

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 เคมี

3.1.1 การแยกสกัด andrographolide (1), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (2) and 14-deoxyandrographolide (3)

แยกสารสกัดเมธานอลด้วยคลื่นไมโครมาโตกราฟี ได้สาร andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide and 14-deoxyandrographolide.

Andrographolide: Yield, 0.25% (25 g); colorless amorphous powder; melting point (m.p.), 230-231 °C in DCM:MeOH, 1:1 (ref. 229-230 °C in methanol, Jain et al., 2000). IR (KBr): 3398, 2928, 1728, 1675, 1459, 1221, 1033 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 6.84 (1H, *br t*, *J*=7.0 and 6.6 Hz, H-12), 5.00 (1H, *d*, *J*=5.9 Hz, H-14), 4.88 (1H, *s*, H-17a), 4.66 (1H, *s*, H-17b), 4.46 (1H, *dd*, *J*=10.1 and 6.2 Hz, H-15a), 4.15 (1H, *dd*, *J*=10.1 and 2.0 Hz, H-15b), 4.11 (1H, *d*, *J*=10.9 Hz, H-19a), 3.36 (1H, *d*, *J*=11.3 Hz, H-19b), 3.41 (1H, *m*, H-3), 2.59 (2H, *m*, H-11), 2.42 (1H, *m*, H-7a), 2.02 (1H, *m*, H-7b), 1.92 (1H, *dd*, *J*=3.9 Hz, H-9), 1.21 (3H, *s*, H-18), 0.75 (3H, *s*, H-20). ¹³C NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_C 171.2 (C=O, C-16), 148.0 (CH, C-12), 147.3 (C, C-8), 128.3 (C, C-13), 107.8 (CH₂, C-17), 79.5 (CH, C-3), 74.7 (CH₂, C-15), 65.2 (CH, C-14), 63.5 (CH₂, C-19), 55.9 (CH, C-9), 54.9 (CH, C-5), 42.3 (C, C-4), 38.5 (C, C-10), 37.5 (CH₂, C-7), 36.7 (CH₂, C-1), 27.6 (CH₂, C-2), 24.3 (CH₂, C-11), 23.8 (CH₂, C-6), 21.9 (CH₃, C-18), 14.1 (CH₃, C-20).

14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide: Yield 0.013% (1.3 g); colorless amorphous powder; m.p. 203-204 °C in DCM:MeOH, 1:1 (ref. 203-204 °C in methanol, Matsuda et al., 1994). IR (KBr): 3304, 2927, 1736, 1635, 1447, 1346, 1100, 1038 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 7.16 (1H, *br s*, H-12), 6.86 (1H, *dd*, *J*= 10.1 and 9.8 Hz, H-11), 6.11 (1H, *d*, *J*=15.6 Hz, H-14), 4.80 (2H, *br s*, H-15), 4.77 (1H, *d*, *J*=1.2 Hz, H-17a), 4.52 (1H, *d*, *J*=1.5 Hz, H-17b), 4.21 (1H, *d*, *J*=10.9 Hz, H-19a), 3.47 (1H, *dd*, *J*=4.7 Hz, H-3), 3.34 (1H, *d*, *J*=10.9 Hz, H-19b), 2.43 (1H, *dt*, *J*=1.6 and 2.3 Hz, H-7a), 2.31 (1H, *d*, *J*=10.1 Hz, H-7b), 2.07 (1H, *dt*, *J*=4.7 Hz, H-1), 1.02 (3H, *s*, H-18), 0.89 (3H, *s*, H-20). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_C 172.3 (C=O, C-16), 148.1 (C, C-8), 142.9 (CH, C-14), 136.0 (CH, C-12), 129.3 (C, C-13), 121.1 (CH, C-11), 109.2 (CH₂, C-17), 80.8 (CH, C-3), 69.6 (CH₂, C-15), 64.2 (CH₂, C-19), 61.7 (CH, C-9), 54.7 (CH, C-5), 43.0 (C, C-4), 38.6 (C, C-10), 38.2 (CH₂, C-7), 36.6 (CH₂, C-1), 28.1 (CH₂, C-2), 23.0 (CH₂, C-6), 22.6 (CH₃, C-18), 15.9 (CH₃, C-20).

14-Deoxyandrographolide: Yield, 0.018% (1.8 g); colorless amorphous powder; m.p. 167-169 °C in DCM:MeOH, 1:1 (ref. 172-173 °C in methanol, Fujita et al., 1984). IR (KBr): 3283, 2930, 1754, 1637, 1439, 1350, 1207, 1091, 1039 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 7.08 (1H, *br t*, H-14), 4.87 (1H, *br t*, H-17a), 4.76 (2H, *br t*, H-15), 4.58 (1H, *br t*, H-17b), 4.16 (1H, *d*, *J*=11.0 Hz, H-19a), 3.46 (1H, *m*, H-3), 3.30 (1H, *d*, *J*=11.0 Hz, H-19b), 2.42 (2H, *m*, H-7), 2.10 (1H, *m*, H-11a), 1.65 (1H, *m*, H-11b), 1.02 (3H, *s*, H-18), 0.89 (3H, *s*, H-20). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_C 174.3 (C=O, C-16), 146.8 (C, C-8), 144.0 (CH, C-14), 134.7 (C, C-13), 107.3 (CH₂, C-17), 80.5 (CH, C-3), 70.1 (CH₂, C-15), 64.2 (CH₂, C-19), 56.0 (CH, C-9), 55.3 (CH, C-5), 42.9 (C, C-4), 39.0 (C, C-10), 38.2 (CH₂, C-7), 36.9 (CH₂, C-1), 28.2 (CH₂, C-2), 24.5 (CH, C-6), 24.0 (CH₂, C-12), 22.7 (CH₃, C-18), 21.9 (CH₂, C-11), 15.2 (CH₃, C-20).

3.1.2 สารกึ่งสังเคราะห์

รายชื่อสารกึ่งสังเคราะห์ทั้งหมดและการทดสอบอยู่ใน Appendix 3

3,19-Dipalmitoylandrographolide: Yield: 45%; crystalline powder (CH₂Cl₂), mp 182–185°C; R_f 0.52, silica gel 60 F₂₅₄, CH₂Cl₂/MeOH (95:5); IR: 3400, 2936, 1726, 1674, 1221, 1022, 980 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 6.89 (1H, *t*, *J*=5.3 and 7.0 Hz, H-12), 5.0 (1H, *d*, *J*=5.3 Hz, H-14), 4.84 (1H, *s*, H-17a), 4.54 (1H, *s*, H-17b), 4.43 (1H, *d*, *J*=7.9 Hz, H-15a), 4.39 (1H, *dd*, *J*=6.2 Hz, H-15b), 4.23 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz, H-19a), 4.11 (1H, *d*, *J*=11.9 Hz, H-19b), 4.18 (1H, *dd*, *J*=1.8 and 10.6 Hz, H-3), 2.48 (1H, *d*, *J*=11.0 Hz, H-7), 2.36 (1H, *d*, *J*=11.4 Hz, H-11a), 2.27 (1H, *d*, *J*=9.2 Hz, H-11b), 2.21 (2H, *m*, H-2', H-2''), 2.14 (1H, *m*, H-9), 1.91 (1H, *dd*, *J*=4.4 and 13.2 Hz, H-6a), 1.54 (1H, *m*, H-6b), 0.94 (3H, *s*, H-18), 0.81 (3H, *s*, H-16'), 0.79 (3H, *s*, H-16''), 0.71 (3H, *s*, H-20); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_C: 173.7 (C=O, C-1'), 173.4 (C=O, C-1''), 169.8 (C=O, C-16), 148.6 (CH, C-12), 146.4 (C, C-8), 128.1 (C, C-13), 108.9 (CH₂, C-17), 79.5 (CH, C-3), 74.2 (CH, C-15), 66.2 (C-14, CH), 64.6 (C-19, CH₂), 56.0 (C-9, CH), 55.3 (C-5, CH), 41.3 (C, C-4), 39.0 (C, C-10), 37.9 (CH₂, C-7), 37.0 (CH₂, C-1), 24.2 (CH₂, C-11), 24.7 (CH₂, C-2), 24.6 (CH₂, C-6), 34.7 (CH₂, C-2'), 34.5 (CH₂, C-2''), 22.6 (CH₃, C-18), 14.5 (CH₃, C-20), 14.1 (CH₃, C-16', C-16''); EIMS *m/z*: [M+Na+H]⁺, 850.2999, (calcd 850.6663).

14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-dipalmitoyl andrographolide: Yield 50%; amorphous white powder (ethyl acetate); mp 57–61 °C. R_f 0.85, silica gel 60F₂₅₄, 1% methanol in CH₂Cl₂. IR (KBr): 3080 (very weak, C=C), 2956 (C-H), 2916 (very str, (C-H), 2851 (C-H), 1748 (st, C=O), 1727 (very st, C=O), 1472 (m, CH₂), 804 (wk, broad, CH bending of long chain hydrocarbon) cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.09 (1H, *s*, H-14), 6.85 (1H, *q*, *J*=9.8 and 15.8 Hz, H-12), 6.05 (1H, *d*, *J*=15.6 Hz, H-11), 4.74 (2H, *s*, H-15), 4.73 (1H, *s*, 17a), 4.53 (1H, *t*, *J*=8.6 and 7.8 Hz, H-3), 4.49 (1H, *s*, H-17b), 4.23 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz, H-19a), 4.14 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz, H-19b), 0.94 (3H, *s*, H-20), 0.82 (3H, *s*, H-31'), 0.81 (3H, *s*, H-18), 0.79 (3H, *s*, H-31''). ¹³C NMR (CDCl₃) δ: 172.1 (C16, C=O), 173.7 (C1', C=O), 173.4 (C1'', C=O), 147.9 (C8, C), 143.1 (C14, CH), 135.7 (C12, CH), 129.2 (C13, C), 121.3 (C11, CH), 109.2 (C17, CH₂), 79.7 (C3, CH), 69.5 (C15, CH₂), 64.7 (C19, CH₂), 61.7 (C9, CH), 54.8 (C5, CH), 41.4 (C4, C), 38.7 (C10, C), 38.3 (C7, CH₂), 36.7 (C1, CH₂), 24.2 (C6, CH₂), 24.0 (C2, CH₂), 22.7 (C20, CH₃), 15.2 (C18, CH₃), 14.1 (C16', 16'', CH₃), ESI *m/z*: 882.75.

