วิธีวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ สังเคราะห์เป็น ชนิด Synthesis grade ของ บริษัท Merck ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเป็นชนิด commercial grade และที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นชนิด analytical grade เครื่อง Infrared เป็นของบริษัท Perkin Elmers Series 1600 NMR spectra คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นของบริษัท Variance, Mercury 400, CDCl3 and CD3OH เครื่อง LC-MS คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นของบริษัท Bruker Daltonics's, electrospray ionization ตรวจวัด positive mass โดย TOF detector.

2. การทดลอง

2.1 Chemistry

2.1.1 การแยกสกัด

หมัก ฟ้าทะลายโจรแห้งที่บดเป็นผงด้วย methanol จากนั้นแยกด้วย column chromatography โดยใช้สารละลายผสม dichloromethane และ methanol ด้วยสัดส่วนต่างๆ

2.1.2 การสังเคราะห์

วิธีการทั่วไปหลังการสังเคราะห์

หากไม่ได้ระบุไว้ในวิธี หลังปฏิกิริยา เติมน้ำ และเติม dichloromethane หรือ ethyl acetate เพื่อ partition ระหว่างสารสังเคราะห์และสารที่ละลายน้ำ นำชั้น organic phase มาทำแห้งด้วย sodium sulphate ระเหยแห้ง แยกด้วย column chromatography โดยมี silica เป็น stationary phase และ elute ด้วย gradient mixture ของ hexane และ ethyl acetate และ TLC ที่ spray ด้วย Kedde reagent เป็นตัวตรวจวัด

2.1.2.1 การเตรียม palmitoyl derivatives

การเตรียม 3, 19- isopropylidene andrographolide

ละลาย andrographolide (200 มล, 0.571mmole) ใน DMSO ด้วยปริมาณที่น้อยที่สุด เติม pyridinium p-toluene sulphonate 1-2มล เติม benzene เติม dimethoxy propane (0.6 mmole) stir บน magnetic stirrer 8 ชม นำมาเติม ether 100 มล น้ำ 100 มล แยกชั้นน้ำทิ้ง ล้างชั้น ether ด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง นำชั้น ether ไประเหยจนแห้ง นำไปผ่าน short column elute ด้วย chloroform เก็บ chloroform fraction ครั้งละ 20 มล

การเตรียม 14-palmitoyl andrographolide and 14-palmitoyl-3,19-isopropyridene andrographolide

ละลาย 3,19-isopropyridene andrographolide 0.3367 ก (0.862 mmole) dichloromethane 3.0 มล และ DMSO 1.0 มล เติม palmitoyl chloride 1.5 มล (4.911 mmole) DMAP 2 มล และ dichloromethane 2.0 มล คน 20 minutes เติมน้ำและ7% NaOH สกัดด้วย ether อย่างรวดร็ว แยกชั้น ทำให้แห้ง และระเหยแห้ง แยกด้วย วิธีปกติ

การเตรียม 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-dipalmity andrographolide

ละลาย andrographolide 0.0760 ก (0.216 mmole) ใน 5.0มล DMSO เติม palmitic anhydride 1.4901 ก (3.011 mmole), 6.0 มล of benzene, และ 4-pyrolidinyl pyridine (4-PPY) 2 มล, คน 12 ชม.

การเตรียม 14-palmitoyl andrographolide

นำ 14-palmitoyl 3, 19-isopropylidene andrographolide มาละลายใน DMSO เติม 50% acetic acid ในน้ำ stir 30นาที

การเตรียม 3,14,19-tripalmitoyl andrographolide และ 3,19-dipalmitoyl andrographolide

ละลาย andrographolide 0.7387 ก (2.10 mmole)เติม DMSO 3 เติม Palmitoyl chloride 4.0 มล (0.013 mmole), DMAP 5 มล เติม dichloromethane 4.0 มลคนเป็นเวลา 15 นาทีล้างด้วย 7% sodium hydroxide and water. สกัดด้วย dichloromethane

2.1.2.2 การเตรียม acetyl andrographolides

การเตรียม 3,14,19-triacetyl andrographolide

andrographolide 0.5368 ก (1.53 mmole) เติม DMSO 3.0 มล จนละลายหมด เติม anhydrous benzene 30 มล เติม acetic anhydride 2.5 มล (0.034 mmole), dimethyl aminopyridine (DMAP) 5 มล and dried dichloromethane 2.0 มล คนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม

การเตรียม 14-monoacetyl andrographolide and 14-monoacetyl-3,19-isopropyridene andrographolide

