318

รายงานฉบับสมบูรณ์

การแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรผักคราดหัวแหวน

(Isolation and Biological Activities of *Spilanthes acmella* Murr.)

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผู้ร่วมวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพิณ วงศ์สวัสดิ์กุล
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รองศาสตราจารย์ ดร. ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา
ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

615.321
ส838ก

ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2549
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

248	การแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรผักคราดหัวแหวน : รายงานฉบับสมบูรณ์	สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล	615.321 ส838ก	31011104808621

615.321
ส838ก

ปริจาค

รายงานฉบับสมบูรณ์

การแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรผักคราดหัวแหวน

(Isolation and Biological Activities of *Spilanthes acmella* Murr.)

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ผู้ร่วมวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรพิณ วงศ์สวัสดิ์กุล
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รองศาสตราจารย์ ดร. ฉัตรเฉลิม อิศรางกูร ณ อยุธยา
ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ก.ค. 2553

ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2549
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

5 : 70601

บทคัดย่อ

ผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes acmella* Murr.) เป็นสมุนไพรวงศ์ Compositae เป็นไม้ล้มลุกอายุ 1 ปี สูงประมาณ 20-50 เซนติเมตร ชอบขึ้นตามที่ชื้นแฉะ หรือร่มเงาไม้ใหญ่ใกล้แหล่งน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินเหนียวและดินร่วน มีสรรพคุณทางยา เช่น ใช้เป็นยาชาแก้ปวดฟัน แก้เจ็บคอ รักษาแผล แก้โรคบิด แก้ไขข้ออักเสบ แก้ไอ ยาระบาย และขับปัสสาวะ นอกจากนี้ยังใช้ยอดอ่อนประกอบอาหารหรือรับประทานเป็นผักสด

การศึกษานี้ได้นำผักคราดหัวแหวนมาสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ทั้ง 4 ชนิด มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการทางchromatography พบสาร stigmasterol, stigmasterol – 3 – *O* – β – D – glucopyranoside, 3 – acetylaleuritolic acid, vanillic acid, β – sitostenone, scopoletin และ *trans* – ferulic acid รวมทั้งสารผสม triterpenes และ สารผสม fatty esters ได้ศึกษาโครงสร้างของสารดังกล่าวนี้โดยใช้เทคนิคทาง spectroscopy จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด คือ สารสกัด hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol มีผลทำให้หลอดเลือด arteries คลายตัวลักษณะ dose dependent โดยการสร้าง nitric oxide ที่ endothelial cell โดยที่สารสกัด chloroform ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้สูงสุด (R_{max} 80%) เมื่อเปรียบเทียบกับ acetylcholine (positive control) และพบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดลดลงอย่างมีค่านัยสำคัญ เมื่อเติม L-NAME (NOS inhibitor) ลงในหลอดเลือด โดยค่า R_{max} ของสารสกัดทุกชนิดโดยเฉพาะสารสกัด chloroform ลดลงเป็น 65.9% เมื่อเปรียบเทียบกับ acetylcholine ในการนำสารสกัด 4 ชนิด และสารที่แยกได้จาก column มาศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยวิธี agar dilution พบว่า สารสกัด chloroform มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ที่ความเข้มข้น 256 µg/mL สารกลุ่ม C3, C4, C5, C2.2, C2.3, C2.7 และ C3.2 ซึ่งแยกได้จากสารสกัด chloroform มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10356 ที่ความเข้มข้น 64 – 256 µg/mL สารกลุ่ม C4 ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Bacillus cereus* ที่ความเข้มข้น 128 และ 256 µg/mL ตามลำดับ สารสกัด ethyl acetate กลุ่ม E3, E4 และ E14 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10356 ที่ความเข้มข้น 64 µg/mL

Abstract

Spilanthes acmella Murr., a medicinal plant of family Compositae, known as para-cress or tooth-ache plant. It has long been used as traditional medicine for local anesthetic, antibacterial, antiviral, antihypertensive, antiinflammation and diuretic actions as well as anticough and laxative. Additionally, shoot tips of the plant are used as cooking ingredient and serving as fresh vegetable.

The *spilanthes acmella* Murr. was investigated by performing extraction and isolation of constituents then biological activity evaluation. Isolations of crude hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts using chromatographic methods afforded stigmasterol, stigmasterol – 3 – *O* – β – D – glucopyranoside, 3 – acetylaleuritolic acid, vanillic acid, β – sitostenone, scopoletin and *trans* – ferulic acid including a mixture of triterpenes and fatty esters. Structures of these compounds were elucidated by spectroscopic methods. Vasorelaxation effect of the crude hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts was investigated. It was found that all the crude extracts displayed vasorelaxation activity, on the arterties in the dose dependent manner, through endothelial cells producing nitric oxide. However, the crude chloroform extract exhibited highest vasorelaxation effect with R_{max} 80% comparing to the control, acetylcholine. In the presence of L–NAME (NOS inhibitor) the significant reductions of the vasorelaxation activity of all the crude extrats were observed. The R_{max} of crude chloroform extract was shown to be 65.9% comparing to the control. Antimicrobial activity of the crude extracts and the isolates was carried out using agar dilution method. The results showed that the crude chloroform extract exhibited antigrowth activity against *Streptococcus pyogenes* at 256 μg/mL. Fractions C3, C4, C5, C2.2, C2.3, C2.7 and C3.2 isolated from the crude chloroform extract inhibited the growth of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC10356 at 64 – 256 μg/mL. Furthermore, the fraction C4 displayed antigrowth activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus cereus* at 128 and 256 μg/mL. respectively. In addition, fraction E3, E4 and E14 of the ethyl acetate crude extracts showed antigrowth activity against *Corynebacterium diphtheriae* at 64 μg/mL.

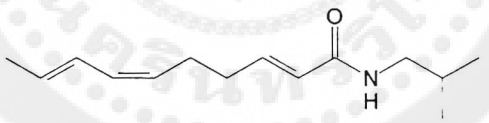
สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทนำ	1
การทดลอง	4
ผลการทดลอง	8
สรุป	17
เอกสารอ้างอิง	21
กิตติกรรมประกาศ	

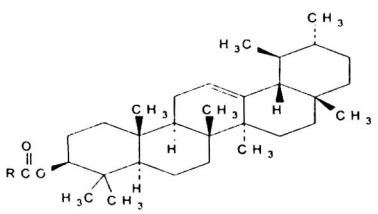
บทนำ

ผักคราดหัวแหวน *(Spilanthes acmella* Murr.*)* เป็นสมุนไพรวงศ์ Compositae[1,2,3] เป็นไม้ล้มลุกอายุ 1 ปี สูงประมาณ 20-50 เซนติเมตร ชอบขึ้นตามที่ชื้นแฉะ หรือร่มเงาไม้ใหญ่ใกล้แหล่งน้ำ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินเหนียวและดินร่วน มีสรรพคุณทางยา เช่น ใช้เป็นยาชา แก้ปวดฟัน แก้เจ็บคอ รักษาแผล แก้โรคบิด แก้ไขข้ออักเสบ แก้ไอ ยาระบาย และขับปัสสาวะ[4-6] นอกจากนี้ยังใช้ยอดอ่อนประกอบอาหารหรือรับประทานเป็นผักสด

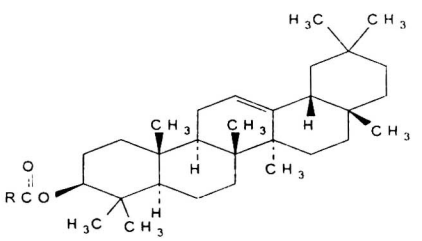
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรผักคราดหัวแหวน พบว่าส่วนดอกของสารสกัด ethanol มีสาร spilanthol[7] (**1**) และสารสกัด hexane จากดอกของ *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke มีสาร spilanthol (**1**) undeca – 2*E*,7*Z*,9*E*-trienoic acid isobutylamide (**8**) และ undeca-2*E*-en-8,10-diynoic acid isobutylamide[8] (**9**) เมื่อนำทั้งต้นของผักคราดหัวแหวนมาสกัดด้วย petroleum ether และทำการแยก พบว่ามีสาร α- และ β-amyrin ester[9] (**2 และ 3**) stigmasterol (**4**) spilanthol (**1**) และ myricyl alcohol[9] (**5**) นอกจากนี้ยังพบสาร sitosterol-*O*-β-D-glucoside (**6**) และolean-12-en-3-*O*-β-D-galactopyranosyl (1→4)-*O*-α-L-rhamno pyranoside (**7**) จากส่วนรากของสารสกัด ethanol[10] จะเห็นได้ว่ายังไม่มีการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัด hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol ของต้นผักคราดหัวแหวน



