

## บทคัดย่อ 209261

ฟ้าทะลายโจรเป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเอเชียสรรพคุณของฟ้าทะลายโจร ในการรักษา ได้แก่ฤทธิ์ ด้านเชื้อมาเลเรีย เชื้อแบคทีเรีย ด้านไวรัส ด้านมะเร็ง แก้วไข แก้วปวด ด้าน อักเสบ ช่วยเพิ่มความพดติกรรมทางเพศ และยังเพิ่มสเปิร์ม ในฟ้าทะลายโจรมี แอนโดรกราโฟ ลายด์ (SSI) อยู่สูงถึง 0.6% ซึ่งเป็นสาร กลุ่ม diterpene ชนิด *ent-labdan*e คาร์บอนตำแหน่งที่ 13-16 จับตัวกันเป็นกลุ่ม  $\gamma$ -lactone และกลุ่มอะตอม เป็นกลุ่มฮัยดรอกซีอิสระ 3 กลุ่ม ที่ตำแหน่งที่ 3, 14 และ 19 ในการทดลองนี้ได้มีการคัดแปลง กลุ่ม ฮัยดรอกซีอิสระทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยการทำปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชันกับกรดอินทรีย์ที่มีสายยาว (กรดปาล์มิติก) และ สายสั้น (กรดอะซีติก) พบว่า DMAP เป็น สารเร่งที่ดีที่สุด ส่วนไพรีนมีผลต่อการสูญเสีย กลุ่มฮัยดรอกซีที่ตำแหน่ง 14 จากการสังเคราะห์ได้ สารกึ่งสังเคราะห์และนำมาหาฤทธิ์ทั้งหมด 11ตัว ได้แก่ 1) 3,19-ไดปาล์มิตอิลแอนโดรกราโฟลายด์ (SS40), 2) 14-ไดออกซี-11,12-ไดคิฮัยโดร-3,19-ไดปาล์มิตอิลแอนโดรกราโฟลายด์(SS17), 3) 3,19-ไอโซโปรพัยลิคแอนโดรกราโฟลายด์(SS3), 4) 14-อะเซตอิลแอนโดรกราโฟลายด์(SS19) 5) 3,14,19-ไตรอะเซตอิลแอนโดรกราโฟลายด์(SS20B), 6) 3,14,19-ไตรปาล์มิตอิลแอนโดรกราโฟลายด์ (SS39), 7) 14-โมนอะเซตอิล-3,19-ไอโซโปรพัยลิคแอนโดรกราโฟลายด์(SS34A), 8) 14-ไดออกซี-11,12-ไดคิฮัยโดร-3,19-ไอโซโปรพัยลิคแอนโดรกราโฟลายด์ (SS27RT)

สารกึ่งสังเคราะห์ทุกตัวไม่มีรสขม และได้นำมาทดสอบเทียบฤทธิ์ ทางชีววิทยา เทียบกับสาร ที่แยกได้จากธรรมชาติซึ่งได้แก่ แอนโดรกราโฟลายด์ (SS1) 14-ไดออกซี-11,12-ไดคิฮัยโดรแอนโดร กราโฟลายด์ (SS2) และ ไดออกซีแอนโดรกราโฟลายด์ (AND) สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ อะซีโตอิล และปาล์มิตอิลได้นำมาทดสอบหาฤทธิ์ ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ด้านเชื้อ HSV-1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รี เวอร์ส ทรานสคริปต์สของเชื้อ HIV ฤทธิ์ลดไข้ บรรเทาปวด ด้านอักเสบและการกระตุ้นพดติกรรม ทางเพศ จากการทดสอบพบว่า อนุพันธ์ อะซีโตอิล ให้ผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis* โดย SS19 ให้ผลดีกับ *B. subtilis* และเมื่อนำไปหาตำแหน่งการออกฤทธิ์พบว่า ผลต่อการสร้างผนังเซลล์ ส่วนฤทธิ์ในการ ด้านไวรัส HSV-1 นั้นพบว่าสารกลุ่มอะซีโตอิลมีฤทธิ์ต่อต้านการเข้าเซลล์เข้าบ้าน ส่วนฤทธิ์ในการต้าน เชื้อ หลังการเข้าสู่เซลล์เข้าบ้านนั้น SS3 มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ในเซลล์และรบกวน การสร้างดีเอ็นเอในช่วงแรก (early stage) ในขณะที่ SS2 ออกฤทธิ์ต้านเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริป ท์ได้ดีที่สุดตามด้วย SS39, 72.44%, 6.46  $\mu$ M และ 67%, 16  $\mu$ M ตามลำดับ