ชั่ง 0.1934 ก (0.495 mmole) of 3,19-isopropyridene andrographolide เติม 5.0 มล of dichloromethane DMSO3.0 มล จนละลายหมด เติม anhydrous benzene 30 มล เติม acetic anhydride 2.5 มล (0.034 mmole), dimethyl aminopyridine (DMAP) 2 มล และ dried dichloromethane 2.0 มล คนที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม

การเตรียม 14-deoxy didehydroandrographolide-3,19-diacetate

ละลาย 0.5004 ก (1.427 mmole) andrographolide ด้วย dimethylsulfoxide 2 มล เติม acetic anhydride 0.33 มล (4.494 mmole) และ 5.0 มล of pyridine และ dimethyaminopyridine 5 มล คนเป็นเวลา 4 ชม

2.1.3 Development the HPLC method

Sample preparations

All tested compounds were prepared at concentration of 1.0 $mg.mL^{-1}$ in acetronitrile, and were used as stock solutions. They were diluted with acetronitrile to obtain the concentrations of 15, 30, 60, 120 and 180 $\mu g.mL^{-1}$.

HPLC conditions

Stationary phase was a Hypersil® BDS C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) and maintained at 25 °C. A mobile phase containing 30% acetonitrile and water, the flow rate was 1 $mL.min^{-1}$. Photodiode array UV-visible detector setting at the wavelengths of 223, 248 and 266 nm.

Validation for HPLC method

Validation of the analytical procedure was performed according to the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines 2005.

(1) Accuracy

A kown concentration was spiked to samples containing 15, 60 and 180 $\mu g.mL^{-1}$. Determination was undertaken tree times for each ample. The total amounts were determined and the spiked content was calculated compared to the spiked amount.

$$\%\ R = \frac{(CF-CA) \times 100}{C^*A} \quad \ldots\ldots\ldots (1)$$

Where CF = measured concentration of spiked tested compound with accurate amounts sample

CA = measured concentration of tested compound

C*A = concentration of accurate amounts sample

(2) Precision

Intermediate precision, one concentration of a compound was determined seven times in the same day (Intra-day) for precision repeatability. The other intermediate precision that same concentration of the compounds assigned to determined on difference three days (Inter-days), five times each.

(3) Linearity

Five different concentrations 15, 30, 60, 120 and 180 $\mu g.mL^{-1}$ of the compound were analyzed to give peak areas, with five times each. Plotted regression line was generated using peak areas against their concentrations.

(4) Limit of quantification (LOQ)

The parameters LOQ was determined on the basis of signal to noise ratio as following equation (2). The compound at concentration of LOD and LOQ was injected for ten times each.

$$LOQ = 10\ SD_B \quad \ldots\ldots\ldots (2)$$

Where SD_B = standard deviation of base line

2.1.4 Par

experiments base on the principle described by Engelmann *et al.* (2007) and Paschke *e* minor modifications. Briefly, they were carried out at 25±2 °C with triplicates for each c h tested compound. Two solvents *n*-octanol and phosphate buffer pH 7.4 were mixed vig 5 °C, to obtain saturated solutions in both phases. The tested compound was dissolved i turated phosphate buffer gave concentration of 1 mg.mL^{-1}. Then, various volumes of pH 7.4-saturated *n*-octanol were added to get *n*-octanol/ phosphate buffer pH 7.4 volume 1:2 and vigorously vortexed at 25 °C for 30 min. After that, the phases were allowed to s fuge with 50,000 rpm for 15 min. The amount of tested compound was analyzed in b validated HPLC method. The partition coefficient of *n*-octanol/ phosphate buffer pH 7.4 s P_{OB} value by equation (3) following,

$$P_{OB} = \frac{C_{n\text{-octanol}}}{C_{buffer}} \quad \text{..... (3)}$$

Where The partition coefficient in *n*-octanol/phosphate buffer pH 7.4

$C_{n\text{-octan}}$ ration of compound in *n*-octanol phase

C_{buffer} ration of compound in phosphate buffer pH 7.4 phase

2.2 Biological Act

2.2.1 Anti-HSV A

Materials

1. Cell culture pr

Vero cells n monkey kidney cell line) were used for propagation of HSV-1 and investigation of anti-. They were cultured as a monolayer and maintained in Opti-modified eagle's medium (Opt o-BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Seromed, Berl 100 units/ ml of penicillin, 100 micrograms/ml of streptomycin, 40 micrograms/ml of gen 2.5 micrograms/ml of amphotericin B. As the cell became confluent, they were subcultured ispersing with 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetate (EDTA). All the cells were incubate a 5% CO2 incubator.