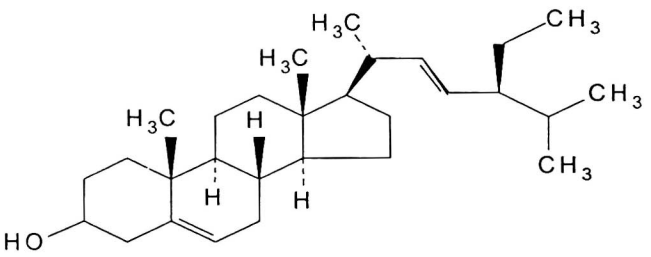
spilanthol **(1)**



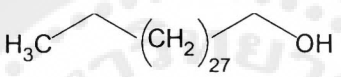
α - amyrin ester **(2)**



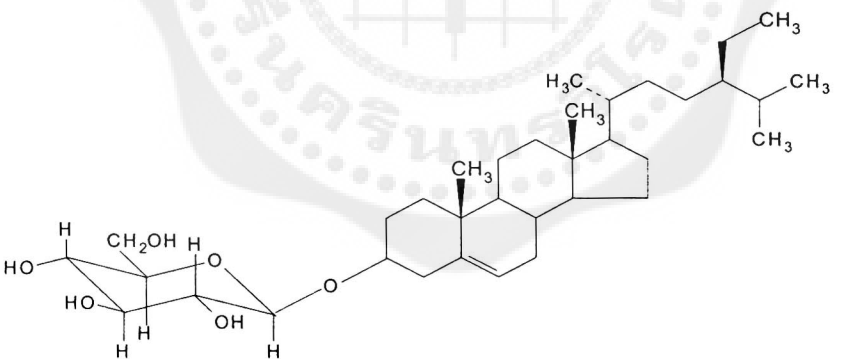
β - amyrin ester **(3)**



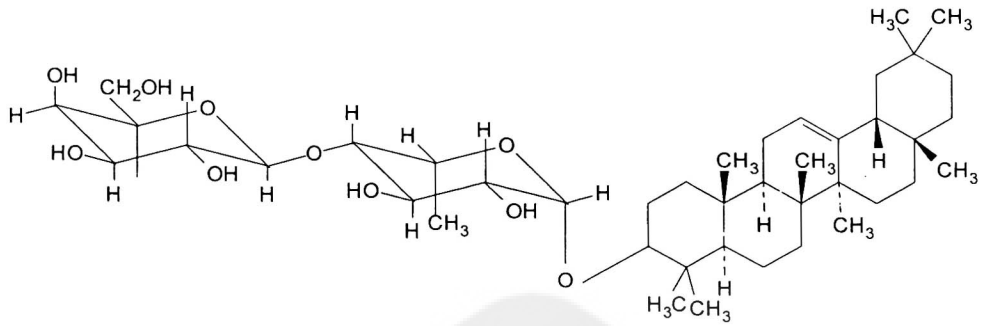
stigmasterol **(4)**



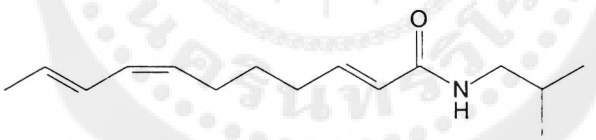
myricyl alcohol **(5)**



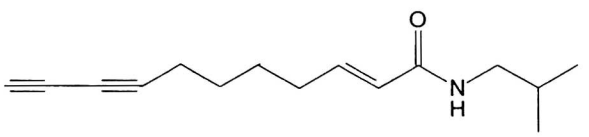
sitosterol-*O*-β-D-glucoside **(6)**



olean-12-en-3-*O*-*β*-D-galactopyranosyl(1→4)-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside **(7)**



undeca-2*E*,7*Z*,9*E*-trienoic acid isobutylamide **(8)**



undeca-2*E*-en-8,10-diynoic acid isobutylamide **(9)**

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสมุนไพรผักคราดหัวแหวนมีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่[11] แก้ปวด[12] ขับปัสสาวะ[13] ต้านไวรัส[6] และต้านแบคทีเรีย[13a] โดยใช้สารสกัด ethanol ของดอกและก้าน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Streptococcus pyogenes* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 23 และ 100 mg/mL ตามลำดับ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อทำการแยกและศึกษาโครงสร้างของสารจากสมุนไพรผักคราดหัวแหวน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัด และสารที่แยกได้จากสมุนไพรผักคราดหัวแหวน
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรผักคราดหัวแหวนต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนู rat

การทดลอง

I. การสกัด การแยกสารและการศึกษาโครงสร้างของสารจากสมุนไพร ผักคราดหัวแหวน

การสกัดสาร นำผักคราดหัวแหวนแห้งบดละเอียด 5 kg สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane โดยแช่ใน hexane 7 วัน กรองและระเหยให้แห้งด้วย เครื่องกลั่นระเหยลดความดัน ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ ทำการสกัดซ้ำด้วย hexane อีก 2 ครั้ง ได้สารสกัด hexane รวม 57 g

โดยวิธีเดียวกันนำกากผักคราดหัวแหวนไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย chloroform, ethyl acetate และ methanol ได้สารสกัด chloroform 55 g สารสกัด ethyl acetate 95 g และสารสกัด methanol 170.7 g ตามลำดับ

การแยกสารสกัด ใช้วิธี column chromatography โดยมี silica gel เป็นตัวดูดซับและชะสารออกจาก column ด้วยตัวทำละลาย (gradient elution) ระเหยให้แห้ง ทำ Thin Layer Chromatography (TLC chromatogram) รวมสารที่แยกได้เป็นกลุ่มๆ โดยพิจารณาจาก TLC chromatogram

1. สารสกัด hexane ทำการแยกสารสกัด hexane 55 g ด้วย silica gel 1000 g ชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane-CH_2Cl_2, CH_2Cl_2 และ CH_2Cl_2-MeOH เก็บสารละลายที่ชะออกจาก column นำไประเหยให้แห้ง รวมสารเข้าด้วยกันโดยพิจารณาจาก TLC chromatogram ได้สาร 10 กลุ่ม ลักษณะหนืดเป็นสีเขียวเข้ม (H1-H10)

นำสารกลุ่ม H1, H3 และ H8 ไปแยกต่อด้วย column ชะด้วย hexane , hexane-CH_2Cl_2 , และ CH_2Cl_2-MeOH ตามลำดับ

กลุ่ม H1, H7 และ H8 ได้ stigmasterol 3.7 2.3 และ 1.8 mg ตามลำดับ

กลุ่ม H3 ได้ stigmasterol 7.1 mg และของผสม triterpene

2. สารสกัด chloroform แยกสารสกัด chloroform 50 g ด้วย silica gel 1000 g ชะด้วยตัวทำละลาย hexane - EtOAc และ EtOAc - MeOH ได้สาร 12 กลุ่ม ลักษณะเป็น wax สีเขียวเข้ม (C1-C12)

นำสารกลุ่ม C2, C3, C4 และ C5 ไปทำการแยกต่อดังนี้

การแยกสารกลุ่ม C2 นำสารกลุ่ม C2 น้ำหนัก 6.5 g ไปแยกด้วย silica gel 150 g ชะด้วยตัวทำละลาย hexane - $CHCl_3$, $CHCl_3$ - EtOAc และEtOAc - MeOH ได้สาร 8 กลุ่ม ลักษณะเป็น wax เขียวเข้ม (C2.1-C2.8)

นำสารกลุ่ม C2.6 น้ำหนัก 1.0 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 40 g ชะด้วยตัวทำละลาย $CHCl_3$ - MeOH ได้สาร 6 กลุ่ม (C2.6.1- C2.6.6)

นำสารกลุ่ม C2.7 น้ำหนัก 0.47 g ไปแยกด้วย silica gel 35 g ชะด้วยตัวทำละลาย $CHCl_3$ - EtOAc ได้สาร 4 กลุ่ม (C2.7.1- C2.7.4)

การแยกสารกลุ่ม C3

นำสารกลุ่ม C3 น้ำหนัก 5.43 g ไปแยกด้วย silica gel 170 g ชะด้วยตัวทำละลาย $CHCl_3$ - EtOAc และ EtOAc - MeOH ระเหยให้แห้งได้สาร 6 กลุ่ม (C3.1- C3.6)

นำสารกลุ่ม C3.1 น้ำหนัก 0.43 g. ไปแยกด้วย silica gel 70 g ชะด้วยตัวทำละลายHexane - $CHCl_3$ และ$CHCl_3$ - EtOAc ได้สาร 6 กลุ่ม (C3.1.1- C3.1.6)