จากการที่ SS3 มีผลต่อฤทธิ์ด้านไวรัส HSV-1 ดีมาก ได้ถึง 100% จึงได้ทดสอบหาค่า สัมประสิทธิ์การกระจายตัวเทียบกับสารธรรมชาติ SS1, SS2 และ AND โดยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณสารทั้งสี่ใน ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และออกทานอล ได้ค่าพารามิเตอร์ของการ วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้นมามีค่าดังนี้ ค่าปริมาณต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้อยู่ระหว่าง 4.72 to 5.21 ไมโครกรัม/มล ค่าความเที่ยงตรง  $98.7 \pm 5.39$ ,  $96.7 \pm 5.25$ ,  $100.3 \pm 6.77$ ,  $104.7 \pm 2.75$  %

ของปริมาณสารที่เดิม ความแม่นยำในวันเดียวกัน 0.06, 0.08, 0.06 และ 0.07%RSD และในระหว่างวัน 0.57, 3.01, 1.76, และ 0.74%RSD สัญญาณที่แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นอยู่ที่ 18.6-223.5, 13.0-157.5, 16.0-192.0 และ 12.5-150.0 ไมโครกรัม/มล โดยมีค่า regression อยู่ที่ 1.0000, 0.9995, 0.9998 และ 0.9999 ตามลำดับ สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารทั้ง 4 ตามลำดับเป็นดังนี้  $43 \pm 3.96$ ,  $374.9 \pm 4.31$ ,  $348.1 \pm 9.04$  and  $1017.3 \pm 7.5$

สำหรับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดไข้ แก่ปวด และต้านอักเสบของสาร SS1, SS2, SS19, SS3 และ SS17 นั้น ทำการทดสอบแก้ปวดทำในหนูถีบจักรโดยวิธี hot plate และ writhing เพื่อดูตำแหน่งการออกฤทธิ์ ที่สมองส่วนกลางหรือปลายประสาท พบว่า SS1, SS3 และ SS17 ให้ผลดี แต่การเพิ่มปริมาณที่สูงเกินกว่า 8 มก/กก ก็ไม่ได้เพิ่มฤทธิ์แต่ประการใด ในขณะที่ SS3 และ SS17 ให้ผลดีใน การทดสอบแบบ writhing แต่ SS1 กลับไม่ให้ผล ส่วนการลดไข้ด้วยการเหนี่ยวนำด้วยเบเกอรี่สต์พบว่า SS3 and SS17 ลดอุณหภูมิของสัตว์ทดลองได้ ( $p < 0.05$ ) ส่วนฤทธิ์ต้านอักเสบด้วยการเหนี่ยวนำด้วยคาราจีแนนก็พบว่า SS1, SS3 และ SS17 ลดขนาดของอุ้งเท้าหนูได้เช่นกัน สาร SS3 และ SS17 เมื่อให้ในขนาดที่สูงถึง 100 มก/กก ในสัตว์ทดลอง ไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลันแต่อย่างใด จึงสรุปได้ว่าเป็นสารที่น่าสนใจและออกฤทธิ์ดีกว่าสารดั้งเดิมมาก

ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในด้านอื่นพบว่าทั้ง SS3 และ SS17 ไม่มีผลต่อความก้าวร้าว ความกังวล หรือลดความเครียดแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามเมื่อให้ SS17 ด้วยขนาด 50 มก/กก พบว่า SS17 ด้วยการรับประทาน พบว่าเพิ่ม mounting frequency ในวันที่ 1-4 แต่ไม่เท่า sildenafil ซึ่งใช้เป็นยาเปรียบเทียบกับการออกฤทธิ์ และพบว่าเมื่อให้ SS1 ขนาด 50 มก/กก ทางปากเป็นเวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ในหนูถีบจักรและหนู พบว่าเพื่ระดับเทสโตสเตอโรนในสัปดาห์ที่ 4 และลดลงในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 และไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเสียปริม นอกจากนี้ยังพบว่า SS1 สามารถลดอาการหดตัวของผนังเส้นเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วย นอร์อีพิเนฟรีน

**Keywords:** Andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, 14-deoxyandrographolide, 3,19-Dipalmitoylandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-dipalmitoylandrographolide, 3,19-isopropylideneandrographolide, 14-acetylandrographolide, 3,14,19-triacetylandrographolide, 3,14,19-tripalmitoylandrographolide, 14-monoacetyl-3,19-isopropylideneandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-isopropylideneandrographolide, anti-HSV-1, anti-replication of HSV-1, HSV-1 pre-infection, reverse transcriptase inhibition, HIV, antibacterial, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, male sexual function, blood testosterone level

## Abstract

209261

*Andrographis paniculata* is a well known plant in Asia. It is used in traditional medicine for antimalarial, antibacterial, antiviral, anticancer, antipyretic, analgesic, anti-inflammatory, and sexual stimulation and increase sperm production. The highest active constituent in *A. paniculata* is andrographolide (SS1), 0.6%. Andrographolide (SS1) is an *ent*-labdane diterpene, its 13-16 carbon forming a  $\gamma$ -lactone ring. There are 3 free hydroxyls at positions 3, 14 and 19. In this experiment, esterifications of these three OHs with long and short chains fatty acids were carried out. In this study, 11 analogues of andrographolide were synthesized and tested for biological activities; they are 1) 3,19-Dipalmitoylandrographolide (SS40), 2) 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-dipalmitoylandrographolide (SS17), 3) 3,19-isopropylideneandrographolide (SS3), 4) 14-acetylandrographolide (SS19) 5) 3,14,19-triacetylandrographolide (SS20B), 6) 3,14,19-tripalmitoylandrographolide (SS39), 7) 14-monoacetyl-3,19-isopropylideneandrographolide (SS34A), 8) 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-isopropylideneandrographolide (SS27RT).