2. Preparation of HS

HSV-1 (F str were prepared in Vero cells. For standard viral preparation, the cells were infected by HSV-1 d subsequently 0.1 multiplicity of infection (m.o.i.) and the infected

cells were harvested at 72 h postinfection (p.i.) and centrifuged at 2000 rpm, at 4oC for 15 min. The supernatant was collected and the virus titers were determined by a standard plaque assay. The infectious titers of the stock solutions were 106 PFU/ml and virus stock was stored at -70oC until use.

3. Preparation of extracts

The stock solutions of *A. paniculata* compounds such as SS2, SS3 and SS19 were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to concentrations of 1.33, 1.29 and 1.17 mg/ml, respectively. The stock solutions of these compounds were stored at -70oC until use.

4. Cytotoxicity study

Subtoxic concentrations of the *A. paniculata* compounds were determined before the study of anti-HSV-1 activity. Vero cell were seeded in a 96-well tissue culture plate and incubated at 37oC, 5% CO2 overnight. Then the monolayer cells were incubated in Opti-MEM medium with or without serial two-fold dilutions of *A. paniculata* compounds at 37oC, 5% CO2 for 72 h. The cells were washed with cold PBS twice. After staining the cells with 3% crystal violet solution 50 µl per wells for 15 min, the cells were washed with water and dried at room temperature overnight. Stained crystal violet was dissolved in DMSO and OD620 of the solution was measured.

The cell viability was evaluated by the percentage of the mean value of the optical density resulting from the cell control that set 100%. The subtoxic concentration was the maximal concentration that has OD as the cell control. The 50% cytotoxic concentration (CC50) of each *A. paniculata* compounds was calculated from the mean dose-response of three independent assays.

5. Anti-viral activity in pre-infection

The subtoxic concentration of *A. paniculata* compounds were incubated with 2000, 1000 and 500 PFU /ml (or 100, 50 and 25 PFU/well) of HSV-1 at 37oC for 10, 30 and 60 min. Control were mixtures of HSV-1 and medium (virus control) and HSV-1 and 2 µg/ml of dextran sulfate (inhibition of HSV entry control). After each of incubation times, all of the mixtures were added 50 µl per wells and adsorbed on confluent Vero cell monolayer in a 96-well culture plate at 37oC for 1 h under a humidified 5% CO2 atmosphere. After virus adsorb, the mixtures were aspirated, the cells were washed twice with PBS (pH 7.5) and once with Opti-MEM medium and replaced with 0.8% of CMC in Opti-MEM.

After incubation at 37oC under a humidified 5% CO2 atmosphere for 72h, the cell monolayer were fixed in 10% formalin and stained with 3% crystal violet. Plaques were counted and compared with control group. The inhibitory activities of test extracts or dextran sulfate on HSV-1 activity in pre-incubation were calculated as follows:

$$\text{Inhibitory activity (\%)} = \frac{\text{Plaque numbers of Control - Plaque numbers of Experiment}}{\text{Plaque numbers of Control}} \times 100$$

If the *A. paniculata* compounds exhibit anti-viral activity in pre-infection more than 80% of virus control, we assume that the extract had anti-viral activity in pre-infection.

6. Anti-viral activity in post-infection

Confluent Vero cell monolayer in a 96-well culture plate were adsorbed with 2000, 1000 and 500 PFU /ml (or 100, 50 and 25 PFU/well) of HSV-1 at 37oC for 1 h under a humidified 5% CO2 atmosphere. After adsorption, the mixtures were aspirated, the cells were washed twice times with PBS (pH 7.5) and once time with Opti-MEM medium and replaced with 0.8% of CMC in Opti-MEM with each of subtoxic concentration of *A. paniculata* compounds. The controls were replaced with 0.8% of CMC in Opti-MEM without or with 5 μg/ml of acyclovir.

After incubation at 37oC under a humidified 5% CO2 atmosphere for 72h, the cell monolayer were fixed in 10% formalin and stained with 3% crystal violet. Plaques were counted and compared with the control. The inhibitory activities of test extracts or acyclovir on HSV-1 activity in pre-incubation were calculated as above.

The *A. paniculata* compounds which exhibited inhibitory activity in post-infection more than 80% of virus control was assumed to have anti-viral activity in post-infection.

