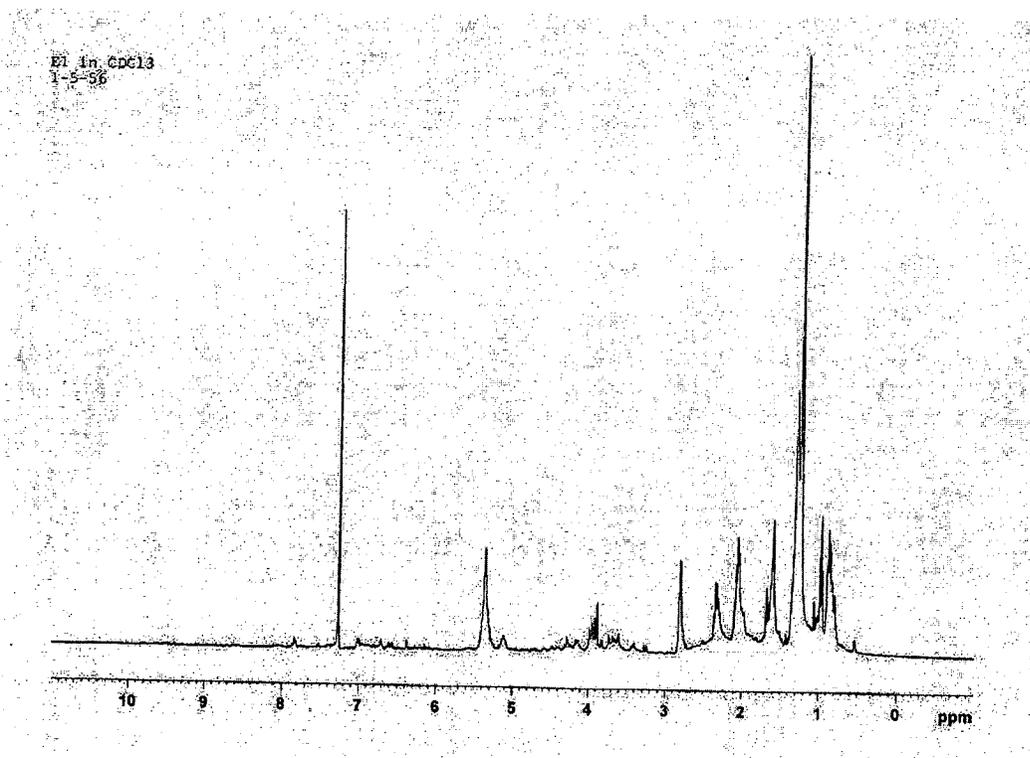
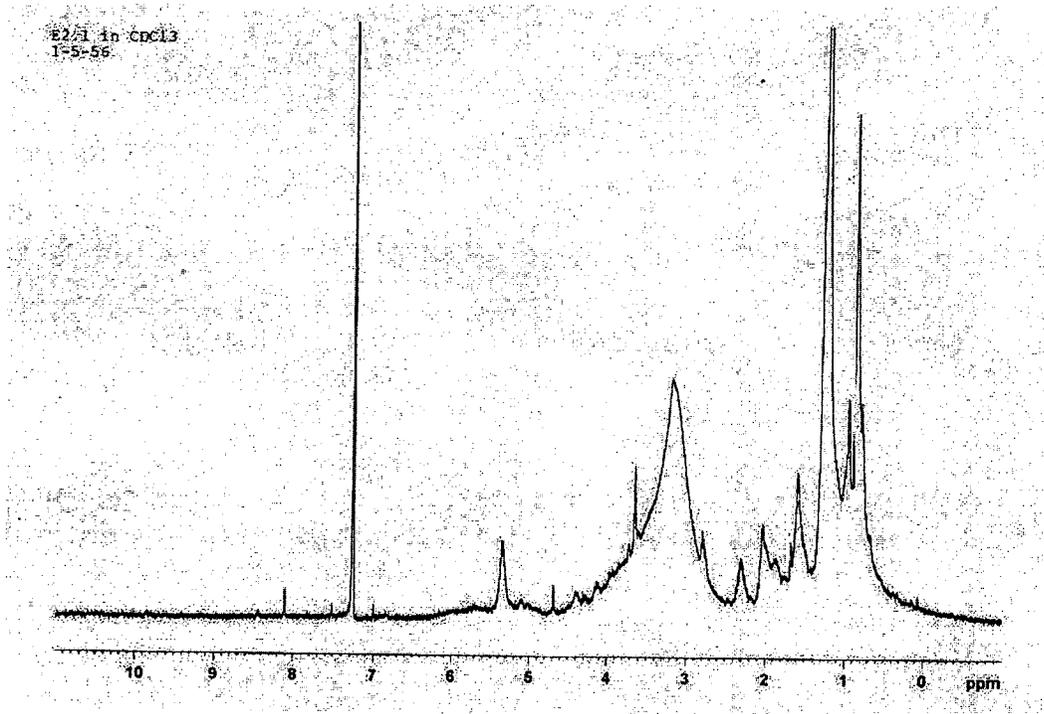


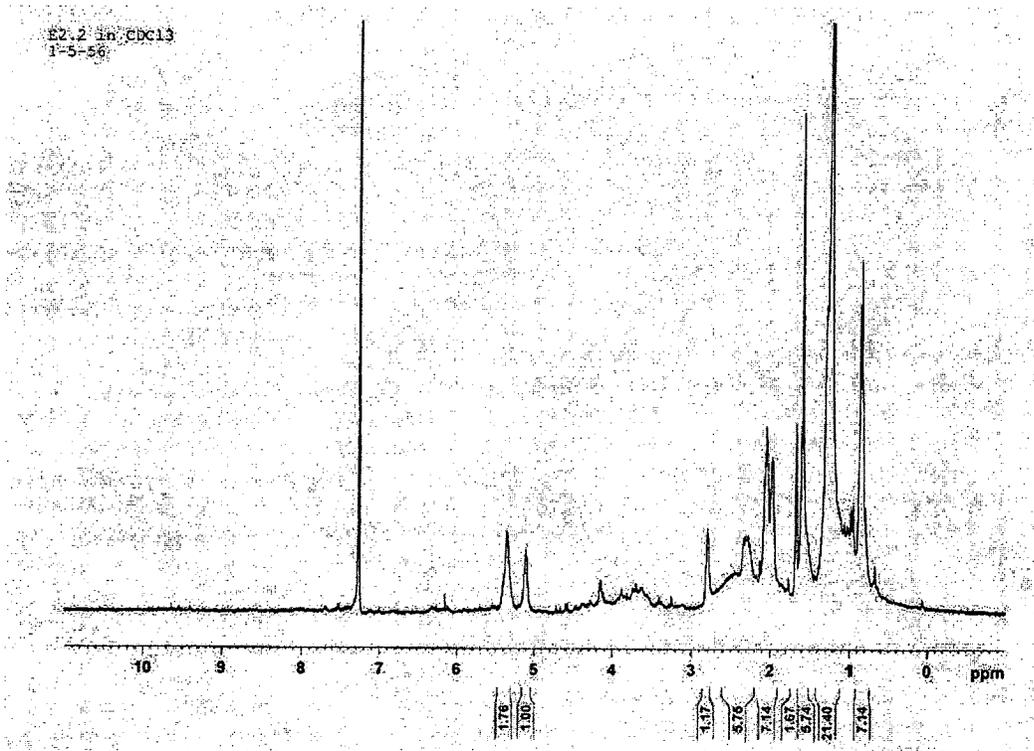
ภาคผนวก



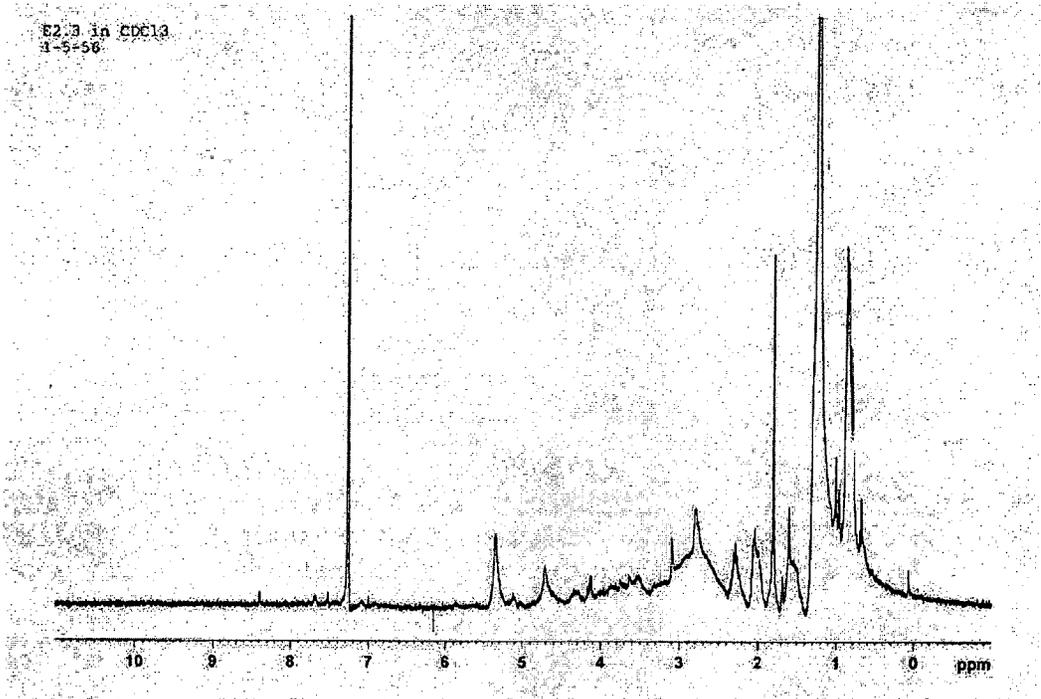
รูปที่ ผ 1-1 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบสาบแร้งสาบกา



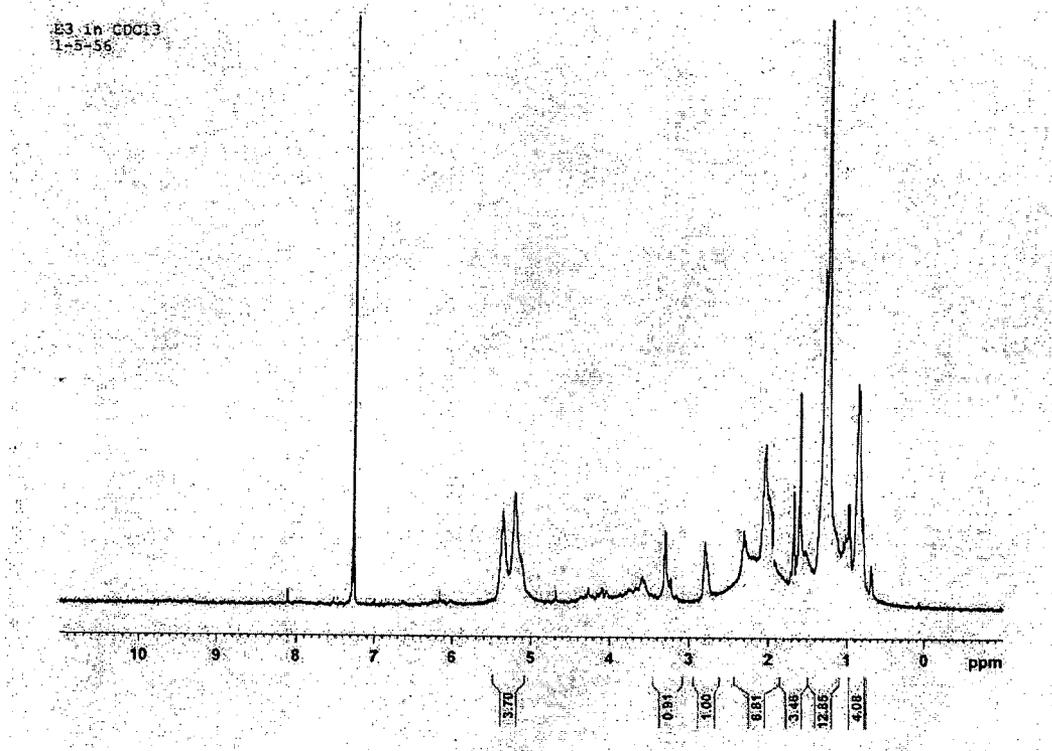
รูปที่ ผ 1-2 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าเอื้องหมายนา



รูปที่ ผ 1-3 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบเอื้องหมายนา

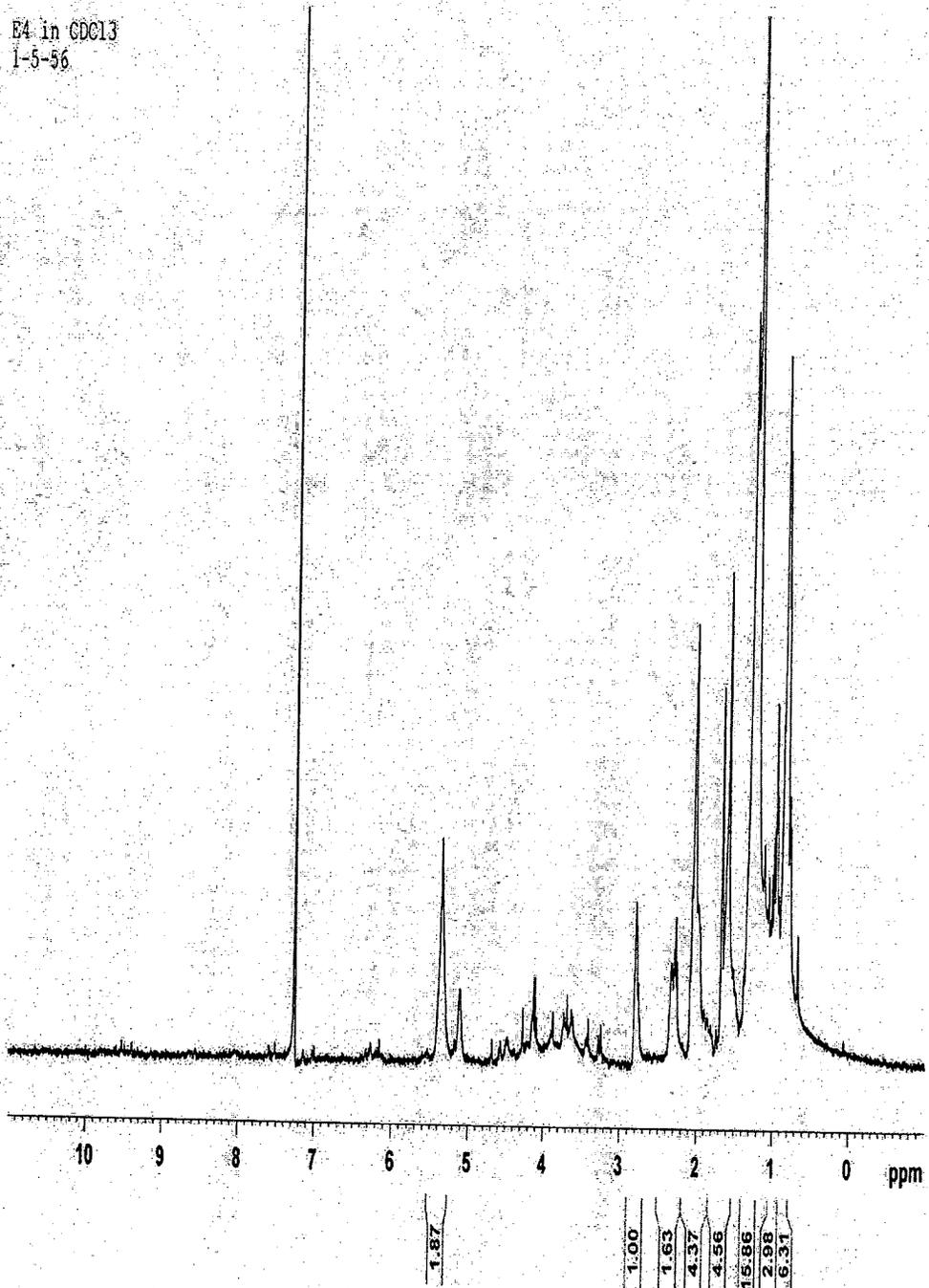


รูปที่ 1-4 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของต้นเอื้องหมายนา