All compounds lost the bitter taste as found in andrographolide. In the studying of the biological activity analogues were compared with the naturally occurring compounds which are andrographolide (SS1), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (SS2), 14-deoxyandrographolide (AND2). Acetyl and palmitoyl analogues were used to test for antibacterial, anti-HSV-1, and reversed transcriptase inhibition for anti-HIV activity, antipyretic, analgesic, anti-inflammatory and sexual stimulation. It was found that the acetyl analogues are active against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*. It was found that 14-acetylandrographolide, the most active analogue, exerted the effect on the cell wall of *B. subtilis*.

which is the most susceptible bacteria. For anti-HSV-1, all acetoxy analogues were found to be active at the pre-viral infection stage. Whereas the most active post infection stage is SS3 which exerts the activity at the early stage of DNA synthesis. Meanwhile SS2 gave the highest activity on reverse transcriptase against the HIV ( $10\ \mu\text{M}$ , 84%) and followed by SS39 (72.44%,  $6.46\ \mu\text{M}$ ) and SS1 (67%,  $16\ \mu\text{M}$ ).

Since SS3 is very effective and showed absolute activity in antireplication of HSV-1, the partition coefficient of the compound was compared to the natural occurring compounds, SS1, SS2, AND. An analytical HPLC method simultaneous determination of SS1, SS2, AND and SS3 was established to determine the partition coefficients of the four compounds. The quantitation limits were 4.72 to  $5.21\ \mu\text{g/ml}$ . The accuracy were  $98.7\pm 5.39$ ,  $96.7\pm 5.25$ ,  $100.3\pm 6.77$ ,  $104.7\pm 2.75\%$  recovery, respectively. The intraday variations were 0.06, 0.08, 0.06 and 0.07% RSD, the interday variations were 0.57, 3.01, 1.76, and 0.74% RSD. The linearity ranges were 18.6-223.5, 13.0-157.5, 16.0-192.0 and 12.5-150.0  $\mu\text{g/ml}$  with the regression of 1.0000, 0.9995, 0.9998, and 0.9999, respectively. Partition coefficients were  $43\pm 3.96$ ,  $374.9\pm 4.31$ ,  $348.1\pm 9.04$  and  $1017.3\pm 7.5$ , respectively.

For pharmacological activity, SS1, SS2, SS19, SS3 and SS17 were intraperitoneally tested for their analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and acute toxicity effects in animal models. Analgesic effects were tested in mice using hot plate and writhing tests to distinguish the central and peripheral effects, respectively. The results showed that, at 4 mg/kg, all tested substances have significant analgesic effects, and the highest potency was seen with SS3, SS19 and SS17. Increasing the dose of SS 3 and SS17 to 8 mg/kg did not increase the analgesic effect. In the

writhing test, SS3 and SS17, but not SS1, showed significant results. Meanwhile, in a baker's yeast-induced fever model, SS3 and SS17 significantly reduced rats' rectal temperature ( $p < 0.05$ ). In a carrageenan-induced inflammation model, SS1, SS3 and SS17 significantly reduced rats' paw volume. Doses of SS3 and SS17 up to 100 mg/kg did not show any serious toxic effects. From this study, SS3 and SS17 are the most interesting derivatives, showing much greater potency than their parent compounds.

For the other pharmacological activities, SS3 and SS17 showed no activity on aggressiveness, anxiolytic effect and antidepressive effect.

However, intraperitoneally injection of at the dose of 50mg/kg of SS17 increase the mounting frequency in days 1-4 but not equivalent to sildenafil, the positive drug control. However, 50mg/kg of SS1 when orally administered for 2, 4, 6 and 8 weeks to mice and rats, increased the blood testosterone level significantly in week 4 and decreased in weeks 6 and 8. There was no change in sperm movement. In endothelium-intact rat aortic strips, norepineprine-induced contraction was reduced by preincubation with andrographolide.

**Keywords:** Andrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, 14-deoxyandrographolide, 3,19-Dipalmitoylandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-dipalmitoylandrographolide, 3,19-isopropylideneandrographolide, 14-acetylandrographolide, 3,14,19-triacetylandrographolide, 3,14,19-tripalmitoylandrographolide, 14-monoacetyl-3,19-isopropylideneandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro-3,19-isopropylideneandrographolide, anti-HSV-1, anti-replication of HSV-1, HSV-1 pre-infection, reverse transcriptase inhibition, HIV, antibacterial, analgesic, antipyretic, anti-inflammatory, male sexual function, blood testosterone level