นำสารกลุ่ม C3.3 น้ำหนัก 2.84 g ไปแยกด้วย silica gel 60 g ชะด้วยตัวทำละลาย Hexane - $CHCl_3$ และ$CHCl_3$ - EtOAc ได้สาร 8 กลุ่ม คือ C3.3.1- C3.3.8 สารกลุ่ม C3.3.5 ลักษณะเป็นของแข็ง นำไปตกผลึกด้วย MeOH ได้ของแข็งสีขาว 0.06 g m.p. 151-152 °C (stigmasterol)[14]

การแยกสารกลุ่ม C4

นำสารกลุ่ม C4 น้ำหนัก 3.65 g มาแยกด้วย silica gel 150 g ชะด้วยตัวทำละลาย Hexane - EtOAc และ EtOAc ได้สาร 12 กลุ่ม คือ C4.1- C4.12

นำสารกลุ่ม C4.1 เป็น wax สีดำอมเขียวปนของแข็ง นำมาตกผลึกด้วย MeOH ได้ของแข็งน้ำหนัก 0.085 g มี m.p. 61-71 °C (ของผสม long chain fatty ester)

นำสารกลุ่ม C4.2 น้ำหนัก 1.15 g ไปแยกด้วย silica gel 54 g ชะด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2- EtOAc ได้สาร 7 กลุ่ม คือ C 4.2.1 – C 4.2.7

การแยกสารกลุ่ม C5

นำสารกลุ่ม C5 น้ำหนัก 3.13 g มาแยกด้วย silica gel 170 g ชะด้วยตัวทำละลาย $CHCl_3$ - EtOAc และ EtOAc - MeOH ได้สาร 8 กลุ่ม ดังนี้ คือ C 5.1 – C 5.8

สารกลุ่ม C8 เมื่อตั้งไว้มีผลึกสีเขียวอ่อนเกิดขึ้น จึงแยกออกมาได้น้ำหนัก 0.1034 g. แล้วนำมาตกผลึกด้วย $CHCl_3$ - MeOH ได้สาร **C-8** ผลึกขาวหนัก 15.4 mg จุดหลอมเหลว 261-262 °C (stigmasterol – 3 – *O* – β – D – glucopyranoside)[27]

3. สารสกัด ethyl acetate ทำการแยกสารสกัด ethyl acetate 50 g ด้วย silica gel 1500 g ชะด้วยตัวทำละลาย EtOAc-$CHCl_3$ และ EtOAc-MeOH ได้สาร 14 กลุ่ม (E1-E14) ลักษณะหนืดสีเขียวเข้ม

นำสารกลุ่ม E5, E6, E8 และ E12 ไปแยกต่อดังนี้

การแยกสารกลุ่ม E5 นำสารกลุ่ม E5 3.49 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 190 g ชะด้วย EtOAc-hexane (4: 6) ได้สาร **A** 23.7 mg m.p. 299-300 °C (3-acetylaleuritolic acid)[15-16]

การแยกสารกลุ่ม E6 นำสารกลุ่ม E6 2.78 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 160 g ชะด้วย EtOAc-hexane (1: 1) ได้สาร **B** 3.8 mg m.p. 210-212 °C (vanillic acid)[17-19]

การแยกสารกลุ่ม E8 นำสารกลุ่ม E8 2.61 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 160 g ชะด้วย EtOAc – $CHCl_3$ (7: 3) ได้สาร **C** 4 mg m.p. 97 – 99°C (β-sitostenone)[20-21]

การแยกสารกลุ่ม E12 นำสารกลุ่ม E12 3.16 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 280 g ชะด้วย MeOH – $CHCl_3$ (1: 9) ได้สาร 3.4 mg (unidentified)

4. สารสกัด MeOH นำสารสกัด MeOH 40 g มาแยกด้วย silica gel 140 g ชะด้วยตัวทำละลาย MeOH -$CHCl_3$ (1:9) ได้สาร 5 กลุ่ม (M1-M5) ลักษณะเหนียวดำเข้ม

นำสารกลุ่ม M2 และ M3 ไปทำการแยกต่อดังนี้

การแยกสารกลุ่ม M2 นำสารกลุ่ม M2 3.12g ไปแยกต่อด้วย silica gel 110 g ชะด้วย MeOH : $CHCl_3$ (15 : 85) ได้สาร **D** 3.2 mg m.p. 205 – 206 °C (scopoletin)[22-24]

การแยกสารกลุ่ม M3 นำสารกลุ่ม M3 4.25 g ไปแยกต่อด้วย silica gel 110 g ชะด้วย MeOH – $CHCl_3$ (1 : 9) ได้สาร **E** 5.1 mg m.p. 168 - 169 °C (*trans*-ferulic acid)[25-26]

II. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดและสารที่แยกได้จากสมุนไพรผักคราดหัวแหวน

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพโดยวิธี agar dilution (Baron, E. J., Peterson, L. R., and Finegold, S. M. 1994 : 168) โดยนำเชื้อจุลชีพมาเพาะเลี้ยงใน tryptic soy broth ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard เบอร์ 1 แล้ว inoculate ลงใน Müeller-Hinton plate ที่มีความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบตามที่ปรับไว้ (ในช่วงความเข้มข้น 2-256 μg/mL) โดยใช้ automatic multipoint inoculator นำไปอบที่ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพโดยเทียบกับ control Müeller-Hinton plate ที่เตรียมโดยวิธีเดียวกันแต่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ โดยเกรดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพใน control plate เป็น 4 แล้วลดลงตามปริมาณเชื้อที่ขึ้นในแต่ละ plate เป็น 3 2 1 และ 0 (เมื่อไม่เห็นเชื้อขึ้น) ตามลำดับ

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ 27 ชนิด ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และเชื้อรา ดังนี้

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- *Citrobacter freundii,*
- *Edwardsiella tarda*
- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311
- *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708
- *Shigella dysenteriae*
- *Morganella morganii*
- *Vibrio cholerae*
- *Vibrio mimicus*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Plesiomonas shigeloides*
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Strenotrophomonas (Xanthomonas) maltophila*
- *Neisseria mucosa*
- *Branhamella catarrhalis*
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Streptococcus pyogenes*
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Micrococcus lutens* ATCC 10240
- *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10356
- *Listeria monocytogenes*
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 90028
- *Bacillus cereus*
- *Micrococcus flavas*

สารที่ทดสอบ

- สารสกัดสมุนไพรผักคราดหัวแหวน 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัด hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol
- สารที่ได้จากการแยก column
  - สารกลุ่ม C2-C12 (11 กลุ่ม)
  - สารกลุ่ม C2.2, C2.3 และC2.7 (3 กลุ่ม)
  - สารกลุ่ม C3.2
  - สารกลุ่ม E1-E14 (14 กลุ่ม)
  - สารกลุ่ม M1-M5 (5 กลุ่ม)
  - สาร **A, B** และ **C-8**

III. การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรผักคราดหัวแหวนต่อการทำงานของหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat

ใช้สารสกัดสมุนไพรผักคราดหัวแหวน 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัด hexane, chloroform, ethyl acetate และ methanol

วิธีที่ใช้ทำการศึกษา อ้างอิงจาก Woodman,OL.,Wongsawatkul, O. and Sobey,CG., "Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K^+ channel to acetylcholine induced dilation of rat

conduit and resistance arteries", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,2000 :27,32-34.* มีวิธีการดังนี้

1. ใช้หนู Sprague-Dawley เพศผู้น้ำหนัก 170 – 250 g จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำให้สลบด้วยการฉีด ketamine hydrochloride เข้าใต้กล้ามเนื้อขา (0.03 mL/kg) นำหลอดเลือด thoracic aorta ออกและแช่ในสารละลาย Kreb-Henseleit ที่เย็น หลังจากกำจัด debris tissue ออกแล้ว ตัดหลอดเลือดให้มีความยาว 2 – 3 mm

2. แขวนหลอดเลือดใน organ bath ที่บรรจุด้วยสารละลาย Kreb-Henseleit อุณหภูมิ 37 °C และมีแกส 95% O_2 และ 5% CO_2 ไหลเวียนตลอดเวลา ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง force-displacement transducer ตั้งไว้ (incubate) 50 – 60 นาทีภายใต้แรงตึง 1 g (resting tesion)

