รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลทางสรีรวิทยาของสารพิพอกไซด์บริสุทธิ์จากกิ่งและใบของต้นกล้วยหมูสัง

Physiological effects of pipoxide isolated from stems and leaves of *Uvaria purpurea* (Blume.)

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

ผู้วิจัยหลัก: นางสาวศันสนีย์ สวัสดิพงษ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

นายฉัตรชนก กะราลัย ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

นางชนิตา พงษ์ลิมานนท์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

นางญาณิศา รัตนาภา ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

ผู้ร่วมวิจัย: นางรัชวรรณ ลิ้มวิวัฒน์กุล ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

นางสุภาพ นวลพลับ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุน ประจำปี 2544

จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ถ่าย

เลขหมู่ QK495.A6 T64 2545 ฉ.1

Bib Key 225300

บทคัดย่อ

กล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Blume.) เป็นพืชในวงศ์ Annonaceae เป็นไม้เลื้อยเนื้อแข็ง พบในภาคใต้ของประเทศไทย จากการวิจัยโครงสร้างทางเคมีของสารที่สกัดได้จากใบกล้วยหมูสังพบว่ามีสารประกอบในกลุ่ม cyclohexene epoxides โดยเฉพาะพิพอกไซด์ ที่มีปริมาณมากถึง 3-4% ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจและอาจนำมาพัฒนาเป็นยาได้ จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทางชีวภาพของสารบางตัวในกลุ่ม cyclohexene epoxides พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและต้านการเกิดมะเร็งเม็ดเลือด การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลทางสรีรวิทยาของพิพอกไซด์ ต่อ 1) การทำงานของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้และมดลูกที่แยกออกจากตัว 2) ความดันเลือดแดง และ 3) การทำงานของไต ในหนูขาว สารพิพอกไซด์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แยกได้จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบกล้วยหมูสัง โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและการหมุนระนาบของแสงโพลาไรซ์ การทดลองหาการออกฤทธิ์ของพิพอกไซด์ทางสรีรวิทยานั้นทำในหนูขาวน้ำหนักตัวระหว่าง 200-400 กรัม ในการทดลองแบบนอกตัวทำให้หนูเสียชีวิตโดยดึงคอ และแยกชิ้นลำไส้เล็กส่วนต้นและชิ้นมดลูกออกมาบันทึกการหดตัวใน organ bath ที่บรรจุสารละลาย Tyrode และ Krebs-Ringer ที่ให้แก๊สคาร์โบเจนตลอดการทดลองตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าพิพอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} โมลาร์สามารถลดความแรงในการหดตัวของชิ้นลำไส้เล็กได้ 24 และ 26% ตามลำดับ (ค่า $P<0.05$, $n=7$) และที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ มีผลเพิ่มความถี่ของการหดตัว 3 เท่า (ค่า $P<0.05$, $n=7$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับ ซึ่งกลไกการควบคุมความสัมพันธ์ระหว่างความถี่ในการหดตัวกับความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้นั้น แม้ในภาวะปกติยังไม่ทราบแน่ชัด ในการทดลองรูปแบบเดียวกันในชิ้นมดลูกไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของทั้งความแรงและความถี่ในการหดตัว ผลของพิพอกไซด์ต่อความดันเลือดและการทำงานของไตนั้นทำในหนูที่สลบ วัดความดันเลือดแดงเฉลี่ยทางหลอดเลือดแดงคาโรติดและใช้เป็นทางเก็บตัวอย่างเลือดด้วย ฉีดสารที่ใช้เป็นดัชนีวัดการทำงานของไตเข้าทางหลอดเลือดดำจูกูลาร์ด้วยอัตรา 0.02 มล. ต่อนาทีต่อน้ำหนักตัวหนู 100 กรัม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปัสสาวะทางกระเพาะปัสสาวะ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดและปัสสาวะมาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่ใช้เป็นดัชนีวัดการทำงานของไต และคำนวณค่าเคลียรานซ์ของสารเหล่านี้ได้แก่ polyfructosan และ para-aminohippuric acid เพื่อใช้ประมาณค่าอัตราการกรองและปริมาณพลาสมาที่ไหลผ่านไตตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าพิพอกไซด์ที่ให้ในขนาด 0.5 มก.ต่อนาทีต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทำให้ความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลง 15 มม.ปรอท (ค่า $P<0.05$, $n=7$) ซึ่งอาจเป็นได้ว่าการออกฤทธิ์นี้จะผ่านกลไกอย่างหนึ่งคือการขยายตัวของหลอดเลือดแดงโดยลดแรงตึงตัวลง พิพอกไซด์ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้และที่สูงและต่ำกว่าขนาดนี้ 10 เท่าไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไตในแง่ปริมาณการขับปัสสาวะ อัตราการกรอง ปริมาณเลือดที่ไหลผ่านไต และอัตราการขับทิ้งของเกลือโซเดียมและโปแตสเซียม อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าพิพอกไซด์น่าจะออกฤทธิ์ลดการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ โดยเฉพาะส่วนที่เป็นองค์ประกอบของทั้งลำไส้เล็กและหลอดเลือดแดงด้วยกลไกคล้ายคลึงกัน ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไปก่อนที่นำไปพัฒนาเป็นยาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอีกชนิดหนึ่ง

Abstract

Uvaria purpurea Blume., a woody climber belonging to Annonaceae family is distributed widely in the southern part of Thailand. One of the cyclohexene epoxides isolated from its leaves is pipoxide with 3-4% isolated yield. This makes it as an interesting natural product with potential to be developed to be a drug. Preliminary biological testing of some cyclohexene epoxides exhibited antitumor and antileukemia activities. This research aimed to investigate the physiological effects of pipoxide on 1) isolated intestinal and uterine contraction 2) mean arterial blood pressure and 3) renal function in adult rats. Pipoxide was isolated from hexane extract of leaves of *Uvaria purpurea* by chromatographic method and its structure was elucidated by spectroscopy and measurement of optical rotation. The physiological effects of pipoxide were then studied in Wistar rat body weight ranging between 200-400 g. The rats were sacrificed by dislocation of the neck. A piece of duodenum and uterus were then isolated and fixed in organ bath containing Tyrode and Krebs-Ringer solution respectively. These solutions were bubbled with carbogen gas throughout the experiment. It is found that pipoxide at the concentration of 10^{-4} and 10^{-3}M significantly decreased the force of contraction by 24 and 26 %, respectively ($P<0.05$, $n=7$). However, at the concentration of 10^{-5}M, significantly increased the frequency of contraction 3 times when compared to the control group ($P<0.05$, $n=7$). In normal condition, the relationship between the mechanism(s) of force and frequency of contraction are still unclear. The similar method was also used to study uterine contraction and no change in both parameters were observed. The effects of pipoxide were further studied on arterial blood pressure and renal function in anesthetized rats. Carotid artery was canulated for blood pressure monitored and blood samplings. Clearance marker substances in 0.9% NaCl as index of renal functions were infused through jugular vein at the rate of 0.02 ml min^{-1} 100 g body $weight^{-1}$ for 3 hours. Urine samples were collected from urinary bladder. Calculations of clearance of polyfructosan and para-aminohippuric acid were used to represent glomerular filtration rate (GFR) and renal blood flow (RBF), respectively. The results indicated that pipoxide at the rate of 0.5 mg min^{-1} kg body $weight^{-1}$ significantly decreased mean arterial blood pressure by 15 mmHg ($P<0.05$, $n=7$). It is possible that this effect may be occured via the vasodilation of peripheral blood vessel. However, at the same concentration and the concentrations of either 10 times lower or higher did not show any effects on renal functions in term of urine flow rate, GFR, RBF and sodium and potassium excretion rate. In conclusion, pipoxide may act to decrease smooth muscle contraction in both intestine and blood vessel with, perhaps, similar mechanism (s). Further studies need to be done to clarify the mechanism(s) of action(s) before development as a drug from natural product.

Summary

ใบกล้วยหมูสังรวบรวมจากบ้านเกาะโคบ ตำบลเกาะหมาก อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง นำมาทำให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ได้น้ำหนักรวม 3.20 กิโลกรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยวิธีสกัดเย็น (cold extraction) แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตกผลึกสารที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์ม-เฮกเซน สามารถสกัดสาร pipoxide ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลัก เป็นของแข็งสีขาวหนัก 3.0 กรัม (คิดเป็น 0.10%) สารนี้แสดงค่าสเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]^{28}_{D}$ +50° ในคลอโรฟอร์มเข้มข้น $4x10^{-2}$ g/cm^{-3} ค่าคงที่ของการเคลื่อนตัว (R_f) 0.15 (20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน) มีจุดหลอมเหลว 153-154 °C ยืนยันโครงสร้างสารด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ทั้ง UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR ทั้ง 1D และ 2D รวมทั้ง ^{13}C NMR ตลอดจนเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR กับข้อมูลที่รายงานแล้วจากเอกสารอ้างอิง (Joshi *et al.*, 1979)

จากรายงานผลทางชีวภาพเบื้องต้นของสารในกลุ่ม cyclohexene epoxides พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเนื้องอกและการเกิดมะเร็งเม็ดเลือด แต่ยังไม่มีรายงานผลต่อการทำงานของอวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย ดังนั้นการวิจัยมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบสาร pipoxide ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้และมดลูก ความดันเลือด และการทำงานของไตเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

การทดสอบผลทางสรีรวิทยาของสาร pipoxide ทำโดยการนำมาละลายในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นจึงนำมาละลายต่อใน physiological fluid ที่ใช้ในการทดลองแต่ละชนิด การทดลองใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนคือการทดลองนอกตัว (*in vitro experiment*) โดยทดสอบผลของสารละลาย pipoxide ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กและมดลูก และการทดลองในตัว (*in vivo experiment*) โดยทดสอบผลของสารละลาย pipoxide ต่อความดันเลือดแดงเฉลี่ยและการทำงานของไต ได้แก่ ผลต่อ 1) ปริมาณพลาสมาที่มาเลี้ยงไต (renal plasma flow) 2) อัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate) และ 3) อัตราการขับทิ้งเกลือโซเดียมและโปแตสเซียม