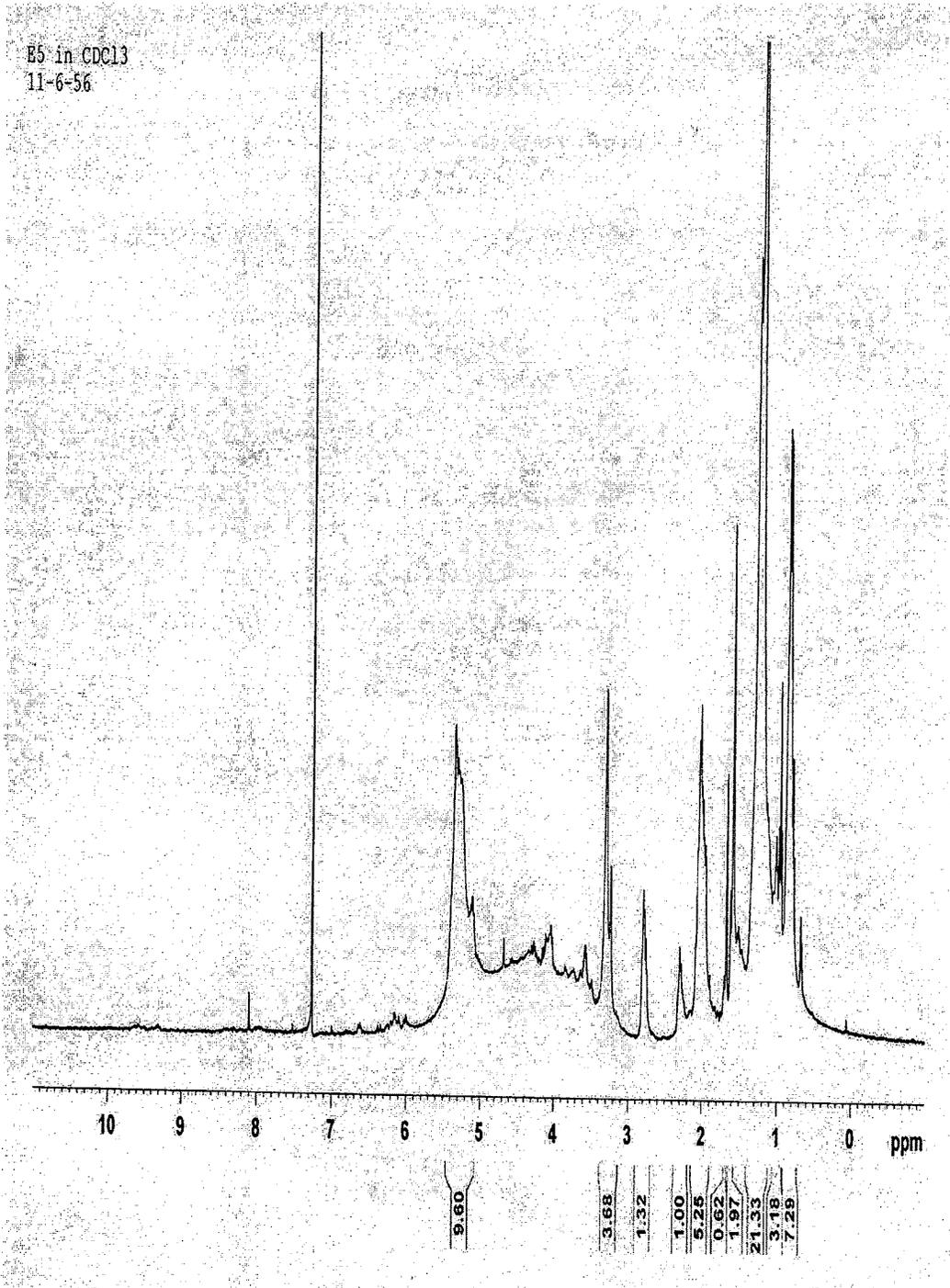


รูปที่ ๕ 1-5 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบขิงโคป่า

E4 in CDCl₃
1-5-56

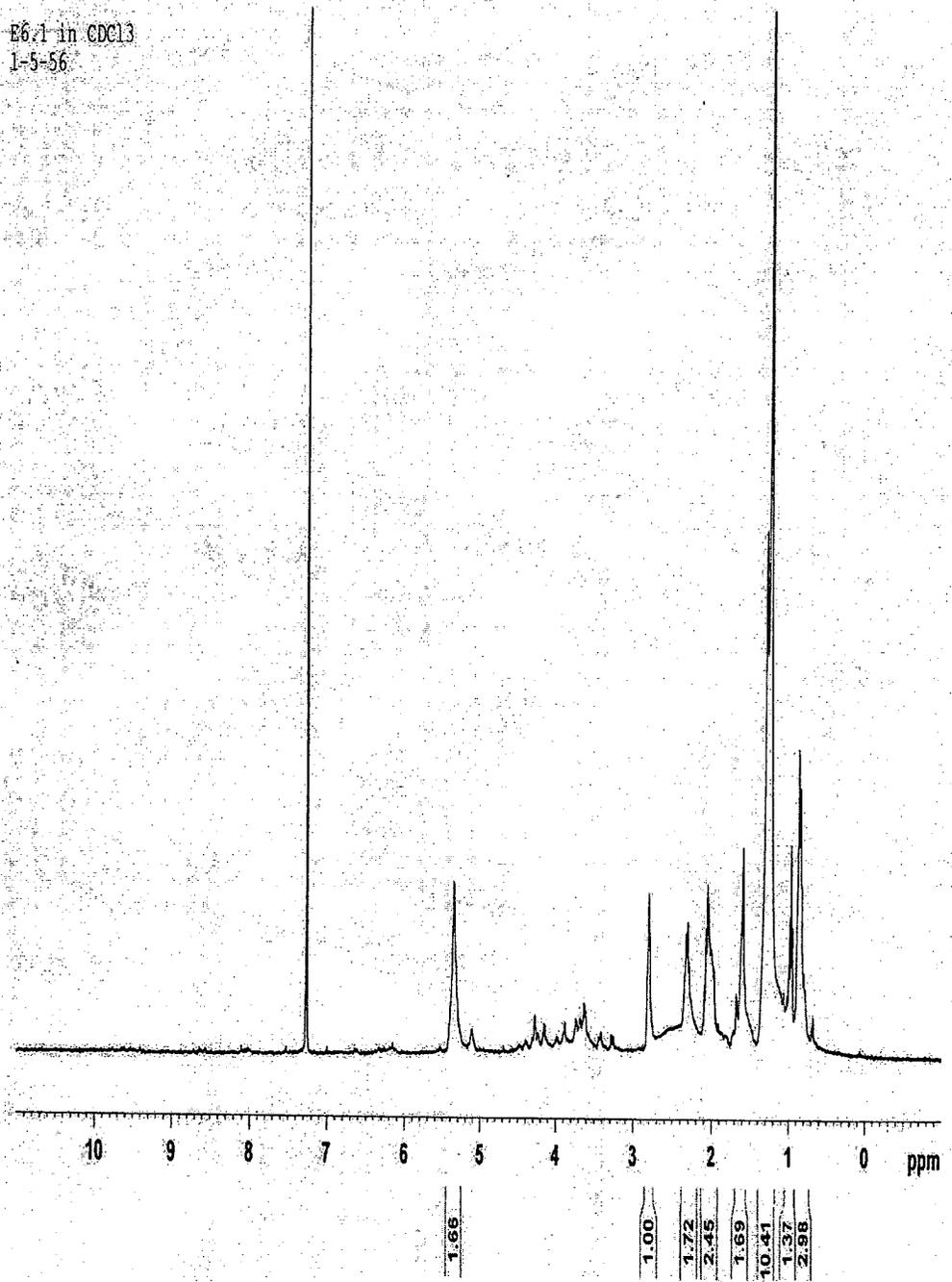


รูปที่ ๑ 1-6 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบมะเดื่อหอม



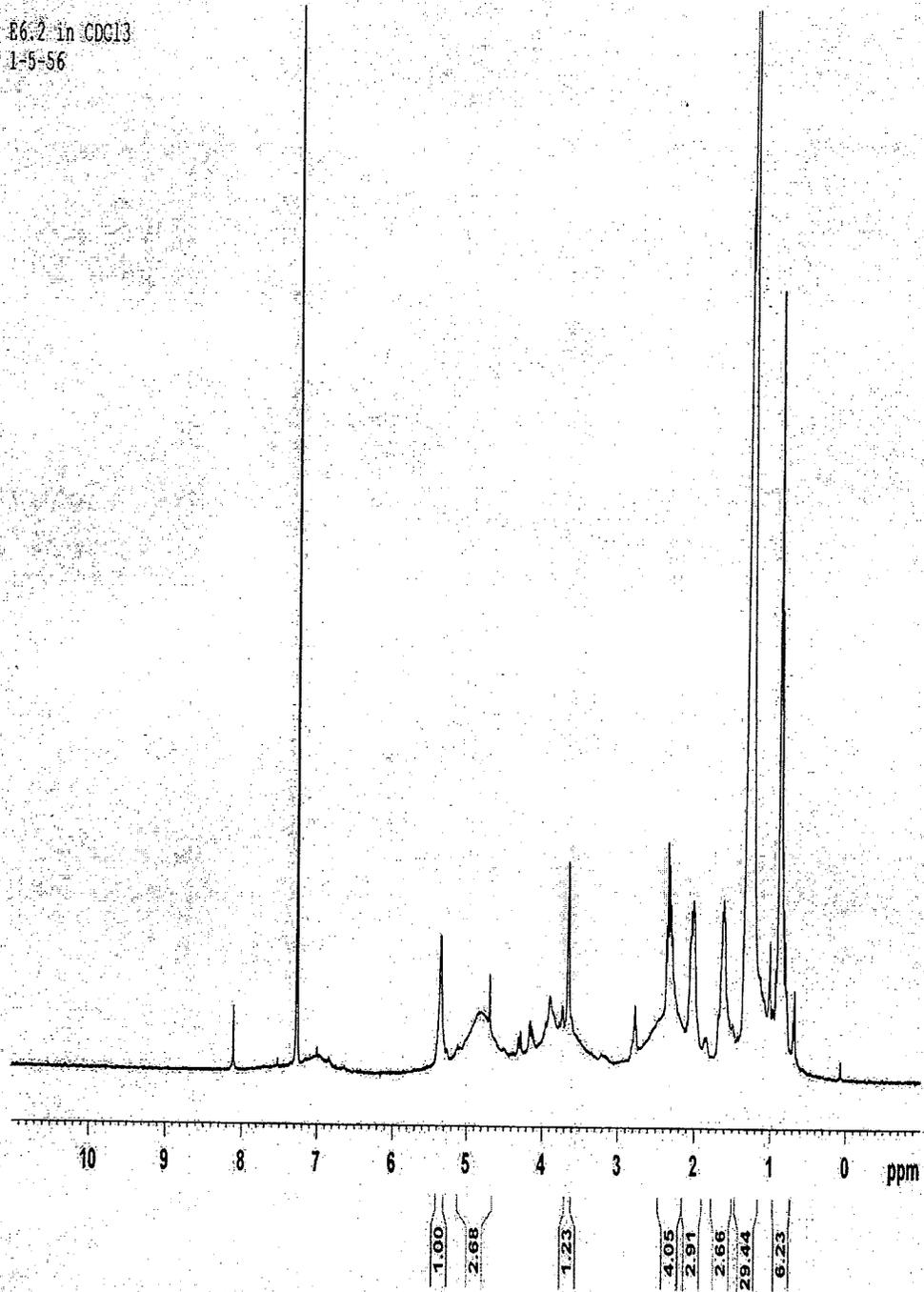
รูปที่ 1-7 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบลายกนก

E6.1 in CDCl₃
1-5-56

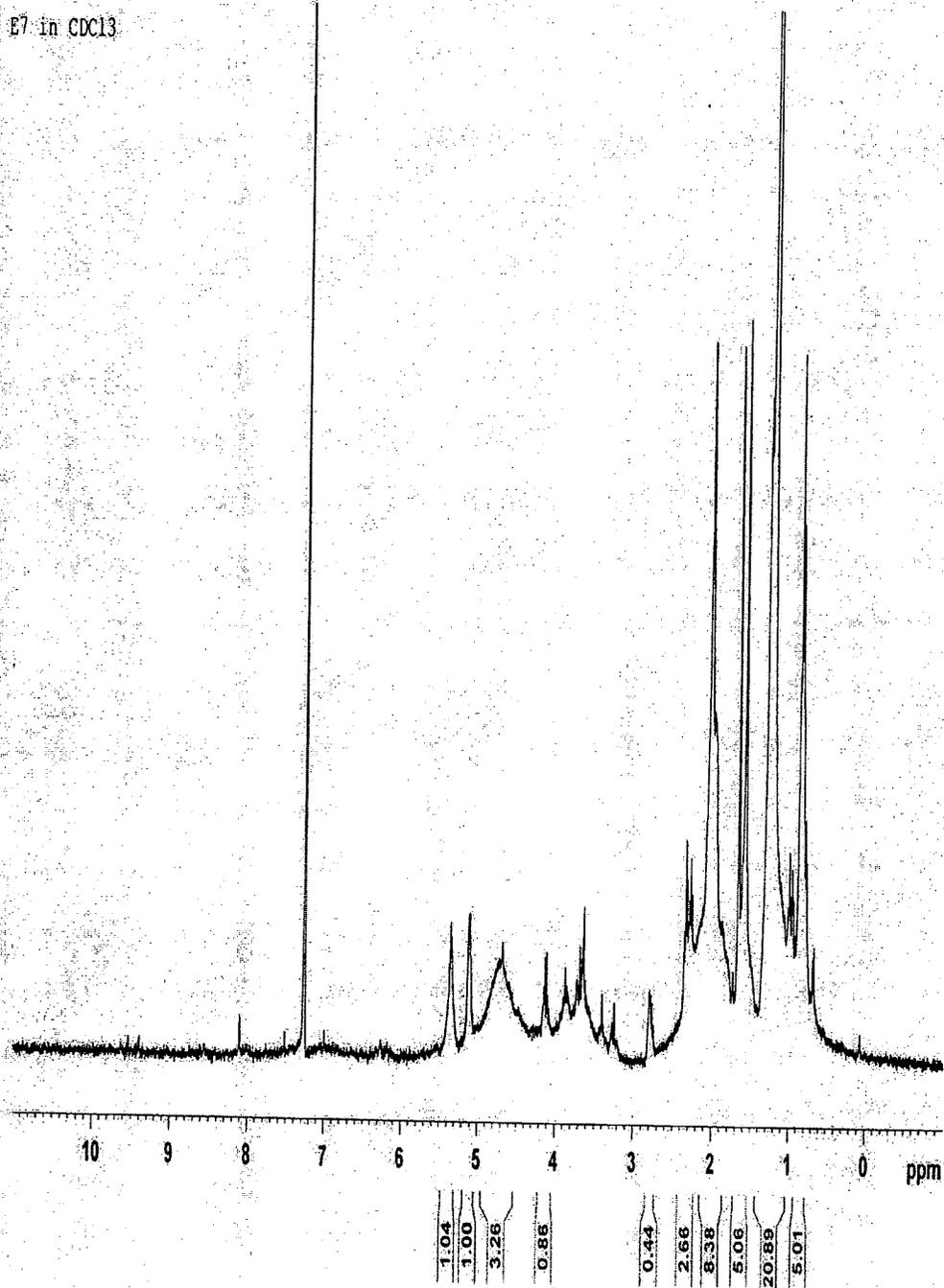


รูปที่ ๘ 1-8 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบระย้อมน้อยดอกขาว

E6.2 in CDCl₃
1-5-56

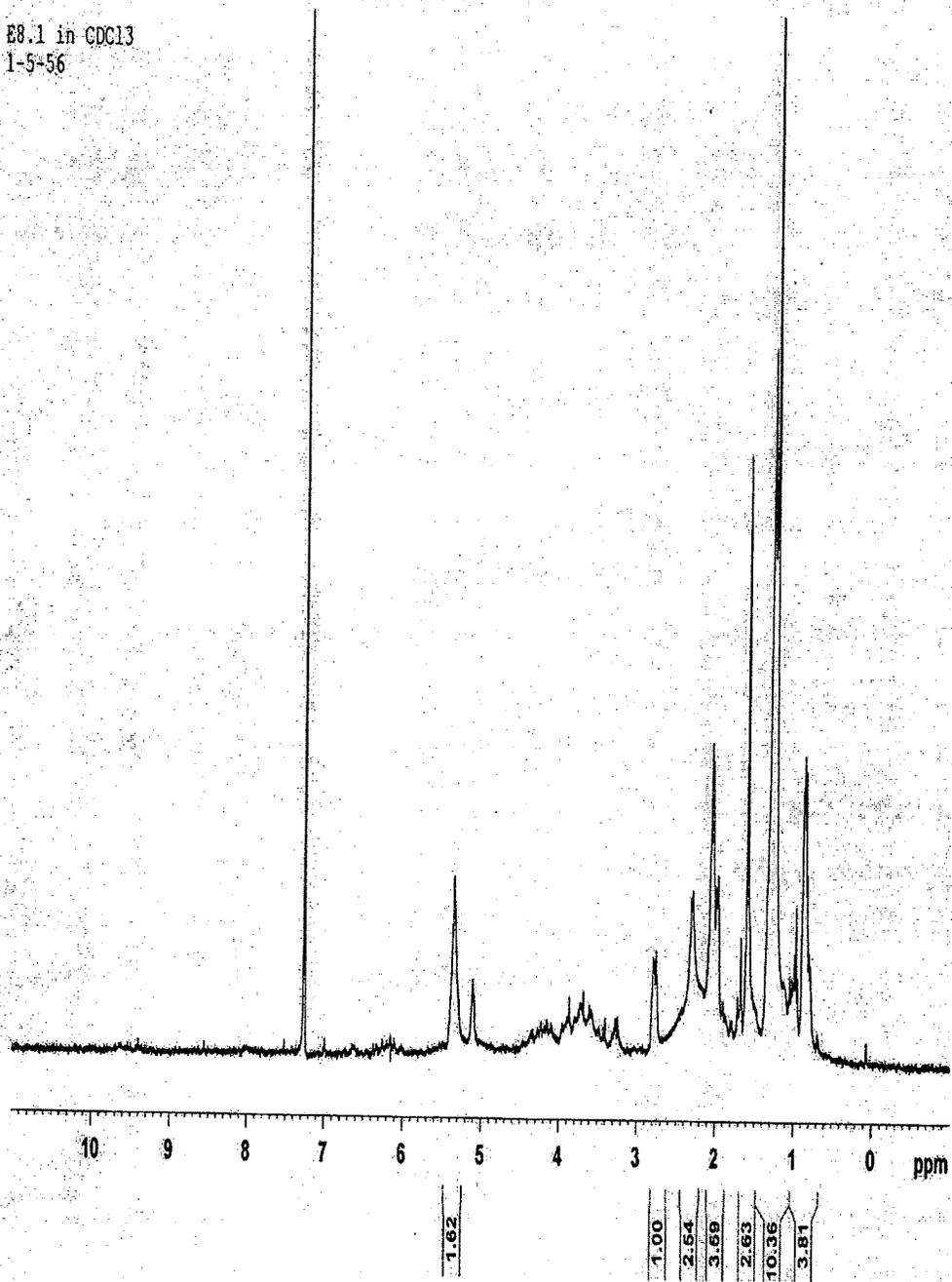


รูปที่ ๗ 1-9 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากระย่มน้อยดอกขาว



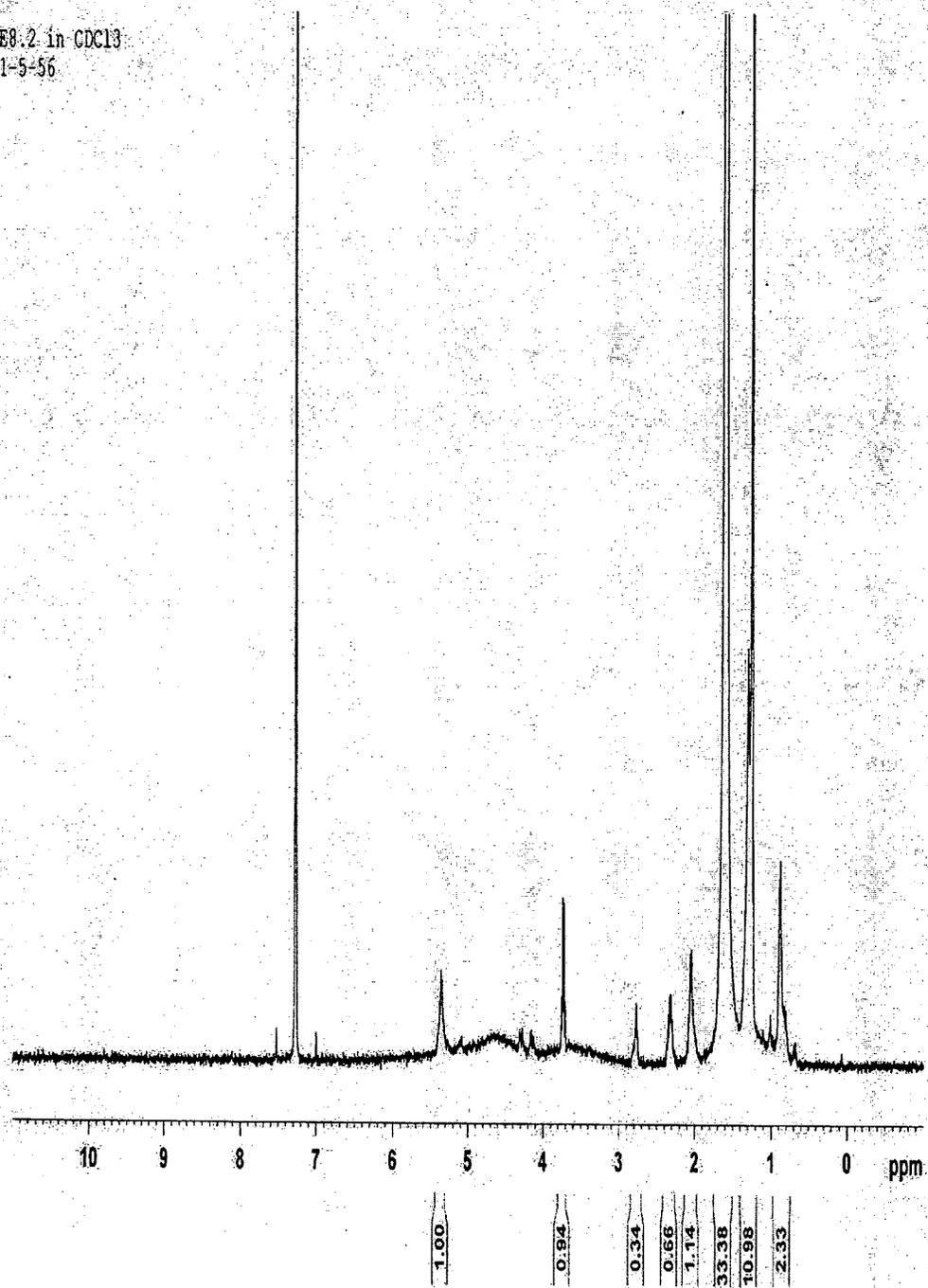
รูปที่ ผ 1-10 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของไมยราบ

E8.1 in CDCl₃
1-5-56



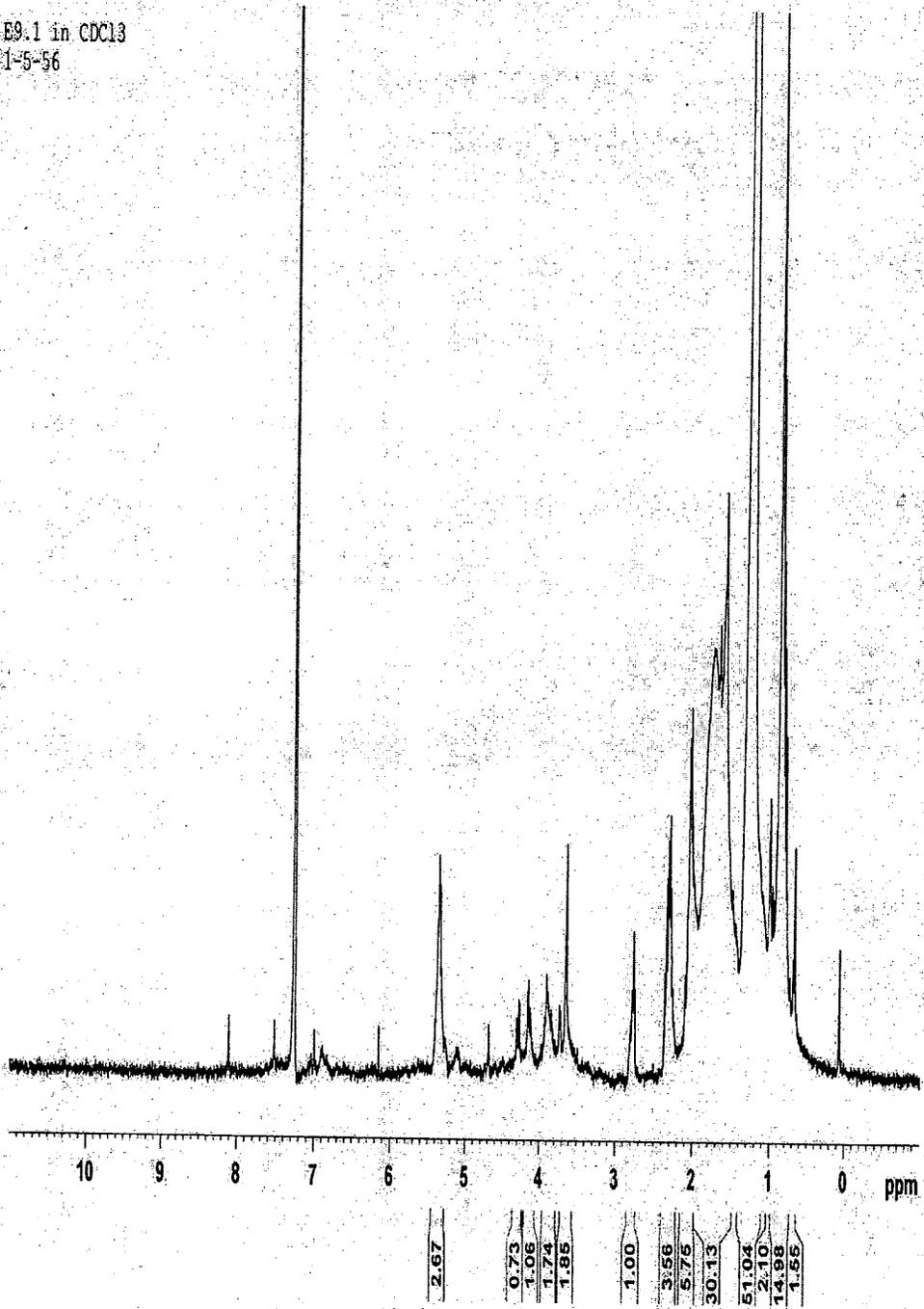
รูปที่ ผ 1-11 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบโคลงเคลง

F8.2 in CDCl₃
1-5-56



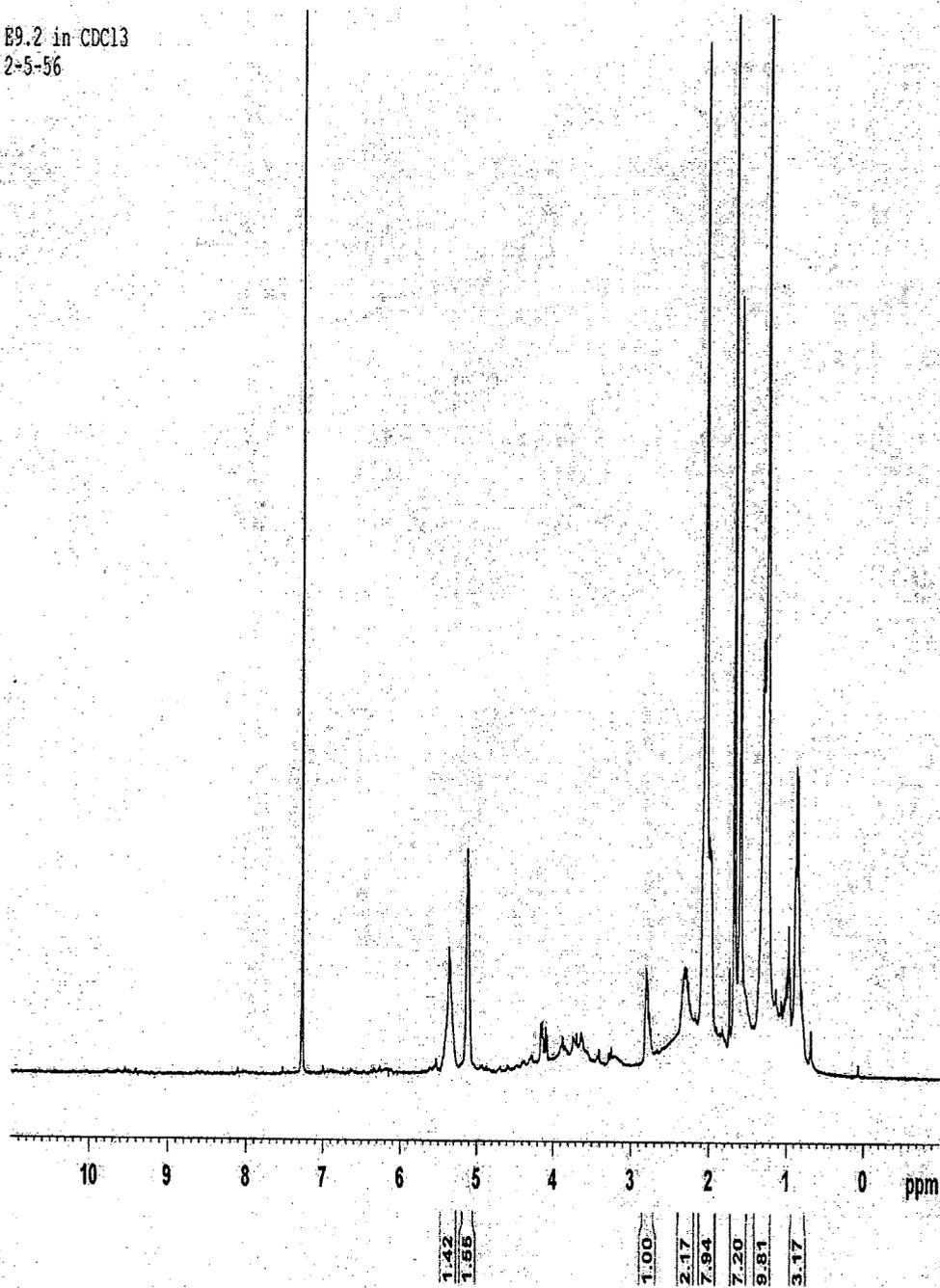
รูปที่ ผ 1-12 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากโคลงเคลง

E9.1 in CDCl₃
1-5-56



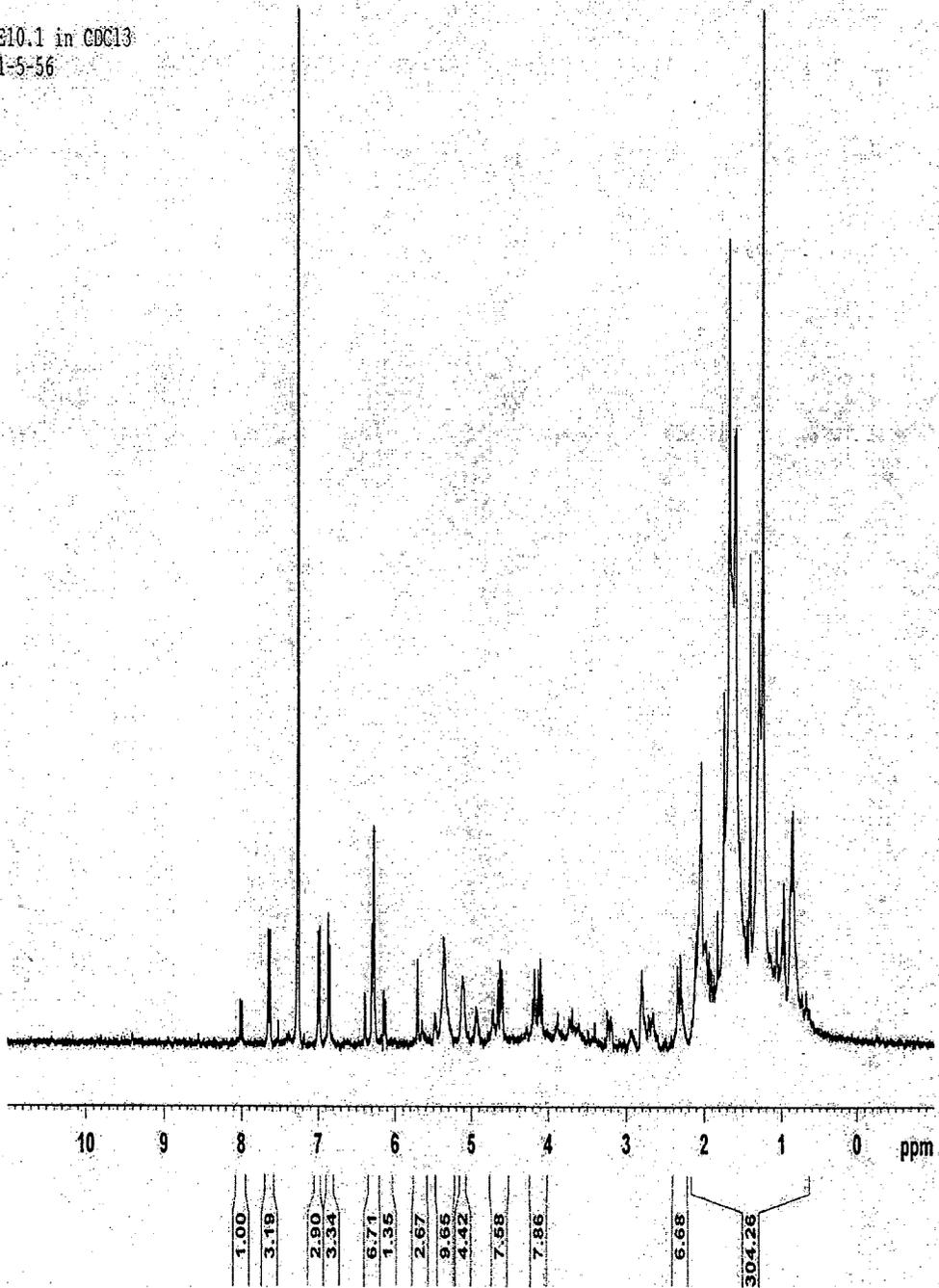
รูปที่ ๑ 1-13 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบค่างควดดำ