3. หลังจากนั้นทำการวัดค่าการหดตัวสูงสุด (maximum contraction) ของหลอดเลือดโดยใช้ phenylephrine (PE) 10^{-5} M อ่านค่า isometric tension จากเครื่อง McIntosh Mac Lab ซึ่งต่อเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์ แล้วล้างสาร PE ออกจากหลอดเลือดด้วย Kreb-Henseleit หลายๆครั้ง ตั้งไว้ 45 นาที

4. จากนั้นเติม phenylephrine (PE) 10^{-7} M เพื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 60 % ทำการวัดการคลายตัวของหลอดเลือด (submaximal tension) เพื่อทดสอบ endothelial intact โดยใช้ acetylcholine (Ach) 10^{-5} M (high dose) หลอดเลือดที่จะนำมาทดสอบต่อไปต้องมีค่าการคลายตัวของหลอดเลือด $\geq$ 80%

5. ทำการล้างหลอดเลือดหลาย ๆ ครั้งด้วย Kreb-Henseleit เพื่อกำจัด ACh ออก ตั้งไว้ 45 นาที หลังจากนั้นเติม phenylephrine (PE) 10^{-7} M เพื่อทำให้หลอดเลือดหดตัวสูงสุด 60% และเติมสารตัวอย่างที่จะทำการทดสอบ หรือ ACh (control) ที่ความเข้มข้นต่างๆลงในแต่ละ Chamber เพื่อวัดการคลายตัวของหลอดเลือดและนำค่าที่ได้ไป plot กราฟ (dose response curve)

6. ก่อนสิ้นสุดการทดลองทุกครั้งเติม SNP (sodium nitropusside) ที่ความเข้มข้น10^{-5} M เพื่อทดสอบสภาพการทำงานของหลอดเลือด

7. ทำ dose-response curve ของ SNP ที่มี L-NAME เทียบกับ control

8. วิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยใช้ one way ANOVA ทดสอบด้วย Student-Newman-Keuls Method เพื่อหาค่านัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และหาค่า ED_{50} ของการคลายตัวของหลอดเลือด โดยใช้ nonlinear regression

ผลการทดลอง

I. การแยกสารและการศึกษาโครงสร้างของสารจากสมุนไพรผักคราดหัวแหวน ได้ทำการสกัดและแยกสารด้วย column chromatography และทำการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้โดยเปรียบเทียบข้อมูลทาง spectroscopy และจุดหลอมเหลวกับสารที่ได้มีการรายงานไว้แล้ว สรุปได้ดังนี้

การแยกสารสกัด hexane สามารถแยกสาร stigmasterol และสารผสม triterpene

การแยกสารสกัด chloroform สามารถแยกสาร stigmasterol, stigmasterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside **(C-8)** และของผสม long chain fatty ester

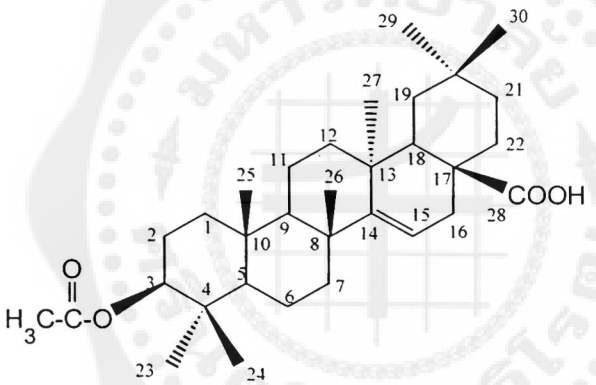
การแยกสารสกัด ethyl acetate สามารถแยกสาร ได้ 3 ชนิด คือ 3-acetylaleuritolic acid **(A),** vanillic acid **(B)** และ β-sitostenone **(C)**

การแยกสารสกัด methanol แยกสารได้ 2 ชนิด คือ scopoletin **(D)** และ *trans*-ferulic acid **(E)**

ข้อมูลทาง Spectroscopy

สาร A

[3-acetylaleuritolic acid, 3-β-*O*-acetyltaraxer-14-en-28-oic]



Physical characteristic: white crystal from methanol
m.p. 299-300°C, (lit[15] 302-304 °C, lit[16] 304-305 °C)

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}:
3435, 2935,1734,1686,1364.1242,1026 (lit[16] 3416, 2938,1732,1685, 1470,1365, 1295, 1245,1028)

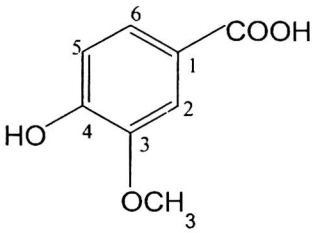
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.47(1H, *dd*,*J* = 3.40, 7.90 Hz,H-15), 4.39(1H, *dd*, *J* =5.50, 10.00 Hz, H-3), 1.97(3H, *s*,$COOCH_3$), 0.86(3H,*s*, H-24), 0.81(3H,*s*, H-27), 0.78 (3H,*s* H-25), 1.18(3H,*s* H-26)

^{13}C NMR ($CDCl_3$,100 MHz) δ 37.88(C-4), 39.00(C-8), 37.87(C-10), 37.37(C-13), 160.53 (C-14), 116.59(C-15), 51.44(C-17), 29.22(C-20), 171.06 ($COOCH_3$), 184.03 (COOH), 80.88(CH-3), 55.59(CH-5),49.03(CH-9),41.58 (CH-18), 40.83(CH_2-7), 37.37 (CH_2-1), 35.33(CH_2-19), 33.64(CH_2-12), 33.30(CH_2-21), 31.43(CH_2-16), 30.76(CH_2-22), 23.42(CH_2-2),18.64(CH_2-6), 17.26(CH_2-11) 31.92(CH_3- 29), 28.65(CH_3-30), 27.91(CH_3-23),26.02(CH_3-26), 22.46(CH_3-27), 21.21($COOCH_3$), 16.52 (CH_3-24), 15.52 (CH_3-25)

MS *m/z* (% relative intensity):
329(3), 269(7), 234(7), 189(100) 133(21),119(50) [lit[15]498 (M^+,0.2),483(1), 438 (4), 248(33),234(100),189(69)]

สาร B

[vanillic acid , 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid]



Physical characteristic: white crystal from chloroform
m.p. 210-212 °C (lit [17] 213-214 °C)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε):
253(3.41), 286(3.47) (lit[18] in ethanol 260, 290)

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}:
3485,2955,1686,1598,1547,1523,1473,1299,1239 ,1205,1113, 918, 882, 819
(lit17 3745, 2940,1682,1600,1247,1212)

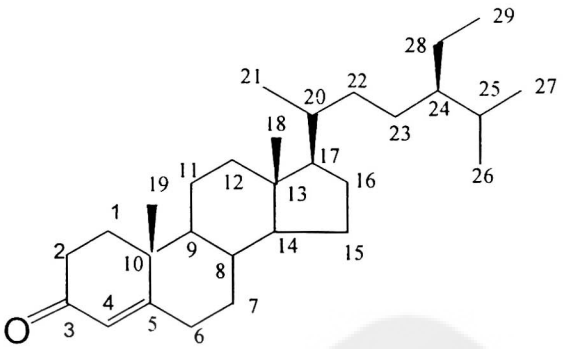
^{1}H NMR (CD_3OD+$CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.55 (1H, *d, J* =1.90 Hz, H-2), 7.59 (1H, *dd, J* = 1.90, 8.20 Hz ,H-6), 6.88(1H, d. *J* =8.20 Hz, H-5), 3.92(3H, *s.* OCH_3)

^{13}C NMR (CD_3OD+$CDCl_3$,100 MHz) δ 169.11(CO),150.81 (C-1),147.00 (C-3),·124.22 (C-6), 121.90(C-4), 114.56(C-5), 112.63(C-2), 55.68(OCH_3)

MS *m/z* (% relative intensity):
168(M^+,100),153(72),125(35).97(55) 77(5) [lit[19] 168 (M^+.100),153(77),125(23), 77(55)]

สาร C

β-sitostenone (stigmast-4-en-3-one, 24α-ethyl-cholest-4-en-3-one)



Physical characteristic: white crystal from methanol
m.p. 97-99°C, (lit[20] 95-96°C)

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}:
2936,1681,1464,1378,1228 (lit[21] 2959, 2983,2874,1663, 1614,1467,1378,1232)

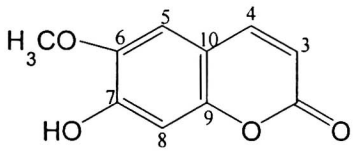
^{1}H NMR ($CDCl_3$,400 MHz) δ 5.74(1H,*s*,H-4), 0.71(3H,*s*,H-18), 0.80-1.10 (*m*,H-21,26,27, 29),1.18 (3H,*s*,H-19).