3,19-isopropylidene andrographolide: Yield 98%; m.p. 194–196 °C; IR (KBr) 3409, 2939, 1785, 1683, 1222 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 6.97 (1H, *dt*, *J*=1.5 and 7.0 Hz, H-12), 5.05 (1H, *t*, *J*=5.9 and 6.2 Hz, H-14), 4.91 (1H, *s*, H-17a), 4.62 (1H, *s*, H-17b), 4.45 (1H, *q*, *J*=6.2 and 10.5 Hz, H-15a), 4.26 (1H, *dd*, *J*=2.0 and 10.5 Hz, H-15b), 3.96 (1H, *d*, *J*=11.3 Hz, H-19a), 3.50 (1H, *dd*, *J*=3.1, 3.9 and 8.6 Hz, H-3), 3.18 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz, H-19b), 2.57 (2H, *m*, H-11), 2.42 (1H, *m*, H-7a), 2.03 (1H, *m*, H-7b), 1.97 (1H, *m*, H-9), 1.85 (1H, *m*, H-6a), 1.80 (2H, *m*, H-2), 1.74 (1H, *m*, H-1a), 1.41 (3H, *s*, H-22), 1.37 (3H, *s*, H-23), 1.33 (1H, *d*, *J*=4.3 Hz, H-6b), 1.25 (1H, *d*, *J*=4.7 Hz, H-1b), 1.20 (3H, *s*, H-18), 0.97 (3H, *s*, H-20); ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_C 169.7 (C, C-16), 149.0 (C, C-12), 147.0 (CH, C-8), 127.9 (C, C-13), 108.9 (CH₂, C-17), 99.2 (C, C-21, spiro), 76.1 (CH, C-3), 74.2 (CH₂, C-15), 66.2 (CH, C-14), 63.9 (CH₂, C-19), 56.1 (CH, C-9), 52.2 (CH, C-5), 38.4 (C, C-4), 37.9 (C, C-10), 37.6 (CH₂, C-7), 34.5 (CH₂, C-1), 27.0 (CH₃, C-22), 26.1 (CH₃, C-23), 25.3 (CH₂, C-11), 25.0 (CH₃, C-18), 24.9 (CH₂, C-2), 23.2 (CH₂, C-6), 16.2 (CH₃, C-20); EIMS *m/z*: 412.8[M+Na]⁺

3,14,19-triacetyl andrographolide: The yield was 95%; crystalline powder (CH₂Cl₂), mp 110–111°C, lit 110–111 °C⁸; R_f 0.70, silica gel 60F₂₅₄, 5% methanol in CH₂Cl₂. IR (KBr): 2954 (m), 1754(s), 1736 (very s), 1250, 1237(s). ¹H NMR (CDCl₃): 7.25 (1H, *s*, H-14), 6.99 (1H, *t*, *J*=1.3 and 6.7 Hz, H-12), 5.91 (1H, *d*, *J*=5.7 Hz, H-11), 4.89 (1H, *s*, H-17a), 4.51 (1H, *s*, H-17b), 4.59 (1H, *dd*, *J*=4.0 and 11.7 Hz, H-15a), 4.54 (1H, *dd*, *J*=6.1 and 11.2 Hz, H-15b), 4.23 (1H, *dd*, *J*=1.7 and 11.4 Hz, H-3), 4.34 (1H, *d*, *J*=11.9 Hz, H-19a), 4.11 (1H, *d*, *J*=11.9

Hz, H-19b), 2.11 (3H, Ac), 2.03 (6H, 2Ac), 1.02 (3H, *s*, H-20), 0.74 (3H, *s*, H-18). ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.9 (C, C=O (Ac)), 170.5 (C, C=O(Ac)), 170.4 (C, C=O(Ac)), 169.0 (C, C-16), 150.1 (CH, C-12), 146.5 (C, C-8), 124.0 (C, C-13), 108.9 (CH_2 , C-17), 79.6 (CH, C-3), 71.6 (CH, C-15), 67.8 (CH, C-14), 64.7 (CH_2 , C-19), 55.8 (CH, C-9), 55.2 (CH, C-5), 41.2 (C, C-4), 38.9 (C, C-10), 37.8 (CH_2 , C-7), 37.0 (CH_2 , C-1), 25.1 (CH_2 , C-11), 24.6 (CH_2 , C-2), 24.2 (CH_2 , C-6), 22.7 (CH_3 , C-18), 21.1 (CH_3 , Ac), 21.0 (CH_3 , Ac), 20.7 (CH_3 , Ac), 14.5 (CH_3 , C-20). ESI m/z : 499.24 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$

3,14,19-tripalmitoylandrographolide: Yield: 35%; white powder (CH_2Cl_2), mp 61–63°C; R_f 0.86, silica gel 60 F₂₅₄, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5); IR: 2918, 1735, 1471, 1188, 720 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{H} : 6.99 (1H, *t*, $J=6.2$ Hz, H-12), 5.91 (1H, *d*, $J=5.7$ Hz, H-14), 4.89 (1H, *s*, H-17a), 4.60 (1H, *dd*, $J=4.0$ and 11.4 Hz, H-15a), 4.54 (1H, *d*, $J=6.2$ and 11.0 Hz, H-15b), 4.51 (1H, *s*, H-17b), 4.28 (1H, *d*, $J=11.9$ Hz, H-19a), 4.21 (1H, *m*, H-3), 4.12 (1H, *d*, $J=11.9$ Hz, H-19b), 2.44 (1H, *d*, $J=13.2$ Hz, H-7), 2.39 (2H, *t*, $J=7.5$ Hz, H-11), 2.27 (1H, *d*, $J=10.1$ Hz, H-9), 2.11 (2H, *d*, $J=2.2$ Hz, H-2''), 2.03 (2H, *d*, $J=2.2$ Hz, H-2'), 1.95 (2H, *d*, $J=2.6$ Hz, H-2'''), 1.76 (1H, *d*, $J=10.1$ Hz, H-6), 1.00 (3H, *s*, H-18), 0.89 (3H, *s*, H-16'), 0.87 (3H, *s*, H-16''), 0.85 (3H, *s*, H-16'''), 0.73 (3H, *s*, H-20); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ_{C} : 173.7 (C=O, C-1'), 173.3 (C=O, C-1'', C-1'''), 169.0 (C=O, C-6), 150.1 (CH, C-12), 146.5 (C, C-8), 124.1 (C, C-13), 108.9 (CH_2 , C-17), 79.3 (CH, C-3), 71.7 (CH, C-15), 67.6 (CH, C-14), 64.5 (CH_2 , C-19), 55.8 (CH, C-9), 55.3 (CH, C-5), 41.3 (C, C-4), 38.9 (C, C-10), 37.8 (CH_2 , C-7), 37.0 (CH_2 , C-1), 25.1 (CH_2 , C-11), 24.6 (CH_2 , C-2), 24.2 (CH_2 , C-6), 34.7 (CH_2 , C-2'), 34.5 (CH_2 , C-2''), 34.1 (CH_2 , C-2'''), 22.6 (CH_3 , C-18), 14.5 (CH_3 , C-20), 14.1 (CH_3 , C-16', C-16'', C-16'''); EIMS m/z : $[\text{M}]^+$, 1064.8988, (calcd 1064.8983).

14-acetyl andrographolide: Yield 40%; white powder (CH_2Cl_2); mp 168.29°C (onset 163.65, endset 170.41°C, lit 168–170°C⁶); R_f 0.35, silica gel 60F₂₅₄, 5% methanol in CH_2Cl_2 . IR (KBr): 3363, 1772, 1751, 1209, 1021 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): 7.00 (1H, *dt*, $J=6.63$, 0.39 Hz, H-12), 5.91 (1H, *d*, $J=5.5$ Hz, H-14), 4.87 (1H, *s*, H-17a), 4.49 (1H, *s*, H-17b), 4.23 (1H, *d*, $J=10.9$ Hz, H-15a), 4.16 (1H, *d*, $J=10.9$ Hz, H-15b), 3.47 (1H, *t*, $J=7.03$, H-3), 3.3 (1H, *d*, $J=8.2$, H-19), 2.83 (2H, 2*s*), 2.11 (3H, *s*, Ac), 1.25 (3H, *s*, H-18), 0.66 (3H, *s*, H-20). ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.5 (C, C=O(Ac)), 169.1 (C, C-16), 150.5 (CH, C-12), 146.7 (C, C-8), 123.8 (C, C-13), 108.7 (CH_2 , C-17), 80.4 (CH, C-3), 71.6 (CH_2 , C-15), 67.7 (CH, C-14), 64.1 (CH_2 , C-19), 55.8 (CH, C-9), 55.2 (CH, C-5), 42.8 (C, C-4), 38.8 (C, C-10), 37.7 (CH_2 , C-1), 37.0 (CH_2 , C-7), 28.1 (CH_2 , C-2), 25.3 (CH_2 , C-11), 23.7 (CH_3 , C-18), 22.7 (CH_2 , C-6), 20.7 (CH_3 , Ac), 15.1 (CH_3 , C-20). ESI MS m/z : 415.2106 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

14-monoacetyl-3,19-isopropylideneandrographolide: Yield 50%; amorphous powder (CH_2Cl_2), hygroscopic, mp 58–59 °C; R_f 0.8, silica gel 60F₂₅₄, 5% methanol in CH_2Cl_2 . IR (KBr): 2937 (*s*), 1765, 1740(*s*), 1225(*s*), 1023 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3): 7.02 (1H, *dt*, $J=1.75$ and 6.82 Hz, H-12), 5.92 (1H, *d*, $J=6.16$ Hz, H-14), 4.88 (1H, *s*, H-17a), 4.53 (1H, *s*, H-17b), 4.54 (1H, *dd*, $J=6.16$ and 11.43 Hz, H-15a), 4.23 (1H, *dd*, $J=1.76$ and 11.0 Hz, H-15b), 3.95 (1H, *d*, $J=11.88$ Hz, H-19a), 3.49 (1H, *dd*, $J=3.96$ Hz, H-3), 3.18 (1H, *d*, $J=11.88$ Hz, H-19b), 2.11 (3H, *s*, Ac), 1.86 (1H, *dd*, H-9), 1.40 (3H, *gem*-Mt), 1.36 (3H, *s*, *gem*-Mt), 1.19 (3H, *s*, H-18), 0.93 (3H, *s*, H-20). ^{13}C NMR (CDCl_3): 170.5 (C, C=O (Ac)), 169.0 (C, C-16), 150.6 (CH, C-12), 147.1 (C, C-8), 123.8 (C, C-13), 108.9 (CH_2 , C-17), 99.2 (C, *spiro i*-Pr), 76.1 (CH, C-3), 71.6 (CH, C-15), 67.8 (CH, C-14), 63.9 (CH_2 , C-19), 55.8 (CH, C-9), 52.2 (CH, C-5), 38.3 (C, C-4), 37.9 (C, C-10), 37.6 (CH_2 , C-7), 34.5 (CH_2 , C-1), 27.0 (CH_3 , *gem*-Mt), 26.1 (CH_3 , *gem*-Mt), 25.4 (CH_2 , C-11), 25.27 (CH_3 , C-18), 24.9 (CH_2 , C-2), 23.1 (CH_2 , C-6), 20.7 (CH_3 , Ac), 16.1 (CH_3 , C-20).