ผลการทดลองพบว่าสารละลาย pipoxide ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} โมลาร์ สามารถลดความแรงในการหดตัวของลำไส้เล็กได้ 24 และ 26% ตามลำดับ ($P<0.05$, $n=7$) และที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่มความถี่ของการหดตัวได้ 3 เท่า ($P<0.05$, $n=7$) ในความเข้มข้นระดับเดียวกันสารละลาย pipoxide ไม่ออกฤทธิ์ต่อการหดตัวของมดลูก นอกจากนี้สารละลาย pipoxide ขนาด 0.5 มก.ต่อนาทีต่อ กก. น้ำหนักตัว ทำให้ความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลง 15 มม.ปรอท ($P<0.05$, $n=7$) ในขณะที่ขนาดที่ต่ำและสูงกว่านี้ 10 เท่า ไม่ทำให้ปริมาณการขับปัสสาวะและการทำงานของไตเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าสารละลาย pipoxide น่าจะออกฤทธิ์ต่อการทำงานกล้ามเนื้อเรียบลำไส้และกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยทำให้เกิดการตึงตัวลดลง ส่วนในการพัฒนาสาร pipoxide เป็นยาการรักษาโรคนั้น ยังต้องการการศึกษาวิจัยถึงกลไกการออกฤทธิ์โดยละเอียดต่อไป

สารบัญเรื่อง

หน้า

สารบัญตาราง i

สารบัญรูป ii

บทคัดย่อ iii

Abstract iv

ตอนที่ 1 การสกัดและแยกสารพิพอกไซด์ให้บริสุทธิ์จากกิ่งและใบของกล้วยหมูสัง

บทที่ 1/บทนำ 1

บทที่ 2/วิธีการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 7

วิธีดำเนินการ 7

บทที่ 3/วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง 10

เอกสารอ้างอิง 22

ตอนที่ 2 การทดสอบผลทางสรีรวิทยาของพิพอกไซด์บริสุทธิ์จากกิ่งและใบของกล้วยหมูสังในหนูขาว

ตอนที่ 2.1 การทดลองแบบนอกตัว (*In vitro* experiment)

วัตถุประสงค์ 23

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ 23

ผลการทดลอง 26

อภิปรายผล 39

ตอนที่ 2.2 การทดลองแบบในตัว (*In vivo* experiment)

วัตถุประสงค์ 41

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ 41

ผลการทดลอง 50

อภิปรายผล 52

สรุปผลและอภิปรายทั่วไป 55

เอกสารอ้างอิง 59

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงสกุล ส่วนของพืชที่นำมาสกัด สารเคมีที่พบ และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Uvaria*.....4

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^{1}H NMR ^{13}C NMR และ 2D HMBC ของสาร TAN1-001A.....13

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^{1}H NMR สเปกตรัมของ TAN1-001A (500 MHz) เปรียบเทียบกับ pipoxide (100 MHz) จากเอกสารอ้างอิง (Joshi *et al.*, 1979) 14

ตารางที่ 4 แสดงผลของ solvent (DMSO) ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ 28

ตารางที่ 5 แสดงผลของ 10^{-5}M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ 29

ตารางที่ 6 แสดงผลของ 10^{-4}M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ 30

ตารางที่ 7 แสดงผลของ 10^{-3}M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ 31

ตารางที่ 8 แสดงผลของ solvent (DMSO) ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 34

ตารางที่ 9 แสดงผลของ $0.25X10^{-5}$M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 35

ตารางที่ 10 แสดงผลของ $0.25X10^{-4}$M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 36

ตารางที่ 11 แสดงผลของ $0.25X10^{-3}$M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก 37

ตารางที่ 12 ผลของสารละลายพิพอกไซด์ขนาดต่างๆ ต่อการทำงานของไตหนู.....51

ตารางที่ 13 ผลของ dimethyl sulfoxide (DMSO) ต่อความดันเลือดแดงและการทำงานของไตหนู 57

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ดอก ใบและผลกล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Blume.) 3
รูปที่ 2 โครงสร้างของสารที่สกัดได้จากพืชสกุล *Uvaria* ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากตารางที่ 1..... 5-6
รูปที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบ pipoxide (TAN1-001A).....11
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนบางส่วนจากข้อมูล 2DHMBC.....12
รูปที่ 5 แสดง UV spectrum (EtOH) 15
รูปที่ 6 แสดง IR spectrum (KBr) 16
รูปที่ 7 แสดง ESI-MS spectrum 17
รูปที่ 8 แสดง ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) 500 MHz 18
รูปที่ 9 แสดง ^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$) 125 MHz 19
รูปที่ 10 แสดง DEPT spectrum 20
รูปที่ 11 แสดง 2D HMBC spectrum 21
รูปที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความแรงการหดตัวเฉลี่ยของลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction).....32
รูปที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความถี่การหดตัวเฉลี่ยของลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction).....32
รูปที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความแรงการหดตัวเฉลี่ยของมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น $0.25x10^{-5}$, $0.25x10^{-4}$ และ $0.25x10^{-3}$ M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction).....38
รูปที่ 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความถี่การหดตัวเฉลี่ยของมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น $0.25x10^{-5}$, $0.25x10^{-4}$ และ $0.25x10^{-3}$ M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction).....38
รูปที่ 16 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไตโดยวิธีเคลียรานซ์ ในสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2.....45
รูปที่ 17 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไตโดยวิธีเคลียรานซ์ ในสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ 3.....45
รูปที่ 18 แสดงผลของพิพอกไซด์ต่อค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MABP) ในหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับสารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.05 0.5 และ 5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว.....50

ตอนที่ 1

การสกัดและแยกสารพิพอกไซด์ให้บริสุทธิ์จากกิ่งและใบของกล้วยหมูสัง

(*Uvaria purpurea* Bl.)

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การสำรวจเอกสารทางวิทยาศาสตร์ของพืชวงศ์ Annonaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชวงศ์ Annonaceae

พืชวงศ์ Annonaceae มีทั้งไม้ต้น ไม้พุ่ม และไม้เถา เปลือกและใบมีกลิ่นเหม็นเขียว เพราะมีต่อมน้ำนมกระจายอยู่ เปลือกค่อนข้างเรียบ ส่วนมากมีสีเทาปนดำหรือปนน้ำตาล เปลือกชั้นในลอกได้เป็นชั้น ๆ เนื้อบางเป็นร่างแห กิ่งเล็ก ๆ มักมีไส้ ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ขอบใบเรียบ ไม่มีหูใบ ดอกโดยมากเป็นดอกสมบูรณ์คือ มีทั้งเพศผู้และเพศเมียในดอกเดียวกัน มีน้อยที่แยกกันอยู่ กลีบรองกลีบดอกมี 3 กลีบ กลีบอาจเชื่อมติดกันหรือแยกเป็นอิสระแก่กัน กลีบดอกมี 3 – 6 กลีบ ถ้าเป็น 6 กลีบจะเรียงกันเป็น 2 ชั้น ๆ ละ 3 กลีบ โคนกลีบจะซ้อนทแยงกันใต้กระเปาะรังไข่ เกสรตัวผู้มีมากเบียดชิดติดกันบนแกนที่บวมเป็นกระเปาะคล้ายกระดุม ก้านเกสรสั้นมาก หรือมองไม่เห็นเลย ทั้งหมดจะอยู่ใต้กระพุ้งของกลีบดอก อับเรณูมี 2 ลอน ปลายเป็นจงอยและแตกออกตามยาว รังไข่มีเป็นจำนวนมาก หายากที่มีดอกเดี่ยว ๆ ในรังไข่หนึ่งอันมีช่องเดียวหรือหลายช่อง แต่ละช่องจะมีไข่อ่อนหนึ่งหรือมากกว่าซึ่งติดอยู่ตรงก้นรังไข่ ท่อรังไข่มักสั้นหรือไม่มีเลย ผลมักมีก้านเห็นชัดและเกาะเป็นกลุ่มหรือเป็นหวี คล้ายผลกล้วยอยู่บนแกนอันเดียวกัน เมล็ดมักมีเยื่อหุ้ม

ลักษณะเด่นของพืชวงศ์นี้คือ ดอกจะเรียงเป็นชั้น ๆ ชั้นละ 3 กลีบ ใบและเปลือกเมื่อขยี้จะมีกลิ่นเหม็นเขียว เปลือกชั้นในลอกออกได้เป็นชั้น ๆ เนื้อบางเป็นร่างแห กิ่งหรือเนื้อไม้ถ้าตัดตามขวางจะเห็นเส้นรัศมีจากแกนกลางไปถึงเปลือกชัดเจน (วัชรี สีห์ชำนาญธุระกิจ, 2539)

Annonaceae เป็นพืชวงศ์ที่มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วย 120 สกุลและมีมากกว่า 2,000 ชนิด แต่มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยทั้งทางด้านอนุกรมวิธาน, เคมี และเภสัชวิทยา เพียง 41 สกุล 150 ชนิดเท่านั้น พืชวงศ์นี้พบในพื้นที่เขตร้อน หรือค่อนข้างร้อน

ในปี ค.ศ.1969 Takhtajan (Leboeuf *et al.*, 1982) ได้ทำการสำรวจและรวบรวมพืชวงศ์นี้ที่พบในแต่ละเขตของโลกคือ ในแถบเอเชีย และหมู่เกาะในมหาสมุทร แปซิฟิกภาคกลางและใต้ พบเพียง 50 สกุล 950 ชนิด ทวีปแอฟริกา และมาดากัสคาร์ พบ 40 สกุล 450 ชนิด และในทวีปอเมริกา พบ 38 สกุล 740 ชนิด ดังนั้นจากสกุลและชนิดของพืชในแต่ละเขตที่รวบรวมมานี้ จะเห็นว่าพื้นที่ในเขตเอเชีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิกภาคกลางและใต้เป็นศูนย์กลางของพืชวงศ์นี้ Takhtajan ได้แสดงทรรศนะว่าพื้นที่บริเวณดังกล่าวเป็นต้นกำเนิดของพืชวงศ์ Annonaceae