^{13}C NMR ($CDCl_3$,100 MHz) δ 29.64(CH-25), 35.60(CH-8), 36.07(CH-20),45.81(CH-24), 53.79(CH-9), 55.85(CH-14), 55.99(CH-17),123.69 (CH-4),11.14(CH_3-29), 11.90 (CH_3-18), 18.65(CH_3-19),18.98(CH_3-21),19.75(CH_3-27), 20.99(CH_3-26),21.10 (CH_2-11), 23.04(CH_2-28), 24.14(CH_2-15), 26.08(CH_2-23), 28.13(CH_2-16), 32.91 (CH_2-7), 33.86 (CH_2-6), 33.93 (CH_2-2), 35.65 (CH_2-22), 36.06 (CH_2-1), 38.57 (CH_2-12), 39.59(C-10), 42.35(C-13), 171.64(C-5),199.58 (C=O)

MS *m/z* (% relative intensity):
412(M^+,13), 397(27),370(13),288(26),271(39),229(92),187(26),173(46),147(57), 124(100) [lit[21] 412(M^+13), 397(2), 370(5), 288 (8), 271(7), 245(3), 229(45),187 (13),173 (12),147(32),124(100)]

สาร D

[scopoletin , 7-hydroxy-6-methoxycoumarin]



Physical characteristic: yellowish needle crystal from chloroform
m.p.205-206 °C (lit[22] 203-204°C)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε):
294(3.68), 344(4.07) [lit[22] in methanol 297 (3.68), 345(4.04)]

FTIR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}:
3333, 1702, 1566, 1437 (lit[23] 3330, 1670, 1615, 1595, 1550, 1490)

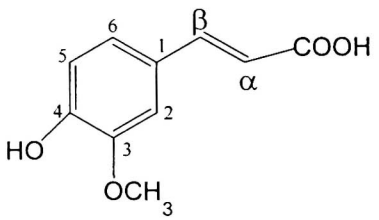
^{1}H NMR (CD_3OD,400 MHz) δ 6.23(1H, *d*,*J* = 9.42 Hz, H-3), 7.89(1H,*d*,*J* = 9.42 Hz,H-4), 6.82 (1H, *s*, H-8), 7.14(1H, *s*, H-5), 3.91(3H, *s*, OCH_3), 8.10(1H, *s*, OH)

^{13}C NMR (CD_3OD,100 MHz) δ 163.00(CO),150.00(C-9),149.00(C-7),146.00(C-6),144.91 (C-4), 111.15(C-3),110.00(C-10),108.63(C-5), 102.57 (C-8), 55.51(OCH_3)

MS *m/z* (% relative intensity):
192(M^+,100),177(28),164(41),121(37) [lit[24] 192(M^+,100),180(40),154(48),135(52) (121(18)]

สาร E

[*trans*-ferulic acid , *trans*-4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid]



Physical characteristic: browish crystal from chloroform
m.p.168-169 °C (lit[25] 168-169 °C)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ε):
289 (3.83), 318 (3.86) [lit [18] in ethanol 298.3 (sh), 322.5)]

FT IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1}:
3437,1691,1665,1517 (lit[26] 1671,1641,1512, 1323,1264,1209,1137,1025, 818)

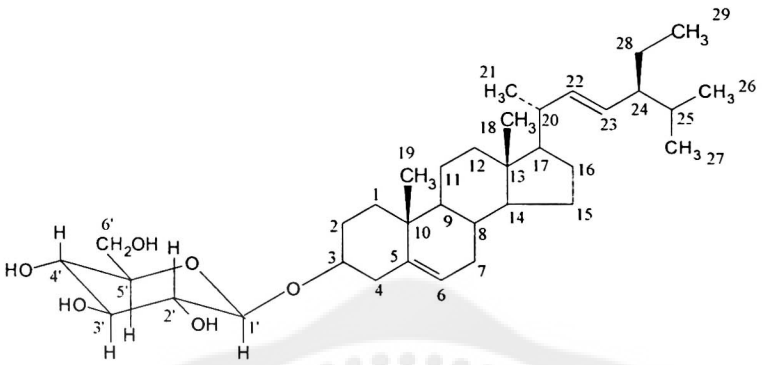
^{1}H NMR (CD_3OD, 400 MHz) δ 7.18(1H, *d*, *J*=1.93 Hz, H-2), 7.07 (1H, *dd*, *J*=1.93, 8.23 Hz,H-6), 6.82(1H, *d*, *J*=8.23 Hz, H-5),6.31(1H, *d*, *J*=15.88 Hz, H-α), 7.59 (1H, *d*, J=15.88 Hz, H-β), 3.89 (3H, *s*, OCH_3)

^{13}C NMR (CD_3OD, 100 MHz) δ 171.19 (CO), 151.50 (C-3), 149.90 (C-4) , 127.76 (C-1), 123.97(C-6), 116.46(C-5),115.89 (C-α),111.64(C-2),146.95(C-β), 56.45(OCH_3)

MS *m/z* (% relative intensity):
194(M^+,100), 179(16), 161(5), 148(6), 133(17), 105(5), 77(6)

สาร C-8

Stigmasteryl-3-*O*-β-D-glucopyranoside



Physical characteristic: white powder from chloroform-methanol
mp 261-262 ^{0}C (Lit[27] mp 261-262 ^{0}C)
IR(KBr)ν_{max}3447(OH), 1636, 1473, 1165, 1078, 1022 cm^{-1}.
^{1}H NMR($CDCl_3$ + CD_3OD) : δ 0.64-2.50(m, CH , CH_2 , CH_3), 3.20-3.90(m, 2′, 3′,4′,5′, 6′-H), 3.56-3.64(m, H-3), 4.42(d, J=7.83 Hz, 1′-H), 5.03(dd, 1H, J=15.66, 8.75 Hz, CH=CH), 5.17(dd, 1H, J=15.63, 8.62 Hz, CH=CH), 5.38(t, 1H, J = 3.59, H-6).
^{13}C NMR($CDCl_3$ + CD_3OD) : δ 36.9 (C-1), 29.3(C-2), 69.2(C-3), 41.9(C-4), 140.0(C-5), 121.9(C-6), 31.6(C-7, C-8), 49.94(C-9), 36.5(C-10), 22.8(C-11), 39.5(C-12), 42.1(C-13), 56.6(C-14), 24.0(C-15), 28.9(C-16), 55.8(C-17), 11.7(C-18), 19.5(C-19), 40.3(C-20), 20.9(C-21), 138.1(C-22), 129.0(C-23), 51.02(C-24), 33.6(C-25), 19.0(C-26), 20.8(C-27), 25.2(C-28),11.9(C-29), 100.8(C-1′), 73.3 (C-2′), 76.1(C-3′), 69.5(C-4′), 76.7(C-5′), 61.2(C-6′).
EIMS m/z 412(7), 393(57), 394(82), 381(31), 300(76), 287(65), 255(100), 227(37), 213(61), 147(87), 145(92), 105(65), 91(85).

Stigmasterol (4)

Physical characteristic : white powder, from methanol mp 151-155 ^{0}C (Lit[14] mp 166 ^{0}C, mp 169-170 ^{0}C)
IR(KBr)ν_{max} 3424 (OH), 2937, 1464, 1382, 1054 cm^{-1}.
^{1}H NMR($CDCl_3$) : δ 0.60-1.05 (m, CH_3), 1.05-2.30(m, CH, CH_2), 3.50(m, H-3), 4.49-5.16(m,H-6, H-22, H-23), 5.35(brs, H-6).
^{13}C NMR($CDCl_3$) : δ 37.2(C-1), 31.6(C-2), 71.8(C-3), 42.2(C-4), 140.6(C-5), 121.6(C-6), 31.9(C-7,C-8), 50.1(C-9), 36.5(C-10), 21.0(C-11), 39.7(C-12), 42.2(C-13), 56.8(C-14), 24.3(C-15), 28.9(C-16), 56.0(C-17), 12.0(C-18), 19.4(C-19), 40.5(C-20), 21.0(C-21), 138.3(C-22), 129.2(C-23), 51.21(C-24), 31.87(C-25), 21.2(C-26), 19.0(C-27), 25.3(C-28), 12.23(C-29).
EIMS m/z 412(M^+, 1.5), 273(30), 271(43), 255(65), 231(42), 213(69), 185(34), 159(100).

II. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดและสารที่แยกได้จากสมุมไพรผักคราดหัวแวน

สารสกัด chloroform มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. pyogenes* ที่ความเข้มข้น 256 µg/mL

สารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทุกชนิดที่ใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 256 µg/mL

สารที่แยกได้จาก column แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ดังนี้

สารกลุ่ม	เชื้อจุลชีพ	MIC (µg/mL)
C3	*C.diphtheriae* NCTC 10356	64
C4	*C.diphtheriae* NCTC 10356 *B.subtilis* ATCC 6633 *B.cereus*	64 128 256
C5	*C.diphtheriae* NCTC 10356	128
C2.2	*C.diphtheriae* NCTC 10356	256
C2.3	*C.diphtheriae* NCTC 10356	256
C2.7	*C.diphtheriae* NCTC 10356	256
C3.2	*C.diphtheriae* NCTC 10356	256
C2,C6-C12	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	
E3, E4, E14	*C.diphtheriae* NCTC 10356	64
E1,E2,E5-E13	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	
M1-M5	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	
สาร **A**	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	
สาร **B**	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	
สาร **C-8**	ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ	

III. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผักคราดหัวแหวนต่อการทำงานของหลอดเลือดหนู rat

การศึกษาผลของ ACh และ SNP ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat

จากการทดลองพบว่า ACh และ SNP (ความเข้มข้น 10^{-9} – 10^{-4} M) มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวสูงสุด (R_{max}) ได้ 119% และ 120% โดยมีค่า ED_{50} 7.88 x 10^{-7} M และ 1.73 x 10^{-7} M ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ACh ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยการสร้าง nitric oxide (NO) เพื่อสนับสนุนการคลายตัวของหลอดเลือดดังกล่าว ได้ศึกษา Dose response curve ของ ACh โดยเติม L-NAME 1 mM ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง nitric oxide synthase (NOS inhibitor) พบว่าค่า R_{max} ของ ACh ลดลงเป็น 81% และมีค่า ED_{50} 4.16 x 10^{-7} M แต่ไม่มีผลต่อ R_{max} ของ SNP ซึ่งมีค่า ED_{50} 3.17 x 10^{-7} M จะเห็นได้ว่า ACh ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยมี NOS enzyme เป็นตัวสร้าง NO ดังรูป 1

ผลของสารสกัด hexane ต่อหลอดเลือด thoracic aorta

ทำการศึกษา dose response curve ของสารสกัด hexane ซึ่งละลายใน polyethylene glycol (PEG) พบว่าตัวทำละลาย PEG ไม่มีผลต่อหลอดเลือด (รูป 2) สารสกัด hexane มีค่า R_{max} 64% (ED_{50}3.06 x 10^{-7} mg/mL) เมื่อเปรียบเทียบกับ ACh ซึ่งมีค่า R_{max} 112% และค่า ED_{50} 2.99 x 10^{-7}M ค่า R_{max} ของสารสกัด hexane ลดลงเป็น 32% (ED_{50} 4.6 x 10^{-7} mg/mL) เมื่อเติม L-NAME 1 mM ซึ่งเป็น NOS inhibitor ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัด hexane ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้โดยการสร้าง (partially) NO จาก endothelial cell

ผลของสารสกัด $CHCl_3$ ต่อหลอดเลือด thoracic aorta

พบว่าสารสกัด $CHCl_3$ มี dose response curve คล้ายสารสกัด hexane โดยสารสกัด $CHCl_3$ มีค่า R_{max} 97% (ED_{50} 4.53 x 10^{-7} mg/mL) ขณะที่ ACh มีค่า R_{max} 122% (ED_{50} 8.92 x 10^{-7} M) แสดงให้เห็นว่าสารสกัด $CHCl_3$ มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว เมื่อเติม L-NAME ลงไปพบว่ามีผลทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดลดลงมีค่า R_{max} 54% (ED_{50} 8.76 x 10^{-7} mg/mL) ส่วน ACh มีค่า R_{max} ลดลงเป็น 82% มีค่า ED_{50} 3.46 x 10^{-7} M การทดลองนี้พบว่าสารสกัด $CHCl_3$ มีผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือดโดยการสร้าง NO จาก endothelial cell ดังรูป 3

ผลของสารสกัด EtOAc ต่อหลอดเลือด thoracic aorta

สารสกัด EtOAc ให้ dose response curve (รูป 4) ทำนองเดียวกับสารสกัดที่กล่าวแล้วข้างต้น พบว่า R_{max} ของ ACh เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด EtOAc เป็น 115% (ED_{50} 5.65 x 10^{-7} M) และ 82% (ED_{50} 7.61 x 10^{-8} mg/mL) ตามลำดับ เมื่อเติม L-NAME ลงในหลอดเลือด พบว่าค่า R_{max} ของสารสกัด EtOAc ลดลงเป็น 54% มีค่า ED_{50} 3.88 x 10^{-7} mg/mL ขณะที่ R_{max} ของ ACh เป็น 83% (ED_{50} 5.65 x 10^{-7} M) จะเห็นได้ว่าสารสกัด EtOAc มีผลต่อการคลายตัวของหลอดเลือด โดยการสร้าง NO จาก endothelial cell เช่นเดียวกับสารสกัด $CHCl_3$ และ hexane

ผลของสารสกัด MeOH ต่อหลอดเลือด thoracic aorta

สารสกัด MeOH ให้ R_{max} 65% (ED_{50} 9.55 x 10^{-7} mg/mL) เมื่อเปรียบเทียบกับ ACh ซึ่งมีค่า R_{max} 121% (ED_{50} 8.18 x 10^{-7} M) เมื่อเติม L-NAME ลงไปพบว่าหลอดเลือดคลายตัวได้ลดลง โดยสารสกัด MeOH มี R_{max} 33% (ED_{50} 1.38 x 10^{-6} mg/mL) สำหรับ ACh มี R_{max} 82% และ ED_{50} 3.43 x 10^{-7} M ผลที่ได้นี้ (รูป 5) แสดงให้เห็นว่า สารสกัด MeOH (partial agonist) ทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยการสร้าง NO จาก endothelial cell

เมื่อพิจารณาการคลายตัวของหลอดเลือด (R_{max}) ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับค่า R_{max} ของ Ach พบว่าเป็นสัดส่วนดังนี้

สารสกัด hexane : ACh = 64/112 = 0.57 (57%)

สารสกัด $CHCl_3$: ACh = 97/112 = 0.80 (80%)

สารสกัด EtoAc : ACh = 82/115 = 0.71 (71%)

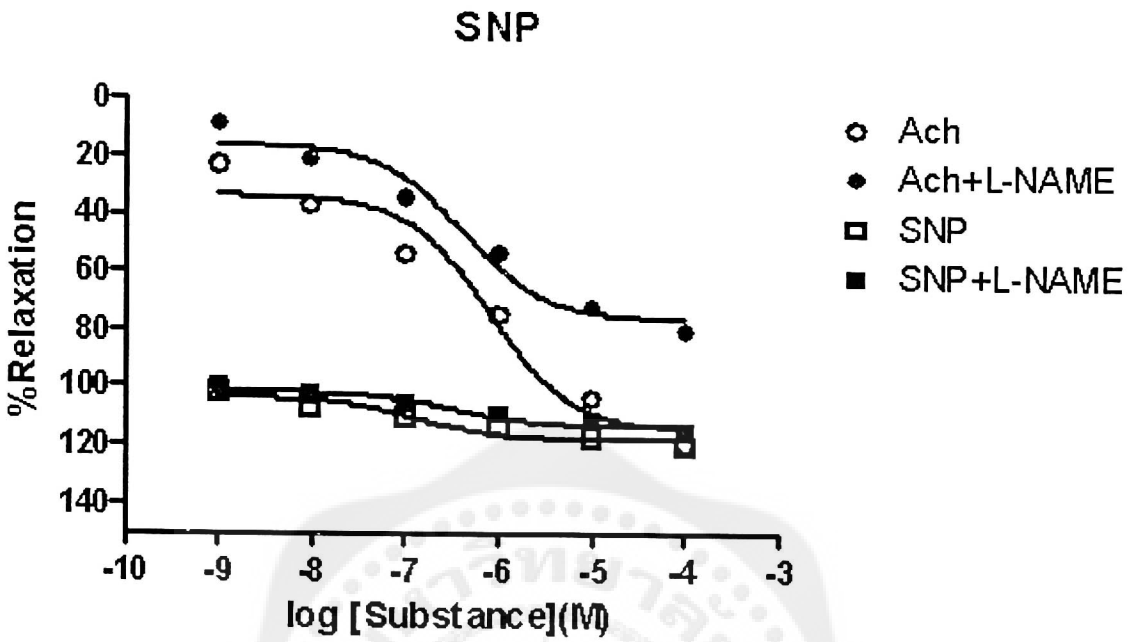
สารสกัด MeOH : ACh = 65/121 = 0.54 (54%)