14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-isopropylideneandrographolide: Yield: 83%; white powder (C₂₈H₃₄:EtOAc, 1:1), mp 61-63°C; R_f 0.59, silica gel 60 F₂₅₄, CH₂Cl₂/MeOH (95:5); IR: 2942, 1757, 1736, 1454, 1349, 1100, 1038, 981 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_H: 7.16 (1H, s, H-12), 6.90 (1H, *dd*, *J*=10.1 Hz, H-11), 6.11 (1H, *d*, *J*=16.0 Hz, H-14), 4.81 (1H, *d*, *J*=1.6 Hz, H-15), 4.79 (1H, *d*, *J*=1.6 Hz, 17a), 4.55 (1H, *d*, *J*=1.6 Hz, 17b), 4.09 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz, H-19a), 3.46 (1H, *dd*, *J*=4.7 Hz, H-3), 3.24 (1H, *d*, *J*=11.7 Hz, H-19b), 2.46 (1H, *m*, H-7a), 2.35 (1H, *d*, *J*=9.8 Hz, H-9), 2.06 (1H, *m*, H-7b), 2.06 (1H, *m*, H-6a), 1.73 (2H, *m*, H-2), 1.52 (1H, *m*, H-1a), 1.43 (3H, s, H-22), 1.37 (3H, s, H-23), 1.28 (3H, s, H-18), 1.25 (1H, *m*, H-6b), 1.21 (1H, *m*, H-1b), 1.12 (1H, *m*, H-5), 1.01 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ_C: 172.2 (C, C-16), 148.3 (CH, C-8), 142.8 (C, C-12), 136.1 (CH₂, C-11), 129.3 (C, C-13), 121.2 (CH, C-14), 109.4 (CH₂, C-17), 98.4 (C, C-21), 78.4 (CH, C-3), 69.6 (CH₂, C-15), 63.4 (CH₂, C-19), 61.5 (CH, C-9), 53.1 (CH, C-5), 38.3 (C, C-4), 37.4 (C, C-10), 36.5 (CH₂, C-7), 36.5 (CH₂, C-1), 26.4 (CH₃, C-22), 25.7 (CH₃, C-23), 28.7 (CH₃, C-18), 26.0 (CH₂, C-2), 22.3 (CH₂, C-6), 16.3 (CH₃, C-20); EIMS *m/z*: [M+Na]⁺, 396.22, (calcd 396.2276).

3.1.3 Developing of HPLC method

สารที่มีคุณสมบัติต้านไวรัส HSV-1 ได้ศึกษาได้นำนามาวิเคราะห์หาค่า partition coefficient ซึ่งจะต้องวิเคราะห์ปริมาณสารใน phase น้ำ และ oil

โครมาโตแกรมของสารที่ (1)-(4) แสดงในรูปที่ 1 และ 2

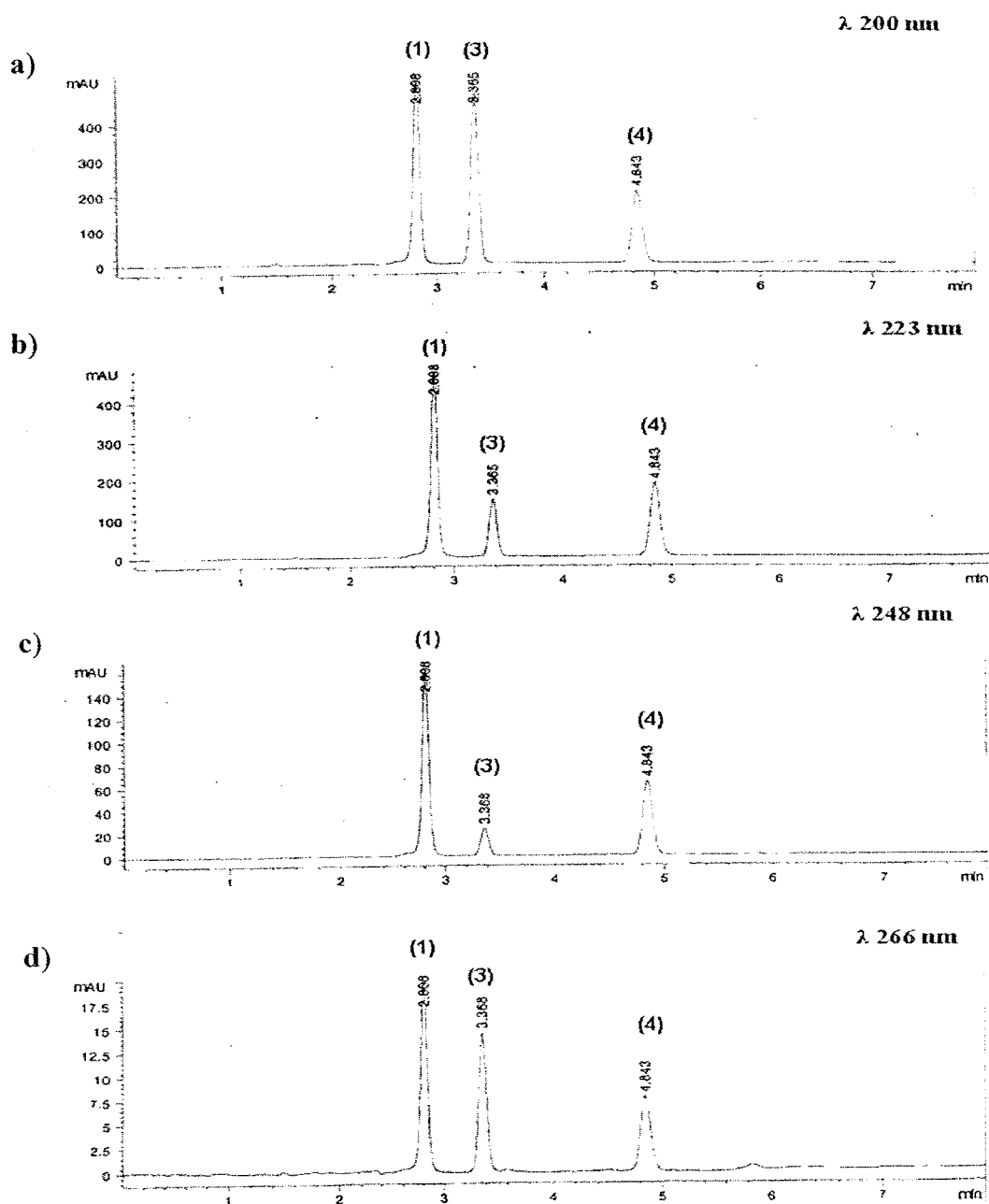
พารามิเตอร์ส ของคุณสมบัติในการวิเคราะห์โดยวิธี ICH แสดงในตารางที่ 1 และ 2

3.1.4 Partition coefficient

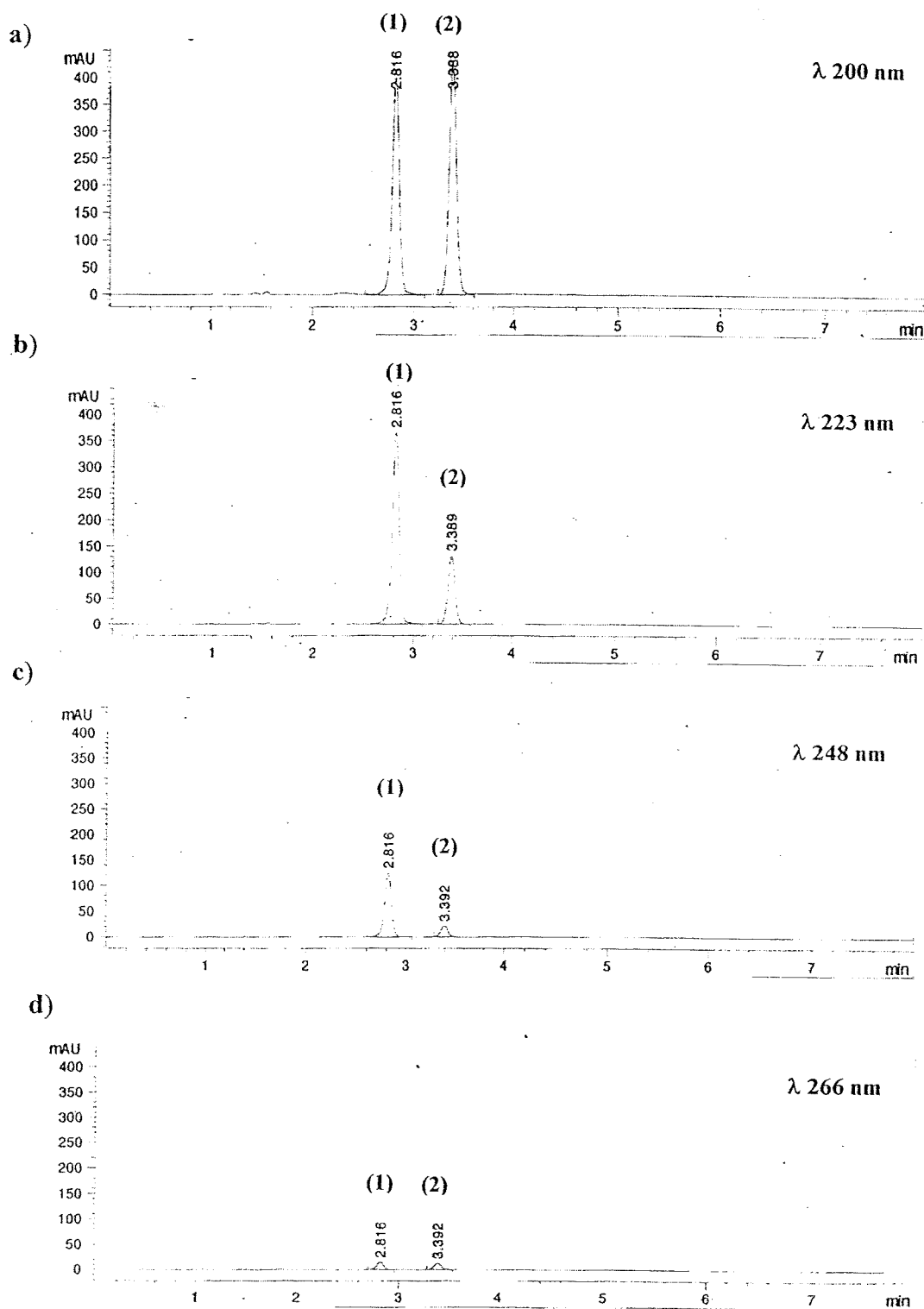
ค่า partition coefficient ของสาร (1) - (4) ระหว่าง *n*-octanol และ phosphate buffer pH 7.4 แสดงในตารางที่ 3. ค่า partition coefficient ของสาร (1) มีค่าต่ำสุด คือ 43.0±3.96 และของสาร(4) สูงสุด 1017.3±7.51.