2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ RetroSys™ kit (Innovagen, Sweden)

วิธีทดลอง เตรียมสารละลายเริ่มต้นดังในตารางที่ 1

1. เจือจางสารสกัดสมุนไพรที่เตรียมไว้ด้วย diluted sample dilution buffer แบบ serial 10-fold dilution เป็น 1:10, 1:100, 1: 1,000 และ 1: 10,000
2. เตรียม reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย reconstitution buffer และ RT reaction components
3. ใส่ reaction mixture 100 μl ลงในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่เคลือบด้วย template/primer construct จำนวน 48 หลุม (A1-6, B1-6,..., H1-6)
4. นำสารสกัดที่ไม่ได้เจือจาง และที่เจือจางแต่ละ dilution จำนวน 50 μl ใส่ลงในแต่ละหลุมที่มี reaction mixture โดยใส่ dilution ละ 3 หลุม จะเหลือแถว H1-6 ให้เติม diluted sample dilution buffer จำนวน 50 μl ใช้เป็น reference และ background control
5. ปิดเพลทด้วย adhesive tape แล้ว incubate นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 33°C
6. เติม HIV-1 rRT-standard enzyme จำนวน 50 μl ลงในแต่ละหลุมทุกหลุมยกเว้น H4-6 ให้เติม diluted sample dilution buffer จำนวน 50 μl แทน

7. ปิดเพลทด้วย adhesive tape แล้ว incubate นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 33°C บน orbital shaker set at gentle agitation
8. หยุดปฏิกิริยาโดยการล้างเพลทด้วย Triton X-100 ปริมาณ 6 ml/หลุม
9. เติม RT product tracer หลุมละ 100 µl
10. ปิดเพลทด้วย adhesive tape แล้ว incubate นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 33°C บน orbital shaker set at gentle agitation
11. ล้างเพลทด้วย Triton X-100 4 ครั้ง
12. เติม alkaline phosphatase substrate solution หลุมละ 200 µl
13. ปิดเพลทด้วย adhesive tape แล้ว incubate นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้องบน orbital shaker set at gentle agitation ในที่มืด
14. อ่าน absorbance ที่ 405 nm โดยใช้หลุม H4-6 เป็น background control
15. คำนวณค่า IC_{50} value (ความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้ง RT activity ได้ร้อยละ 50)

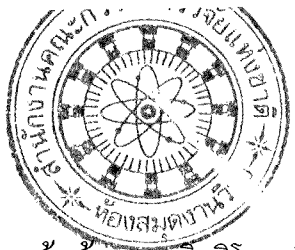
ตารางที่ 1 สารสกัดและความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

Derivatives	M.W.	Start conc. (µg/mL)	Start conc. (µM)
SS1	350.209	5.700	16.28
SS2	332.199	3.325	10.01
AND2	334.214	5.400	16.16
SS3	390.241	4.667	11.96
SS34A	432.251	0.871	2.02
SS34B	392.220	0.625	1.59
SS20B	476.241	0.500	1.05
SS40	836.669	1.000	1.20
SS39	1064.898	6.875	6.46
SS17 (SS13)	808.658	12.750	15.77

2.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและ *Candida albicans* ของ andrographolide และอนุพันธ์

สารตัวอย่างได้แก่ SS1, SS2, SS3, SS19, SS20, SS30, SS34, SS36, SS37, SS39, และ SS40

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารตัวอย่างโดยใช้วิธี broth microdilution ตามวิธีที่ระบุในเอกสาร CLSI M7-A4 ของ Clinical and Laboratory Standards Institute (เดิมคือ NCCLS) (1) แบคทีเรียทดสอบที่ใช้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



1. การเตรียมสารตัวอย่าง

ก. การทดสอบเบื้องต้น

ละลายสารตัวอย่างใน dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ แล้วเจือจางต่อใน Mueller Hinton broth (MHB) ให้ได้ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปิเปตสารละลายสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate โดยทำสองซ้ำ

ข. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MIC)

ในกรณีที่สารตัวอย่างแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ ทำการเจือจางสารตัวอย่างเป็น 2 เท่า ตามลำดับ ตั้งแต่ 4 มิลลิโมลาร์ ถึง 0.0078 มิลลิโมลาร์ เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ ปิเปตสารละลายสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate สำหรับหลุมที่ 11 และ 12 ใส่อาหารเพาะเชื้อที่มี DMSO 2 % 50 ไมโครลิตร และอาหารเพาะเชื้อ 100 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยทำสองซ้ำ และใช้ ampicillin เป็น positive control

2. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

เพาะแบคทีเรียทดสอบในอาหาร tryptic soy broth และบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 3 ชม. แล้วนำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ 0.5 McFarland turbidity standard โดยวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร และปรับให้ได้ OD เท่ากับ 0.1 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 ซีเอฟยู/มล. ทำการเจือจางเชื้อต่อ 100 เท่า ใน MHB ทำให้ได้เชื้อประมาณ 10^6 ซีเอฟยู/มล. ปิเปตเชื้อทดสอบ 50 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่ใส่สารตัวอย่างไว้แล้ว