เนื่องจากพืชวงศ์ Annonaceae เป็นแหล่งขององค์ประกอบทางเคมี (Chemical constituent) มากมายหลายชนิด ทั้งที่เป็นสารประกอบ Alkaloids และ Non-alkaloids สารประกอบบางตัวนั้นมีความสำคัญในการแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพ (Biological activity) เช่น แสดงคุณสมบัติการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) (Hufford and Lasswell, 1978) การต่อต้านเชื้อรา (Antifungal activity) (Leboeuf *et al.*, 1982) การ

ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity) และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (Antitumor activity) (Leboeuf *et al.*, 1982) ทำให้นักเคมี และ นักเภสัชวิทยาเกิดความสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติทางชีวภาพของสารประกอบเหล่านี้

Uvaria purpurea Bl. เป็นชื่อทางพฤกษศาสตร์ มีชื่อไทยพื้นเมืองว่า กล้วยหมูสัง ย่านนมควาย เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Annonaceae

กล้วยหมูสังมีลักษณะเป็นไม้เลื้อยดูเป็นไม้พุ่ม กิ่งอ่อนมีขนรูปที่ดาวสีน้ำตาล แผ่นใบสีเขียวเข้มปลายใบสีเขียวอ่อน ๆ แผ่นใบเรียบยกเว้นเส้นกลางใบด้านล่างเส้นกลางใบจะมีสีอ่อนกว่า และมีขนรูปที่ดาวแน่นหนา รูปที่ร่างใบมีลักษณะรูปที่ขนาน-รูปที่ใบหอก ถึงรูปที่รี-ขอบขนาน บางครั้งดูคล้ายรูปที่ไข่กลับ ปลายใบแหลมหรือเรียวแหลม โคนใบมน และค่อนข้างเป็นรูปที่หัวใจ เส้นใบหลักมี 14-17 คู่ ด้านบนจะมองเห็นเส้นใบไม่ชัด แต่ด้านล่างจะมองเห็นเป็นเส้นนูนขึ้นค่อนข้างตรง เส้นใบสานกันเป็นร่างแหเห็นได้ชัดทั้ง 2 ด้าน ใบมีความยาว 11-23 เซนติเมตร บางครั้งอาจยาวถึง 28 เซนติเมตร มีความกว้าง 6-9.5 เซนติเมตร ก้านใบยาว 3-7 มิลลิเมตร มีขนสั้น ๆ ลักษณะดอกเป็นดอกเดี่ยว เมื่อบานมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5-10.5 เซนติเมตร มีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย ดอกจะออกตรงข้ามกับใบ ใบประดับมีรูปที่ร่างคล้ายใบมีขนสั้น ๆ ใบประดับมี 2 ใบ คือ ใบหนึ่งอยู่ที่ฐานรองดอก อีกใบอยู่ด้านบน ก้านดอกยาว 5 มิลลิเมตร ก้านดอกย่อยยาว 2-3.8 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงยาว 2-2.5 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายแผ่นกระดาษ สีเขียวแกมเหลืองหรือสีเขียวแกมน้ำตาล รูปที่ร่างคล้ายสามเหลี่ยมเว้าเล็กน้อย ด้านนอกมีขนสั้น ๆ ส่วนด้านในเรียบ กลีบดอกยาว 3.5-4 เซนติเมตร สีแดงเข้มเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีม่วง โคนกลีบดอกมีสีชีดทั้งสองด้าน รูปที่ร่างของกลีบดอกเป็นรูปที่ขอบขนาน-ไข่กลับ ปลายกลีบเรียบมนไม่ม้วน ในกลีบดอกมีเส้นท่อลำเลียงภายใน เกสรตัวผู้จำนวนมากยาว 7 มิลลิเมตร และไม่เป็นหมัน มีสีเหลืองอ่อน มีเนื้อเยื่อที่เชื่อมระหว่างอับเรณู 2 อัน รังไข่มีความยาว 7 มิลลิเมตร จะสุกก่อนเกสรตัวผู้ เมื่อเกสรตัวผู้แก่สีเหลืองอ่อนจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ส่วนฐานรองดอกเป็นครึ่งวงกลมมีขนปกคลุม carple ที่สุกจะยาว 4-5 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นรูปที่ทรงกระบอกปลายมนมีร่องตามยาวและมีขนปกคลุม ก้านของ carple ยาว 1.3-2.5 เซนติเมตร มีขนปกคลุม เมล็ดจะแบน มีสีน้ำตาลอ่อน

ก

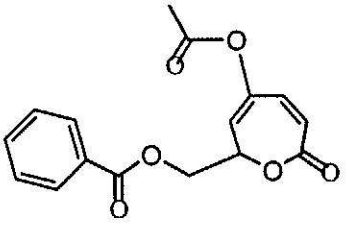
ข

รูปที่ 1 กล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Blume.) ก.ดอกและใบ ข.ผล

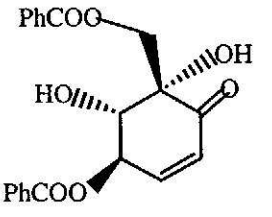
สารประกอบทางเคมีบางส่วนที่พบในพืชสกุล Uvaria พร้อมทั้งฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงสกุล ส่วนของพืชที่นำมาสกัด สารเคมีที่พบ และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Uvaria*

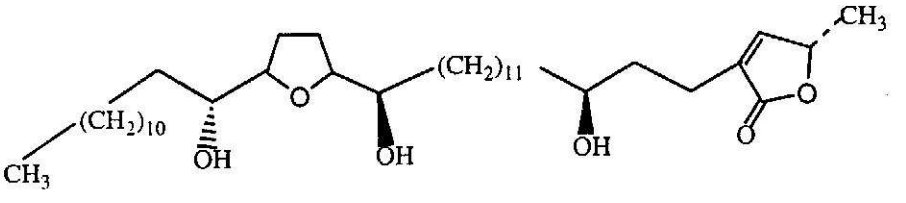
สกุล	ส่วนพืชที่นำมาสกัด	สารเคมีที่พบ	ฤทธิ์ทางชีวภาพ
Uvaria klaineana	กิ่ง	klaivanolide	Antileishmanial activity (Akendengue *et al.*, 2002)
Uvaria tonkinesis	ราก	Tonkinecin	Cytotoxic to human tumour cell , HCT8, HL60 (Chen *et al.*, 1996)
Uvaria hamiltonii Hook.	ใบและกิ่ง	hamiltrone	DNA strand –scission activity (Huang *et al.*, 1998)
Uvaria sp. (Panda)	เปลือกรากและเปลือกกิ่ง	uvaretin	Antimalarial activity (Nkunya *et al.* 1991)
Uvaria pandensis Verdc.	เปลือกราก	3-farnesylindole	Antimalarial activity (Nkunya *et al.* 1991)
Uvaria pauci-ovulata	เปลือกต้น	squamocin	Acaricidal activity (Raynaud *et al.* 2000)
Uvaria chamae	เปลือกต้น	uvarinol	Cytotoxicity against KB and PS cells, antimicrobial activity (Hufford *et al.* 1979)
Uvaria grandiflora	ใบและกิ่ง	zeylenone	Nucleoside transport inhibitor (Liao *et al.* 1997)



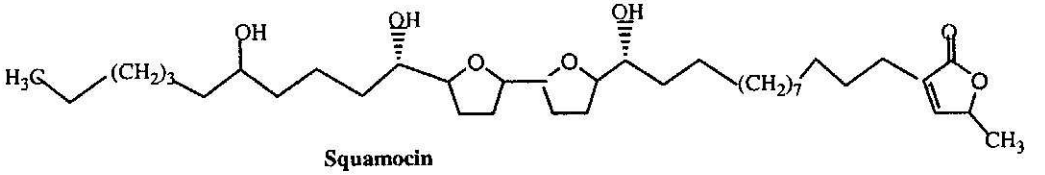
Klaivanolide



Zeylenone

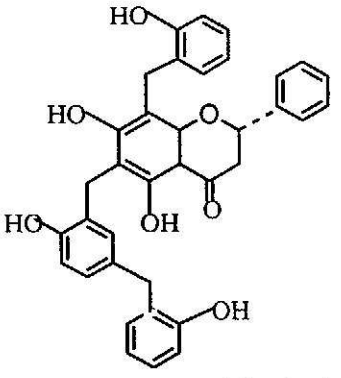


Tonkinecin

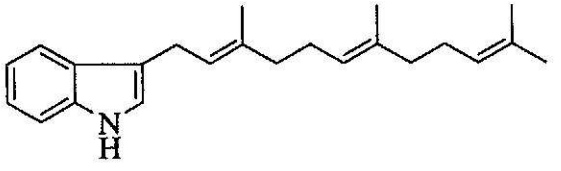


Squamocin

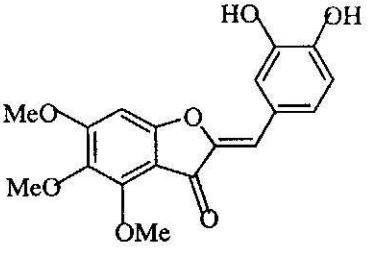
รูปที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารที่สกัดได้จากพืชสกุล *Uvaria* ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากตารางที่ 1



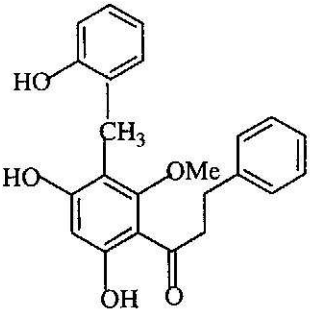
Uvarinol



3-Farnesylindole



Hamiltrone



Uvaretin

รูปที่ 2 (ต่อ) แสดงโครงสร้างของสารที่สกัดได้จากพืชสกุล *Uvaria* ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากตารางที่ 1

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

จุดหลอมเหลวของสารวัดด้วยเครื่อง Electrothermal melting point ใช้หน่วยเป็นองศาเซลเซียส (^{o}ซ)

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม (Ultraviolet spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง UV-160A spectrophotometer (SHIMADZU) ใช้หน่วยความยาวคลื่นเป็น นาโนเมตร (nanometer,nm) และใช้ λ_{max} แทนค่าความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงไว้มากที่สุด โดยใช้เมธานอลเป็นตัวทำละลาย

อินฟราเรดสเปกตรัม (Infrared spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer IR 783 และ Perkin-Elmer FT-IR 783 โดยใช้ $CHCl_3$ และ KBr มีหน่วยเป็น wave number (cm^{-1}) การดูดกลืนแสงที่ได้แสดงลักษณะเป็น s (strong) และ br (broad)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (Nuclear Magnetic Resonance spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง JEOL-PMx60 spectrometer ที่ 60 MHz และ FT-NMR 500 MHz Varian UNITY INOVA โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง บอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วยสัญญาณของ chemical shift parameter, δ (ppm) และใช้สัญญาณ *s* (singlet), *br* (broad), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quartet), และ *m* (multiplet)

แมสสเปกตรัม (Mass spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง LCT-ESI Micromass spectrometer

วิธีดำเนินการ

การแยก pipoxide ให้บริสุทธิ์จากใบกล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Bl.)

ใบกล้วยหมูสังรวบรวมจากเกาะโคบ เขตจังหวัดพัทลุง จำแนกสกุล และชนิดโดย ศ.ดร.พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ ภาควิชาชีววิทยา แล้วนำมาทำให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ (3.20 กิโลกรัม) และสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนด้วยวิธีสกัดเย็น (cold extraction) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำเอาส่วนที่สกัดได้ไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้เครื่องลดความดัน จะมีของแข็งเกิดขึ้น จึงนำมากรองแยกส่วนที่เป็นของแข็งออก ล้างด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจะได้ของแข็งสีเหลือง (4.50 กรัม) และสารละลาย นำส่วนของสารละลายที่กรองได้มาระเหยเฮกเซนออกภายใต้การลดความดัน จะได้ของผสมหนืดสีเขียวคล้ำ (20.92 กรัม)

นำส่วนของแข็ง (4.50 กรัม) มาแยกคลอโรฟิลล์ออกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วย 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน และรองรับสารแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 30 มิลลิลิตร จากนั้นรวมสารละลายที่ปราศจากคลอโรฟิลล์เข้าไว้ด้วยกัน นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก จะได้เป็นของแข็งสีเหลืองนวล (4.30 กรัม) นำของแข็งดังกล่าวมาตกผลึกซ้ำ

โดยใช้คลอโรฟอร์ม-เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย จะได้ผลึกสีขาว (4.00 กรัม) นำส่วนของผลึกมาทำ Flash คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวชะด้วยเอธิลอะซิเตทจนกระทั่งถึง 15 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน รองรับสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทรกราฟีแผ่นบาง ในตัวเคลื่อนที่ 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน รวมสารที่มีการเคลื่อนตัวเท่ากันไว้ด้วยกัน สามารถแยกสารได้ 3 ส่วน

<u>ส่วนที่ 1</u> เป็นของแข็งสีขาว (3.00 กรัม คิดเป็น 0.10 %) จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซสเปกตรัม ตรงกับสารประกอบ (+) pipoxide (Joshi *et al.*, 1979)

<u>ส่วนที่ 2</u> เป็นของแข็งสีขาว (0.80 กรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง สารส่วนที่ 2 เป็นสารผสมระหว่าง สารส่วนที่ 1 และ ส่วนที่ 3

<u>ส่วนที่ 3</u> เป็นของแข็งสีขาว (0.05 กรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง จะแสดงผลเป็นจุดเดียว มองเห็นจากเครื่องให้แสง UV แต่จะมองเห็นเป็น 2 จุด เมื่อตรวจสอบกับโครมาโทกราฟีแผ่นบางชนิด RP-18 ในตัวเคลื่อนที่ 20 % น้ำในเมธานอล จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางชนิด RP-18 จะได้ของแข็งสีขาว (22 มิลลิกรัม) ของ purpoxide

<u>สารประกอบ (+)-pipoxide</u>

เป็นของแข็งสีขาว แสดงค่าสเปซิฟิกโรเตชัน $[\alpha]^{28}_{D}$ +50° ในคลอโรฟอร์ม เข้มข้น $4x10^{-2}$ g/cm^{-3} ค่าคงที่ของการเคลื่อนตัว (R_f) 0.15 (20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน) มีจุดหลอมเหลว 153-154 °ซ โดยมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ดังต่อไปนี้

UV (EtOH) λ_{max}(nm)	: 230 (ε 22,146.5) 204 (ε 15,502.7) และ 274	
(รูปที่ 5)	(ε 1,698.47)	
IR (KBr)	: 3,400 (broad, OH stretching) 2,000-1,900 (overtone	
(รูปที่ 6)	band) 1720 (C=O stretching) 1600 (C=C stretching) 750 และ 705 (C-H bending)	
^{1}H NMR ($CDCl_3$)	: 3.17	(-OH, *d*, *J* = 6 Hz)
δ 500 MHz	: 3.60	(1H-6, *dd*, *J* = 4 และ 2 Hz)
(รูปที่ 8)	: 4.33	(1H-2, *dd*, *J* = 8 และ 6 Hz)
	: 4.48 และ 5.00	(2H-7 AB system, *d*, *J* = 12.5 Hz)
	: 5.67	(1H-3, *ddd*, *J* = 8, 3 และ 2 Hz)
	: 5.91	(1H-4, *ddd*, *J* = 10, 3 และ 2 Hz)
	: 6.10	(1H-5, *ddd*, *J* = 10, 4 และ 3 Hz)
	: 7.45	(4H-*m*-Ar, *m*)

	: 7.58	(2H-*p*-Ar, *m*)
	: 8.06	(4H-o-Ar, *m*)
^{13}C NMR ($CDCl_3$)	: 59.494	(C_1)
δ 125 MHz	: 54.198	(C_6)
(รูปที่ 9)	: 71.057	(C_2)
	: 62.909	(C_7)
	: 74.818	(C_3)
	: 132.957	(C_4)
	: 124.729	(C_5)
	: 128.474	($2C_{mAr}$)
	: 128.434	($2C_{mAr}$)
	: 133.445	(C_{pAr}) ,
	: 133.383	(C_{pAr})
	: 129.843	($2C_{oAr}$)
	: 129.775	($2C_{oAr}$)
ESI- MS (m/z)	: 367 [M^++1]	
(รูปที่ 7)		

บทที่ 3

วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

การแยก pipoxide ให้บริสุทธิ์จากใบกล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Bl.)

การแยกสารประกอบ pipoxide และสารองค์ประกอบรองบางตัวที่อยู่ในส่วนสกัดเฮกเซนจากใบกล้วยหมูสัง (*Uvaria purpurea* Bl.) อาศัยขบวนการแยกสารทางกายภาพ เริ่มจากการระเหยเฮกเซนที่เป็นส่วนสกัดเย็นให้แห้ง จะมีของแข็งผสมอยู่กับของเหลวหนืด แยกของแข็งออกด้วยการกรองและล้างด้วยเฮกเซน นำของแข็งที่ได้มาแยกคลอโรฟิลล์ออกโดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วย 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้เครื่องลดความดัน จะได้ของแข็งสีเหลือง จากนั้นตกผลึกของแข็งสีเหลืองดังกล่าวโดยใช้คลอโรฟอร์ม-เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ได้ผลึกสีขาว นำผลึกสีขาวที่ได้มาละลายในคลอโรฟอร์มแล้วทดสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางใช้ตัวเคลื่อนที่ 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน แสดงผลเป็น 2 จุด ซึ่งมีค่าคงที่ในการเคลื่อนตัว (R_f) ใกล้เคียงกัน (0.15 และ 0.13) จึงนำของของแข็งสีขาวนั้นมาทำ Flash คอลัมน์โครมาโทกราฟี ค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวชะที่ใช้ เริ่มจากเฮกเซนจนกระทั่งถึง 15 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน แยกสารได้ 3 ส่วน ส่วนที่ 1 (TAN1-001A) แสดงผลกับโครมาโทกราฟีแผ่นบางเป็น 1 จุด ส่วนที่ 2 แสดงผลเป็น 2 จุด และส่วนที่ 3 แสดงผลเป็น 1 จุด ในตัวเคลื่อนที่ 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน นอกจากนั้นส่วนที่ 3 ยังแสดงผลเป็น 2 จุด กับโครมาโทกราฟีแผ่นบางชนิด RP-18 ในตัวเคลื่อนที่ 20 % น้ำในเมธานอล นำของผสมส่วนที่ 3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแผ่นบาง RP-18 ในตัวเคลื่อนที่ 20 % น้ำในเมธานอล สามารถแยกสารได้ 2 สาร (TAN1-001B และ TAN1-001C) ในการแยกของผสมส่วนที่ 3 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ต้องเจือจางสารให้พอเหมาะ มิฉะนั้นของผสมจะเกิดการตกตะกอนกลายเป็นของแข็งขึ้นมาบนตัวอยู่กับที่ทั้งโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์ หรือแผ่นบาง ทำให้เกิดปัญหาในการแยกสาร นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่มนี้ไม่เสถียร และมักเกิดการสลายตัวในขณะที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี สารประกอบทั้ง 3 เป็นสารประกอบจำพวก cyclohexene oxides สามารถระบุโครงสร้างได้ 2 สาร คือ TAN1-001A และ TAN1-001C ส่วน TAN1-001B ไม่สามารถระบุโครงสร้างที่แน่นอนได้ เนื่องจากจะสลายตัวง่ายที่อุณหภูมิห้อง จากการวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร TAN1-001A โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H NMR ค่าสเปซิฟิกโรเตชัน และจุดหลอมเหลวกับสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว (Joshi *et al.*, 1979) พบว่าเป็นสารประกอบ pipoxide

การวิเคราะห์หาโครงสร้างของ TAN1-001A

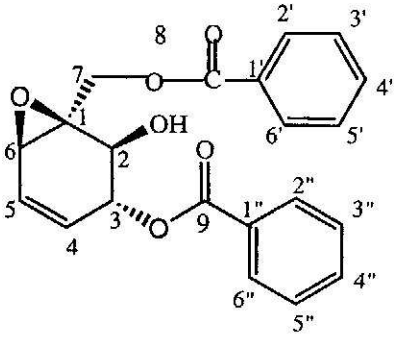
TAN1-001A เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลว 153-154 °ซ แสดงค่าสเปซิฟิกโรเตชัน ($[\alpha]^{28}_D$) +50 ° ในตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เข้มข้น $4x10^{-2}$ g/cm^{-3} และมีค่าคงที่ของการเคลื่อนตัว (R_f) 0.15 ในตัวเคลื่อนที่ 20 % เอธิลอะซิเตทในเฮกเซน

UV สเปกตรัม (รูปที่ 5) แสดงแถบการดูดกลืน (λ_{max}) ที่ 274, 230 และ 204 ซึ่งแสดงว่า TAN1-001A มีพันธะคู่ที่คอนจุเกตกัน

IR สเปกตรัม (รูปที่ 6) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ 3,400 (broad OH stretching) 2,000-1,900 (overtone band) 1720 (C=O stretching) 1,600 (C=C stretching) 750 และ 705 (C-H bending) แสดงว่ามีหมู่ฟังก์ชันต่อไปนี้ ไฮดรอกซิล วงแหวนอะโรเมติกที่มีหมู่แทนที่ 1 หมู่ และคาร์บอนิลของอะโรเมติกเอสเทอร์ แถบการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิลสามารถยืนยันเพิ่มเติมได้จาก ^{13}C NMR ซึ่งแสดงสัญญาณของคาร์บอนิลคาร์บอนที่ δ 166.20 และ δ 166.87

ESI- MS สเปกตรัม (รูปที่ 7) แสดงมวลเป็น 367.4 (M^++1) ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{18}O_6$

^{1}H NMR สเปกตรัม (รูปที่ 8) แสดงค่า chemical shift และค่าคงที่ของการคู่ควบ (ตารางที่ 2) สามารถจำแนกโปรตอนที่ปรากฏดังนี้ ไฮดรอกซิลโปรตอน ที่ δ 3.17 (1H,*d*, *J*=6 Hz) olefinic methine protons จำนวน 2 โปรตอน เป็นโปรตอนในตำแหน่งที่ 4, 5 สัญญาณปรากฏที่ δ 5.91 (*ddd*, *J* = 10, 3 และ 2 Hz) และ δ 6.10 (*ddd*, *J* = 10, 4 และ 2 Hz) ตามลำดับ ค่าคงที่การคู่ควบของโปรตอนทั้งสองแสดงค่า 10 Hz ชี้ให้เห็นว่าโปรตอนทั้งสองอยู่ในลักษณะที่เป็น *cis*- กัน epoxy methine proton 1 โปรตอน (H-6) ปรากฏที่ δ 3.60 (*dd*, *J* = 4 และ 2 Hz) methine protons 2 โปรตอน (H-2 และ H-3) ปรากฏที่ δ 4.33 (*dd*, *J* = 8 และ 6 Hz) และ δ 5.67 (*ddd*, *J* = 8, 3 และ 2 Hz) และ methine protons บนวงแหวนอะโรเมติกเบนซินปรากฏที่ δ 7.45-8.06 (*m*) อัตราส่วนของเส้น integration วัดได้ 10 โปรตอน แสดงว่ามีวงแหวนเบนซินอยู่ด้วยกัน 2 วง ปรากฏที่ δ 7.45 (4H, m, H-3', H-5', H-3" and H-5"), 7.58 (2H, *m*, H-4' and H-4") and 8.06 (4H, *m*, H-2', H-6', H-2" and H-6") prochiral methylene protons 2 โปรตอน (2H-7) ปรากฏที่ δ4.48 (*d*, AB system, *J* = 12 Hz) และ 5.00 (*d*, AB system, *J* = 12 Hz) (ดูตารางที่ 2)



รูปที่ 3 โครงสร้างของสารประกอบ pipoxide (TAN1-001A)

^{13}C NMR สเปกตรัม (รูปที่ 9) (ตารางที่ 2) แสดงจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 21 คาร์บอน ข้อมูล DEPT (รูปที่ 9) ชี้ว่ามี quaternary คาร์บอน 5 คาร์บอน ซึ่งเป็น sp^3 คาร์บอน 1 คาร์บอน sp^2 คาร์บอน 4 คาร์บอน (แบ่งเป็นคาร์บอนิลคาร์บอน 2 คาร์บอน และคาร์บอน sp^2 2 คาร์บอน) ซึ่งปรากฏที่ δ 59.49, 166.87, 166.20, 129.44 และ 129.40 ตามลำดับ methine คาร์บอน 15 คาร์บอน แบ่งเป็น sp^3 คาร์บอน 3 คาร์บอน ปรากฏที่ δ

74.82, 71.06 และ 54.20 และ sp^2 คาร์บอน 12 คาร์บอน ปรากฏที่ δ 133.44, 133.38, 132.96, 129.84, 129.78, 128.47, 128.43, และ 124.73 และ methylene คาร์บอน 1 คาร์บอน เป็นแบบ sp^3 ปรากฏที่ δ 62.91

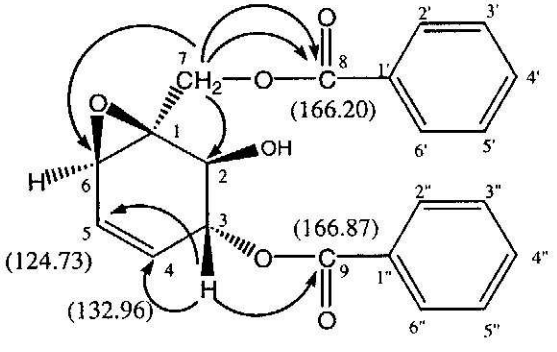
ข้อมูล HMBC (รูปที่ 11) แสดงว่า โปรตอนที่ตำแหน่ง 3 มีความสัมพันธ์กับ C-5 (δ 124.73), C-4 (δ 132.96), และ C-9 (δ 166.87) ซึ่งยืนยันว่า benzoyl group ต่อกับคาร์บอนที่ C-3 (δ 74.82) โปรตอนที่ตำแหน่ง 7 (δ 4.48 และ 5.00) มีความสัมพันธ์กับ C-6 (δ 54.20), C-2 (δ 71.06), และ C-8 (δ 166.20) ซึ่งยืนยันว่า benzoate group ต่อกับคาร์บอนที่ C-7 (δ 62.91) (ดูตารางที่ 2)

นอกจากนั้นการเปรียบเทียบค่าสัญญาณโปรตอนของ TAN1-001A กับค่าสัญญาณโปรตอนของสาร pipoxide จากเอกสารอ้างอิง (Joshi *et al.*, 1979) แสดงค่าที่ใกล้เคียงกัน (ดูตารางที่ 3) ข้อมูลทั้งหมดยืนยันว่าสาร TAN1-001A ที่สกัดได้จากใบกล้วยหมูสัง เป็นสาร pipoxide

สรุปผลการทดลอง

แยกสารประกอบ pipoxide ได้จากส่วนสกัดเฮกเซนจากใบกล้วยหมูสัง โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ยืนยันโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี UV, IR, ESI-MS, ^{1}H NMR ทั้ง 1 D และ 2D รวมทั้ง ^{13}C NMR ตลอดจนเปรียบเทียบข้อมูล ^{1}H NMR กับข้อมูลที่รายงานแล้ว ใบกล้วยหมูสังแห้ง 3.20 กิโลกรัม นำมาแยกแล้วได้สารประกอบ pipoxide บริสุทธิ์ 3.0 กรัม คิดเป็น 0.10 เปอร์เซ็นต์

ส่งสารประกอบ pipoxide ไปทดสอบผลทางสรีรวิทยาต่อไป



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนกับคาร์บอนบางส่วนจากข้อมูล 2D HMBC

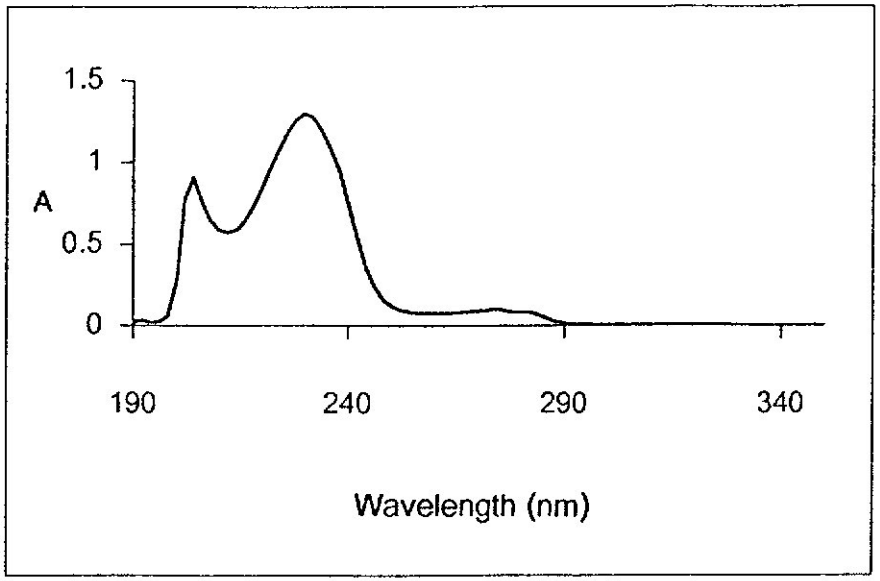
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^{1}H NMR ^{13}C NMR และ 2D HMBC ของสาร TAN1-001A

ตำแหน่งคาร์บอน	δ_C (ppm)	δ_H (ลักษณะการแยก ค่าคงที่ของการคู่ควบ. J, Hz)	HMBC
1	59.49 (C)	-	
2	71.06 (CH)	4.33 (dd, *J* = 8 และ 6 Hz)	C-3, C-7
3	74.82 (CH)	5.67 (*ddd*, *J* = 8, 3 และ 2 Hz)	C-1, C-2, C-4, C-5,C-9
4	132.96 (CH)	5.91 (*ddd*, *J* =10,3 และ 2 Hz)	C-2, C-5, C-6
5	124.73 (CH)	6.10 (*ddd*, *J* =10, 4 และ 2 Hz)	C-3, C-4, C-6
6	54.20 (CH)	3.60 (*dd*, *J* = 4 และ 2 Hz)	C-1, C-4, C-5, C-7
7	62.91 (CH_2)	4.48 และ 5.00 (*d*, *J* = 12 Hz)	C-1, C-2, C-6, C-8
8	166.20 (C=O)	-	-
9	166.87 (C=O)	-	-
1' *	129.40 (C)	-	-
2', 6' **	129.78 (CH)	8.06 (m)	C-8
3', 5' ***	128.43 (CH)	7.45 (m)	-
4' ****	133.38 (CH)	7.58 (m)	-
1" *	129.44 (C)	-	-
2", 6" **	129.84 (CH)	8.06 (m)	C-9
3", 5" ***	128.47 (CH)	7.45 (m)	-
4" ****	133.44 (CH)	7.58 (m)	-
OH	-	3.17 (*d*, *J* = 6 Hz)	C-1, C-2, C-3

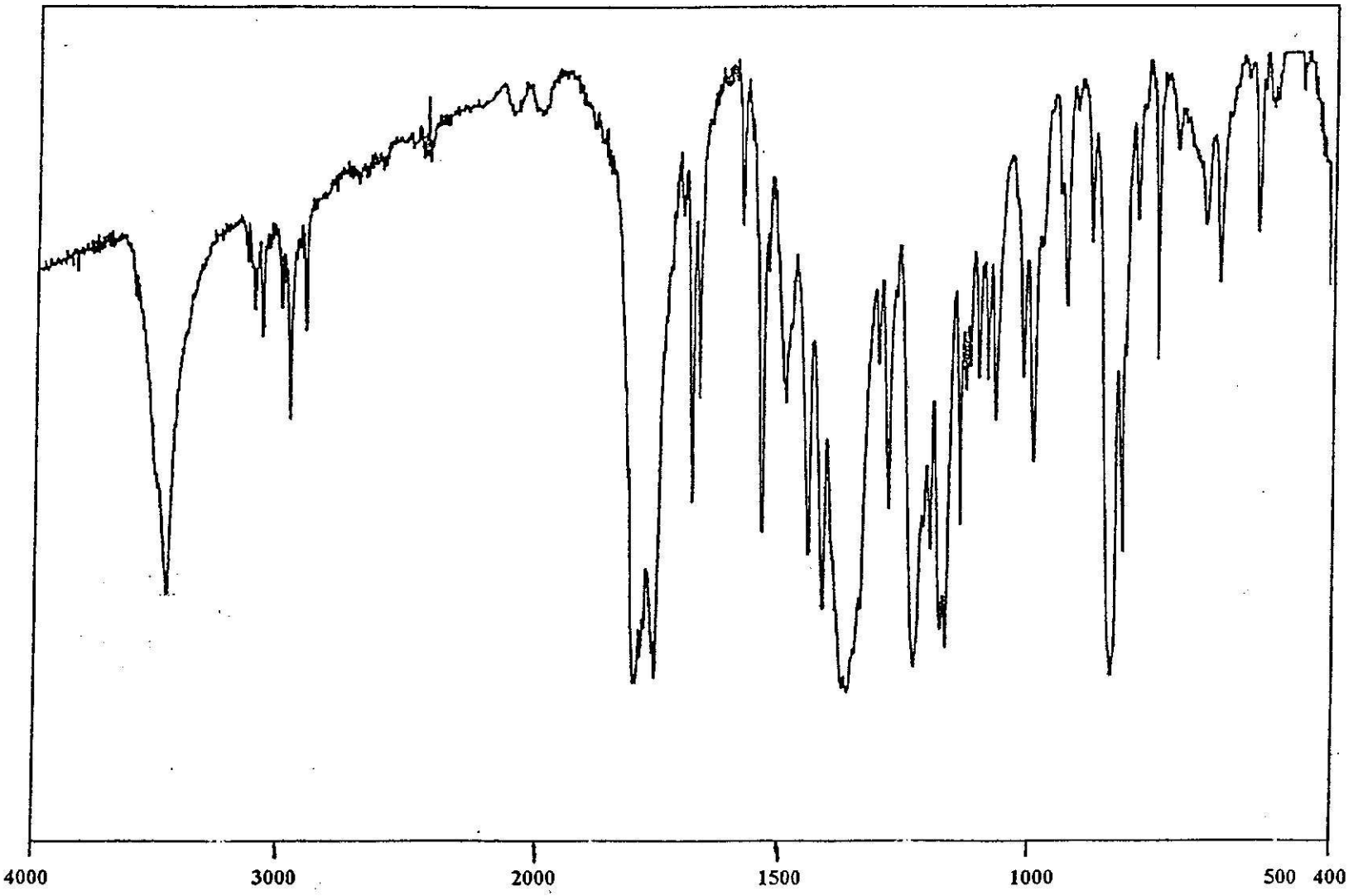
*, **, ***, **** ข้อมูลอาจสลับที่กันได้

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^{1}H NMR สเปกตรัมของ TAN1-001A (500 MHz) เปรียบเทียบกับ pipoxide (100 MHz) จากเอกสารอ้างอิง (Joshi *et al.*, 1979,)

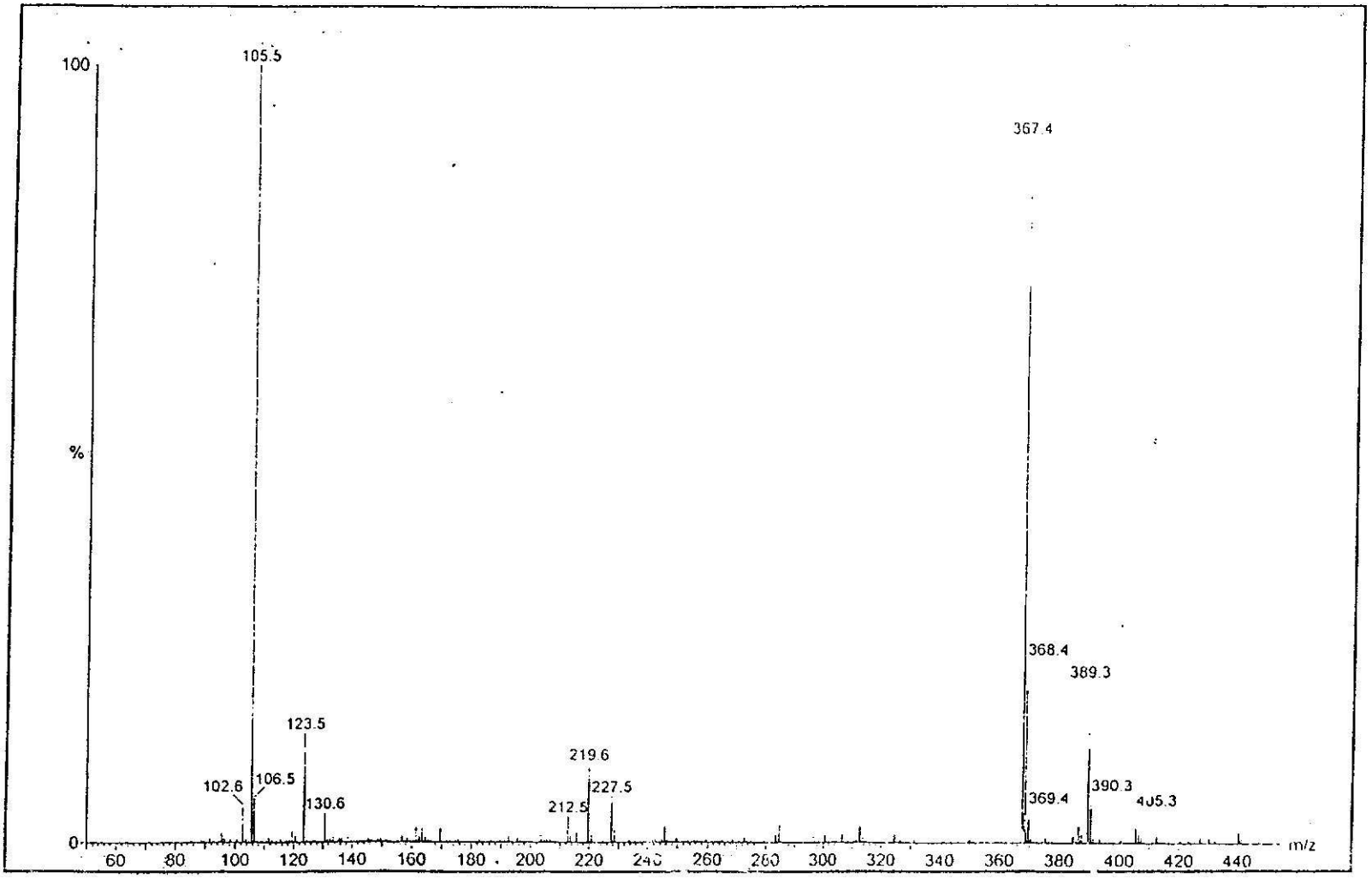
ตำแหน่งโปรตอน	δ_H (ppm) และค่าคงที่ของการคู่ควบ (*J*) Hz	
	TAN1-001A	pipoxide (อ้างอิง)
2	4.33 (*dd*, *J* = 8 และ 6 Hz)	4.32 (*dd*, *J* = 8 และ 6 Hz)
3	5.67 (*ddd*, *J* = 8, 3 และ 2 Hz)	5.68 (*dt*, *J* = 8, 2.5 และ 2 Hz)
4	5.91 (*ddd*, *J* = 10, 3 และ 2 Hz)	5.90 (*dt*, *J* = 10, 2 และ 1.75 Hz)
5	6.10 (*ddd*, *J* = 10, 4 และ 2 Hz)	6.10(*ddd*, *J* = 10, 3.75 และ 2.5 Hz)
6	3.60 (*dd*, *J* = 4 และ 2 Hz)	3.60 (*dd*, *J* = 3.75 และ 1.75 Hz)
7	4.48 และ 5.00 (*d*, *J* = 12 Hz)	4.48 และ 5.10 (*AB*, *J* = 12 Hz)
aromatic protons	7.45 - 8.06 (*m*)	7.3 - 8.1 (*m*)
OH	3.17 (*d*, *J* = 6 Hz)	3.24 (*d*, *J* = 6 Hz)