ตารางที่ 1 Linearity and LOQ values of andrographolide (1), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (2), 14-deoxyandrographolide (3) and 3,19-isopropylideneandrographolide (4)

Comp.	Linearity ranges (µg.mL ⁻¹)	Linearity Equations	R ²	R _t (min)	LOQ±S.D. (µg.mL ⁻¹)
(1)	18.6-223.5	y= 25189x-38.763	1.0000	2.81	4.72±0.73
(2)	13.0-157.5	y= 33521x-44.753	0.9995	3.36	4.24±0.48
(3)	16.0-192.0	y= 33205x-41.832	0.9998	3.39	4.18±0.47
(4)	12.5-150.0	y= 24051x-47.659	0.9999	4.84	5.21±0.31



รูปที่ 1 Chromatograms of compound (1), (3) and (4) with various wavelengths;
a) 200 nm, b) 223 nm, c) 248 nm and d) 266 nm.



รูปที่ 2 Chromatograms of andrographolide (1) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (2) at various wavelengths; a) 200 nm, b) 223 nm, c) 248 nm and d) 266 nm.

ตารางที่ 2 Recoveries, Intra-day and Inter-days variations of andrographolide (1), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (2), 14-deoxyandrographolide (3) and 3,19-isopropylideneandrographolide (4)

Comp.	Recovery (N=3)			Precision (N=6)		
	Amount comp. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Amount added ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recovery (%R)	Mean $\pm$ S.D. (%)	Intra-day (R.S.D.)	Inter-day (R.S.D.)
(1)	18.6	74.5	92.47	98.7 $\pm$ 5.39	0.06	0.57
	74.5	74.5	102.33			
	223.5	74.5	101.18			
(2)	13.0	52.5	92.62	100.3 $\pm$ 6.77	0.08	3.01
	52.5	52.5	105.49			
	157.5	52.5	102.69			
(3)	16.0	64.0	91.49	96.7 $\pm$ 5.25	0.06	1.76
	64.0	64.0	102.00			
	192.0	64.0	96.59			
(4)	12.5	50.0	107.12	104.7 $\pm$ 2.75	0.07	0.74
	50.0	50.0	101.71			
	150.0	50.0	105.24			

ตารางที่ 3 Partition coefficients of compounds (1) to (4).

Comp.	Volumn ratios (<i>n</i> -Octanol:Buffer)	Concentration in		$P_{O/B}$	$P_{O/B}$ (mean $\pm$ R.S.D.)	Log $P_{O/B}$
		<i>n</i> -Octanol (μ g/mL)	Buffer (μ g/mL)			
(1)	1:1	1.620	0.0357	45.38	43.0 $\pm$ 3.96	1.63
		1.472	0.0349	42.18		
	1:2	1.666	0.0386	43.16		
		1.340	0.0323	41.46		
(2)	1:1	1.799	0.0049	367.14	374.9 $\pm$ 4.31	2.57
		1.773	0.0049	361.84		
	1:2	1.832	0.0046	398.26		
		1.824	0.0049	372.24		
(3)	1:1	2.272	0.0059	189.50	348.1 $\pm$ 9.04	2.54
		1.901	0.0052	204.30		
	1:2	1.895	0.0060	190.10		
		1.857	0.0057	202.09		
(4)	1:1	1.6689	0.0016	34.63	1017.3 $\pm$ 7.51	3.01
		1.6028	0.0015	31.43		
	1:2	1.5364	0.0017	36.28		
		1.7913	0.0017	47.16		

3.2 Biological Activity

3.2.1 Anti-HSV-1 ก่อนการทดสอบฤทธิ์ต้าน HSV-1 ได้ทำการหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นที่จะหาฤทธิ์ต่อไป

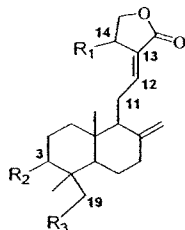
1. The cytotoxicity of andrographolide derivatives

ความเข้มข้นที่ไม่แสดงความเป็นพิษของแต่ละสาร แสดงในตารางที่ 4

2. Anti-HSV-1 activity in pre- and post-infection

นำสารทั้งสามที่ความเข้มข้นไม่แสดงพิษมาทดสอบฤทธิ์ด้านการติดเชื้อมาทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ HSV-1 โดยการนำสารทดสอบมาบ่มกับ HSV-1 2000, 1000 และ 500 PFU /ml (หรือ 100, 50 และ 25 PFU/well) เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที) นำสารผสมที่ได้มาบ่มกับ cell แล้วบ่มที่ 37° C เป็นเวลา 72 ชม ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1-3 พบว่า SS3 ไม่มีผลต่อ pre incubation activity ในขณะที่ SS2 และ SS19 มีฤทธิ์ขึ้นอยู่กัระยะเวลาของการบ่ม แสดงว่า S2 และ SS19 มีผลต่อเชื้อ HSV โดยตรง

ตารางที่ 4. สารที่ 1- 11 และค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ 50% (CC₅₀)



Comp.	R ₁	R ₂	R ₃	Extra db ¹	Extra db ²	CC ₅₀ ^a (μM)
1	OH	OH	OH			76.3
2	-	OH	OH	Δ ¹¹⁽¹²⁾	Δ ¹³⁽¹⁴⁾	243.4
3	-	OH	OH	-	Δ ¹³⁽¹⁴⁾	80.3
4	OH	O-	O-C(CH ₃) ₂			40.2
5	OCOCH ₃	O-	O-C(CH ₃) ₂			5.9
6	OCOCH ₃	OH	OH			6.6
7	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OCOCH ₃			6.4
8	OH	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃			4.2
9	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃			122.1
10	-	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	Δ ¹¹⁽¹²⁾	Δ ¹³⁽¹⁴⁾	73.9
11	-	O-	O-C(CH ₃) ₂	Δ ¹¹⁽¹²⁾	Δ ¹³⁽¹⁴⁾	44.9

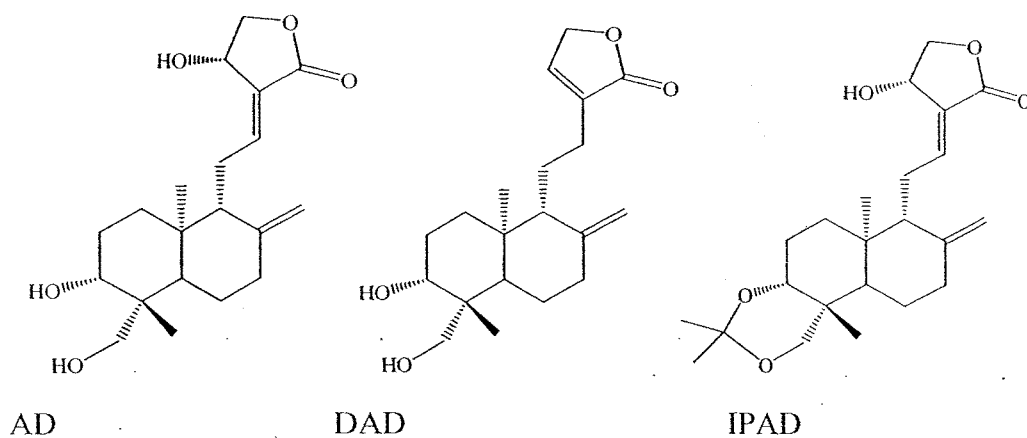
^aCytotoxicity CC₅₀ value is the concentration corresponding to 50% viability of Vero cells, calculated by using a linear regression curve between substance concentration(s) (μM) and the percentage of cell viability.

ตารางที่ 5.ฤทธิ์ต้านไวรัส HSV-1 ก่อนและหลังเข้าไวรัสเซลล์

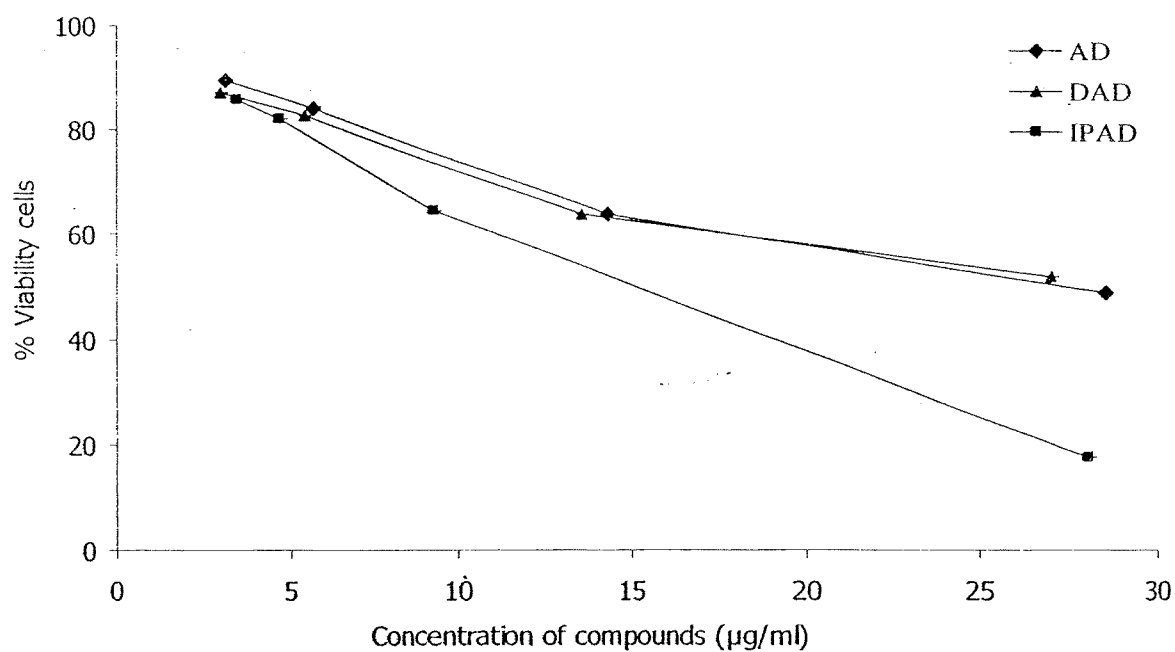
Comp	Tested Conc. (μM)	% inhibition			
		Pre-infection			Post- infection
		10 min	30 min	60 min	
1	16.28	5.75±5.86	11.49±7.78	34.5±11.94	56.9±4.88
2	10.01	4.31±0.71	17.24±6.08	23.56±6.66	83.33±2.08
3	16.16	8.86±1.41	16.46±6.08	27.60±2.99	52.9±10.95
4	11.96	18.97±9.29	25.86±1.00	44.83±4.88	100.0±0.00
5	1.59	96.12±0.58	98.06±0.58	99.03±0.58	79.61±0.00
6	2.02	98.06±1.15	100.0±0.00	100.0±0.00	61.17±1.15
7	1.05	99.23±0.58	100.0±0.00	100.0±0.00	55.56±3.79
8	1.20	90.29±0.58	92.72±2.12	97.09±0.00	69.90±1.53
9	6.46	97.09±1.00	97.09±0.00	99.03±0.58	75.24±0.71
10	15.77	24.14±1.41	25.85±0.00	39.08±5.13	82.76±2.65
11	9.54	36.78±0.71	77.01±1.41	88.51±1.41	79.31±0.00
*Control		100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00	100.0±0.00

*Dextran sulfate (1mg/mL) was used for a positive control in pre-infection inhibition;