3. การบ่มเชื้อและการดูผล

ก. นำ 96-well microtiter plate เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. แล้วเติมสารละลาย *p*-iodonitrotetrazolium (INT) ความเข้มข้น1 มก./มล. หลุมละ 20 ไมโครลิตร และนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อต่ออีก 1 ชม. ก่อนดูผล หลุมที่เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่ามีเชื้อเจริญ หลุมที่ไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

ข. ศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารตัวอย่าง โดยดูดสารละลายจากหลุมที่ไม่เปลี่ยนสีไปหยดลงบน Mueller Hinton agar แล้วนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. ดูผลว่ามีเชื้อเจริญหรือไม่

การศึกษาฤทธิ์ต้าน *Candida albicans*

ทำการศึกษาฤทธิ์ต้าน *Candida albicans* ATCC 90028 ของสารตัวอย่างโดยใช้วิธี broth microdilution ตามวิธีที่ระบุในเอกสาร CLSI M27-A2 (2)

1. การเตรียมสารตัวอย่าง

ละลายสารตัวอย่างใน dimethylsulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ แล้วเจือจางต่อใน RPMI 1640 ให้ได้ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ ปีเปตสารละลายสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate โดยทำสองซ้ำ

2. **การเตรียมยีสต์ทดสอบ**

เพาะ *Candida albicans* บน Sabouraud's dextrose agar ที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. เขี่ยเชื้อที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวใส่ในสารละลาย normal saline และปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.1 OD ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 1-5 x 10^6 ซีเอฟยู/มล. ทำการเจือจางเชื้อต่อใน RPMI 1640 1000 เท่า ได้เชื้อประมาณ 1-5 x 10^3 ซีเอฟยู/มล. ปีเปตเชื้อทดสอบ 100 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมของ 96-well microtiter plate ที่ใส่สารตัวอย่างไว้แล้ว

3. การบ่มเชื้อและการดูผล

นำ 96-well microtiter plate เข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชม. แล้วเติมสารละลาย *p*-iodonitrotetrazolium (INT) ความเข้มข้น1 มก./มล. หลุมละ 20 ไมโครลิตร และนำเข้าบ่มในตู้บ่มเชื้อต่ออีก 24 ชม. ก่อนดูผล หลุมที่เชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงแสดงว่ามีเชื้อเจริญ หลุมที่ไม่เปลี่ยนสีแสดงว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารตัวอย่าง SS19

ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร SS19 ในความเข้มข้น 4xMIC ต่อเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 จำนวน 10^6 ซีเอฟยู/มล. โดยดูลักษณะที่เปลี่ยนแปลงด้วย Transmission electron microscope (TEM)

2. 3 Pharmacological Activities

1 แบบการวิจัย (research design)

การทดลองนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้หนูถีบจักร (mice) และ หนูขาว (rats) เป็นสัตว์ทดลอง แต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยหนูอย่างน้อย 5 ตัว ส่วนการทดสอบความเป็นพิษใช้หนูถีบจักรกลุ่มละ 10 ตัว

2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

2.1 สารตัวอย่างในการทดลองที่ใช้

สารตัวอย่างกึ่งสังเคราะห์ andrographolides จาก**พืชฟ้าทะลายโจร** ที่นำมาทำการทดลองได้จากห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนักอยู่ในระหว่าง 25-35 กรัม และ หนูขาวเพศผู้ น้ำหนักอยู่ในระหว่าง 250-300 กรัม เป็นสัตว์ทดลอง เลี้ยงในสภาวะที่มี light /dark cycle คงที่ประมาณ 14 : 10 ชั่วโมง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารกึ่งสังเคราะห์

การศึกษาครั้งนี้จะใช้สารกึ่งสังเคราะห์ ใน 5% DMSO **แล้วจึง**ทำให้เจือจางโดย normal saline ก่อนนำมาให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (i.p.)

2. 3.1 การทดสอบฤทธิ์ระงับปวดโดยวิธี hot plate test

หนูถีบจักรได้รับสาร 5% DMSO (เป็นกลุ่มควบคุม) หรือ สาร SS1, SS2, SS3, SS17, หรือ SS19 ในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) โดยแต่ละกลุ่มจะมีหนู 5-8 ตัว หลังจากฉีดเป็นเวลา 30 นาที นำหนูไปวางบน hot plate ซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส จับเวลาตอบสนองต่อความร้อนโดยการสังเกตุจากการเลียเท้าหรือการกระโดดแล้วนำเสนอเป็น thermal threshold ทั้งนี้กำหนดเวลาไม่เกิน 30 วินาทีเพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง

2. 3.2 การทดสอบฤทธิ์ลดไข้

หนูขาวจะถูกแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม หนูทุกตัวจะได้รับการวัดอุณหภูมิร่างกายทางทวารหนัก เป็นระยะ ๆ และบันทึกข้อมูลไว้ หนูจะถูกกระตุ้นให้เกิดไข้โดยฉีด baker yeast (in saline) ในขนาด 0.135 กรัม/กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง (i.p.) หลังฉีด yeast ไปแล้ว วัดอุณหภูมิร่างกายทางทวารหนักของหนูทุกชั่วโมงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับ สารละลาย 5%DMSO, paracetamol (1.25 mmole/kg) หรือ สาร SS1, SS2, SS3, SS17, หรือ SS19 ในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (s.c.) หลังการให้ยาหรือสาร จะวัดอุณหภูมิร่างกายทางทวารหนักของหนูทุกชั่วโมงติดต่อกันเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการทดลองนำเสนอเป็นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิร่างกายทางทวารหนักก่อนการฉีด baker yeast

2. 3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

หนูขาวจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่ม ทำการวัดขนาดของเท้าหนูก่อนการทดลองด้วยเครื่อง Plethysmometer จากนั้นหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับ สารละลาย 5% DMSO หรือ สาร SS1, SS3, SS17 หรือ SS20 ในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากให้สาร 30 นาที กระตุ้นเท้าหนูให้เกิดการอักเสบด้วย 0.1 มิลลิลิตร ของ 1 % carrageenan ฉีดเข้าที่อุ้งเท้าหนูของขาหลัง วัดขนาดเท้าที่ 1, 2 และ 3 ชั่วโมงหลังฉีด carrageenan เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของขนาดอุ้งเท้ากับก่อนได้รับสาร

2. 3.4 การทดสอบความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษจะทำในหนูถีบจักรแบ่งออกเป็นกลุ่มกลุ่มละ10 ตัว โดยจะฉีดสารทดสอบ (ในขนาดที่มีฤทธิ์การรักษา และสูงกว่าอย่างน้อยสิบเท่า) เข้าช่องท้อง บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมที่อาจสังเกตุได้จนถึง 6 ชั่วโมงหลังฉีด และอัตราการตาย (ถ้ามี) จนถึง 24 ชั่วโมงหลังการฉีด

ขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบผลของสารกึ่งสังเคราะห์จากพืชฟ้าทะลายโจรต่อสารเปรียบเทียบ และกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลองกระทำโดยใช้ ANOVA Test การเปลี่ยนแปลงที่ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติคือ p-value < 0.05

2.3.5 การทดสอบฤทธิ์ลดภาวะซึมเศร้า (antidepressive effect) ในหนูถีบจักร

การทดสอบฤทธิ์ลดความวิตกกังวลในหนูถีบจักรทำโดยการทดสอบการว่ายน้ำของหนูในโถแก้วซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร บรรจุน้ำไว้สูง 20 เซนติเมตร อุณหภูมิของน้ำขณะทำการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 ส.ค. 2555
209261

ทดลองอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส หนูถีบจักรถูกแบ่งออกเป็น 9 กลุ่มโดยได้รับ 5% DMSO (เป็นกลุ่มควบคุม) หรือ สาร SS3 หรือ SS17 ในขนาด 0.5, 1, 4 หรือ 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) โดยแต่ละกลุ่มจะมีหนู 5-8 ตัวหลังจากฉีดเป็นเวลา 30 นาที นำหนูลงสู่น้ำในโถแก้ว จับเวลาที่หนูหยุดว่ายน้ำในช่วงระยะเวลา 5 นาที ค่าที่ได้นำเสนอเป็นค่า total immobility time การหยุดว่ายน้ำหมายถึงการที่หนูหยุดการเคลื่อนไหวโดยลอยตัวอยู่นิ่งๆเหนือผิวน้ำ

2.3.6 การทดสอบฤทธิ์ลดความวิตกกังวล (anxiolytic effect) ของสารในหนูถีบจักร

ทำการทดสอบโดยใช้ wooden maze ลักษณะเป็นกากบาทสูงจากพื้น 30 เซนติเมตร แขนแต่ละแขนยาว 30 เซนติเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร แขน 2 แขนตรงกันข้ามจะไม่มีผนัง (แขนเปิด) ในขณะที่อีก 2 แขนตรงกันข้ามมีผนังปิดสูง 5 เซนติเมตร หนูถีบจักรถูกแบ่งออกเป็น 9 กลุ่มโดยได้รับ 5% DMSO (เป็นกลุ่มควบคุม) หรือ สาร SS3 หรือ SS17 ในขนาด 0.5, 1, 4 หรือ 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) โดยแต่ละกลุ่มจะมีหนู 5-8 ตัวหลังจากฉีดเป็นเวลา 30 นาทีนำหนูมาวางตรงกลางระหว่างแขนโดยให้หนูหันหน้าไปทางแขนที่มีผนัง ในช่วงเวลา 5 นาทีที่หนูอยู่ใน maze จับเวลาที่หนูอยู่ในแขนเปิด และจำนวนครั้งที่หนูเข้าสู่แขนใดแขนหนึ่ง

2.3.7 การทดสอบฤทธิ์ของ SS17 ที่มีต่อความ aggressive ของหนูถีบจักรเพศผู้

ในการทดสอบความเป็นพิษนั้น สังเกตุพบว่าประมาณวันที่ 4-5 หลังจากหนูได้รับสาร SS17 ในขนาดสูง (50 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) มีบาดแผลที่หลังซึ่งแสดงถึงการกัดกัน ผู้วิจัยจึงสนใจว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดความดุร้าย หรือเพิ่ม aggression ของสัตว์ทดลองได้หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการศึกษาฤทธิ์ของ SS17 ใน aggressive test โดยให้หนูถีบจักรได้รับสารในขนาด 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเป็นขนาดสองเท่าของขนาดออกฤทธิ์ (4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

หนูเพศผู้ถูกนำมาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 5-8 ตัว) ได้แก่ resident mouse และ intruder นำ resident mouse มาแยกเลี้ยงในกรง กรงละ 1 ตัวโดยไม่เปลี่ยนขี้เลื่อยที่รองพื้นกรงเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น resident mouse ได้รับสาร SS17 ในขนาด 8 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางการฉีดเข้าช่องท้อง (IP) เพียง 1 ครั้ง หลังจากฉีดเป็นเวลา 30 นาที นำหนูกลุ่ม intruder 1 ตัวมาปล่อยในกรงของ resident mouse เป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนการกัด (attack bites) ระหว่างหนูทั้งสอง การทำ aggressive test จะทำทุกวันติดกันเป็นเวลา 3 วัน ทั้ง resident และ intruder mice จะใช้เพียงครั้งเดียวในหนึ่งวัน

หลังจากการทดสอบในวันที่ 4 หนูถูกทำให้เสียชีวิตด้วย ether จากนั้นแยกอวัยวะที่สำคัญๆ (ตับ, ไต, ปอด, หัวใจ, กระเพาะ และลำไส้) มาตรวจสอบดูลักษณะผิดปกติด้วยตาเปล่า และชั่งน้ำหนักของอวัยวะแต่ละชนิด นำเสนอเป็น organ weight/body weight ratio

2.3.8 การทดสอบฤทธิ์ของ SS1, SS2 และ SS17 ที่มีต่อพฤติกรรมทางเพศของหนูถีบจักรเพศผู้

สาร SS1, SS2 และ SS17 ได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ที่อาจมีต่อพฤติกรรมทางเพศของหนูถีบจักรเพศผู้ (mating behavior, Tajuddin *et al.*, 2004) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสาร PA ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์

และ sildenafil (เป็น positive control) หนูเพศผู้ถูกนำมาแบ่งเป็น 6 กลุ่ม (กลุ่มละ 5-8 ตัว) หนูแต่ละกลุ่มได้รับการฉีดเข้าช่องท้องด้วย 5% DMSO (เป็นกลุ่มควบคุม), SS1, SS2 หรือ SS17 ในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเพียง 1 ครั้งในวันแรก หรือได้รับการป้อนทางปากด้วย sildenafil ในขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละครั้ง ทุกวันเป็นเวลา 4 วันติดกัน หลังการได้รับสาร 1 ชม หนูจะถูกนำมาใส่ในกรงพร้อมกับหนูเพศเมียที่อยู่ใน estrous cycle (กระตุ้นด้วย estrogen และ progesterone) เป็นระยะเวลา 15 นาที ทำการบันทึกพฤติกรรมทางเพศได้แก่ mounting latency, mounting frequency, intromission latency, intromission frequency และ ejaculation latency.

2. ขั้นตอนและวิธีการเก็บข้อมูล

2.1 สารตัวอย่างในการทดลองที่ใช้

สารสกัดตัวอย่างจากพืช ที่จะนำมาทำการทดลองได้จากภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2.2 การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนักอยู่ในระหว่าง 25-35 กรัม และหนูขาวเพศผู้น้ำหนักระหว่าง 200-250 กรัมเป็นสัตว์ทดลอง เลี้ยงในสภาวะที่มี light /dark cycle คงที่ประมาณ 14 : 10 ชั่วโมง

2.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารกึ่งสังเคราะห์

การศึกษาครั้งนี้จะใช้สารกึ่งสังเคราะห์ในขนาด 1 หรือ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เตรียม stock ใน DMSO แล้วจึงทำให้เจือจางโดย normal saline ก่อนนำมาให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (i.p.)

(1) การทดสอบฤทธิ์เพิ่มพฤติกรรมทางเพศ

หนูไมซ์จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มละ 54 ตัว ประกอบด้วย เพศผู้ 36 ตัว เพศเมีย 18 ตัว หนูเพศเมียต้องชักนำให้อยู่ในระยะการเป็นสัด (estrous) โดยการฉีด (s.c.) β-estradiol-3-benzoate (10 μg / mouse) และ progesterone (500 μg/ mouse) ก่อนทำการทดลอง 48 และ 4 ชม. ตามลำดับ

หนูไมซ์เพศผู้ 18 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับ

1. สารละลาย (DMSO + normal saline)

2. สารแอนโดรกราโฟไลด์ (50 mg/kg)

3. สาร Sildenafil citrate (Viagra®) (5 mg/kg)

สารที่ 1-2 ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (เนื่องจากมีข้อมูลที่เคยทำการศึกษาฤทธิ์ลดไข้แก้ปวดที่ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องแล้วสัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรมทางเพศมากขึ้น) และทำการสังเกตพฤติกรรมทางเพศในช่วงเวลา 10 นาที โดยใช้วิธีmating behavior test (หนูเพศผู้ 1 ตัว : หนูเพศเมีย 1 ตัว) หลังจากฉีดสารไปแล้ว 30, 60, 120 และ 180 นาที ส่วนสาร Sildenafil citrate ให้โดยการป้อน 1 ชม. ก่อนทำการทดลอง (ทุกวัน)

Definition of male mice's sexual behaviors.

BEHAVIOR	DEFINITION

Mounting latency (ML)	Time elapsed from introduction of male with female to the first mount (male approaches a female and assumes a copulatory position).
Mounting frequency (MF)	Number of mounts
Intromission latency (IL)	Time from the introduction of the female up to the first intromission by the male
Intromission frequency (IF)	Number of intromissions
Ejaculation latency (EL)	Time from the first intromission of a series up to the ejaculation (observed by an increased rate of thrusting after intromission, followed by the male cleaning himself).

(2) การทดสอบฤทธิ์ต่อปริมาณสเปิร์ม การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน เมื่อให้สารแบบต่อเนื่อง

การทดลองนี้ใช้หนูไมซ์เพศผู้ 54 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มๆละ 18 ตัว โดยแต่ละกลุ่มจะได้รับสารต่างกันดังนี้

1. สารละลาย (Soluble solvent)
2. สารแอนโดรกราโฟไลด์ (50 mg/kg)
3. Sildenafil citrate (5 mg/kg)

ทั้ง 3 กลุ่มถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1 จะให้สารต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ กลุ่มที่ 2 ให้สารต่อเนื่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และกลุ่มที่ 3 ให้สารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดของแต่ละกลุ่มจะให้สัตว์ทดลองดมยาสลบแบบเกินขนาด (Over dose) เมื่อสัตว์ทดลองหมดสติจะทำการเก็บเลือดจากหัวใจห้องล่างซ้าย (cardiac puncture) และให้ยาสลบต่อจนกระทั่งสัตว์ทดลองตาย ทำการตัดอัณฑะ (testis) เพื่อไปหาปริมาณสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ส่วนเลือดที่เก็บได้จะนำไปวัดหาปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนด้วยวิธี radioimmuno assay

(3) การทดสอบฤทธิ์ต่อหลอดเลือด

หนูแรทถูกนำมาตัดคอ แยก thoracic aorta ออกมา และเตรียมเป็น aortic strip แขวนใน organ bath ที่มี Kreb's solution ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C และให้ก๊าซผสม oxygen (95%) และ carbon dioxide (5%) บันทึก aortic tension โดย polygraph การทดลองใช้ norepinephrine (0.15 ng/ml, final concentration) เป็นสารในการกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัว และบันทึกผลเป็นเวลา 10 นาทีหลังเติมสาร สารแอนโดรกราโฟไลด์จะถูกเติมลงไปก่อนการเติม norepinephrine เป็นเวลา 10 นาที

2.4 ขั้นตอนและวิธีในการวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบผลของสารแอนโดรกราโฟไลด์ ต่อสารเปรียบเทียบ (sildenafil citrate) และกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลองกระทำโดยใช้ ANOVA Test การเปลี่ยนแปลงที่ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติคือ p-value < 0.05