E9.2 in CDCl₃
2-5-56



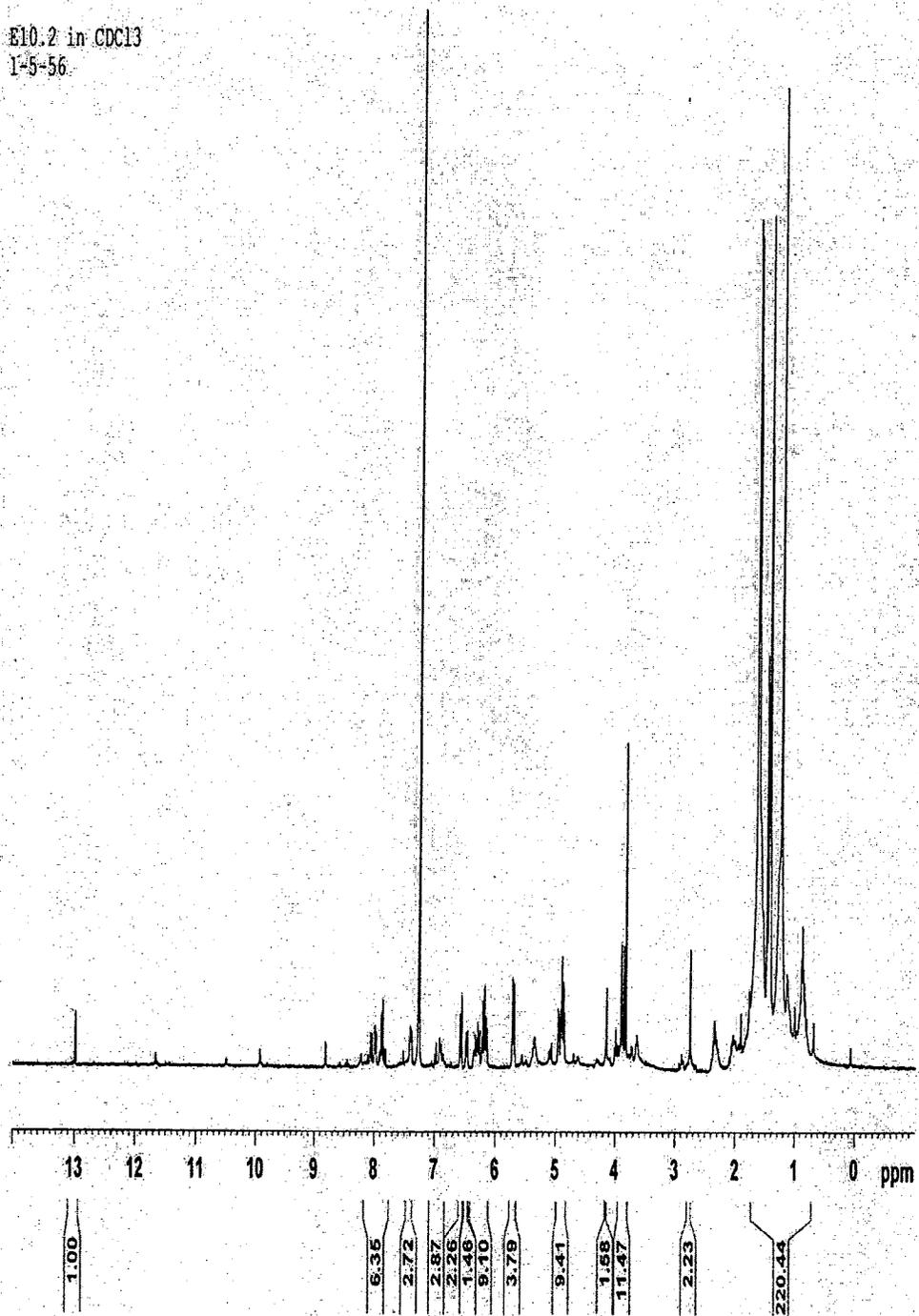
รูปที่ ผ 1-14 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเห็ดค้ำควดำ

E10.1 in CDCl₃
1-5-56



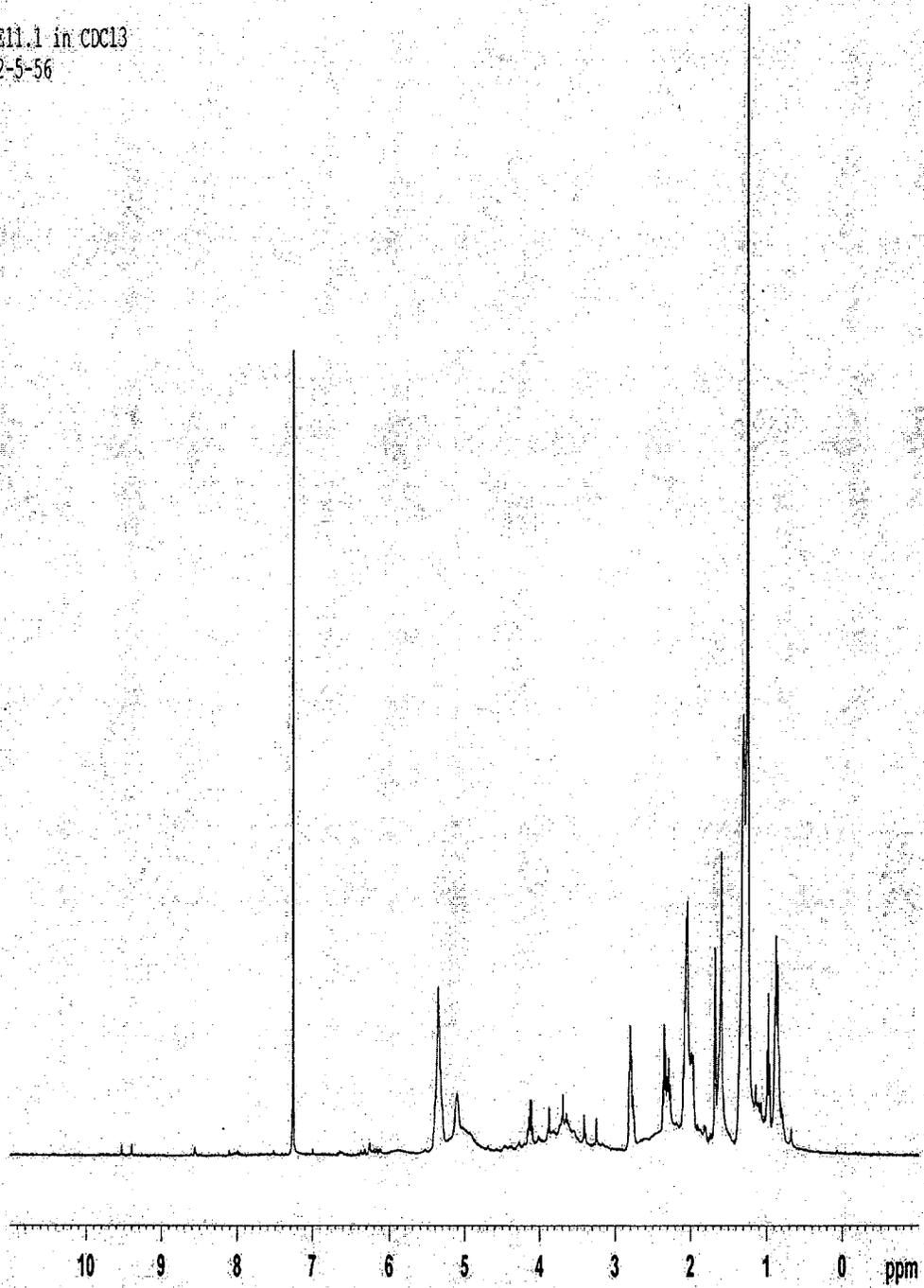
รูปที่ ๗ 1-15 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบดิ่งตัน

E10.2 in CDCl₃
1-5-56



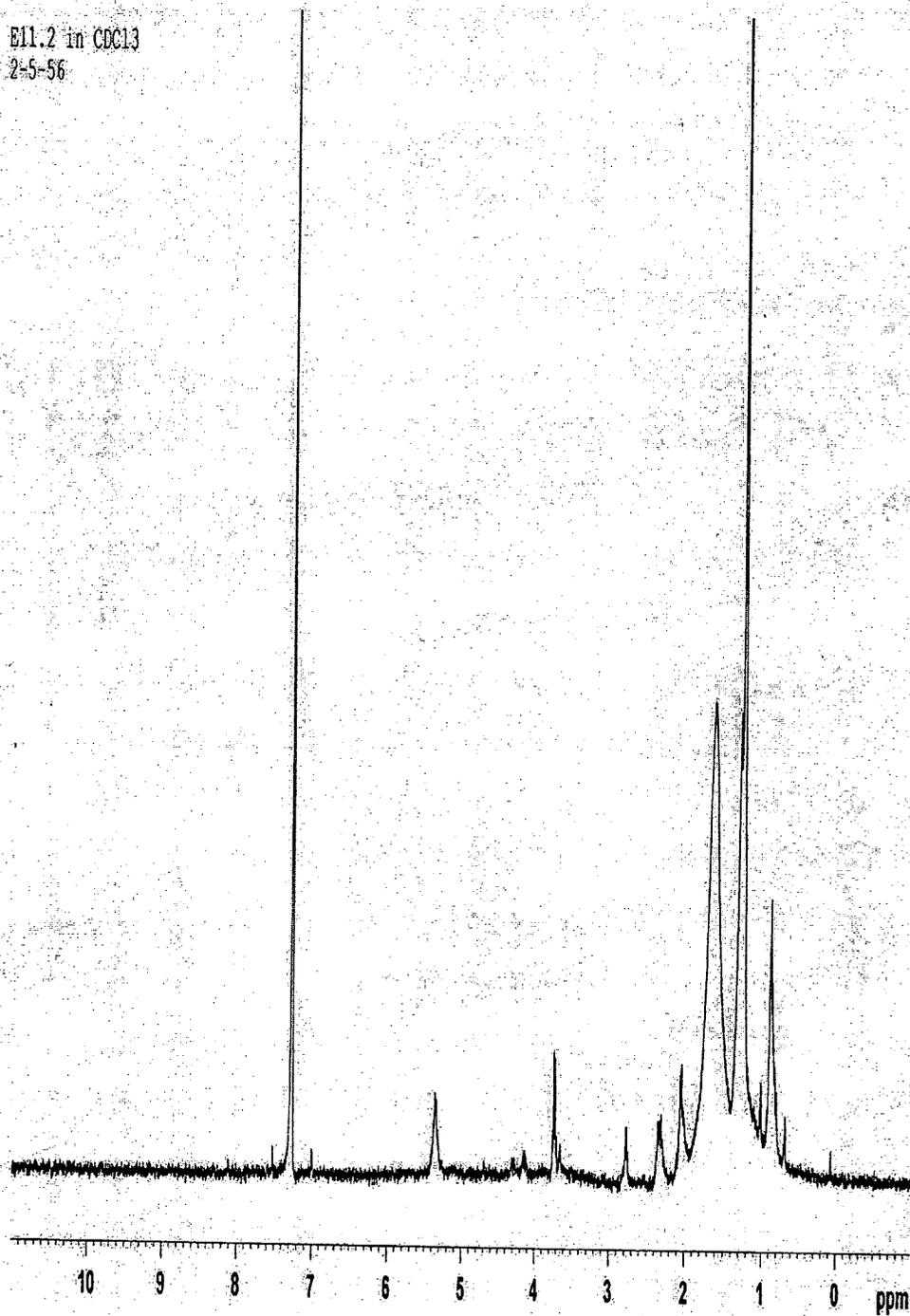
รูปที่ ผ 1-16 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากดีงูตัน

E11.1 in CDCl₃
2-5-56



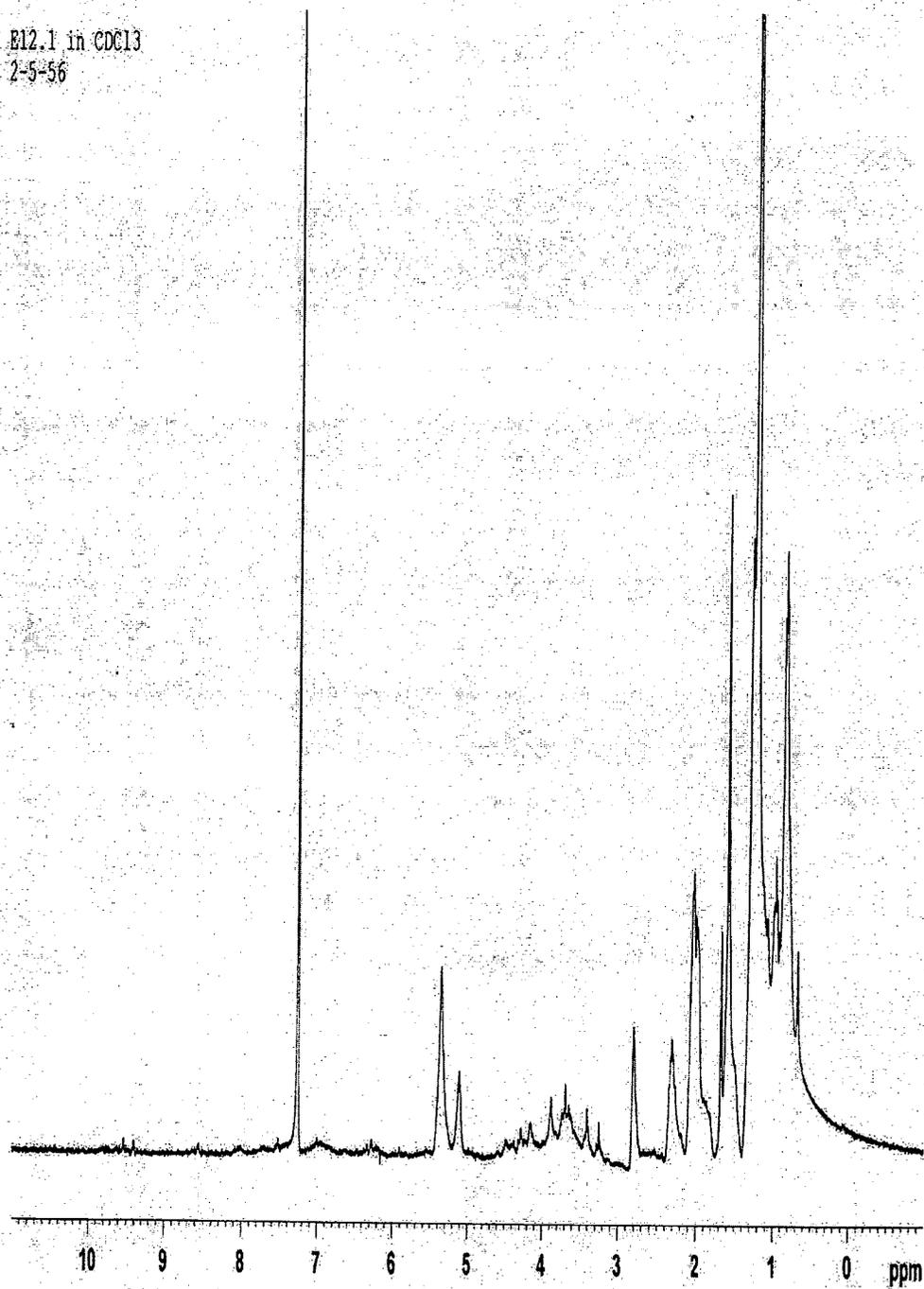
รูปที่ ผ 1-17 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบมะฮิ

E11.2 in CDCl₃
2-5-56



รูปที่ ๑ 1-18 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากมะฮึก

E12.1 in CDCl₃
2-5-56



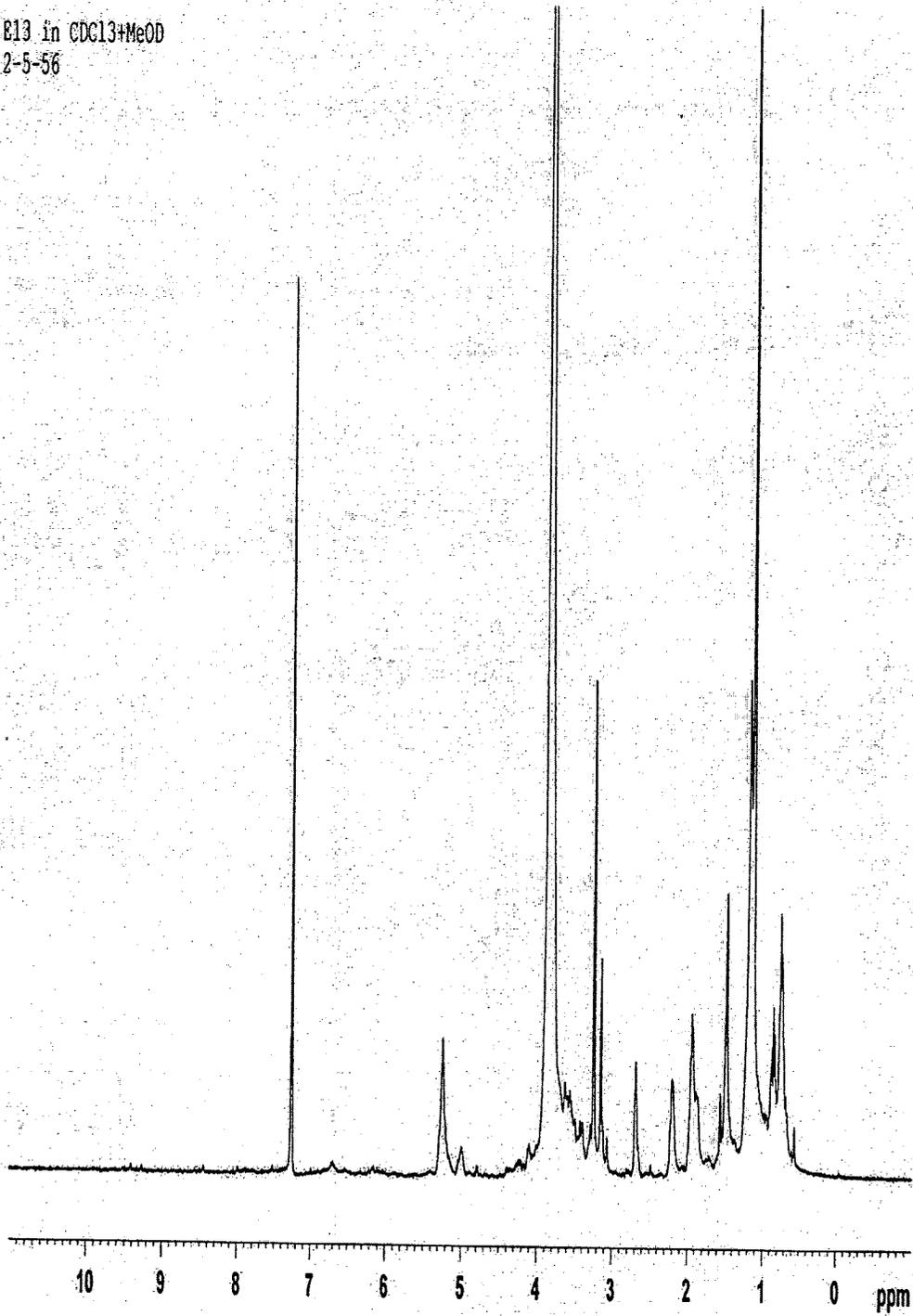
รูปที่ ผ 1-19 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบหัวเดียว

E12.2 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



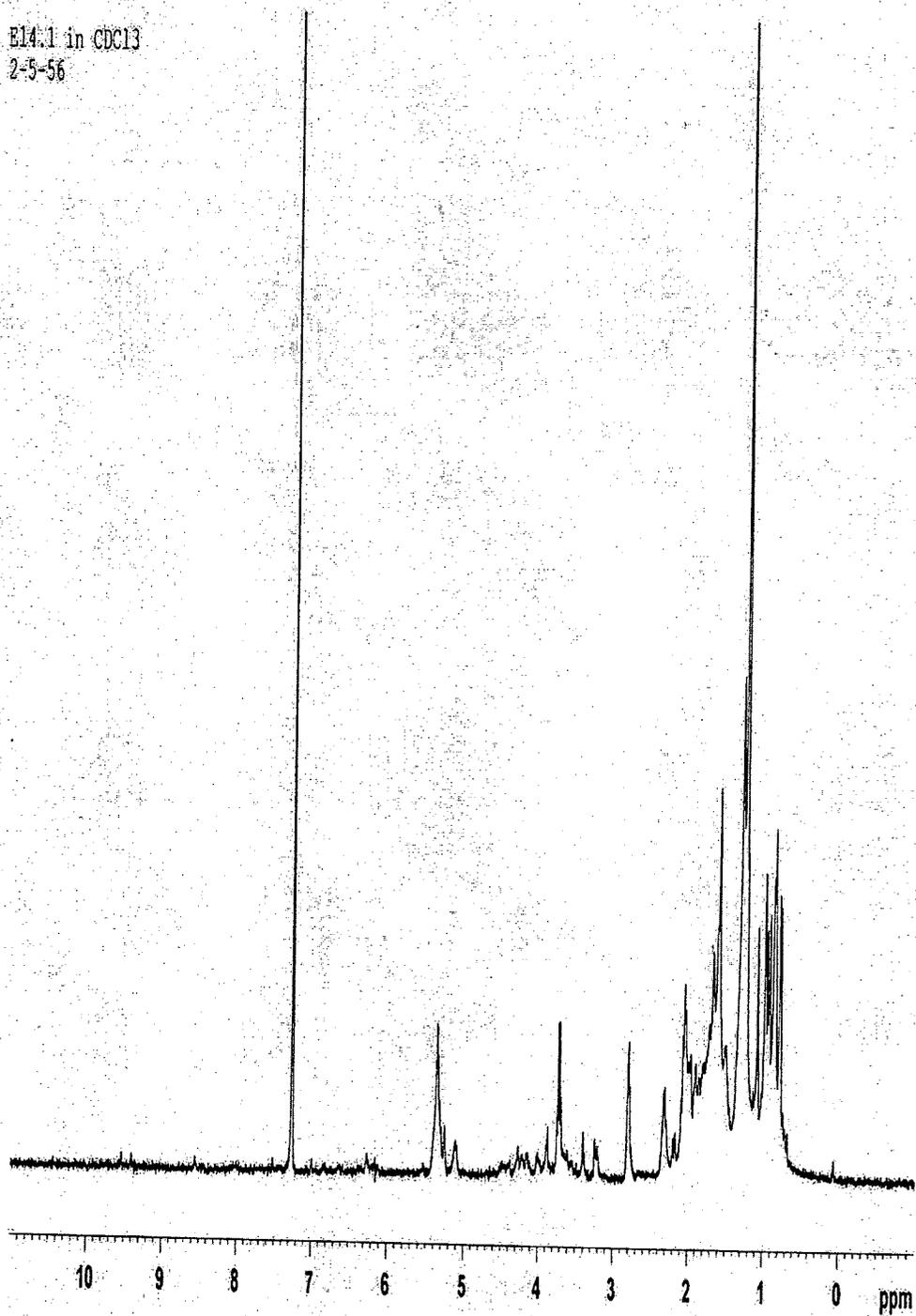
รูปที่ ๘ 1-20 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเหง้าหัวเดียว

E13 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



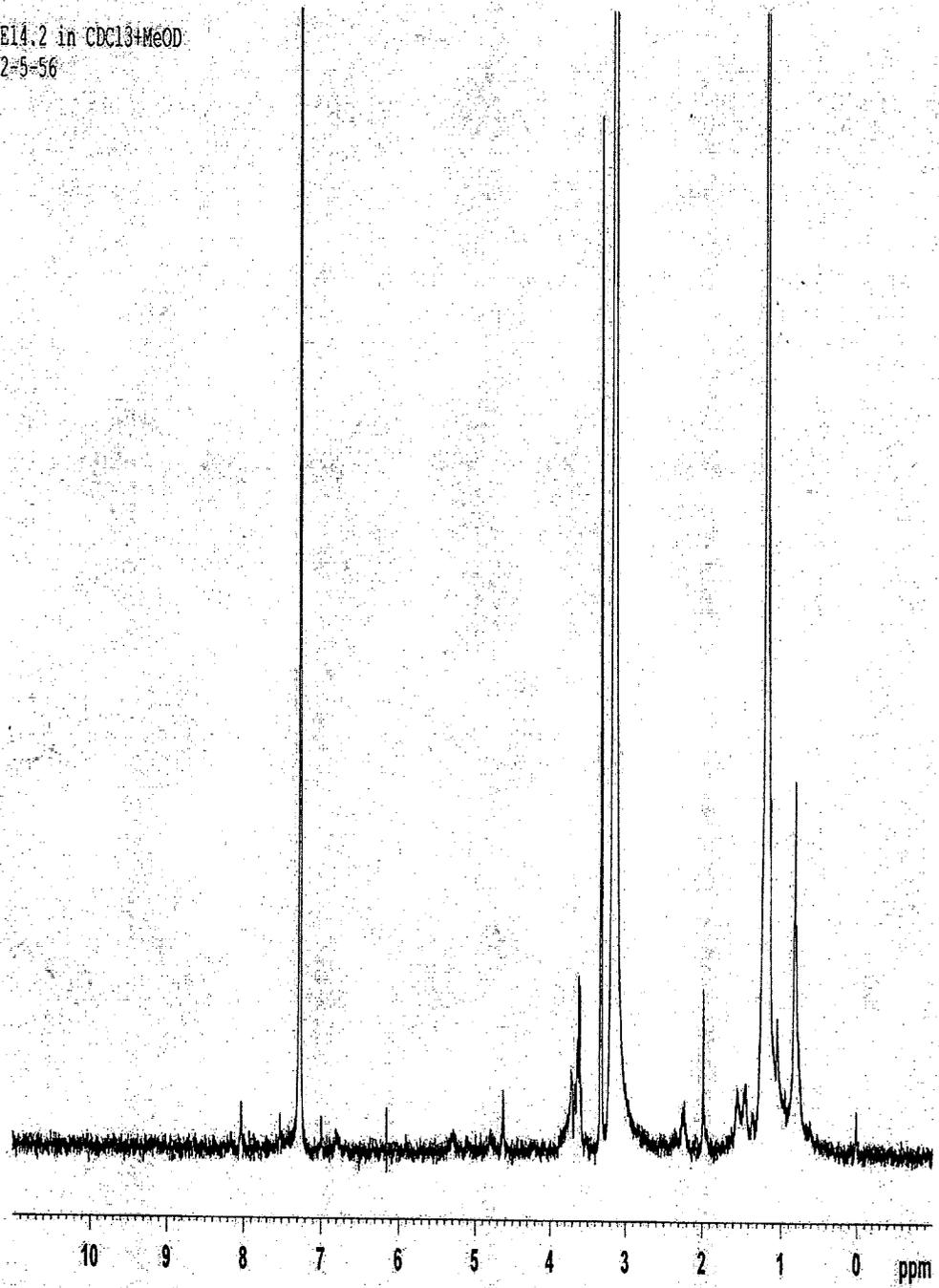
รูปที่ ๑ 1-21 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบไม้ลาย

E14:1 in CDCl₃
2-5-56



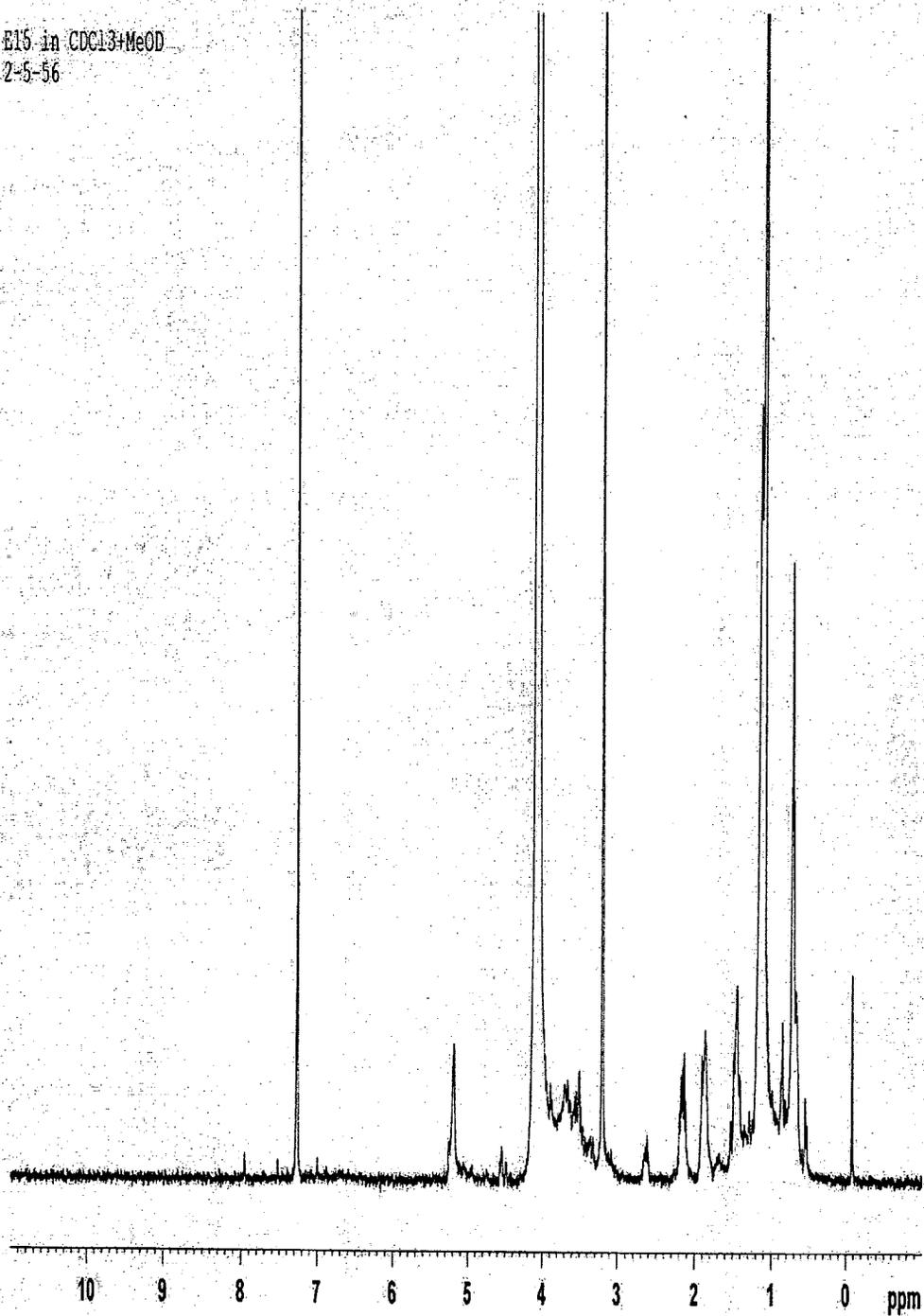
รูปที่ ๑ 1-22 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบเข็มไฉเดีย

E14.2 in CDCl₃+MeOD
2=5=56



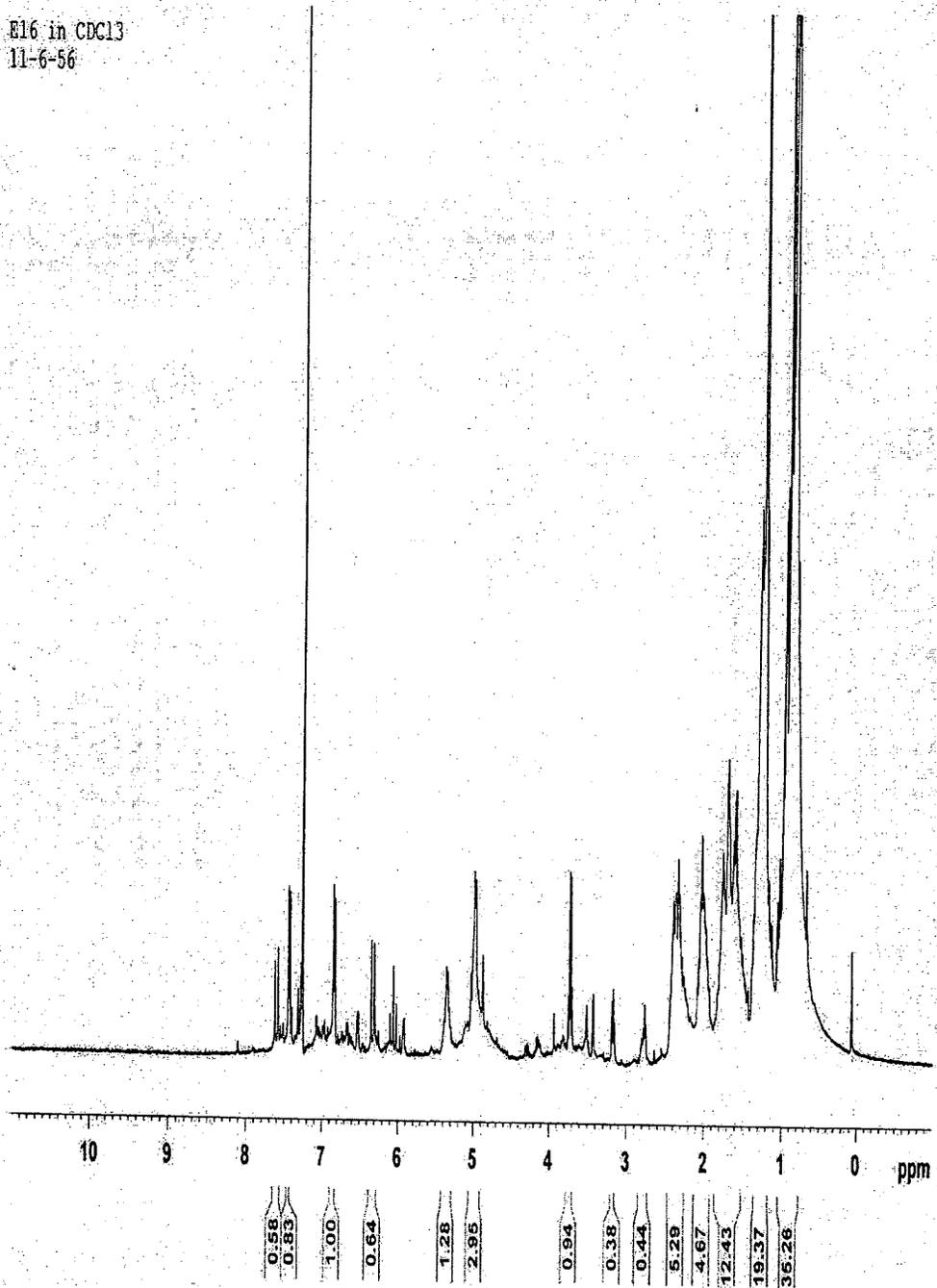
รูปที่ ผ 1-23 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากเข็มไอดี

E15 in CDCl₃+MeOD
2-5-56



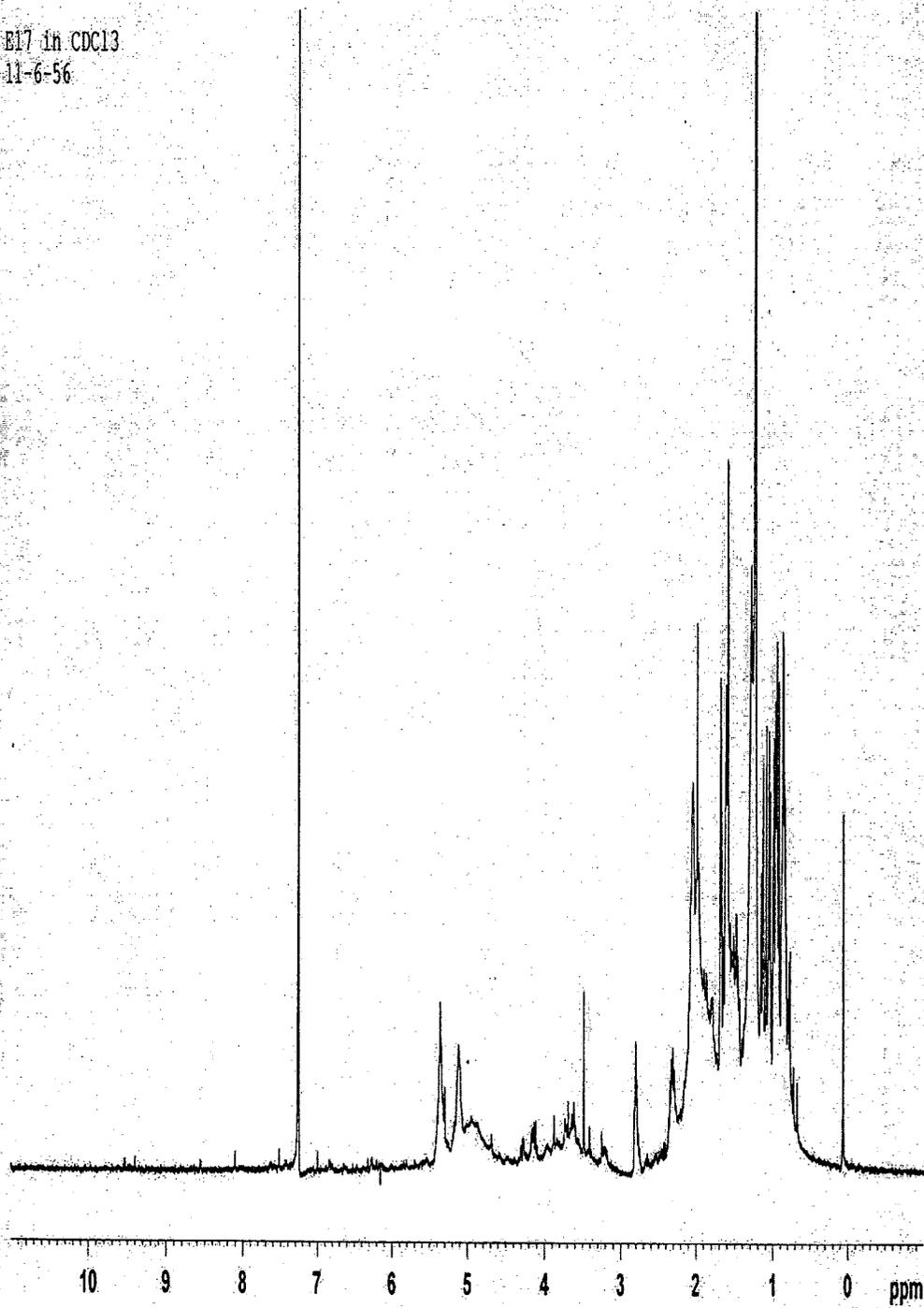
รูปที่ ๑ 1-24 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของรากพนมสวรรค์

E16 in CDCl₃
11-6-56



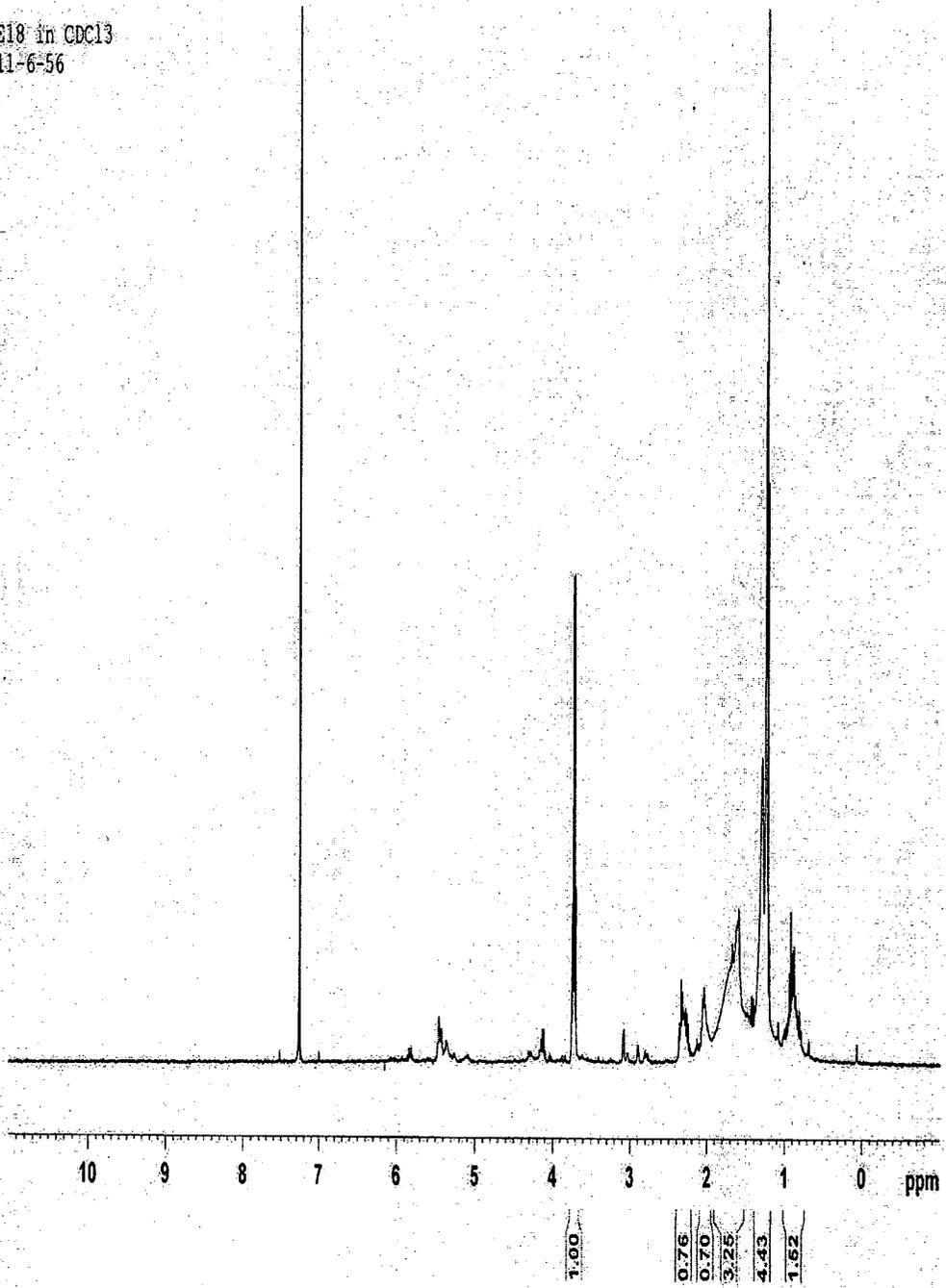
รูปที่ ๘ 1-25 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของลำต้นสะค้านใบพลู

E17 in CDCl3
11-6-56



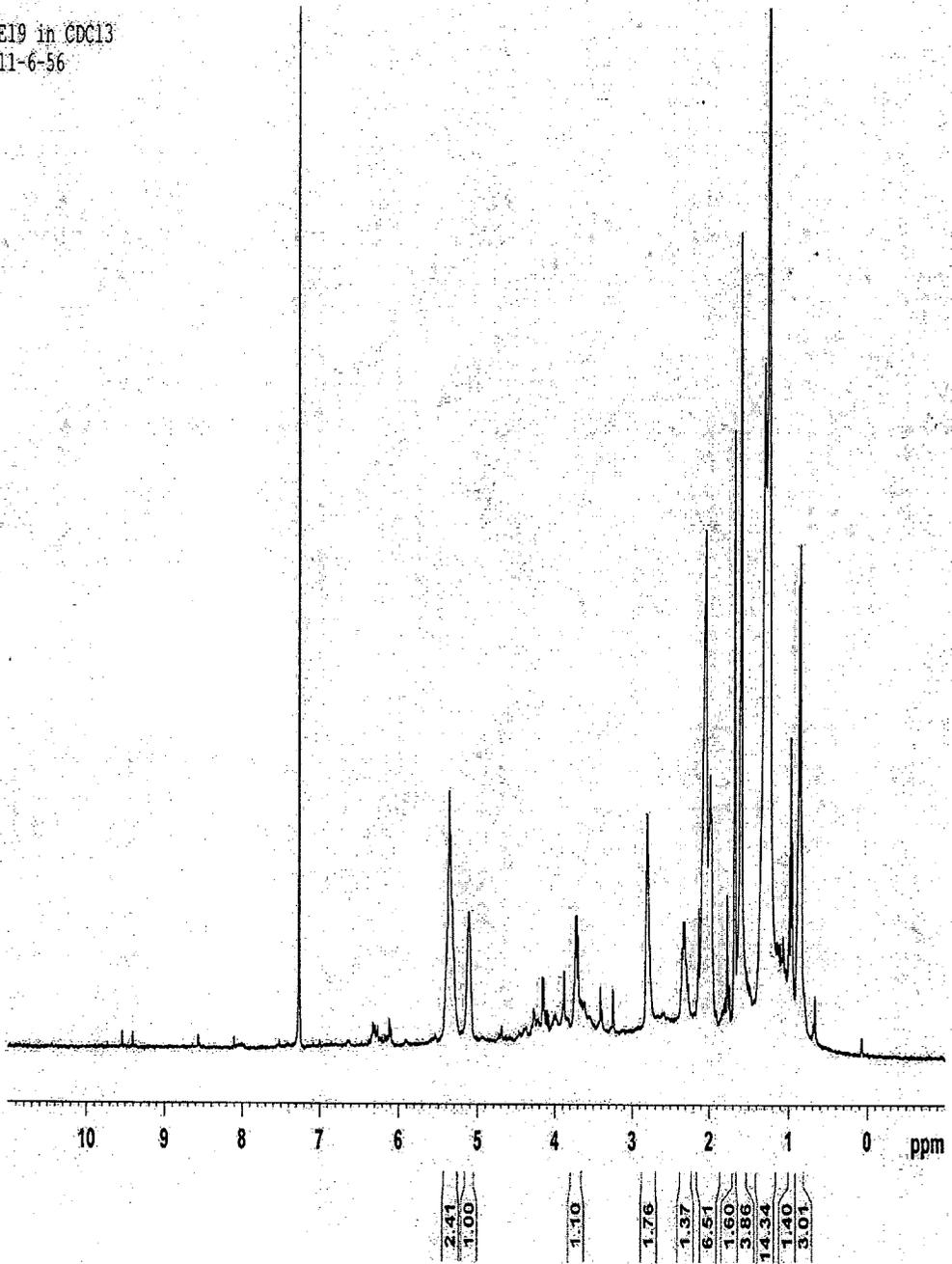
รูปที่ ผ 1-26 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบฝิ่นแสนห้า

E18 in CDCl₃
11-6-56



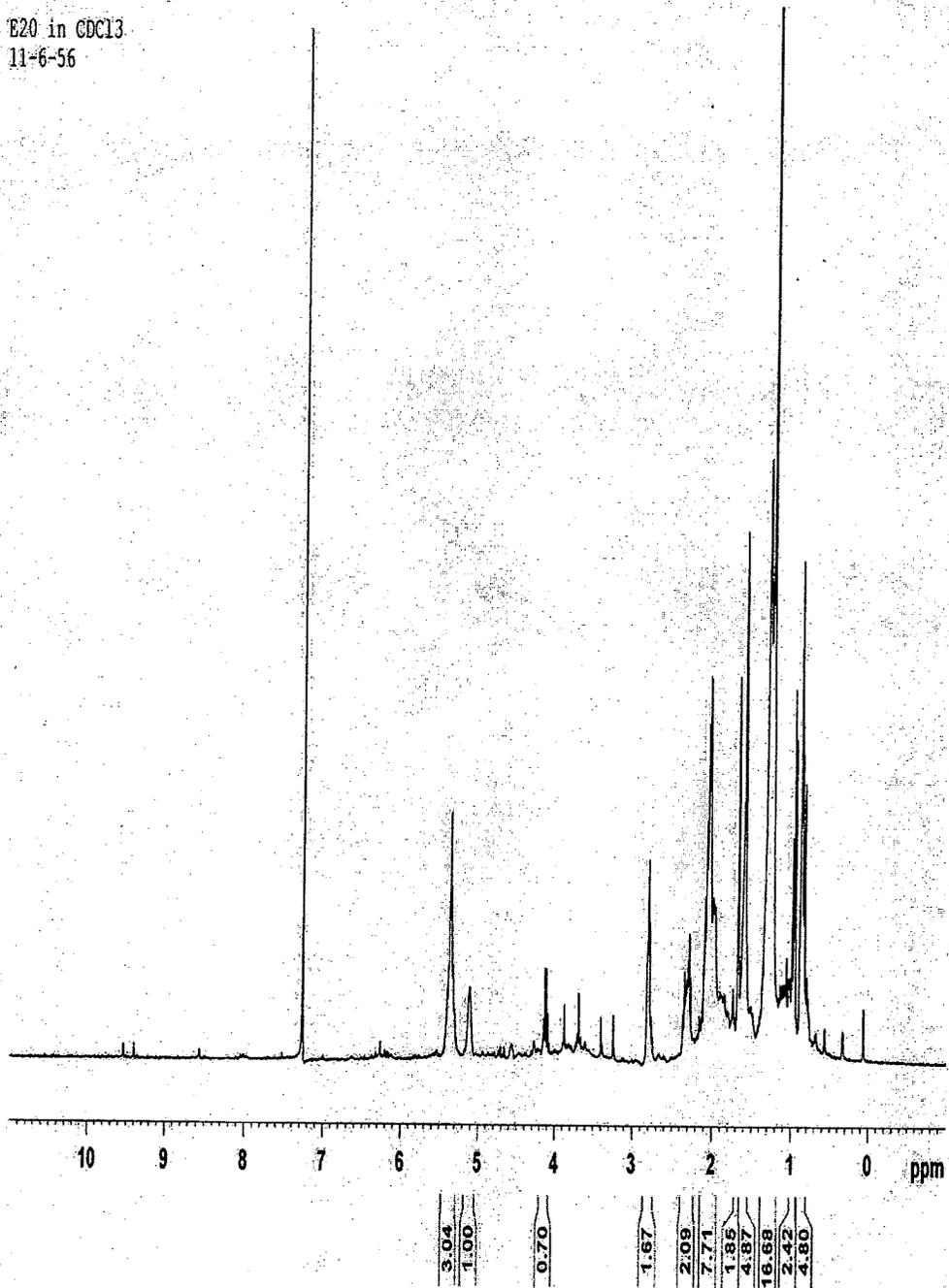
รูปที่ ผ 1-27 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเข็มป่า

E19 in CDCl₃
11-6-56



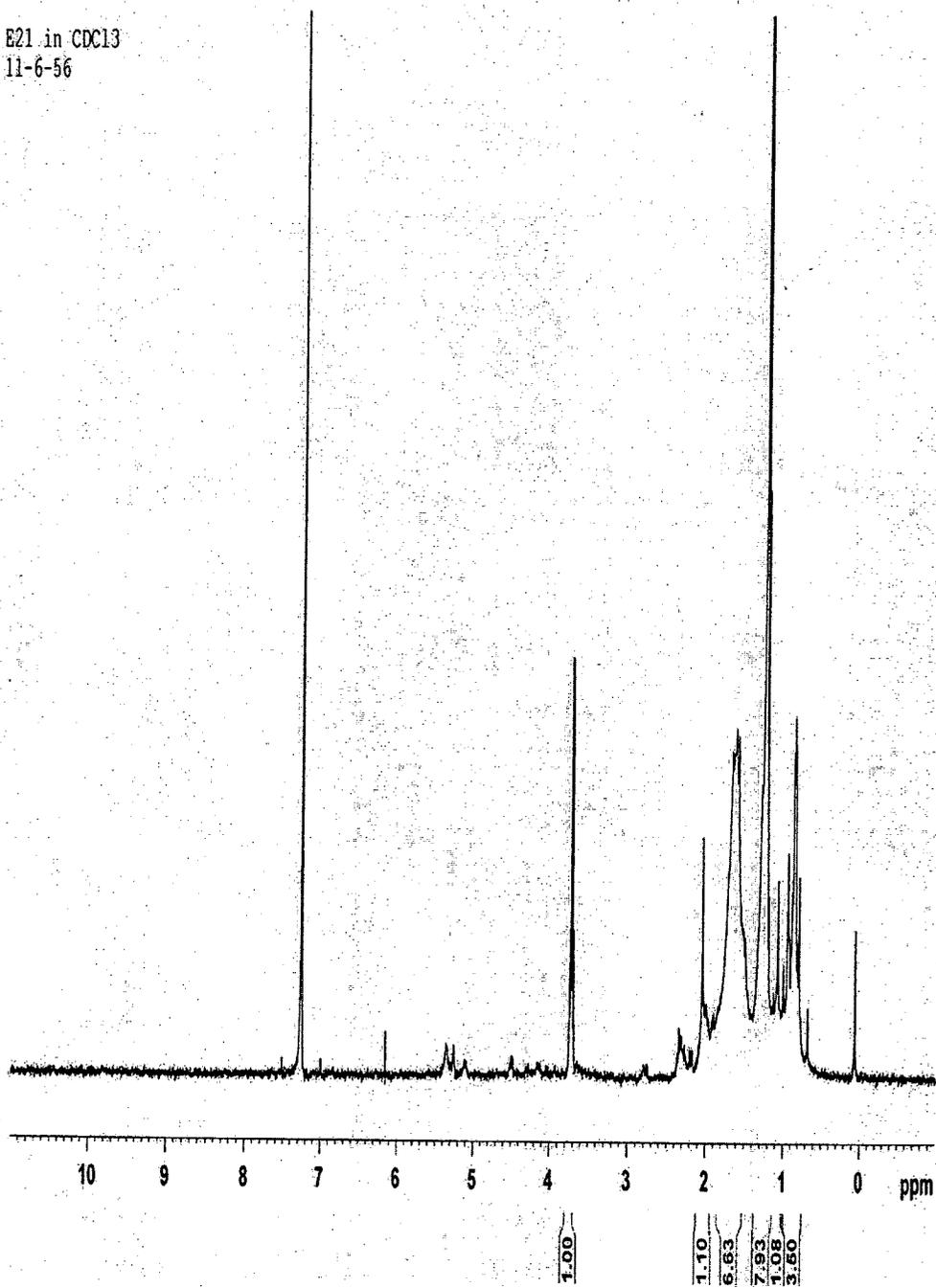
รูปที่ ผ 1-28 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบฟันปลา

E20 in CDCl₃
11-6-56



รูปที่ ผ 1-29 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของใบราชดัด

E21 in CDCl₃
11-6-56



รูปที่ ๗ 1-30 สเปกตรัม NMR ของส่วนสกัดเอทานอลของเปลือกพื้งแห้วใหญ่

ผลผลิตของโครงการวิจัย (Outputs):

1. ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เบญจวรรณ ชิวปรีชา และกล่าวขวัญ ศรีสุข.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. Proceeding of the 5th Science Research Conference, University of Phayao, Thailand, 2013, pp. 95-100.
2. กล่าวขวัญ ศรีสุข, สาวินีย์ สีมานันท์, ปริญญา เกตุกุล, พรสุดา กันแก้ว, เอกรัฐ ศรีสุข, กาญจนา หริ่มเพ็ง, เบญจวรรณ ชิวปรีชา, และคารณ เลียดประถม. (2557). ฤทธิ์ต้านการอักเสบของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด จังหวัดจันทบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 19 (ฉบับพิเศษ), 304-311.
3. Sawinee Seemakhan, Klaokwan Srisook. *Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages. Proceeding of the 5th international conference on natural products for health and beauty, Phuket, Thailand, 2014, pp. 158-163.
4. ผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ ระดับปริญญาตรี สาขาชีวเคมี จำนวน 2 คน คือ นางสาวปริญญา เกตุกุล และ นางสาวพรสุดา กันแก้ว และระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จำนวน 1 คน คือ นางสาว สาวินีย์ สีมานันท์



**ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรบางชนิดในโครงการพัฒนาป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ด
จังหวัดฉะเชิงเทรา**
**Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants from Ban Ang-Ed Official Community
Forest, Chantaburi Province**

ประวิมล เกษม¹, พงศกร กิ่งแก้ว², บุญจรรยา จันทวิภา³ และ กฤษกร วิจิตรวิภา⁴

¹มหาวิทยาลัยราชภัฏ จันทบุรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวิทยาเขตตราด วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2557

²มหาวิทยาลัยราชภัฏ จันทบุรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวิทยาเขตตราด วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2557

³ศูนย์วิจัยและพัฒนาการวิจัยพืชสวนและวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยตราด วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2557

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 11 ชนิด จากจังหวัดฉะเชิงเทรา มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงการพัฒนาป่าชุมชนและชุมชนในบริเวณป่าชุมชนบ้านอ่างเอ็ดจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ *Albizia odoratissima*, *Albizia saman*, *Albizia saman* และ *Albizia saman* โดยใช้วิธีวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธีวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการวิจัยพบว่า รากของ *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่า รากของ *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดตามลำดับ

คำสำคัญ

Abstract

This study was undertaken to evaluate antioxidant activity and total phenolic contents of water and ethanolic extracts of 11 medicinal plants from Chantaburi Province. The antioxidant activity was measured using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity assay. Total phenolic contents were estimated by Folin-Ciocalteu method. The high antioxidant activity and phenolic contents was observed in the roots of *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) stem, leaves of *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) and *Albizia odoratissima* (ฝรั่ง). Total phenolic contents was correlated with antioxidant activity of water extracts and ethanolic extracts with R^2 values of 0.991 and 0.955, respectively. Therefore, *M. cajuputi*, *M. saman* and *A. odoratissima* can be natural source of antioxidants.

Keywords

บทนำ

ประเทศไทยมีสมุนไพรจำนวนมากที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ (Kasornkarn et al., 2005) และมีการใช้สมุนไพรอย่างแพร่หลายทั้งในรูปแบบของยาสมุนไพรและอาหารเสริมสมุนไพร โดยสมุนไพรต่าง ๆ เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ กันได้ เช่น ใช้เพื่อรักษาโรคต่าง ๆ ใช้เพื่อป้องกันโรคต่าง ๆ ใช้เพื่อเสริมสุขภาพ และใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่น ๆ อีกมากมาย (Kasornkarn et al., 2005) อย่างไรก็ตาม การใช้สมุนไพรอย่างปลอดภัยจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเหล่านั้นก่อนนำมาใช้ (Kasornkarn et al., 2005)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 11 ชนิด จากจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยใช้วิธีวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธีวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ผลการวิจัยพบว่า รากของ *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดตามลำดับ ผลการวิจัยพบว่า รากของ *Melastoma cajuputi* (กุ่ม) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงที่สุดตามลำดับ

Corresponding author. E-mail: Kasornkarn@rajabhat.ac.th



ขอเชิญนักวิจัยและบุคลากรในสาขาที่เกี่ยวข้องมาสมัคร เข้าร่วมงานวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาประเทศไทย โดยนำผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นมาเสนอขอรับการพิจารณาเพื่อขอรับรางวัล โดยสามารถส่งผลงานได้ก่อนวันที่ 15 มีนาคม 2561 และขอรับทราบผลการพิจารณาได้ก่อนวันที่ 30 มีนาคม 2561 รายละเอียดการสมัครและขอรับรางวัลสามารถดูได้ที่เว็บไซต์ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และเว็บไซต์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

หลักการ

การสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรม

เป็นการสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาประเทศไทย โดยสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นโดยคนไทยหรือโดยคนไทยร่วมกับชาวต่างชาติ โดยผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นโดยคนไทยหรือโดยคนไทยร่วมกับชาวต่างชาติ จะต้องเป็นผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นโดยคนไทยหรือโดยคนไทยร่วมกับชาวต่างชาติ และต้องเป็นผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่คิดค้นขึ้นโดยคนไทยหรือโดยคนไทยร่วมกับชาวต่างชาติ

ตารางที่ 1 รายการพืชสมุนไพรและพืชสมุนไพรใช้ผสม

รายชื่อพืชสมุนไพร	วงศ์	ประโยชน์ใช้สอย
ใบย่านาง (Ageratum conyzoides Linn.)	Compositae	ใบ
ใบเตย (Drosera rotundifolia (L.) Smith)	Engelmaceae	ใบ, เมล็ด
ขมิ้น (Curcuma sp.)	Leguminosae-Casualties	ใบ, ราก
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza)	Moraceae	ใบ
ขมิ้นชัน (Curcuma sp.)	Apocynaceae	ใบ
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Melastomaceae	ใบ, ราก
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Taccaceae	ใบ, เมล็ด
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Acaceae	ใบ, เมล็ด
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Tiliaceae	ใบ
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Rubiaceae	ใบ, ราก
ขมิ้นชัน (Curcuma xanthorrhiza (Karst.) Merr.)	Umbelliferae	ราก

1. การผลิตสารสกัดสมุนไพรใช้ผสม

นำสมุนไพรที่ระบุชื่อในตารางที่ 1 มาล้างทำความสะอาด และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปตากแดดให้แห้งสนิท จากนั้นนำสมุนไพรที่ตากแห้งแล้วมาบดให้ละเอียด และนำผงสมุนไพรที่บดแล้วมาผสมกันตามอัตราส่วนที่กำหนดในตารางที่ 1 และนำไปบรรจุใส่ถุงพลาสติกให้เรียบร้อย และเก็บรักษาไว้ในที่แห้งและเย็น

2. การผลิตสารสกัดสมุนไพรใช้ผสมใช้ผสม

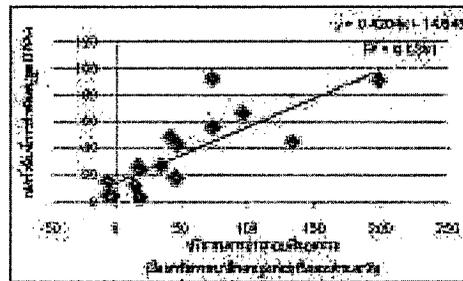
นำผงสมุนไพรที่บดแล้วมาใส่ลงในขวดแก้วที่สะอาด และเติมน้ำสะอาด 500 มิลลิกรัม แล้วปิดฝาขวดให้แน่น และนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำผงสมุนไพรที่แช่ในตู้เย็นแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปบรรจุใส่ถุงพลาสติกให้เรียบร้อย และเก็บรักษาไว้ในที่แห้งและเย็น

3. การผลิตสารสกัดสมุนไพรใช้ผสม

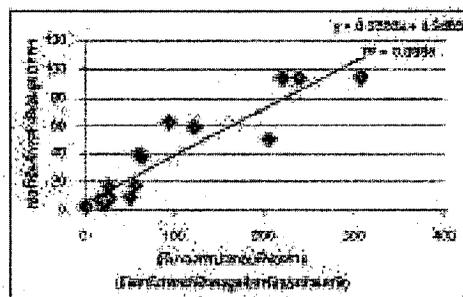
นำผงสมุนไพรที่บดแล้วมาใส่ลงในขวดแก้วที่สะอาด และเติมน้ำสะอาด 500 มิลลิกรัม แล้วปิดฝาขวดให้แน่น และนำไปแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำผงสมุนไพรที่แช่ในตู้เย็นแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปบรรจุใส่ถุงพลาสติกให้เรียบร้อย และเก็บรักษาไว้ในที่แห้งและเย็น



2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย
 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย
 2.1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย



รูปที่ 2-1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย



รูปที่ 2-2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย

บทสรุป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2551-2558

จากผลการวิจัยพบว่า ปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยและปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทยมีความสัมพันธ์กัน โดยปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนบนของประเทศไทยมีค่าสูงกว่าปริมาณการไหลของน้ำในลำน้ำโขงตอนล่างของประเทศไทยในบางช่วงเวลา



- Hui, C. Y., Chan, Y. P. and Chung, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Food Res.*, 40(1), 12-21.
- Imprabuthina, G. P., Srinivasan, B. and Paul SA. (2009). Radical scavenging activities of the seed grapefruit and sour orange fruit extracts in different *in vitro* model systems. *StressourTechnol.*, 22, 4404-4408.
- Kim, D. O., Jeong, S. W. and Lee, C. Y. (2002). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81(2), 221-228.
- Kim, J.M. and Yun-Choi, R. S. (2006). Anti-oxidant effects of flavonoids and terpenoid glycosides from *Sapota*, *Jacquinia*, *Actin*. *Chem Res.*, 31(7), 822-831.
- Zhang, L., Anjireddy, S. R., Srinivas, R. K., Sastry, C. N., Nandimamla, R., Paul, T. K., John, S., Kirubakaran, S., Gendil, M. and Ming, J. W. (2011). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected Medicinal Plants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. *J.Agric.FoodChem.*, 59, 12264-12267.

ตารางที่ 4 : ปริมาณการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศของประเทศไทย

ชื่อ	ชื่อ	ชนิดสินค้า	จำนวนหน่วยนำเข้า		ปริมาณการนำเข้าที่คิดภาษี	
			จำนวนตัน	จำนวนมูลค่า	จำนวนตัน	จำนวนมูลค่า
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Rubricates	เหล็ก	7.8	8.7	232.9 ± 4.0	132.3 ± 3.3
เหล็กกล้า (Mild steel)	Machinery	เหล็ก	2.5	42.7	307.8 ± 2.3	72.9 ± 0.8
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Logarithmic	เหล็ก	7.2	43.2	39.7 ± 2.4	74.2 ± 1.6
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Chemical	เหล็ก	2.3	66.3	106.8 ± 3.8	81.4 ± 1.3
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Textiles	เหล็ก	14.9	23.5	81.9 ± 0.3	33.9 ± 0.6
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Plastics	เหล็ก	2.1	6.3	35.2 ± 0.8	13.2 ± 0.3
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Textiles	เหล็ก	6.0	43.4	221.9 ± 4.3	36.5 ± 1.2
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Chemical	เหล็ก	12.1	3.3	313.2 ± 14.7	325.7 ± 13.6
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Logarithmic	เหล็ก	6.6	7.4	214.5 ± 5.4	226.5 ± 3.7
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Chemical	เหล็ก	6.7	9.7	25.3 ± 1.7	46.8 ± 0.6
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Machinery	เหล็ก	3.5	3.3	24.6 ± 2.8	24.9 ± 0.9
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Apparatus	เหล็ก	2.1	13.0	21.4 ± 0.5	4.1 ± 0.2
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Chemical	เหล็ก	12.2	22.3	36.2 ± 3.7	77.4 ± 1.4
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Plastics	เหล็ก	12.3	23.7	33.2 ± 4.3	47.8 ± 1.3
เหล็ก (Iron and Ferroalloys)	Alloys	เหล็ก	10.2	37.6	123.0 ± 2.1	17.4 ± 0.7

ที่มา: กรมศุลกากร, รายงานประจำปีของกรมศุลกากร, ปีที่ 20 - 21 มีนาคม พ.ศ. 2557

- Sharma, D., Mangrol, N., Choudhary, J., Bhatnagar, S., Srivastava, S., Srivastava, R. (2013). Antioxidant mechanism of anti-inflammatory activity of *Ficus religiosa* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 4, 415-424.
- Colonna, J.M. (2011). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Immunological Reviews*, 1, 1217-1404.
- Das, R., Apeng, S.C., Lee, S., Khoo, C., Koyyathodi, S.R. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and their corresponding phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 7, 26.
- Guan, T.J., Kuriha, R., Adachi-Guzik, T. (2007). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54, 463-467.
- Hirata, S.H.A., Ryu, S., Shin, Z.J., Kim, S.K. (2016). Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction mediates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 65-71.
- Maeng, W. H., Lee, A. B., Tang, C. H. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of polyphenols. *Proceedings of Bioactive Constituents of Green Algae. Biochemistry (Biotechnology)*, 70, 2371-2380.
- Jung, H.W., Seo, J.K., Kim, J.H., Lee, K.H., Park, K.K. (2005). Inhibitory effect of *Pteris aquilina* polyphenols on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses: blocking of NF- κ B signaling pathway in murine macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 313-318.
- Kumar, V., Akbar, A.K., Fatima, N., Mitchell, R.N. (2007). *Antioxidant and Anti-inflammatory* (9 ed.). United States of America, Elsevier Science.
- Misraquid, W., Mahommed, E., Unga, B. (2011). In vivo Anti-inflammatory activities of leaf extracts of *Orbanium molle* in mice model. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 33-38.
- Sanjeev, A.S., Zhang, L., Kojyalovici, S.B., Jeeva, S.C., Bhat, J., et al. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 171.
- Radwan, R., Saeed, R., Elshah, S., Khamis, S. (2012). Cytotoxic and anti-inflammatory activity of some Thai medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 4055-4062.
- Srivastava, R., Patra, M., Mangrol, N., Srivastava, S., Sarma, S. (2014). Anti-inflammatory effect of ethyl acetate extract from *Cassia alata* leaves: Lin may be involved with induction of hemoxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1009-1014.
- Srivastava, R., Shrivastava, D., Srivastava, R., Srivastava, P., Choudhary, P., Srivastava, S. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effects of hot water extract from *Ficus religiosa* leaves-herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 23, 4077-4081.
- Vasanthi, A., Elavari, J.P., Chinn, C.E. (2000). Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease. *Respiratory Research*, 1, 67-72.
- Zhang, L., Aranyosi, S.R., Sarker, R.K., Song, C.J., Noman, T.S., John, E., et al. (2011). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12363-12367.

***Ageratum conyzoides* leaf extract inhibit inflammatory response via suppression of NF- κ B and MAPKs pathway in LPS-induced macrophages.**

Savinee Seensakhan^{1*}, Klakwan Srisook^{2,3*}

¹Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Saensook, Muang, Chonburi, Thailand 20131

²Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Burapha University, Saensook, Muang, Chonburi, Thailand 20131

³Department of Biochemistry, Faculty of Science, Burapha University, Saensook, Muang, Chonburi, Thailand 20131

*klakwan@buu.ac.th

phone +66-3810-3038

fax +66-3839-3495

ABSTRACT

Ageratum conyzoides (Asteraceae) has been widely used in traditional medicine in several countries for the treatment of skin diseases, ulcer wound, diarrhea, fever, pain and inflammation. Leaf extracts from *Ageratum conyzoides* have been shown anti-inflammatory activity in several *in vivo* models. However, the mechanism of its action has not been described yet. In this study, we determined the anti-inflammatory activity and the molecular mechanism of the ethanol extract of *Ageratum conyzoides* leaves (ACE) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW264.7 macrophage model. ACE exhibited an inhibitory effect on inducible nitric oxide synthase (iNOS)-catalyzed nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2)-catalyzed prostaglandin E₂ (PGE₂) production with IC₅₀ values of 23.4 and 18.5 μ g/ml, respectively. ACE showed no significant cytotoxic effect determined by MTT assay. ACE attenuated the expression of iNOS and COX-2 at mRNA as well as protein levels in a concentration-dependent manner. Additionally, ACE suppressed the level of nuclear factor- κ B (NF- κ B) translocation and phosphorylation of p38 kinase, extracellular receptor kinase (ERK) and c-jun NHE terminal kinase (JNK) of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). These results indicate that ACE inhibits inflammatory response, at least in part, by inhibition of NO and PGE₂ production through suppression of iNOS and COX-2 expression via a signaling pathway that involves NF- κ B nuclear translocation and MAPKs phosphorylation. These findings provide the scientific evidence to justify the anti-inflammatory therapeutic use of *Ageratum conyzoides* leaves in traditional medicine.

Keywords: *Ageratum conyzoides*, Nitric oxide, Prostaglandin E₂, iNOS, COX-2, Macrophage

1. INTRODUCTION

Inflammation is a critically important aspect of host responses to infection and injury. In response to inflammatory stimuli such as LPS, macrophages secrete various pro-inflammatory mediators including inducible nitric oxide synthase (iNOS)-catalyzed nitric oxide (NO) and cyclooxygenase-2 (COX-2)-catalyzed prostaglandin E₂ (PGE₂), which are involved in eradication of infection and injury. However, excessive or prolonged secretion of these mediators is implicated in the pathogenesis of a variety of diseases, including asthma, atherosclerosis, cancer, diabetes, inflammatory bowel diseases, and rheumatoid arthritis [1, 2]. Therefore, inhibition of NO and PGE₂ production is a promising target in the development of anti-inflammatory agents. Expression of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated macrophages is mainly regulated by nuclear factor- κ B (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPKs) pathways [3-5].

Azadirachta indica L. (Asteraceae) is a natural herb used in traditional medicine in many countries in the world. The leaves of *A. indica* have been used in the treatment of chronic pain and various inflammatory diseases [6]. *A. indica* leaf extracts have been shown to exert anti-inflammatory activity in several *in vivo* models [7-9]. However, the molecular mechanisms of its action have not been described. The purpose of this study was to investigate underlying anti-inflammatory mechanisms of *A. indica* leaf extract in LPS-induced RAW 264.7 macrophages.

2. MATERIALS AND METHODS

Preparation of extract

Leaves of *A. indica* were collected from Bin Anj-Ed official-community forest, Chantaburi Province. The plants were cleaned with tap water, dried and finally powdered. The powders were soaked in 95% ethanol in a ratio 1:10 for 5 days with occasional shaking, after that ethanol extract was filtered through filter paper. Plant residues were re-extracted with 95% ethanol 2 times. The filtrate were pooled and evaporated by rotary evaporator until dryness before storage at -20°C.

Cell viability assay

Cell viability of RAW 264.7 macrophages were assessed by a modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as determined by Bangpool et al., 2013 [5].

Measurement of nitric oxide production

Nitrite, an oxidation product of NO, in the culture media is an index of NO production determined by Griess reaction according to the method reported by Bangpool et al., 2013 [5].

Determination of PGE₂

PGE₂ produced from LPS-stimulated RAW 264.7 cells was quantified using PGE₂ competitive enzyme immunoassay kit (R&D Systems, USA).

Western blotting analysis

Levels of iNOS, COX-2 and β -actin proteins in macrophages were determined by Western blotting analysis as described by Bangpool et al., 2013 [5].

Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) analysis

Total RNA was reverse transcribed into cDNA using 3x InqTM Reverse Transcription Supermix. The cDNA was used for real-time quantitative PCR which conducted in a CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad) using 2x iQTM Universal SYBR[®] Green Supermix. The fold increase or decrease of iNOS and COX-2 were determined relative to a control after normalized to a housekeeping gene (β -2) using formula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Nuclear protein extraction

For analyses of NF- κ B p65 subunit level, nuclear protein extracts were isolated according to the method reported by Srisook et al., 2011 [10].

3. RESULTS AND DISCUSSION

This study was performed to investigate the mechanism of anti-inflammatory effect of *A. cosquilaria* leaves in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. The ethanol leaf extract of *A. cosquilaria* (ACE) inhibited the production of NO and PGE₂ in a dose-dependent manner with IC₅₀ values of 22.69 ± 0.14 and 23.92 ± 3.72 µg/ml, respectively (Figure 1). ACE at concentrations 3.125 to 50 µg/ml, did not significantly affect cell viability when compared to unstimulated control cell, indicating that the reduction of NO and PGE₂ production was not attributed to cell cytotoxicity. As shown in Figure 2, iNOS and COX-2 proteins were increased dramatically in cells treated with LPS and ACE attenuated the expression of protein iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. In accord, we found that ACE attenuated the level mRNA of iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner (Figure 3). The results show that inhibition of NO and PGE₂ by ACE is a result of the suppression of iNOS and COX-2 mRNA and protein synthesis.

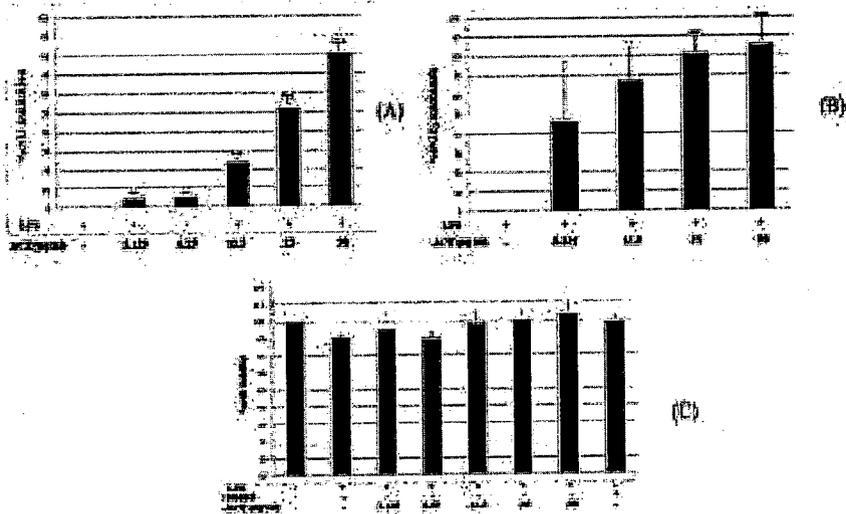


Figure 1. Inhibitory effects of ACE on NO (A) and PGE₂ (B) production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Cells were incubated with ACE and LPS for 24 h. Accumulated nitrite and PGE₂ concentrations present in the medium were determined. (C) Viability of cells was determined using the MTT assay. Each column represents the mean ± SD of at least three independent experiments with triplicate samples. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. LPS alone.

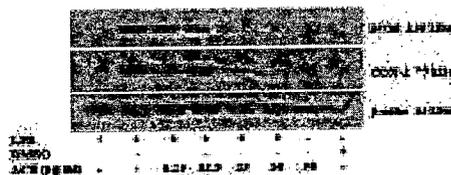


Figure 2. Effect of ACE on iNOS and COX-2 expression in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. Cells were stimulated with ACE and LPS for 24 h. iNOS and COX-2 proteins were detected by Western blot analysis.

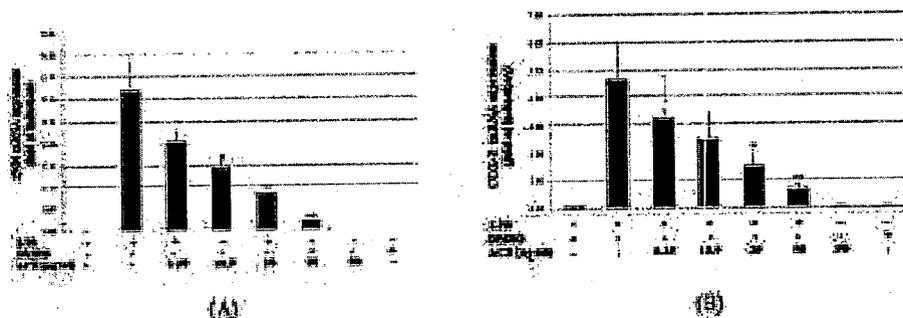


Figure 3. Effect of ACE on iNOS (A) and COX-2 (B) mRNA expression in LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were treated with LPS and ACE for 6 h. Total RNA were isolated, iNOS and COX-2 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR. Each column represents the mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. LPS alone.

In unstimulated cells, transcription factor NF- κ B is bound to inhibitor of κ B (I κ B) in cytoplasm. Upon activation, NF- κ B is rapidly translocated to the nucleus, subsequently facilitates the transcription of target genes involved in inflammation, such as pro-inflammatory cytokines, chemokines, and inducible enzymes such as iNOS and COX-2 [3, 11]. We next determined the effect of ACE on the level of NF- κ B p65 subunit since p65 protein is a subunit of the most common heterodimer NF- κ B. LPS induced NF- κ B p65 subunit translocation in nucleus, but ACE suppressed the level of NF- κ B p65 subunit (Figure 4A). The other major signal pathway of iNOS and COX-2 expression stimulated by LPS is the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway composed of p38 kinase, extracellular receptor kinase (ERK) and c-jun NH₂ terminal kinase (JNK) [4, 5]. As shown in Western blot analysis data in Figure 4B, LPS induced the phosphorylation of ERK and p38 MAPK while ACE suppressed the phosphorylated ERK and p38 MAPK in a dose-dependent manner. These results indicate that ACE inhibited NO and PGE₂ production through suppression of iNOS and COX-2 expression, at least in part, via a reduction of NF- κ B p65 subunit nuclear translocation and ERK and p38 MAPK phosphorylation.

The extracts from *A. cosmetidis* have been shown anti-inflammatory effects in inflammation models of animal which associated with the secretion of inflammatory mediators including PGE₂ and NO [7-9]. The obtained results from LPS-induced PGE₂ and NO release in RAW 264.7 macrophages indicate that the mechanism of anti-inflammatory effect of *A. cosmetidis* on several *in vivo* models [7-9] might be attributed to the inhibition of PGE₂ and NO. Literature review reports indicate the presence of lutein and quercetin in *A. cosmetidis* [6] which have been shown to possess anti-inflammatory activities [12]. Thus these compounds might be attributed to the potent anti-inflammatory activity of ACE in LPS-induced macrophages. However, the bioactive compounds which responsible for anti-inflammatory property of ACE should be identified.

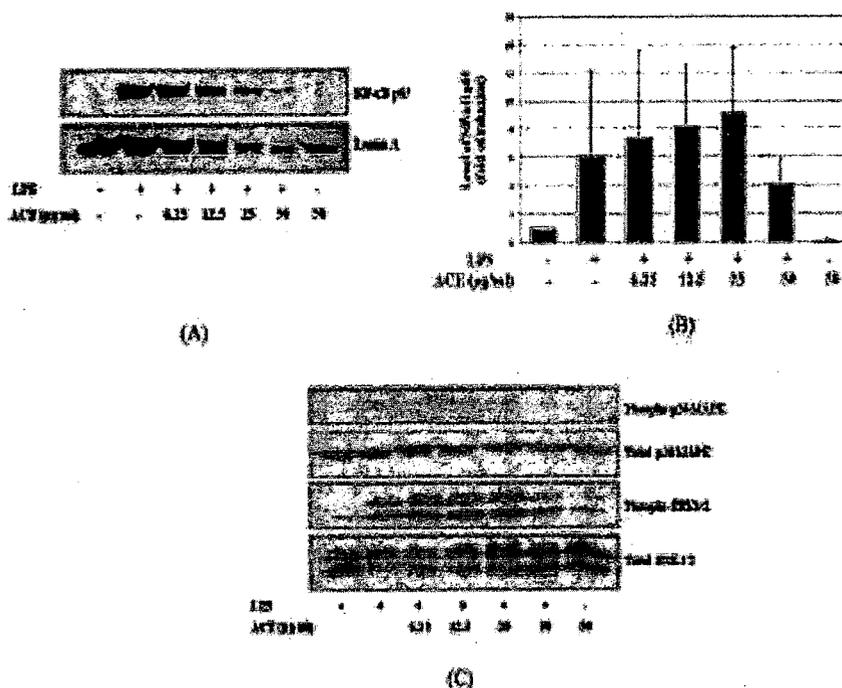


Figure 4. Effect of ACE on the nuclear translocation of subunit p65 of NF- κ B and phosphorylation of MAPKs in RAW 264.7 macrophages. Cells were pre-treated with the indicated concentrations of ACE for 30 min, and stimulated with LPS for 1 h for NF- κ B and 30 min for MAPKs. The nuclear extracts were analyzed the levels of NF- κ B p65 subunit (A). Graph shows the mean \pm SD of results of densitometric analyses of NF- κ B p65 subunit which were normalized to Lamin A densitometric values (n = 3) (B). Whole cell extracts were determined the phosphorylated ERK1/2 and p38 MAPK level by Western blot analysis (C).

4. CONCLUSIONS

These obtained results demonstrate that the mechanism of anti-inflammatory activity of ACE is, at least in part, the inhibition of NO and PGE₂ production by inhibition of iNOS and COX-2 expression, via NF- κ B and MAPKs signaling pathway. These findings support the uses of *Ageratum conyzoides* leaves in traditional medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was financially supported by Burapha University and also by the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Thailand.

REFERENCES

1. Gozik TJ, Kocikat R, Adamek-Gozik T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*. 54, 469-487.
2. Rankin JA. 2004. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*. 15, 3-17.
3. Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 19, 6853-6866.
4. Cocha M, Mackinnon N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 13, 83-94.

5. Busjoud D, Mingshol N, Chamlimal J, Ruytrud S, Srisook E, Srisook E. 2013. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pithecolobium latifolium* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol*. 146: 483-504.
6. Oromde AL. 2002. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia*. 73: 1-16.
7. Motta ACA, Silva ELF, Fraga MCA, Wanderley AG, Aflupont P, Mata MB. 2003. Antiinflammatory and chemia toxicity study of the leaves of *Ageratum conyzoides* L. *in vitro*. *Phytomedicine*. 12: 133-142.
8. Bhandar NM, Aswathitharayana BL, Kulkarni VR, Kulkarni PV, Smith DN, Tarik RC. 2011. Proxative efficacy of ethanolic extract of *Ageratum conyzoides* on experimental induced inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol*. 6: 664-673.
9. Rahman A, Akter N, Rochid H, Ahmed NI, Uddin M, Islam S. 2012. Analgesic and anti-inflammatory effect of whole *Ageratum conyzoides* and *Eleocharis acicularis* extracts in animal models. *African J Pharm Pharmacol*. 6: 1493-1496.
10. Srisook K, Palachet M, Mingshol N, Srisook E, Saengsuat S. 2011. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate extract from *Clusia grandifolia* Lam may be involved with induction of heme oxygenase-1 and suppression of NF- κ B activation. *J Ethnopharmacol*. 133: 1008-1014.
11. Boyon Y, Ortiz MA, Lopez-Hernandez PR, Gao F, Karin M, Pflanz M, Piadralka EJ. 2003. Inhibition of Ikappa B kinase by a new class of retinoid-related anticancer agents that induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 23: 061-1074.
12. Garcia-Medina V, Ortega I, Collado PS, Esceller A, Sanchez-Campos S, Tujón MJ, González-Gallego J. 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and isomiquerol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*. 557: 224-229.