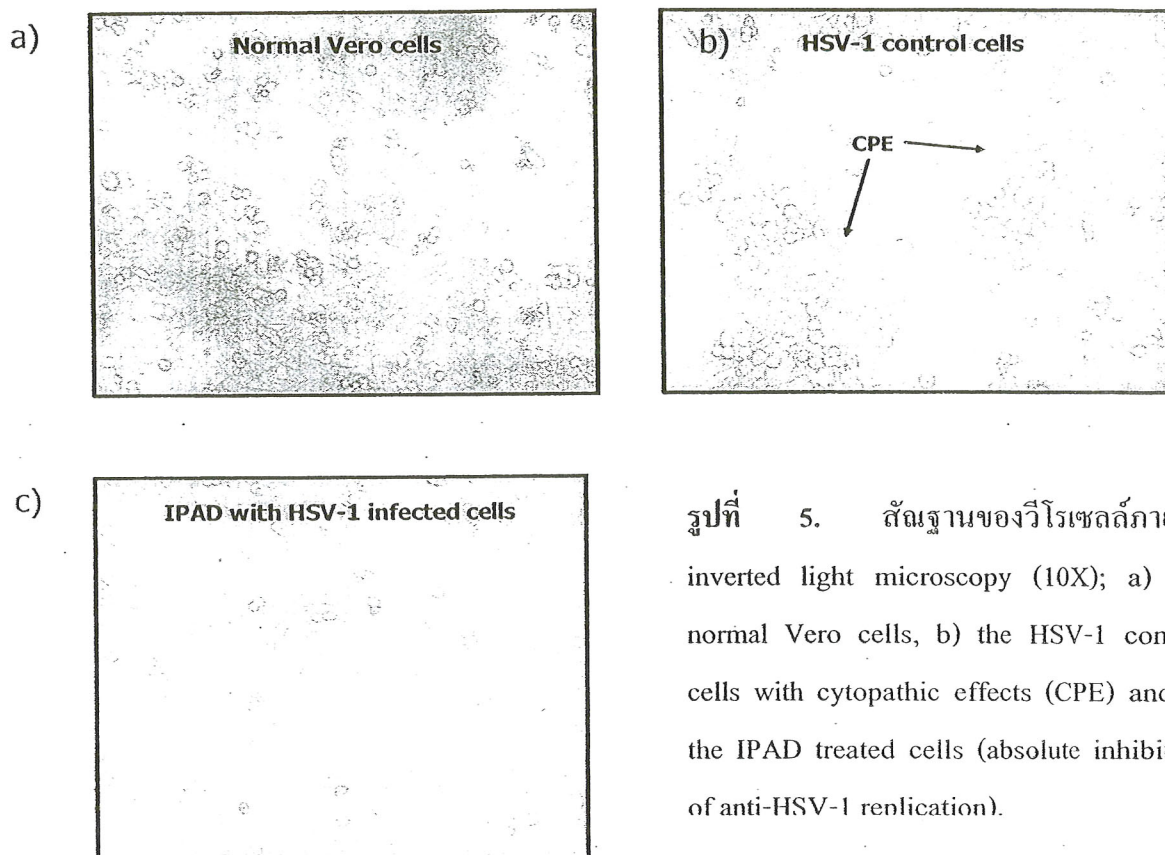
*ACV (5μg/mL) was used for a positive control in pre-infection inhibition



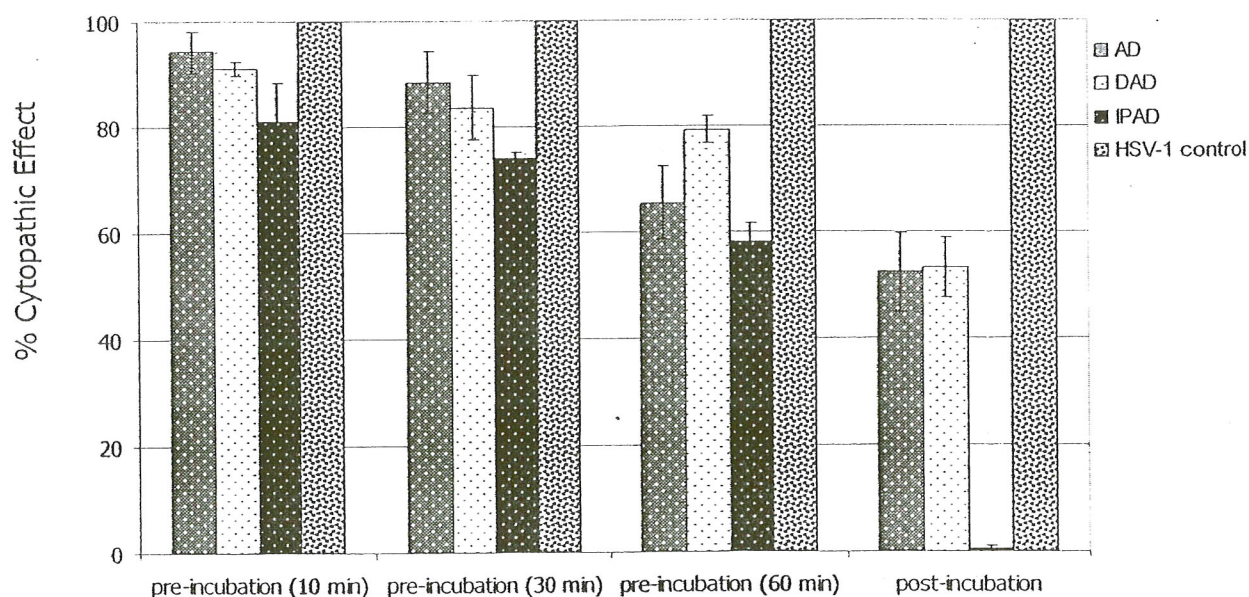
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้าง andrographolide (AD), 14-deoxyandrographolide (DAD), and 3,19-isopropylideneandrographolide (IPAD).



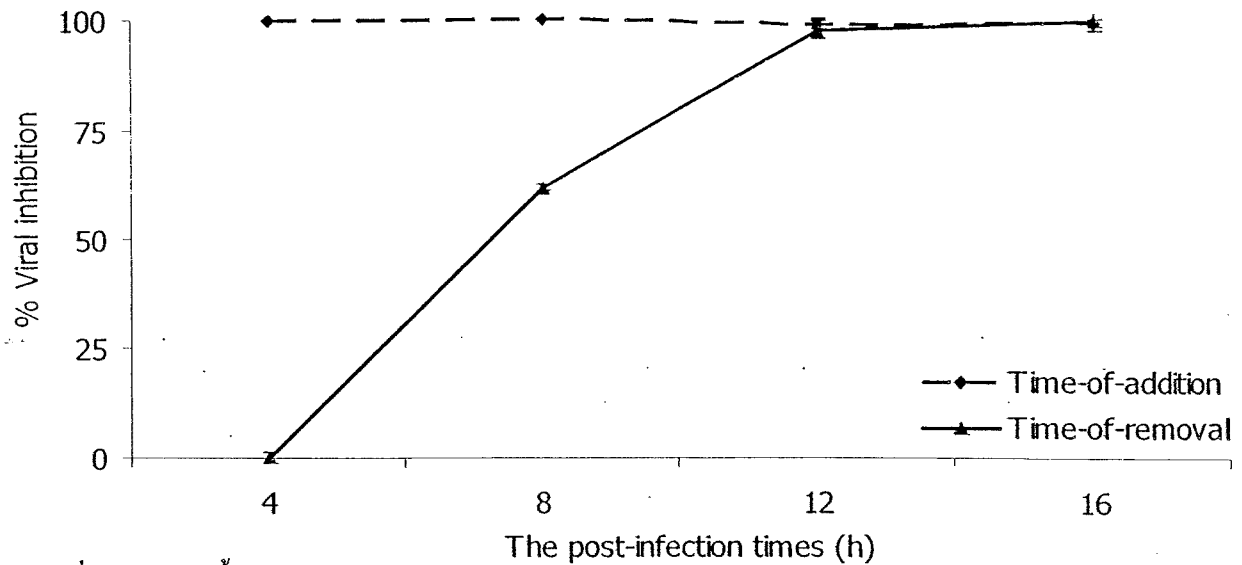
รูปที่ 4. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร AD, DAD และ IPAD และเซลล์ที่ยังมีชีวิต จากกราฟนำมาหาค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ 50% และที่ 20% เพื่อใช้เป็นการวัดความเป็นพิษในการทดสอบฤทธิ์ทางชีววิทยาต่อไป



รูปที่ 5. สัณฐานของไวรัสเซลล์ภายใต้ inverted light microscopy (10X); a) the normal Vero cells, b) the HSV-1 control cells with cytopathic effects (CPE) and c) the IPAD treated cells (absolute inhibition of anti-HSV-1 replication).



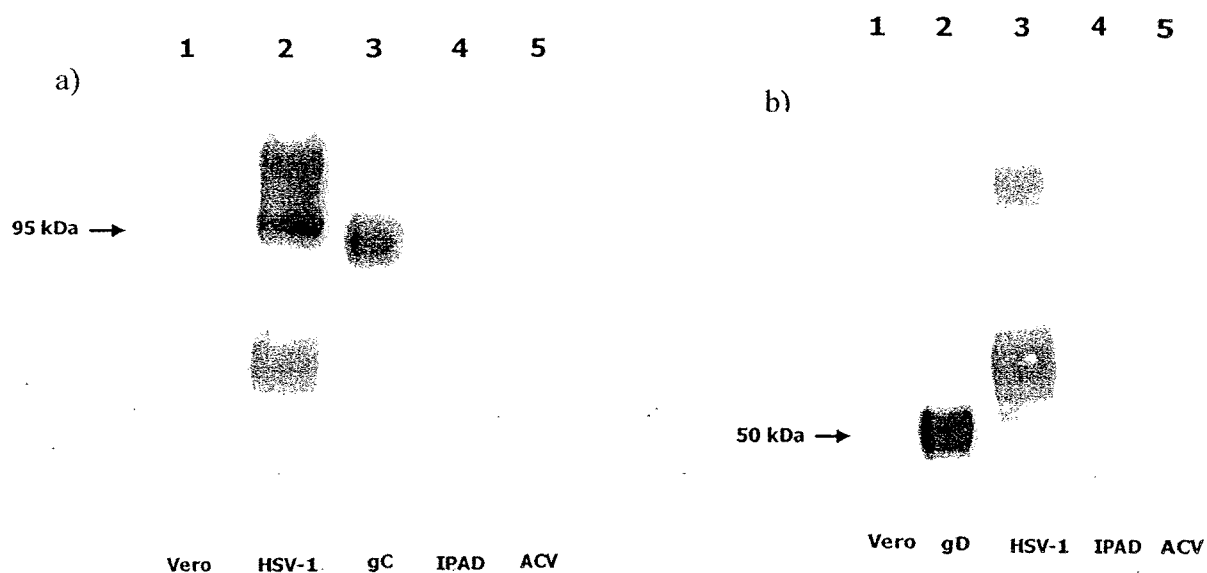
รูปที่ 6. ฤทธิ์การต้านเชื้อ ของ AD, DAD และ IPAD ก่อนและหลังการติด HSV-1 ของ ไวรัสเซลล์ จากการทดลองบ่มก่อนติดเชื้อ 10, 30 และ 60 นาทีสารทั้งสามมีฤทธิ์ไม่ถึง 100% ในขณะที่ IPAD ให้ผล 100% Dextran sulphate และ Acyclovir เป็น positive controls สำหรับการบ่มก่อน และหลังการติดเชื้อตามลำดับ



รูปที่ 7. การยับยั้งการเจริญเติบโตของ HSV-1 ในไวรัสเซลล์ Time-of-addition (▲) and removal (■) of IPAD at 4, 8, 12 and 16 h p.i. In the time-of-addition study, the HSV-1 were inhibited completely in all of the experiments. No inhibitory activity was observed at 4 h of time-of-removal, but the inhibitory effect improved to 100% at 12 and 16 h of time-of-removal.