จะเห็นได้ว่าสารสกัด $CHCl_3$ แสดงฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat ได้ดีที่สุด มีค่า R_{max} 80% เมื่อเปรียบเทียบกับ ACh

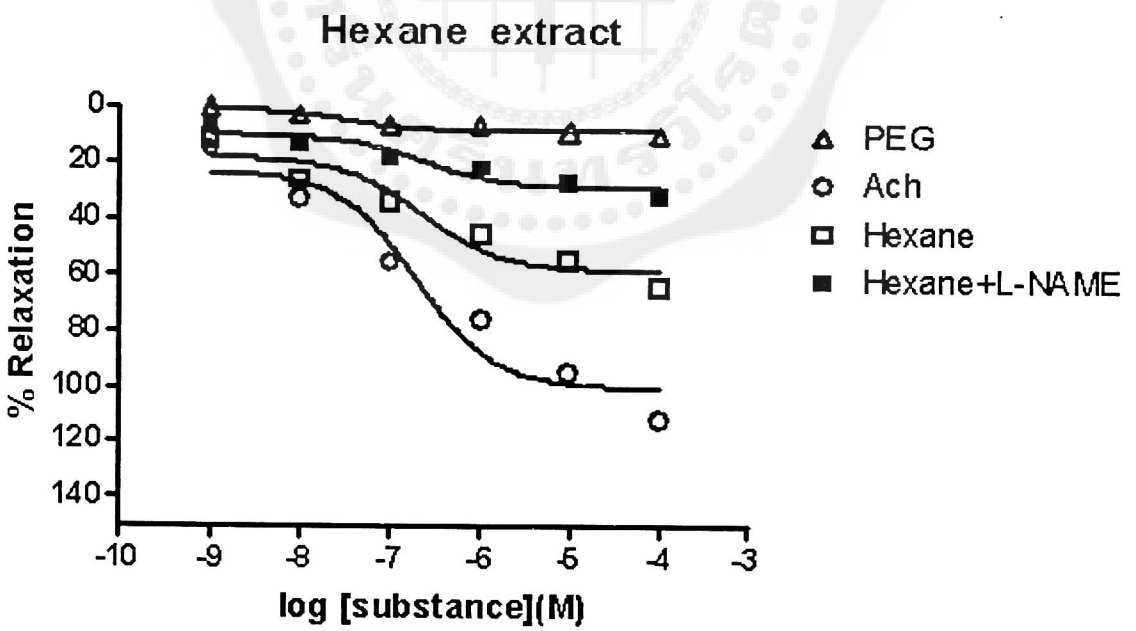
สรุป

ในการศึกษาการแยกและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรผักคราดหัวแหวน สามารถแยกสาร stigmasterol, stigmasterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside, 3-acetylaleuritolic acid, vanillic acid, β-sitostenone, scopoletin และ *trans*-ferulic acid รวมทั้งสารผสม triterpene และสารผสม fatty ester โดยวิธีการทาง chromatography และศึกษาโครงสร้างโดยเทคนิคทาง spectroscopy จากการศึกษาฤทธิ์ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิด (hexane, $CHCl_3$, EtOAc และ MeOH) มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวลักษณะ dose dependent โดยที่สารสกัด $CHCl_3$ มี R_{max} สูงสุด (80%) เมื่อเปรียบเทียบกับ ACh ซึ่งเป็นสาร control การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่าสารสกัด $CHCl_3$ และกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด $CHCl_3$ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C.diphtheriae* NCTC 10356 ที่ความเข้มข้น 64-256 µg/mL

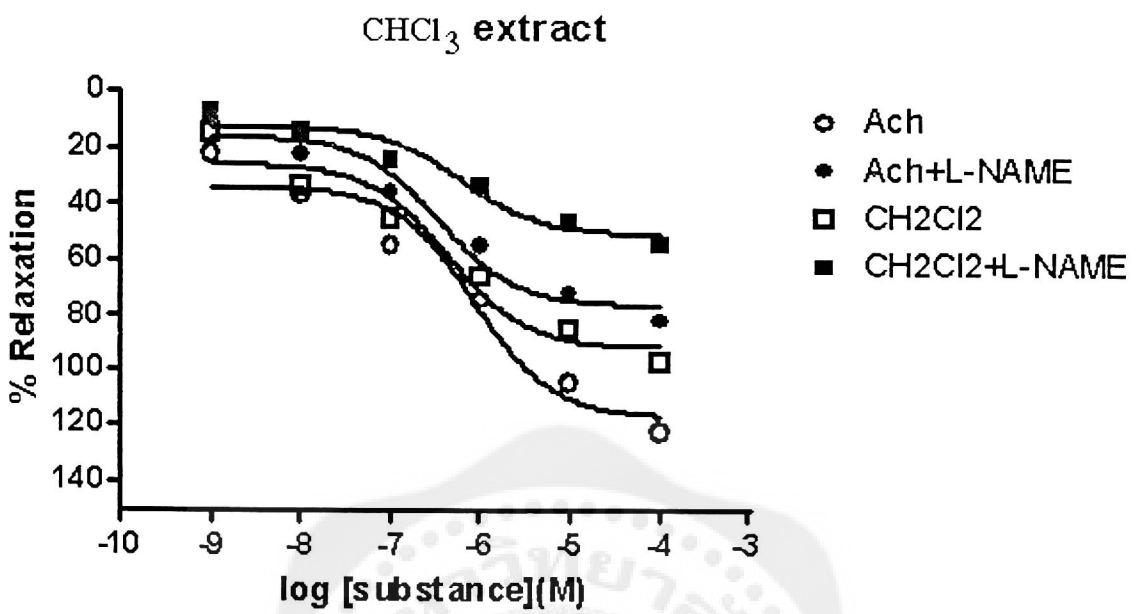
สารกลุ่ม C4 ที่แยกได้จากสารสกัด $CHCl_3$ สามารถยับยั้งเชื้อได้หลายชนิดได้แก่เชื้อ *C.diphtheriae* – NCTC 10356 *B.subtilis* ATCC 6633 และ *B cereus* ที่ความเข้มข้น 64, 128 และ 256 µg/mL ตามลำดับ สำหรับสาร 3 กลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด EtOAc สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 1 ชนิด คือ *C.diphtheriae* – NCTC 10356 ที่ความเข้มข้น 64 µg/mL



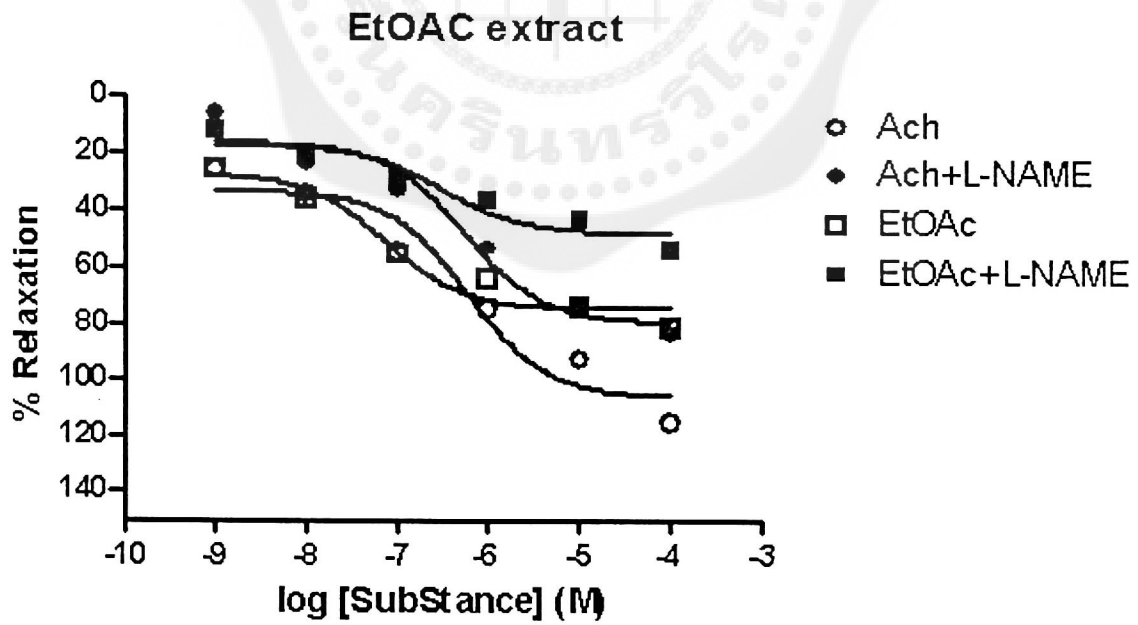
รูปที่ 1 ผลของ ACh และ SNP ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat



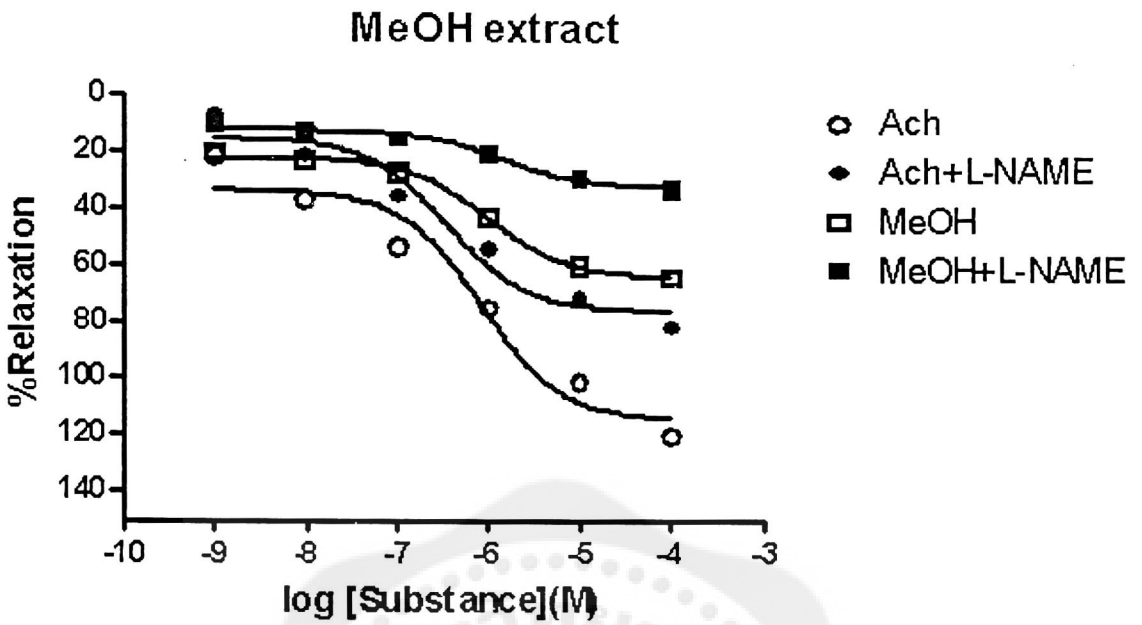
รูปที่ 2 ผลของสารสกัด Hexane ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat



รูปที่ 3 ผลของสารสกัด $CHCl_3$ ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat



รูปที่ 4 ผลของสารสกัด EtOAc ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat



รูปที่ 5 ผลของสารสกัด MeOH ต่อหลอดเลือด thoracic aorta ของหนู rat

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์. (2523). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง).* กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง
2. Chopra, R.N., Nayer, R.N. and Chopra, I.C. (1956). *Glossary of Indian Medicinal Plants*. New Delhi: CSIR Publication.
3. Siemunsma, S.J. and Piluck, K.C. (1993). *Plant Resource of Southeast - Asia No.8, Vegetables*. New Delhi: Prosea Foundation.
4. Perry, L.M. and Metzger, J. (1980). *Medicinal Plants of East and Southeast Asia.* Cambridge: MIT Press.
5. Farnsworth, R.N. et al. (1992). *Thai Medicinal Plant. Bangkok: Medicinal Plant,* Information Center, Mahidol University.
6. Marada, M. and Ngarmwathana, W. (1994). Pharmacological Studies of Thai Crude Drugs, Report on the Thai Medicinal Plants Research Project 1971 – 1973, Japan: JICA.
7. Gokhale, V.G. and Bhide, B.V. (1945). Chemical Investigation of *Spilanthes acmella*, *J. Ind. Chem. Soc. 22* : 250.
8. Ramsewak , R. S., Erickson , A.J., Nair , M.G. (1999) Bioactive *N* – isobutylamide from the flower buds of *Spilanthes acmella, Phytochemistry. 51 :* 729 – 732.
9. Krishnaswamy, N.R. and Prasanna, S. (1975). α and β- Amyrin Esters and Sitosterol Glucoside from *Spilanthes acmella, Phytochemistry. 14* : 1666-1667.
10. Mukharya, D.K. and Ansari, A.H. (1987). Olean–12-en-3-O-β-D-galactopyranosyl(1→4)–*O*-α-L-rhamnopyranoside: A New Triterpenoidal Saponin from the Roots of *Spilanthes acmella* Murr., *Indian J. Chem. 26*(B) : 87.
11. Saengsirinavin C., Vanveerakul B., and Chalermsanyakorn P. (1990). Local Anesthetic Action of *Spilanthes acmella* Murr.. *Siriraj Hospital Gazette. 42*(3) : 123-131.
12. Ansari, A.H., Mukharya, D.K. and Saxena, V.K. (1988). Analgesic Study of *N* – Isobutyl-4,5-Decadieneamide Isolated from the Flowers of *Spilanthes acmella* Murr., *Indian J. Pharm. Sci. 50* : 106.
13. a Ratnasooriya , W.D., Pieris , K.P.P., Samaratunga , U. and Jayakody , J. R.A.C. (2004). Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. *J. Ethnopharmacology. 91* : 317 - 320

13. b Siritapetawee, J. et al. (2000). Preliminary Study of Antibacterial Activity of *Spilanthes acmella* Murr., *Thai J. Phytopharm. 7*(1):13 –17.
14. a. Pouchert, C.J., and Bekke, J.(1993). The Aldrich library of ^{13}C and ^{1}H FTNMR Spectra. Wisconsin : Aldrich Chemical Company, Inc., 569.

    b. Thom, M. J. et al.(1972). NMR Spectra of C-24 Isomeric sterols, Phytochemistry. *11* : 1789.
15. Mesah, I. et al. (1992). " Epoxychiromodine and Other Constituents of *Croton megalocarpus.*" *Phytochemistry.* 31(6) : 2055-2058.
16. Misra, D.R. & Khastgir, N.H. (1970). " Terpenoid and related Compounds –XI ; Chemical Investigation of Aleurites montana and the Structure of Aleuritolic Acid A New Triterpene Acid," *Tetrahedron.* 26 : 3017–3021.
17. Masanori et al. (1980). " Further Characterization of the Constituent of the Thai Medicinal Plant, *Zingiber cassumnar* RoxB," *Chem. Pharm. Bull.* 28(10): 2948–2959.

18. Harborne, B.J. (1998). *Phytochemical Methods*. UK:Chapman & Hall
19. Huang, Z. et al. (1993). " Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanilic Acid and Guaiacol by *Rhodotorula rubra*," *J. Biol. Chem.* 268(32) : 23954–23958.
20. Hill, R.A. et al. (1991). *Dictionary of steroid.* UK: Chapman and Hall London.
21. Gaspar, M.M. et al. (1993). " Steroid Constituents from Mature wheat straw, " *Phytochemistry*. 34(2) : 523-527.
22. Sadavangvivad, C. & Supavilatlai, P. (1977). " Three Monohydroxycoumarins from *Aliyxia Lucida*," *Phytochemistry*. 16 :1451.
23. Tsukamoto, H. et al. (1984). " Coumarin from *Olea africana* and *Olea Capensis* ," *Phytochemistry*. 23(3) : 699–700.
24. Hyun Kang, T. et al. (1999). " Scopoletin : An Inducible Nitric Oxide Synthesis Inhibitory Active Constituent from *Artemisia feddei*," *Planta Med.* 65 : 400–403.
25. Kelley, J.C., Harruff, C.R. and Carmack, M. (1976). "The Polyphenolic Acids of Lithospermum Ruderale. II. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids," *J. Org. Chem.* 41(3) :449-455.
26. Pouchet,J.C. & Behke, J. (1993). *The Aldrich Library of Infrared Spectra. Vol II* Wisconsin : Aldrich Chemical.
27. Maneecharkr, P. (1994). " Chemical and Bioactvity of *Sphaeranthus africanus* Linn.," Master thesis, M.Ed.(Chemistry). Bangkok:Graduate school Photocopied. Chulalongkorn University.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่จัดสรรทุนสนับสนุนการวิจัย งบประมาณประจำปี 2549 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และสิ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์การบันทึกข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี และกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. นักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ หัวหน้าห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี และผู้ช่วยประธานฝ่ายวิจัย สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย