื้องอก³

จากรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีในส่วนเหนือดินของแมงลักคา พบว่ามีสารประเภทเทอร์ปีนอยด์ เช่น α -amyrin¹⁰, β -amyrin¹⁰, betulinic acid¹⁰, dehydroabietinol¹¹, lupeol¹⁰, $9\alpha,13\alpha$ -epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol¹¹, hyptadienic acid¹², urs-12en-3 β -ol-29-oic acid¹³, ursolic acid^{10,17}, oleanolic acid^{10,17}, suaveolol^{14,15,17}, methyl suaveolate^{16,17}, suaveolic acid¹⁷ สารกลุ่ม เฟลโวนอยด์ เช่น 4',5-

dihydroxy-7-methoxy flavone¹⁰ สารประเภทแอลดีไฮด์ เช่น 5-hydroxy methyl furfuraldehyde¹⁰ สารกลุ่มฟีนอลิก เช่น rosmarinic acid, methyl rosmarinate¹⁷ สารกลุ่ม สเตียรอยด์ เช่น β -sitosterol¹⁷, β -sitosteryl glucoside¹⁷ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดแมงลักคาพบว่า สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *Candida albicans*¹⁸ สาร dehydroabietinol ที่แยกได้จากสารสกัดเอทานอลจากส่วนเหนือดินแมงลักคามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* 3D7 strains ซึ่งเป็น chloroquine sensitive strains ได้ดี¹² สาร $9\alpha,13\alpha$ -epi-dioxiabiet-8(14)-en-18-ol ที่แยกได้จากสารสกัดใบแมงลักคามีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ได้ที่ IC₅₀ เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร¹² สารสกัดเอทานอลจากใบแมงลักคามีฤทธิ์รักษาแผลในหนูขาว 19 สารสกัดเฮกเซนและสาร suaveolol มีฤทธิ์ปกป้องกระเพาะอาหารในหนูวิสตา²⁰ สาร suaveolol และ methyl suaveolate มีฤทธิ์ต้านอักเสบ²¹ สาร hyptadienic acid มีฤทธิ์ cytotoxic²² จากอนุสิทธิบัตรของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าสารสกัดน้ำจากส่วนเหนือดินแมงลักคามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ต้านเชื้อไวรัสเริม (*Herpes simplex virus*) และต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*²³ นอกจากนี้ จากการทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดน้ำจากแมงลักคาในหนูขาว พบว่ามีความปลอดภัย โดยการให้สารสกัดทางปากในขนาด 5, 50, 250, 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนู และไม่ทำให้เกิดอาการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรัม หรือพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่

มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด²⁴

จากข้อมูลข้างต้นกล่าวได้ว่า ส่วนเหนือดินจากแมงลักคามิฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลายและมีความปลอดภัยในหนูขาว ผลการศึกษาเบื้องต้นในการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Flu A/H3) และเชื้อเอชไอวี (HIV-1) มีรายงานการศึกษาของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคามิฤทธิ์ยับยั้ง Flu A/H3 เท่ากับ 55.62% และ 80.28% ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 ได้ 90% ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเห็นควรศึกษาว่าสารสกัดน้ำของส่วนเหนือดินแมงลักคามิฤทธิ์ประกอบทางเคมีใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อใช้เป็นสารเทียบในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดน้ำแมงลักคาต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. ตู้อบร้อนไฟฟ้ารุ่น VLE-400 (Memmert)
2. เครื่องบดบั่น รุ่น RT 34 ของ (Chyun Tseh Industrial)
3. เครื่องแรง รุ่น AS 200 Basic (Retsch)
4. เครื่องระเหยสูญญากาศ ประกอบด้วยอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น B-480 (Buchi Laboritechnik) เครื่อง Rotavapor รุ่น R-114 (Buchi) เครื่อง Aspirator รุ่น A-3S ยี่ห้อ Eyela® และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน รุ่น CA-101 ยี่ห้อ Eyela® (Tokyo Rikakikai)
5. เครื่องระเหิดให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze-dried Apparatus) (Labconco)

6. แผ่นเคลือบซิลิกาเจลชนิดจี 60 ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร ความหนา 0.25 มิลลิเมตร (E. Merck) (Merck Number 1.05721.0001) และขนาด 5 x 10 เซนติเมตร ความหนา 0.20-0.25 มิลลิเมตร (Guijiaoban) (Makall)

7. เครื่องอุปกรณ์ถ่ายภาพโครมาโทกราฟี TLC/HPTLC รุ่น Reoprostar 3 (Camag) และกล้องดิจิทัลยี่ห้อ canon รุ่น Powershot G5 (Canon)

8. เครื่องชั่งไฟฟ้า พิกัด 0.1-0.01 มิลลิกรัม (Sartorius)

9. เครื่องแยกโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) (Waters) ประกอบด้วยเครื่องควบคุมปั๊ม รุ่น 600 เครื่องฉีดสารตัวอย่างรุ่น 717 คอลัมน์ยี่ห้อ X-Terra RP18 ขนาด 4.6 ± 150 เซนติเมตร, 60 Å, 5 ไมโครเมตร และเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดแอเรียรุ่น 2996

10. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองต่างๆ เป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์ (analytical grade) และน้ำบริสุทธิ์ที่ใช้ในงานทดลองเป็นน้ำที่ได้จากการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก (deionized water)

11. สารเคมีทุกชนิดที่ใช้กับเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) เป็น HPLC, gradient grade (Merck) และน้ำบริสุทธิ์ที่ต้องการกรองเอาอนุภาคที่มีประจุออก โดยใช้เครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (Ultra Pure Water System) ยี่ห้อ Nanopure (Barnstead)

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคา

ส่วนเหนือดินสดแมงลักคา (20 กิโลกรัม) เก็บ

ผลึกคล้ายปริซึม ดูความขุ่นง่าย ไม่มีสี (1) น้ำหนัก 180 มิลลิกรัม (% yield = 1.80 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดน้ำที่ได้จากการ partition หรือ 0.81 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดน้ำชนิดหยาบ)

สารสกัดเอทิลอะซีเตทที่เตรียมได้จากการ partition (52 กรัม) นำมาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล และชะด้วยสารละลายผสมของคลอโรฟอร์ม: เมทานอล (9.5:0.5 ถึง 7:3) เก็บ fraction ละ 25 มิลลิลิตร นำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง รวมส่วนสกัดที่มีลักษณะคล้ายกันไว้ด้วยกันและระเหยให้แห้ง ได้ส่วนสกัด 6 ส่วน คือ E1-6 นำ E5 (2.2 กรัม) ไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แต่ใช้ Sephadex LH20 เป็นวัสดุภาคคงที่ และชะด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน (9.5:0.5 ถึง 8:2) นำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง รวมส่วนสกัดที่มีลักษณะคล้ายกันไว้ด้วยกันและระเหยให้แห้ง ได้ส่วนสกัด 4 ส่วน คือ E51-54 นำส่วนสกัด E52 (0.2 กรัม) มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ RP18 เป็นวัสดุภาคคงที่และชะด้วยสารละลายผสมของน้ำและเมทานอล (9.5:0.5 ถึง 7:3) เก็บ fraction ละ 25 มิลลิลิตร นำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง รวมส่วนสกัดที่มีลักษณะคล้ายกันไว้ด้วยกันและระเหยให้แห้ง ได้ส่วนสกัด 6 ส่วน คือ E521-526 พบว่าส่วนสกัด E522 มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว น้ำหนัก 120 มิลลิกรัม (2) (% yield = 0.58 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดเอทิลอะซีเตท หรือ 0.033 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดน้ำชนิดหยาบ) นอกจากนี้ นำส่วนสกัด E4 (1.2 กรัม) ไปแยกต่อด้วยเทคนิค คอลัมน์โครมาโทกราฟีแต่ใช้

RP18 เป็นวัสดุภาคคงที่และชะด้วยสารละลายผสมของน้ำและเมทานอล (9.5:0.5 ถึง 6:4) นำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง รวมส่วนสกัดที่มีลักษณะคล้ายกันไว้ด้วยกันและระเหยให้แห้ง ได้ส่วนสกัด 4 ส่วนคือ E41-44 แล้วนำ E42 (0.435 กรัม) มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ Sephadex LH20 เป็นวัสดุภาคคงที่และชะด้วยสารละลายผสมของน้ำและอะซีโตน (1:1) เก็บ fraction ละ 25 มิลลิลิตร นำไปตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง รวมส่วนสกัดที่มีลักษณะคล้ายกันไว้ด้วยกันและระเหยให้แห้ง ได้ส่วนสกัด 5 ส่วน คือ E421-425 โดยพบว่าส่วนสกัด E423 มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว น้ำหนัก 120 มิลลิกรัม (3) (% yield = 0.23 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดเอทิลอะซีเตท หรือ 0.013 โดยน้ำหนัก เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดน้ำชนิดหยาบ)

เมื่อนำสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) โดยซึ่งตัวอย่างประมาณ 500 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องซึ่งไฟฟ้าพิกัด 0.1-0.01 มิลลิกรัม นำไป sonicate ด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร นาน 30 นาที กรอง ปรับปริมาตรด้วยน้ำในขวดปรับปริมาตรจนครบ 25.0 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย nylon filter 0.45 ไมครอน ก่อนใช้ เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid, rosmarinic acid, caffeic acid ให้มีความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในน้ำ, 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล และ 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในเมทานอล ตามลำดับ แล้วกรองด้วย nylon filter 0.45 ไมครอน ก่อนใช้ นำไปเจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4, 0.8, 0.12, 0.16 และ 0.20 มก/มล ตามลำดับ ฉีด

สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน ปริมาณ 25.0 ไมโครลิตร เตรียมหน้ายาแยกโดยใช้ระบบ gradient ของสารละลายน้ำและเมทานอล ในอัตราส่วน 95:5 จนถึง 0:100 สังเกตพีคที่เกิดขึ้นโดยใช้ photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 279 และ 324 นาโนเมตร

3. การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ 1-3 ที่แยกได้มาพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปี โดยส่งตรวจสอบที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้เครื่อง NMR (Bruker-AV500), Mass spectrometer (MS 1200 L Quadrupole MS/MS (Varian)

4. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารสกัดหยบน้ำจากส่วนเหนือดินแมงลักคา และสารบริสุทธิ์ 1-3 ที่แยกได้ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ โดยทดสอบกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Flu A/H3) ด้วยวิธี Plaque Reduction Assay และที่ฝ่ายปฏิบัติการต้านเชื้ออันตรายสูงและภูมิคุ้มกันวิทยา โดยทดสอบการยับยั้งเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี Immunofluorescence Assay นอกจากนี้ สารบริสุทธิ์ 2-3 ได้ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่ BIOTEC ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค (Anti-*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra strain) ด้วยวิธี Resazurin Microplate Assay (REMA) โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (MIC) ของ

สารควบคุมบวก (positive control) คือ rifampicin เท่ากับ 0.047 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, kanamycin เท่ากับ 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, isoniazid เท่ากับ 0.250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; ฤทธิ์ต้านเชื้อริบ (Anti-HSV-1) (Herpes simplex virus type 1) ด้วยวิธี SRB (Sulforhodamine B) Assay โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเชื้อได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของ positive control คือ acyclovir เท่ากับ 2.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Antimalarial) ต่อ *Plasmodium falciparum* ด้วยเทคนิค Microculture Radioisotope โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IC₅₀ ของ positive control คือ dihydroartemisinin เท่ากับ 4.1 นาโนโมลาร์; ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ COX-1, COX-2 ด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IC₅₀ ของ positive control ต่อ COX-1, COX-2 คือ aspirin เท่ากับ 5, 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ; ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Cytotoxicity) ต่อ KB (oral human epidermal carcinoma) ด้วยวิธี SRB Assay, MCF-7 (breast cancer) ด้วยวิธี SRB Assay, NCI-H187 (human, small cell lung cancer) ด้วยวิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IC₅₀ ของ positive control ต่อ KB, MCF-7, NCI-H187 คือ doxorubicin เท่ากับ 0.095, 0.243, 0.026 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Anti-fungal against *Candida*

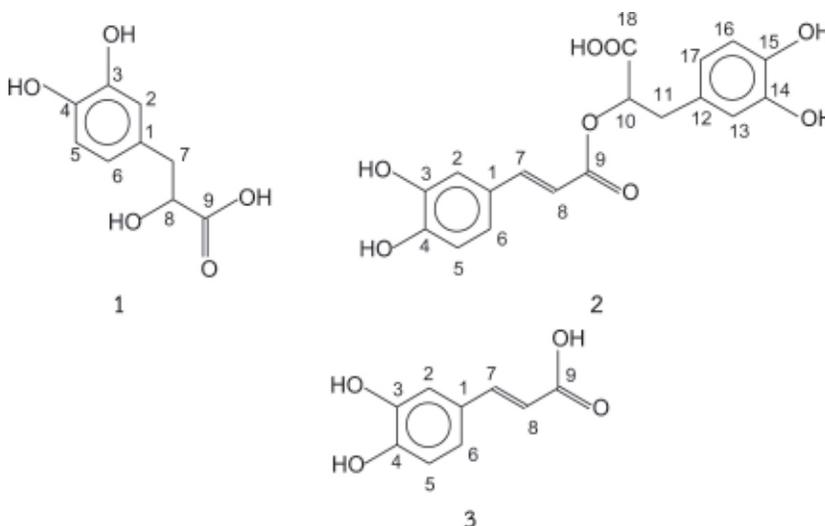
albicans) ด้วยวิธี MTT Assay โดยความเข้มข้นสูงสุดของตัวอย่าง คือ 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ IC_{50} ของ positive control คือ amphotericin B เท่ากับ 0.049 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างทั้งหมดที่เลือกใช้ต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

ผลการศึกษา

จากผลการแยกสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคาด้วยการ partition และใช้เทคนิค CC พบว่าแยกสารบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด โดยสาร 1 มีลักษณะเป็นผลึกคล้ายปริซึม ดูดความชื้นง่าย ไม่มีสี สาร 2 และ 3 มีลักษณะเป็นผง amorphous สีขาว เมื่อพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค spectroscopy พบว่า 1H -NMR spectra มีค่า chemical shift (δ , ppm), splitting pattern และ coupling constant (J, Hz) รวมทั้ง ^{13}C -NMR spectra สอดคล้องกับผลการศึกษาในรายงานการวิจัยที่ตีพิมพ์แล้ว²⁵⁻²⁷ (ตารางที่ 1-6) และจากผล MS spec-

trum ของสาร 1-3 แสดงว่า สารทั้งสามชนิด ได้แก่ 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactic acid (1): $[C_9H_{10}O_5]$ FAB-MS m/z (% relative intensity): 197 (M-1)⁺ (100), 111 (10). Rosmarinic acid (2): $[C_{18}H_{15}O_8]$ TOF-MS (ES+) m/z (% relative intensity): 383.0 (M+Na)⁺ (100), 360.2 (M-Na)⁺ (10), 185.1 (15), 163.0 (42.5). Caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propenoic acid] (3): $[C_9H_8O_5]$ TOF-MS (ES+) m/z (% relative intensity): 203.03 (M+Na)⁺ (15), 181.05 (M+H-Na)⁺ (15), 163.03 (M-H₂O)⁺ (100), 150.12 (10) จากผลการแยกสารพบว่า ได้สาร 1, 2 และ 3 จำนวน 180, 120 และ 120 มิลลิกรัม ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.81, 0.033 และ 0.013 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา

เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง โดยใช้สาร 1-3 เป็นสารเทียบ พบว่าสาร 1 มีค่า retention time



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid (1), rosmarinic acid (2) และ caffeic acid (3)

ตารางที่ 1 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) ของ 1 เปรียบเทียบกับ 3-(3,4-Dihydroxyphenyl) lactic Acid²⁵

ตำแหน่งโปรตอน	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 1	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-acetone}$ ของ 3-(3,4-dihydroxy-phenyl) lactic acid ²⁵
H-2	6.67 (d, J=11.0 Hz, 1H)	6.79 (d, J=2 Hz, 1H)
OH-3	3.20 (s, 1H)	-
OH-4	3.28 (s, 1H)	-
H-5	6.57 (d, J= 8.5 Hz, 1H)	6.72 (d, J= 8 Hz, 1H)
H-6	6.68 (dd, J=10.1 Hz, 1H)	6.60 (dd, J=2, 8 Hz, 1H)
H-7	2.61 (dd, J= 9.7, 5.2 Hz, 1H)	2.73 (dd, J= 14, 7 Hz, 1H)
	2.81 (dd, J= 9.7, 4.9 Hz, 1H)	2.98 (dd, J= 14, 5 Hz, 1H)
H-8	4.06 (dd, J= 5.2, 4.9 Hz, 1H)	4.32 (dd, J= 5, 7 Hz, 1H)
OH-8	3.21 (s, 1H)	-
OH-9	11.0 (s, 1H)	-

ตารางที่ 2 ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) ของ 1 เปรียบเทียบกับ 3-(3,4-Dihydroxyphenyl) lactic Acid²⁵

ตำแหน่งคาร์บอน	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 1	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-acetone}$ ของ 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid ²⁵
C-1	132.34	130.2
C-2	117.63	116.2
C-3	145.17	144.9
C-4	143.89	145.9
C-5	118.66	117.7
C-6	123.30	121.9
C-7	41.00	41.0
C-8	74.77	73.0
C-9	181.94	177.2

เท่ากับ 4.1 นาที ที่ความยาวคลื่น 279 นาโนเมตร และสาร 2, 3 มีค่า retention time เท่ากับ 28.0, 13.8 นาที ที่ความยาวคลื่น 324 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาหาปริมาณสาร 1-3 ในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาที่เตรียมด้วยวิธีการระเหิดน้ำให้

แห้งด้วยความเย็น (freeze-dried) จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean \pm SD) คิดเป็นร้อยละ 1.86 ± 0.61 , 0.43 ± 0.27 , 0.07 ± 0.05 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (รูปที่ 2, ตารางที่ 7) สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพใน

ตารางที่ 3 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) ใน ของ 2 เปรียบเทียบกับ Rosmarinic acid²⁶

ตำแหน่งโปรตอน	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 2	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ rosmarinic acid
H-2	7.36 (s, 1H)	7.06 (s, 1H)
OH-3	7.48 (s, 1H)	8.81 (s, 1H)
OH-4	9.70 (s, 1H)	9.68 (s, 1H)
H-5	6.69 (d, J=8.1 Hz, 1H)	6.77 (d, J=8.0 Hz, 1H)
H-6	6.88 (dd J=8.1 Hz, 1H)	7.01 (d, J=8.0 Hz, 1H)
H-7	7.35 (d, J=15.9 Hz, 1H)	7.47 (d, J=16.0 Hz, 1H)
H-8	6.15 (d, J=15.9 Hz, 1H)	6.24 (d, J=16.0 Hz, 1H)
H-10	4.80 (dd, J=10.3, 2.9 Hz, 1H)	5.03 (dd, J=8.6, 4.0 Hz, 1H)
H-11	2.71 (dd, J=14.2, 10.3 Hz, 1H)	2.91 (dd, J=14.0, 8.6 Hz, 1H)
	3.00 (dd, J=14.1, 2.9 Hz, 1H)	2.99 (dd, J=14.0, 4.0 Hz, 1H)
H-13	6.69 (s, 1H)	6.69 (s, 1H)
OH-14	8.75 (s, 1H)	8.75 (s, 1H)
OH-15	9.20 (s, 1H)	9.20 (s, 1H)
H-16	6.60 (d, J=7.95 Hz, 1H)	6.64 (d, J=7.6 Hz, 1H)
H-17	6.46 (dd, J=8.0, 1.6 Hz, 1H)	6.53 (d, J=7.6 Hz, 1H)
OH-18	12.90 (s, 1H)	12.90 (s, 1H)

ตารางที่ 4 ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) ของ 2 เปรียบเทียบกับ Rosmarinic Acid²⁶

ตำแหน่งคาร์บอน	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 2	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ rosmarinic acid ²⁶
C-1	125.72	126.20
C-2	115.79	115.74
C-3	143.91	144.85
C-4	145.34	145.79
C-5	116.23	116.64
C-6	121.14	122.45
C-7	146.55	146.73
C-8	115.22	114.18
C-9	166.78	166.81
C-10	76.85	73.84
C-11	37.84	37.01
C-12	130.70	128.28
C-13	117.00	117.55
C-14	144.60	146.47
C-15	147.46	149.49
C-16	116.23	116.25
C-17	120.04	120.90
C-18	172.71	171.84

ตารางที่ 5 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) ของ 3 เปรียบเทียบกับ Caffeic Acid²⁷

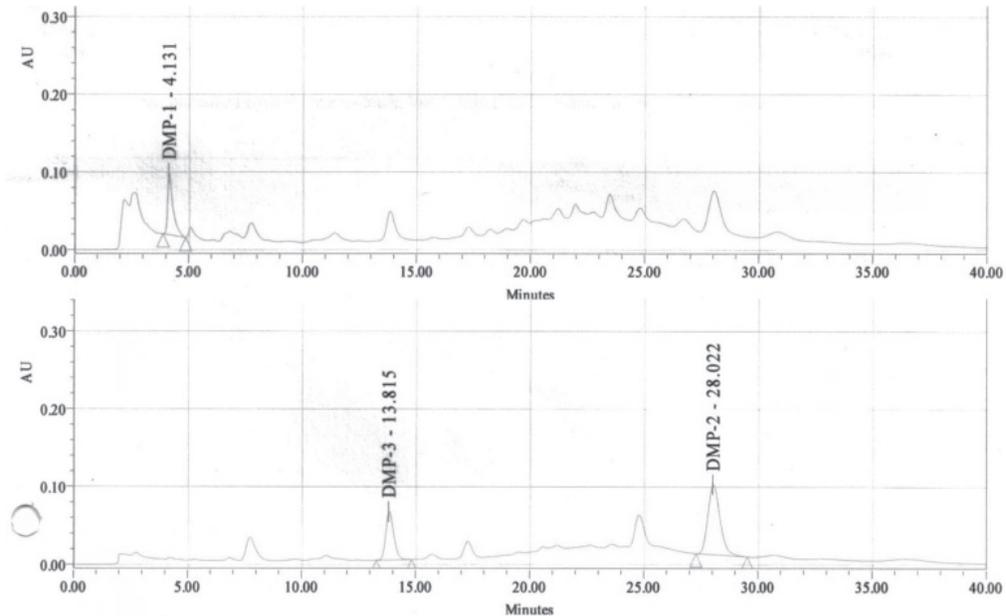
ตำแหน่งโปรตอน	δ_{H} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 3	δ_{H} (ppm) ใน CD_3OD ของ caffeic acid ²⁷
H-2	7.05 (d, J=1.96 Hz, 1H)	7.07 (d, J=2.0 Hz, 1H)
OH-3	9.20 (s, 1H)	-
OH-4	9.60 (s, 1H)	-
H-5	6.75 (d, J=8.1 Hz, 1H)	6.81 (d, J=8.2 Hz, 1H)
H-6	6.95 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1H)	6.95 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H)
H-7	7.40 (d, J=15.84 Hz, 1H)	7.55 (d, J=15.9 Hz, 1H)
H-8	6.15 (d, J=15.85 Hz, 1H)	6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H)
OH-9	12.15 (s, 1H)	-

ตารางที่ 6 ข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz) ของ 3 เปรียบเทียบกับ Caffeic Acid²⁷

ตำแหน่งคาร์บอน	δ_{C} (ppm) ใน $d_6\text{-DMSO}$ ของ 3	δ_{C} (ppm) ใน CD_3OD ของ caffeic acid ²⁷
C-1	126.17	128.3
C-2	115.10	115.7
C-3	146.02	147.2
C-4	148.59	149.8
C-5	116.21	117.0
C-6	121.59	123.4
C-7	145.02	147.6
C-8	115.59	116.0
C-9	168.33	171.6

หลอดทดลองต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Flu A/H3) ด้วยวิธี Plaque Reduction Assay พบว่า สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ 1-3 มีฤทธิ์ยับยั้ง Flu A (ตารางที่ 8) ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเอชไอวี (HIV-1) มีเกณฑ์ในการตัดสินคือ ไม่ให้ติดเชื้อในเซลล์ที่ใช้ทดสอบได้มากกว่าหรือเท่ากับ 90% ขึ้นไป จึงจะถือว่ามฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 ได้ในหลอดทดลอง โดยใช้วิธี Immuno-fluorescence Assay พบว่าสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ 1-3 มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 (ตารางที่ 9)

นอกจากนี้ ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อรา เริม มาลาเรีย วัณโรค cytotoxic และต้านอักเสบ ที่ความเข้มข้นต่างๆ นั้น พบว่า rosmarinic acid และ caffeic acid แสดงฤทธิ์เฉพาะการยับยั้งเชื้อวัณโรค (H37Ra strain) เท่านั้น โดยมีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) เท่ากับ 200 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารควบคุมบวก (positive control) คือ isoniazid มีค่า MIC เท่ากับ 0.250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมสมรรถนะสูงของสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา

DMP1 = 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 279.0 นาโนเมตร

DMP2 = rosmarinic acid ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 324.0 นาโนเมตร

DMP3 = caffeic acid ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 324.0 นาโนเมตร

ตารางที่ 7 ปริมาณเฉลี่ยแสดงเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w) ของสาร 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid, rosmarinic acid และ caffeic acid ในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาที่เตรียมด้วยวิธี freeze-dried

ตัวอย่างที่	ปริมาณ [calculated on dried basis (%w/w), n*=2]		
	3-(3,4-dihydroxyphenyl)- lactic acid (1)	rosmarinic acid (2)	caffeic acid (3)
1	0.8897	0.2172	0.1226
2	1.1246	0.3775	0.1384
3	1.5149	0.2760	0.0307
4	2.8654	0.2791	0.0361
5	1.9156	0.3753	0.0272
6	2.3511	0.2356	0.0279
7	2.2326	0.3564	0.0307
8	1.8441	0.9315	0.1362
9	1.9857	0.8695	0.1103
Average ± SD	1.86 ± 0.61	0.43 ± 0.27	0.07 ± 0.05

*n=duplicate injection

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Flu A/H3) ของสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาและสารบริสุทธิ์

ตัวอย่าง	% plaque reduction ต่อเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอที่ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)				
	10	5	2.5	1.25	0.125
สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา	80.28	55.62	-	-	-
3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (1)	-	55.63	24.63	-	-
rosmarinic acid (2)	-	-	76.81	40.94	-
caffeic acid (3)	-	-	-*	-*	34.78

*ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จากตัวทำละลาย DMSO

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-1) ของสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาและสารบริสุทธิ์

ตัวอย่าง	ร้อยละของการยับยั้ง HIV-1 ที่ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	100	25	6
สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา	>99	93.43	90
3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (1)	>99	98.56	90
rosmarinic acid (2)	>99	>99	96.87
caffeic acid (3)	96.87	34.37	0

วิจารณ์

จากผลการแยกสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคาเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Flu A/H3) จนได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค partition และคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัย²⁵⁻²⁷ (รูปที่ 1, ตารางที่ 1-6) พบว่าแยกสารได้ 3 ชนิด ซึ่งเป็นสารกลุ่มกรดฟีนอลิก ได้แก่ 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid ($C_9H_{10}O_5$) (**1**), rosmarinic acid ($C_{18}H_{15}O_8$) (**2**) และ caffeic acid [3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propenoic acid] ($C_8H_4O_5$) (**3**) โดย rosmarinic acid (**2**) เป็น es-

ter ของ 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (**1**) และ caffeic acid (**3**) จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Flu A/H3) ในหลอดทดลองด้วยเทคนิค plaque reduction พบว่าสารทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่โดยสารบริสุทธิ์ 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 5, 2.5 และ 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55.63%, 76.81% และ 34.78% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55.62% และ 80.28% ตามลำดับ ดังนั้น สารที่มีความแรงในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Flu A/H3) จากมากไป

น้อย คือ $3 > 2 > 1$ และสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา ตามลำดับ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV-1) ในหลอดทดลอง ด้วยวิธี immuno-fluorescence assay พบว่าสาร 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้เท่ากับ 90%, 96.87% และ 0% ตามลำดับ เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นไป 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสาร 1, 2 และ 3 สามารถยับยั้งได้เท่ากับ 98.56%, $\geq 99\%$ และ 34.37% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบน้ำแมงลักคา พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 ที่ IC_{50} เท่ากับ 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้น สารที่มีความแรงในการยับยั้งเชื้อ HIV-1 จากมากไปน้อย คือ $2 > 1$ และสารสกัดหยาบน้ำแมงลักคา > 3 ตามลำดับ นอกจากนี้จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ พบว่า 2 และ 3 มีฤทธิ์อ่อนๆ ในการยับยั้งเชื้อวัณโรค (H37Ra strain) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 200 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นั่นคือ ความแรงของ $3 > 2$

เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาด้วยวิธีโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงโดยใช้สาร 1-3 เป็นสารเทียบ พบว่า ปริมาณของสาร 1-3 ในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาที่เตรียมด้วยวิธี freeze-dried จำนวน 9 ตัวอย่าง พบว่า มีค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean \pm SD) คิดเป็นร้อยละ 1.86 ± 0.61 , 0.43 ± 0.27 , 0.07 ± 0.05 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แสดงว่าในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคามีสาร $1 > 2 > 3$ ซึ่งสอดคล้องเมื่อเทียบกับปริมาณสารสำคัญที่แยกได้ในการศึกษา ซึ่งมี % yield ในการแยกสาร 1-3 เท่ากับ 0.81, 0.033, 0.013 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อคำนวณเทียบกับสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา จากผลการศึกษา

ดังกล่าวทำให้ทราบว่าสาร 1 เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา จึงน่าจะเป็นสาเหตุให้สารสกัดน้ำชนิดหยาบดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเอดส์ได้ดีเท่ากับสาร 1 และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอได้น้อยเท่ากับสาร 1

ข้อสรุป

จากผลการศึกษาวิจัย พบว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากส่วนเหนือดินแมงลักคา [*Hyptis suaveolens* (L.) Poit. วงศ์ Lamiaceae] ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีและพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ NMR และ MS พบว่าสารดังกล่าวเป็นสารกลุ่มกรด ฟีนอลิก ได้แก่ 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (**1**), rosmarinic acid (**2**) และ caffeic acid (**3**) โดยสารที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเชื้อเอดส์ (HIV-1) คือ **1** และ **2** ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งได้ 90% และ 96.87% ตามลำดับ แต่สาร 3 ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวในความเข้มข้นเดียวกัน ส่วนสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งได้ 90% นั่นคือ สาร 1, 2 และสารสกัดน้ำชนิดหยาบมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอดส์ใกล้เคียงกัน สำหรับสารที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Flu A/H3) คือ **3** ที่ความเข้มข้น 0.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งได้ 34.78% และ rosmarinic acid ที่ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ 40.94% ตามลำดับ ดังนั้น caffeic acid มีฤทธิ์แรงกว่า rosmarinic acid ประมาณ 10 เท่า ในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ส่วนสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาที่

ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งได้ 55.62% แสดงว่าสารสกัดน้ำชนิดหยาบมีความแรงน้อยกว่า caffeic acid และ rosmarinic acid ประมาณ 40 และ 4 เท่า ตามลำดับ ในการยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ จากองค์ความรู้นี้สามารถนำสารที่แยกได้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพทางเคมีของสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาให้เหมาะสมกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการคือ ควรใช้ rosmarinic acid และ 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid เป็นสารเทียบในการควบคุมปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี (HIV-1) และควรใช้ caffeic acid เป็นสารเทียบในการควบคุมปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ (Flu A/H3) นอกจากนี้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร 1-3 ในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา 9 ตัวอย่าง พบว่าสาร 1 เป็นองค์ประกอบหลักทางเคมี โดยมีอัตราส่วนของค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร 1: 2: 3 ประมาณ 26: 6: 1 จึงทำให้สารสกัดหยาบน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเอชไอวีได้ดีเช่นเดียวกับสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 ดังนั้น การพัฒนาสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี จะมีความแรงเท่ากันกับการใช้สารบริสุทธิ์ ซึ่งหากใช้สารบริสุทธิ์ 1 และ 2 มาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ จะมีต้นทุนต่อหน่วยสูงกว่าการใช้สารสกัดมาก ถ้าต้องการพัฒนาความแรงในการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ ควรจะศึกษาตัดแปลงโครงสร้างทางเคมีจากอนุพันธ์ของ caffeic acid และหาความสัมพันธ์ของสูตรโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Structure Activity Relationship; SAR) เพื่อพัฒนาเป็นสารต้นแบบที่มีฤทธิ์ดีขึ้นเนื่องจาก caffeic acid มีราคาถูกและมีจำหน่ายใน

ท้องตลาด ในการศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานถึงการพบสาร 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid และ caffeic acid ในสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา ในขณะที่ rosmarinic acid เคยมีรายงานการวิจัยว่าแยกได้จากสารสกัดแมงลักคา¹⁷ รวมทั้งแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวีและไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิดเอในหลอดทดลองของสารสกัดน้ำชนิดหยาบจากแมงลักคา ซึ่งเป็นการสนับสนุนถึงภูมิปัญญาไทยในสรรพคุณของสมุนไพรแมงลักคา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สถาบันพฤกษศาสตร์คุนหมิง (Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, สาธารณรัฐประชาชนจีน) ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้อในการฝึกอบรมและทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. (เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด; 2544. หน้า 289.
2. ธวัชชัย รัตนขเลศ, เจมส์ เอฟ แมกซ์เวล. รายชื่อพืชที่มีรายงานพบในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: เวิร์คเพลส; 2540.
3. Duke JA, Ayensu ES. Medicinal plants of China. Vol. 2. Michigan: Reference Publications, Inc.; 1985. p. 369-70.
4. Wikipedia, the free encyclopedia. Hyptis suaveolens [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 March 1]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Hyptis_suaueolens
5. นันทวัน บุญยะประกาศ, อรุณช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. เล่ม 3. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2542. หน้า 778-80.
6. Backer CA, Bakhuizen van den Brick RC. Lamiaceae. Flora of Java 1965;2:633-5.

7. Keng H. Labiatae. *Flora Malesiana* 1978;8(3):301-72.
8. Burkill IH. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. Vol. 1. Kuala Lumpur: Art printing works; 1966. p. 1239-40.
9. Perry LM, Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia. Cambridge: MIT Press London; 1980. p.186-7.
10. Mungmee C. Weed growth inhibitor from *Hyptis suaveolens* Poit. (master thesis). Bangkok: Faculty of Sciences, Chulalongkorn University; 2002.
11. Ziegler HL, Jensen TH, Christensen J, Stærk D, Hägerstrand H, Sittie AA, et al. Possible artefacts in the in vivo determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: Apparent antiplasmodial activity of dehydroabietinol, a constituent of *Hyptis suaveolens*. *Planta Med* 2002;68:547-9.
12. Chukwujekwu JC, Smith P, Coombes PH, Mulholland DA, Staden JV. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *J Ethnopharmacol* 2005;102(2):295-7.
13. Raja Rao KV, Rao LJM, Prakasa Rao NS. An A-ring contracted triterpenoid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochem* 1990;29(4):1326-9.
14. Mukherjee KS, Mukherjee RK, Ghosh PK. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: A pentacyclic triterpene. *J Nat Prod* 1984;47(2):377-8.
15. Misra TN, Singh RS, Ojha TN, Upadhyay J. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. *J Nat Prod* 1981; 44(6):735-8.
16. Misra TN, Singh RS, Upadhyay J. A natural triterpene acid from *Hyptis suaveolens*. *Phytochem* 1983;22(11):2557-8.
17. เสาวนีย์ ประวัตติศรี, พันธุ์ทิพย์ ทิมสุกใส, อภิชาติ สุขสำราญ. ส่วนประกอบทางเคมีของต้นแมงลักคา. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 October 2005.
18. Rojas A, Hernandez L, Pereda-Mirinda R, Mata R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1992;35(3):275-83.
19. Shirwaikar A, Shenoy R, Udupa AL, Udupa SL, Shetty S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J Exp Biol* 2003;41(3):238-41.
20. Vera-Arzave C, Antonio LC, Arrieta J, Cruz-Hernández G, Velasquez-Mendez AM, Reyes-Ramírez A, et al. Gastroprotection of suaveolol, isolated from *Hyptis suaveolens*, against ethanol-induced gastric lesions in Wistar rats: role of prostaglandins, nitric oxide and sulfhydryls. *Molecules* 2012;17(8):8917-27.
21. Grassi P, Urías Reyes TS, Sosa S, Tubaro A, Hofer O, Zitterl-Eglseer K. Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Z Naturforsch C* 2006;61(3-4):165-70.
22. Gonzalez AG, Moujir L, Bazzocchi IL, Correa MD, Gupta MP. Screening of antimicrobial and cytotoxic activities of Panamanian plants. *Phytomed* 1994;1(2):149-53.
23. กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์. ([http://110.164.177.243/DIP Search/PatentSearch/SearchQuick.aspx](http://110.164.177.243/DIP_Search/PatentSearch/SearchQuick.aspx).) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. เรื่องการใช้สารสกัดด้วยน้ำจากแมงลักคา (*Hyptis suaveolens* Poit.) ในการรักษาภาวะติดเชื้อเอชไอวีและโรคเอดส์. อนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 068663. วันที่ยื่นคำขอ 28 กันยายน 2544.
24. Attawish A, Chivapat S, Chavalittumrong P, Phadungpat S, Bansiddhi J, Chaorai B. Chronic toxicity study of *Hyptis suaveolens* in rats. *Songklanakarin J Sci Technol* 2005;27(5):1-10.
25. Yahara S, Satoshiro M, Nishioka I, Nagasawa T, and Oura H. Isolation and characterization of phenolic compounds from *Coptidis rhizoma*. *Chem Pharm Bull* 1985;33(2):527-31.
26. Mehrabani M, Shams-Ardakani M, Ghannadi A, Dehkordi NG, Jazi SES. Production of rosmarinic acid in *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey. cell cultures. *Iranian J Pharm Res* 2005;2:111-5.
27. Jeong CH, Jeong HR, Choi GN, Kim DO, Lee UK, Heo HJ. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. *Chinese Med* 2011;6(25):1-9.

Abstract**Bioactive compounds of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. extract**

Prapai Wongsinkongman^{1*}, Apirak Sakpetch¹, Jaree Bansiddhi¹, Somchai Sanluangin¹, Tanavat Thongjin², Malinee Jittakarnpitcha³, Panasda Israngkoon Na Ayudhaya³, Noppamas Sonthornchareonnont⁴, Pranee Chavalittumrong⁵

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000.

² Regional Medical Sciences Center 2 Phitsanulok, Department of Medical Sciences, Phitsanulok 65000.

³ National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000.

⁴ Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400.

⁵ Senior Technical Advisors Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000.

¹*Corresponding author: prapai.w@dmsc.mail.go.th

From the preliminary screening activity experiment, it was found that the aqueous crude extract from the aerial part of wild spikenard [*Hyptis suaveolens* (L.) Poit., Family Lamiaceae] exhibited antiviral action against influenza A virus (Flu A) at 55.62% and 80.28% with concentrations of 5 and 10 mg/ml, respectively. Additionally, the extract showed inhibitory activity against HIV-1 virus at 90% using the concentration of 6 µg/ml. From the literature review, it was reported that this plant exhibited activities against *Herpes simplex virus* (HSV), *Candida albicans*, *Salmonella* sp. and *Plasmodium falciparum*. However, there was no report about antiviral activities against Flu A. Therefore, it was interesting to further isolate the bioactive compounds from the extract. As a result, three compounds (1-3) were purified using column chromatography and their chemical structures were elucidated using spectroscopic techniques, as well as comparison with reported data. These phenolic acids were identified as 3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid (1), rosmarinic acid (2) and caffeic acid (3). Compounds 1-3 showed inhibitory activity *in vitro* against Flu A, using plaque reduction assay, at 55.63%, 76.81%, and 34.78%, using the concentrations of 5, 2.5 and 0.125 mg/ml, respectively. The three compounds also exhibited inhibitory activity *in vitro* against HIV-1 virus at 90%, 96.87%, and 34.37%, using the concentrations of 6, 6 and 25 µg/ml, respectively. Therefore, three bioactive compounds can be used as markers for the quality control of the extract.

Key words: *Hyptis suaveolens*; aqueous extract; phenolic acids; antiviral activity