รูปที่ 8. Effects of IPAD on HSV-1 DNA synthesis by using PCR. The HSV-1 DNA of the treated cells: lanes 1 and 3 were time-of-removal at 4 and 10 h p.i., and lanes 2 and 4 were time-of-addition at 4 and 10 h p.i.; lane 5 was the post-infection of IPAD after incubation with infected cells for 24 h p.i.; lane 6 was the ACV treated cells (positive drug control); lane 7 was normal Vero cells; lanes 8 to 10 were 1000, 500, 250 PFU/mL of HSV-1 treated cells, respectively; and lane 11 was blank control.



รูปที่ 9. Effects of IPAD on HSV-1 protein expression. The expression of viral gC (~95 kDa) and gD (~50 kDa) in the treated cells was evaluated by western blot analysis: a) lane1, normal Vero cells; lane2, HSV-1 infected cells; lane3, gC; lane4, IPAD treated cells; and lane5, ACV control cells; b) lane1, normal Vero cells; lane2 gD, lane3, HSV-1 infected cells, lane4 IPAD treated cells; and lane5, ACV control cells.

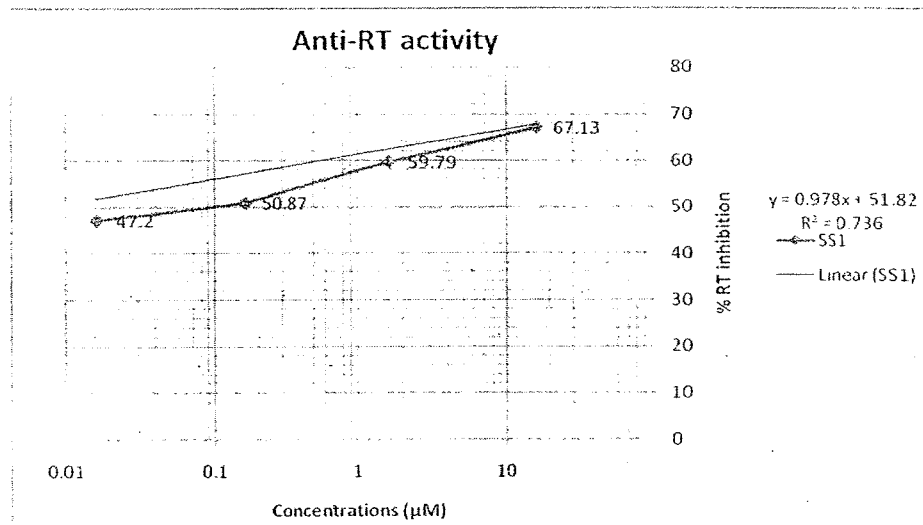
3.2.2 การทดสอบฤทธิ์การ ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรฟ้าทะลายโจร ต่อการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1 โดยใช้ RetroSys™ kit พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดชนิด SS3, AND2, SS17, SS20B, SS34A, SS34B, SS40, SS53 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1 ได้น้อยกว่าร้อยละ 50 จึงไม่ได้คำนวณหาค่า IC50

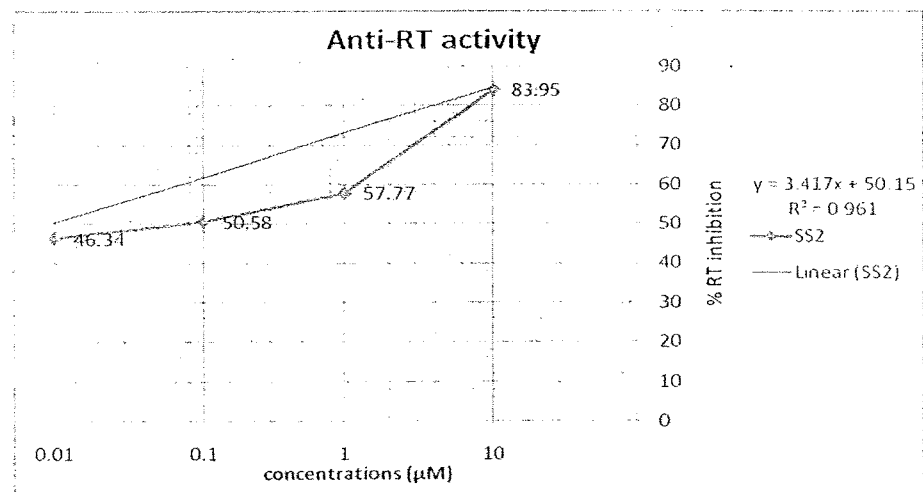
ส่วนสารสกัดชนิด SS1, SS2 และ SS39 ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นสามารถยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1 ได้ร้อยละ 67.13, 83.95 และ 72.44 ตามลำดับ และเมื่อเจือจางสารสกัดลงทีละ 10 เท่า ทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1 ลดลงตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 8-11

ตารางที่ 6 % RT inhibition ของ สารสกัดชนิด SS1, SS2 และ SS39

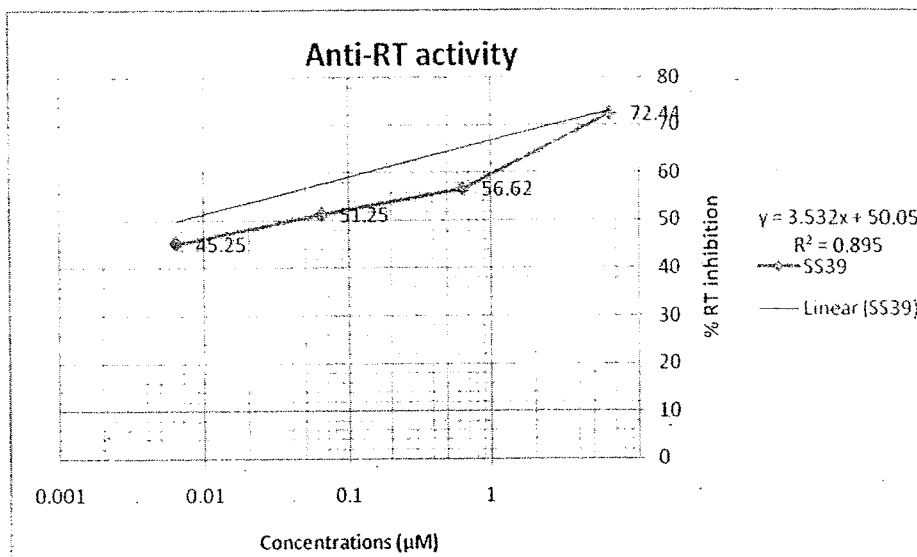
SS1		SS2		SS39	
Conc. (μM)	% RT inhibition	Conc. (μM)	% RT inhibition	Conc. (μM)	% RT inhibition
16.28	67.13%	10.01	83.95%	6.46	72.44%
1.628	59.79%	1.001	57.77%	0.646	56.62%
0.1628	50.87%	0.1001	50.58%	0.0646	51.25%
0.01628	47.20%	0.01001	46.34%	0.00646	45.25%



รูปที่ 10 Anti-reverse transcriptase activity ของสารประกอบ SS1 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ



รูปที่ 11 Anti-reverse transcriptase activity ของสารประกอบ SS2 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ



รูปที่ 12 Anti-reverse transcriptase activity ของสารประกอบ SS39 ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

ตารางที่ 7 ค่า CC_{50} , IC_{50} และ SI ต่อการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1

	SS1	SS2	SS39
CC_{50}^*	76.27 μ M	243.45 μ M	122.06 μ M
IC_{50}	1.861 μ M	0.044 μ M	0.014 μ M
SI	40.98	5,532.95	8,718.57

หมายเหตุ: CC_{50}^* ได้จากการทดสอบ cytotoxicity ของสารสกัดในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด vero cell line

3.2.3ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ andrographolide และอนุพันธ์

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ andrographolide และอนุพันธ์บางตัวคือ gram negative bacteria, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 แสดงในตารางที่ 8, SS19, SS20, SS34, SS36 และ SS37 มีผลต่อ activity against *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 และ *B. subtilis* ATCC 6633 เนื่องจาก SS19ให้ผลดีที่สุดดังนั้นจึงนำมาศึกษา site of action ต่อ สัณฐานของ *B. subtilis* ATCC 6633

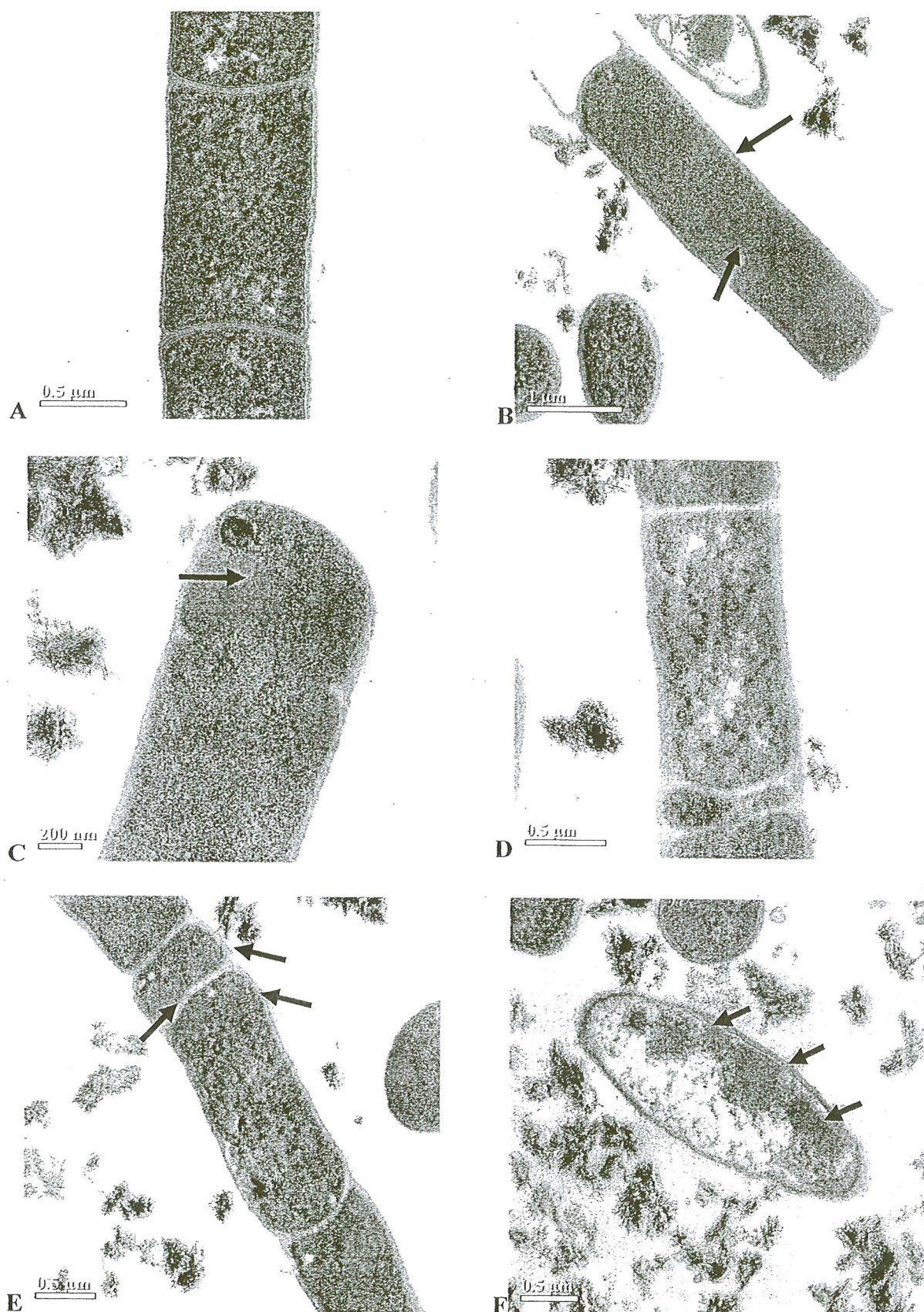
ตารางที่ 8 Activity of andrographolide and andrographolide analogues on various organisms.

Sample		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
SS1	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
SS2	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
SS3	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
SS19	MIC (μ M)	62.5	125	31.25	I	I	I
	MBC (μ M)	62.5	125	31.25	I	I	I
SS20	MIC (μ M)	125	62.5	250	I	I	I
	MBC (μ M)	125	62.5	250	I	I	I
SS30	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
SS34	MIC (μ M)	250	1,000	62.5	I	I	I
	MBC (μ M)	250	1,000	62.5	I	I	I
SS36	MIC (μ M)	1,000	*	1,000	I	I	I
	MBC (μ M)	1,000	*	1,000	I	I	I
SS37	MIC (μ M)	250	*	125	I	I	I
	MBC (μ M)	250	*	125	I	I	I
SS39	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
SS40	MIC (μ M)	I	I	I	I	I	I
	MBC (μ M)	I	I	I	I	I	I
Amp	MIC (μ M)	0.3125	5	80	ND	ND	ND
	MBC (μ M)	0.3125	5	80	ND	ND	ND

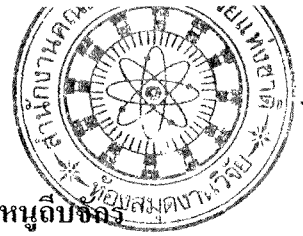
I = Inactive; ND = Non-determined, *Need to be confirmed, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Escherichia coli* ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853; *Candida albicans* ATCC 90028



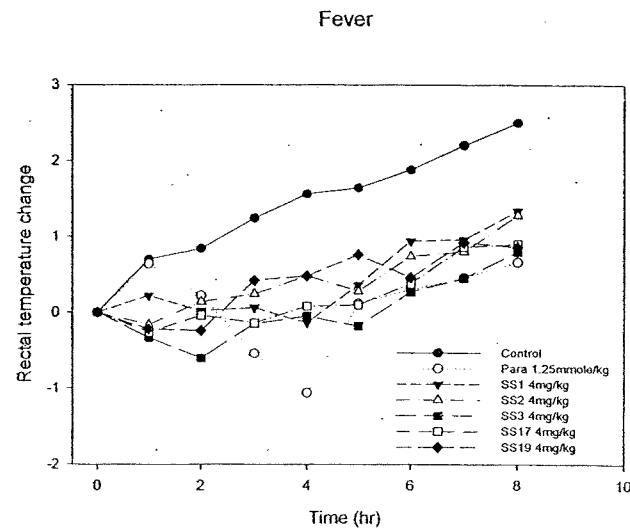
รูปที่ 13. Transmission electron micrographs showing effects of compound (5) on morphogenesis of *B. subtilis* ATCC6633. Untreated cells (A). Cells after treating with compound (4) at 125 μ M (4 x MIC) for 4 h (B-F). Abnormal cytoplasmic aggregates (B, C, E, F, arrow). Elongated cells (B-E). Abnormal polar septation (C-E).



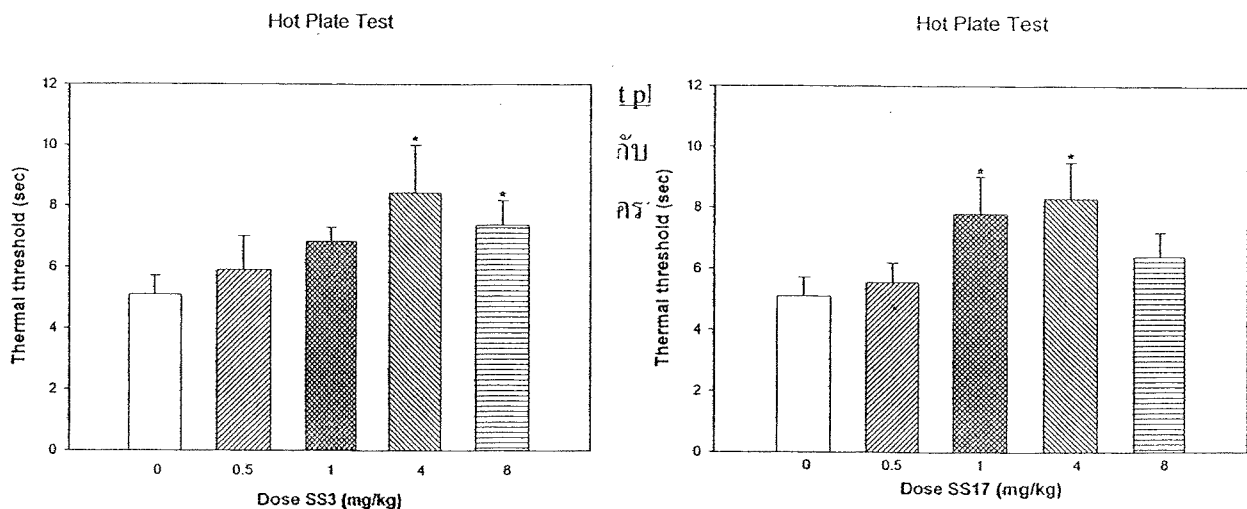
3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

3.3.1 ทดสอบ antipyretic effect โดยการใช้ yeast-induced pyresis ในหนูถีบจักร

ในการทำทดลองสาร (4 mg/kg) เปรียบเทียบกับ ตัวทำละลาย และ paracetamol 125 mmole/kg โดยใช้หนู 5 ตัวในแต่ละกลุ่มพบว่า สารทุกตัวมีฤทธิ์ antipyretic แต่น้อยกว่า paracetamol



รูปที่ 14 ผลของ 5%DMSO (control), paracetamol (1.25 mmole/kg), SS1, SS2, SS3, SS17 และ SS19 ในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ต่ออุณหภูมิร่างกายทางทวารหนักของหนูขาว 2 ชั่วโมงหลังฉีด baker yeast



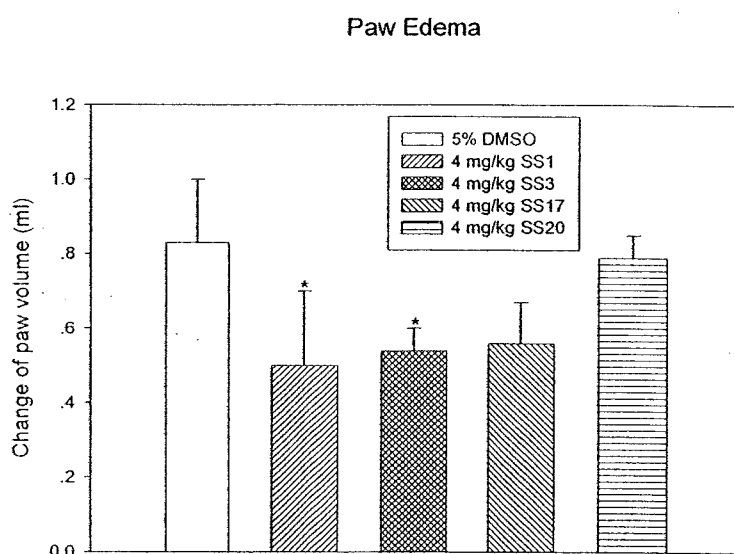
รูปที่ 15 กราฟแสดงผลของSS3 (A) และ SS17 (B) ในขนาด 0, 1, 4 หรือ 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัมในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้น (ความร้อน) ใน Hot Plate Test

3.3.2. ทดสอบฤทธิ์ลดปวดทั้งใน hot plate และ tail flick test ในหนูถีบจักร

ทำการทดลองสาร ((4 mg/kg)) เปรียบเทียบกับ ตัวทำละลาย และ paracetamol 125 mmole/kg โดย ใช้หนู 5 ตัวในแต่ละกลุ่ม พบว่า อนุพันธ์ที่สังเคราะห์และ andrographolide มีฤทธิ์ ด้านความเจ็บปวด (Tail Flick Test และ hot plate test) รูปที่ 3

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

สาร SS1 และ SS3 สามารถลดปริมาตรเท้าของหนูขาวที่ทำให้อักเสบ (บวม) จากการฉีดด้วย carrageenan ได้ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 5% DMSO ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังฉีดด้วย carrageenan (รูปที่ 7) ถึงแม้ว่ากลุ่มที่ได้รับ SS17 จะมีการลดลงของปริมาตรเท้า แต่ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วน SS20 ไม่พบผลด้านการอักเสบในขนาดที่ใช้ทดสอบ



รูปที่ 16 ผลของ 5% DMSO หรือ สาร SS1, SS3, SS17 หรือ SS20 ในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ที่ มีต่อขนาดเท้าของหนูขาวที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังทำให้เท้าบวมด้วย carrageenan

3.3.4 Toxicity ทดลองสาร 8 mg/kg (double dose for pain) โดยใช้หนู 5 ตัวในแต่ละกลุ่ม พบว่า ขนาดที่ให้ เท้าของขนาดที่ให้แก้ไข้ ไม่มี acute toxicity

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ลดภาวะซึมเศร้า (antidepressive effect) ในหนูถีบจักร

จากการทดลองไม่พบฤทธิ์ด้านภาวะซึมเศร้าของสาร SS3 หรือ SS17 ในขนาด 0.5, 1, 4 หรือ 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่อง

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ลดความวิตกกังวล (anxiolytic effect) ของสารในหนูถีบจักร

จากการทดลองไม่พบฤทธิ์ลดความวิตกกังวลของสาร SS3 หรือ SS17 ในขนาด 0.5, 1, 4 หรือ 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่อง

3.3.7 การทดสอบฤทธิ์ของ SS17 ที่มีต่อความ aggressive ของหนูถีบจักรเพศผู้

จากการทดลองพบว่า การให้สาร SS17 ในขนาด 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางเข้าช่องไม่มีผลเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทางด้านความก้าวร้าวของหนูถีบจักรเพศผู้

นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะต่างเมื่อตรวจสอบด้วยตาเปล่า

3.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของ SS1, SS2 และ SS17 ที่มีต่อพฤติกรรมทางเพศของหนูถีบจักรเพศผู้

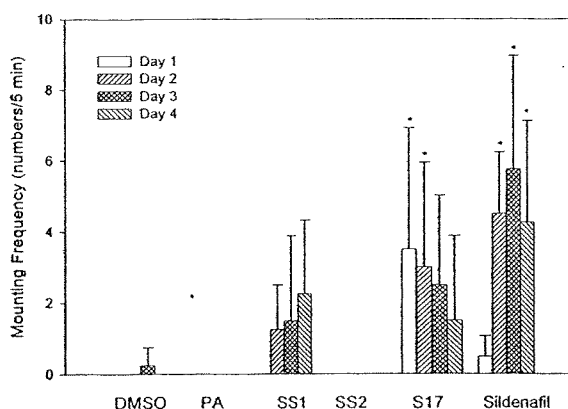
ผลการทดลองพบว่า PA (สารที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศของ SS1) และ SS2 ไม่มีผลต่อพฤติกรรมทางเพศของหนูถีบจักรเพศผู้

หนูที่ได้รับ sildenafil ทุกวัน ๆ ละ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าในวันที่ 2-4 ของการทดลองหนูมีการเพิ่มขึ้นของ mounting frequency อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การได้รับ SS1 ขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเข้าทางช่องท้องเพียง 1 ครั้ง สามารถเพิ่ม mounting frequency ได้ในวันที่ 2-4 อย่างไรก็ตามยังไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

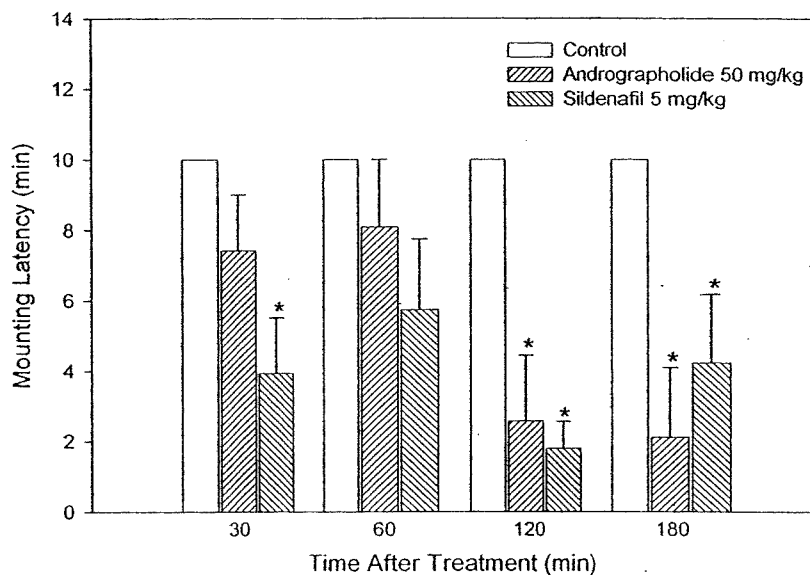
การได้รับ SS17 ขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเข้าทางช่องท้องเพียง 1 ครั้ง สามารถเพิ่ม mounting frequency ได้ในตั้งแต่วันที่ 1-4 อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มขึ้นของ mounting frequency ในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รูปที่ 8

เมื่อให้สารแอนโดรกราโฟไลด์โดยการป้อนในขนาด 50 มก./กก. 1 ครั้ง และทำการสังเกตพฤติกรรม mounting latency และ mounting frequency หลังให้สาร 30, 60, 120 และ 180 นาที ผลปรากฏว่าหลังจากป้อนสาร 120 นาทีเป็นต้นไป สัตว์ทดลองที่ได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์มีพฤติกรรมทางเพศสูงที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยเห็นได้ทั้งการลดลงของ mounting latency และการเพิ่มขึ้นของ mounting frequency



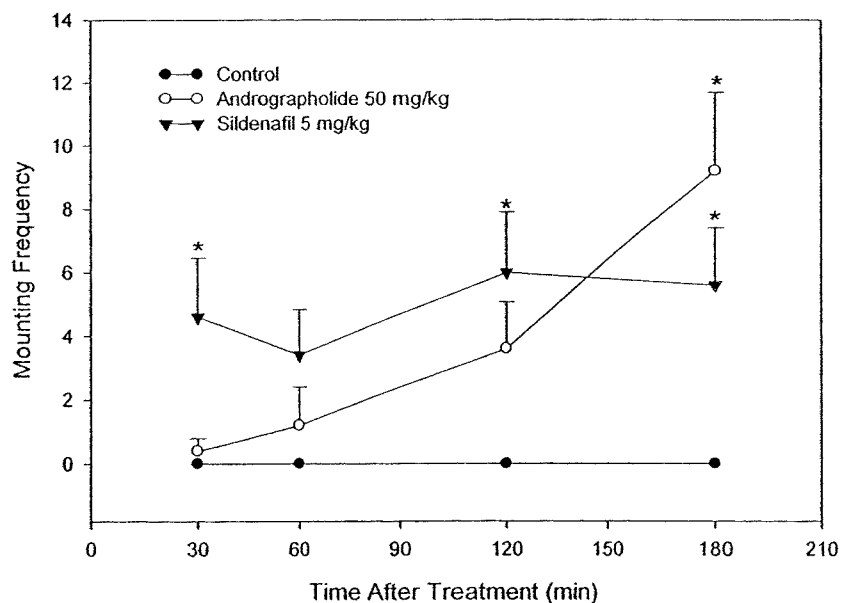
รูปที่ 17 ผลของ SS1, SS2, SS17 และ Sildenafil ต่อ mounting frequency

Mounting Latency



รูปที่ 18 ผลของ 50 mg/kg andrographolide ต่อ mounting latency ของหนูเพศผู้ เมื่อให้ ทางปาก เมื่อเทียบกับ negative control (5% DMSO), และ 5 mg/kg sildenafil ซึ่งเป็น positive control

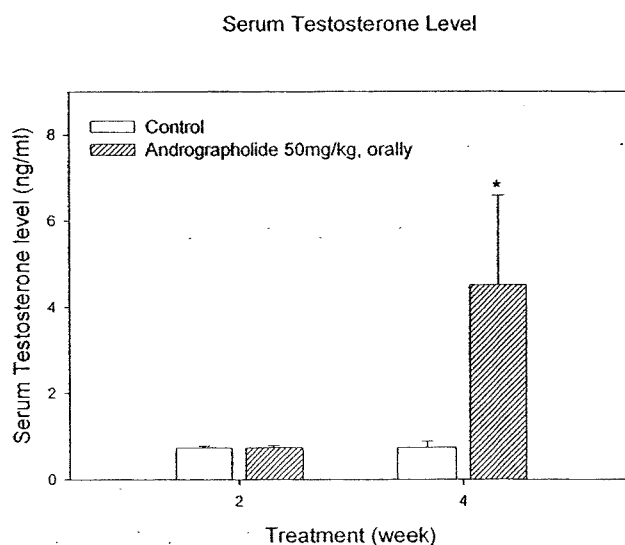
Mounting Frequency



รูปที่ 19 ผลของ 50 mg/kg andrographolide ต่อ mounting frequency ของหนูเพศผู้ เมื่อให้ ทางปาก เมื่อเทียบกับ negative control (5% DMSO), และ 5 mg/kg sildenafil ซึ่งเป็น positive control

3.3.9 การทดสอบฤทธิ์ต่อปริมาณสเปิร์ม การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน เมื่อให้สารแบบต่อเนื่อง

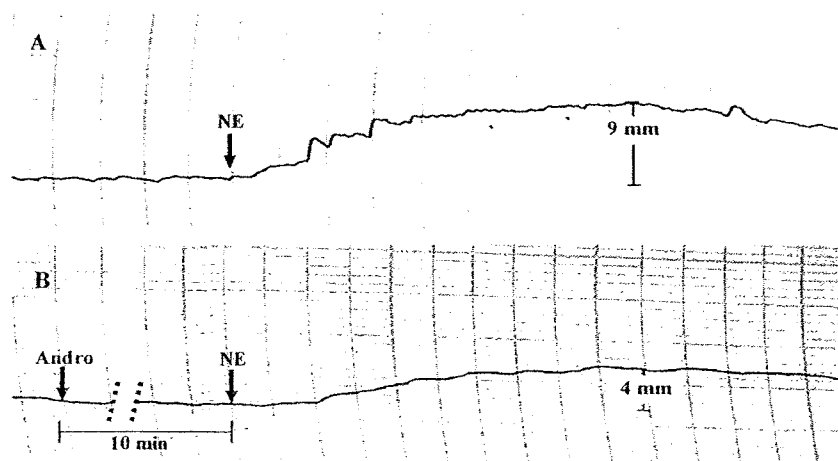
เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสเลือด โดยการป้อนผงของฟ้าทะลายโจรที่มีขนาดของสารแอนโดรกราโฟไลด์เท่ากับ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 4 และลดลงในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 และจากการทดลองไม่พบว่าจำนวนและการเคลื่อนไหวของสเปิร์มลดลง



รูปที่ 20 ผลของ andrographolide ต่อระดับ testosterone ในหนูเพศผู้ เมื่อเทียบกับ negative control (5% DMSO)

3.3.10 การทดสอบฤทธิ์ต่อหลอดเลือด

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อหลอดเลือด โดยการเติมสารแอนโดรกราโฟไลด์ (0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ลงไปใน organ bath ที่มีหลอดเลือด (aortic strip) ของหนูแรทแขวนอยู่ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะเติม norepinephrine (0.15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) พบว่าสารแอนโดรกราโฟไลด์สามารถลดการหดตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากฤทธิ์ของ norepinephrine ได้



รูปที่ 21 ผลของ 0.15 ng/ml norepinephrine (NE) ต่อ aortic strip ของหนู rat เมื่อมีการ preincubate กับ 0.2 mg/ml andrographolide (Andro) 10 นาที