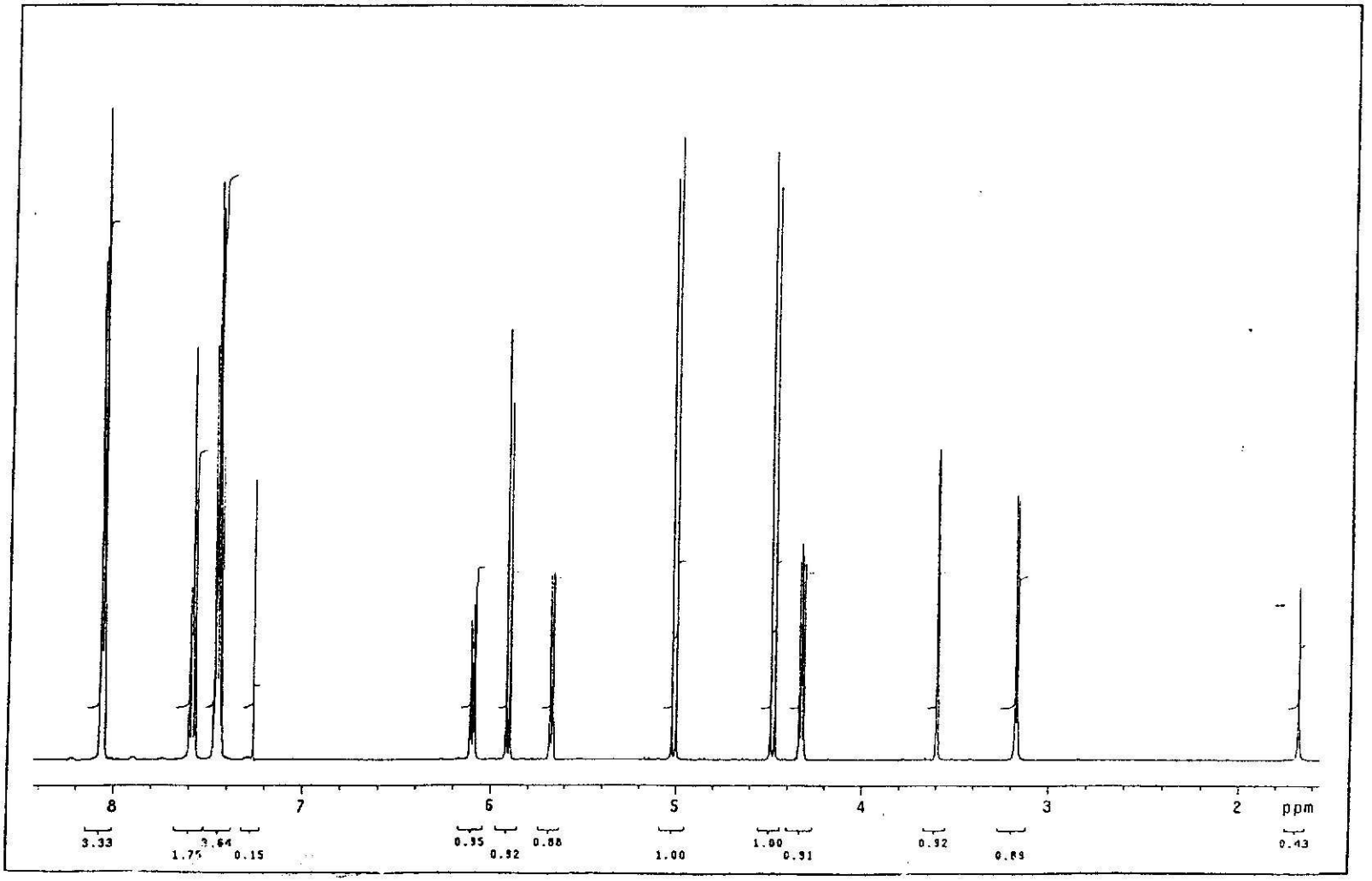
รูปที่ 5 แสดง UV spectrum (EtOH)



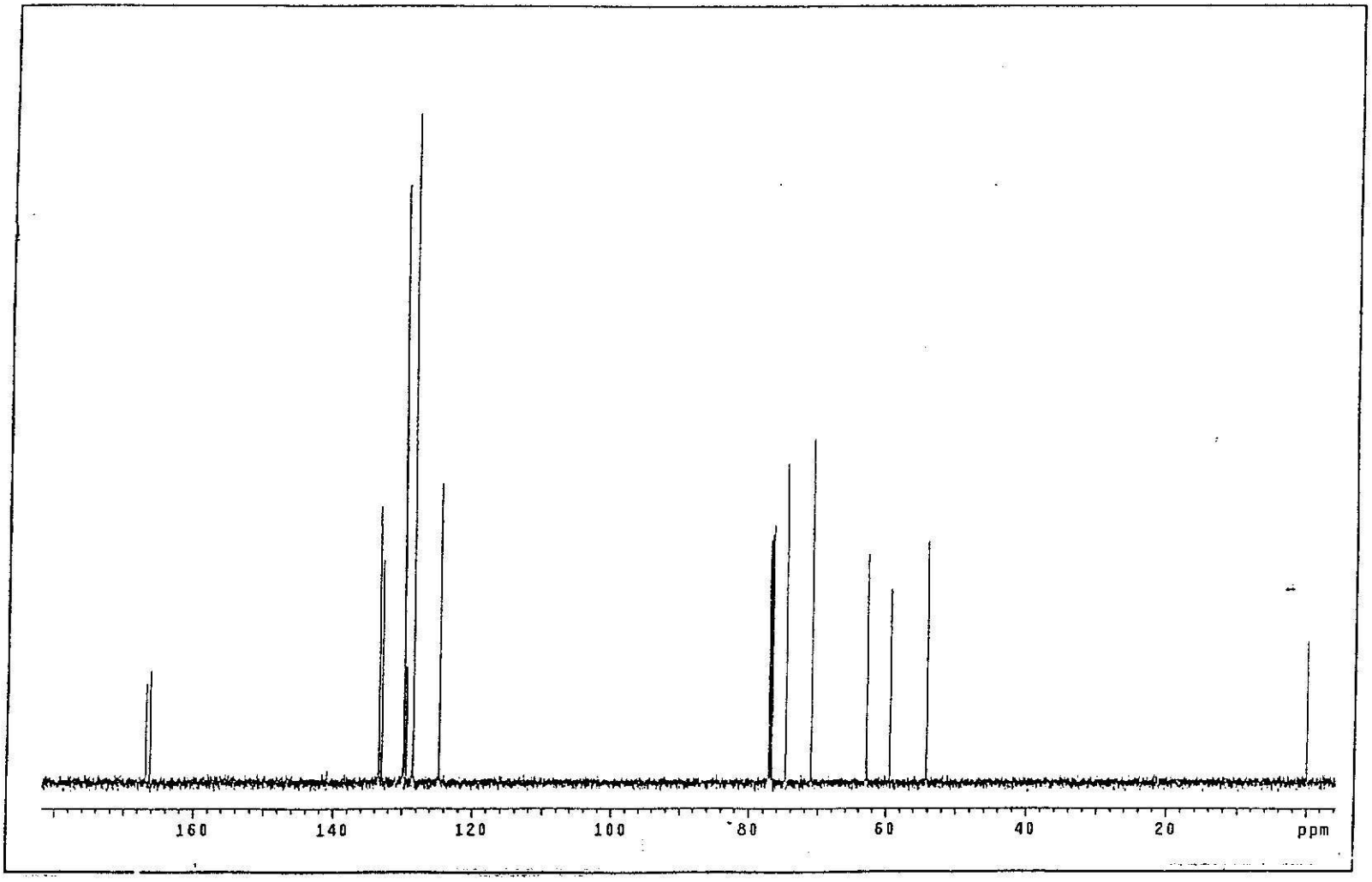
รูปที่ 6 แสดง IR spectrum (KBr)



รูปที่ 7 แสดง ESI-MS spectrum

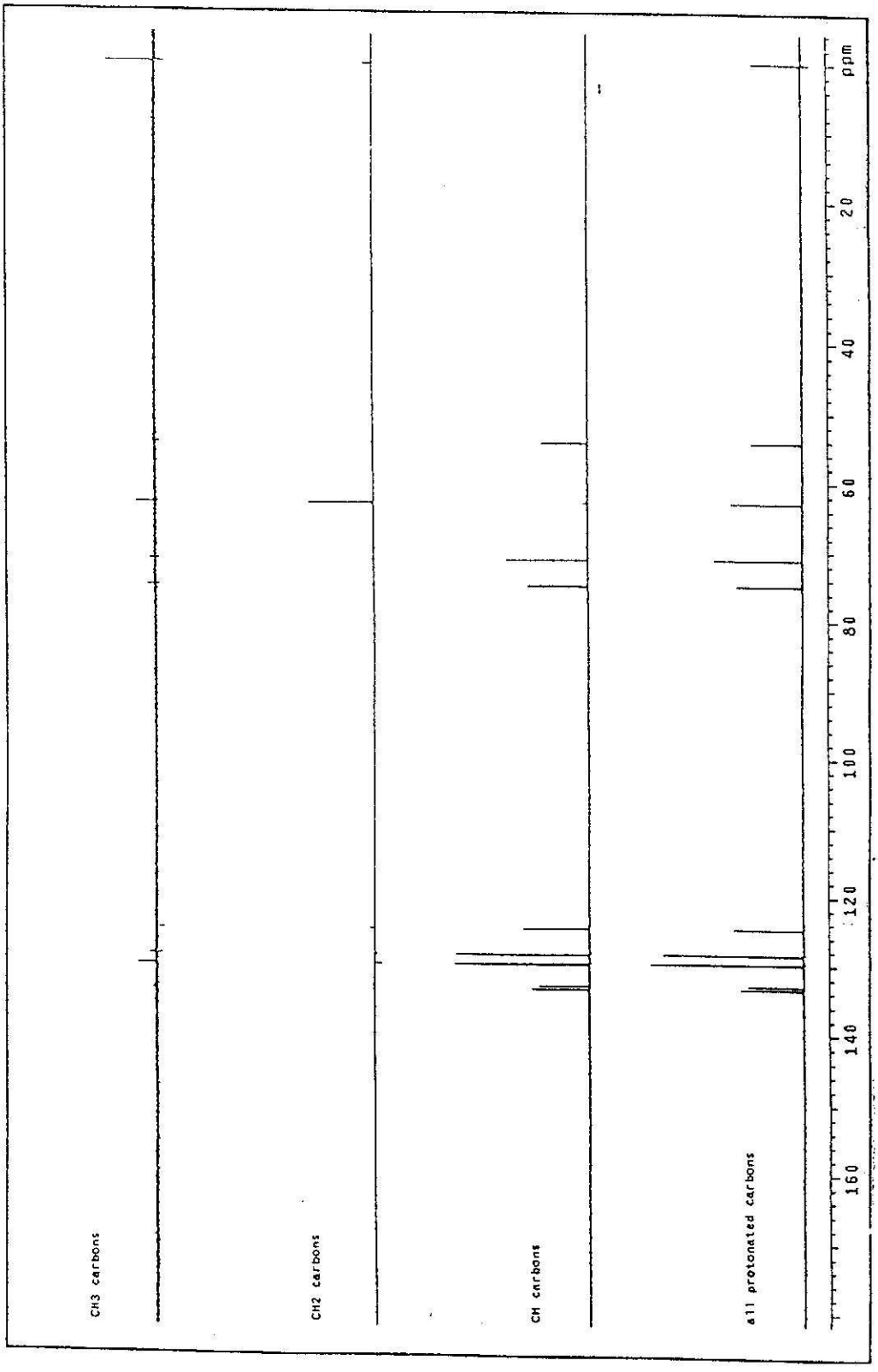


รูปที่ 8 แสดง ^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$) 500 MHz

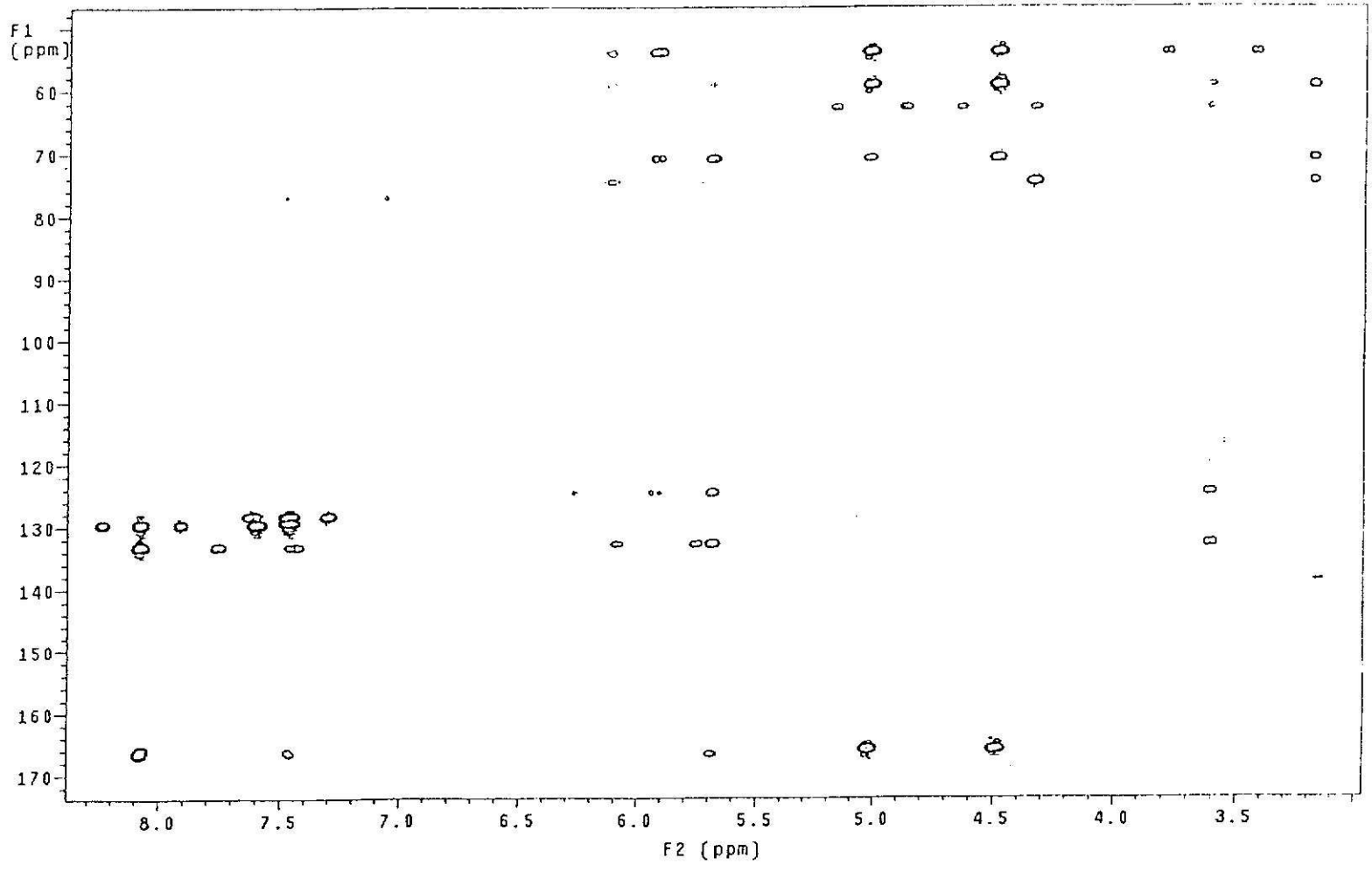


รูปที่ 9 แสดง ^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$) 125 MHz

Central Library
Prince of Songkla University



รูปที่ 10 แสดง DEPT spectrum



รูปที่ 11 แสดง 2D HMBC spectrum

เอกสารอ้างอิง

วัชรี สีห์ชำนาญธุระกิจ. 2539. "สารประกอบฟลาโวนอยด์จากพืชนมวัว (*Uvaria dulcis* Dunal) " วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเคมีอินทรีย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Akendengue, B ; Roblot, F; Loiseau, P.M.; Bories, C. ; Ngou-Milama, E. ; Laurens, A. and Hocquemiller, R. 2002. " Klaivanolide, an Antiprotozoal Lactone from *Uvaria klaineana*", *Phytochemistry*, 59, 885-888.

Chen, Y. and Yu, D.Q. 1996. " Tonkinecin, a Novel Bioactive Annonaceous Acetogenin from *Uvaria tonkinenesis* " *J. Nat. Prod.*, 59, 507-509.

Huang, L.; Wall, M.E. ; Wani, M.C. ; Navarro, H. ; Santisuk, T. ; Reutrakul, V. ; Seo, E.K. ; Farnsworth, N.R. and Kinghorn A.D. 1998. " New Compounds with DNA Strand-Scission Activity from the Combined Leaf and Stem of *Uvaria hamiltonii* " , J. Nat. Prod., 61, 446-450.

Hufford, C.D. and Lasswell, W.L. Jr. 1978. " Antimicrobial activities of Constituents of *Uvaria chamae*", *lloydia.*, 41, 156-160.

Hufford, C.D. and Lasswell, W.L. Jr. 1979. " Uvarinol: a Novel Cytotoxic Tribenzylated Flavanone from *Uvaria chamae*", *J. Org. Chem.*, 44, 4709-4710.

Joshi, B.S. and Gawad, D.H. 1979. " Revised Structures of Pipoxide and Pipoxide Chlorohydrin", *Tetrahedron Letters*, 26, 2427-2430.

Leboeuf, M ; Cave, A; Bhaumik, P.K. ; Mukherjee, B. and Mukherjee, R. 1982. " The Phytochemistry of the Annonaceae", *Phytochemistry*, 21, 2783-2813.

Liao, Y.H.; Xu, L.Z.; Yang, S.L.; Dai, J.; Zhen, Y.S.; Zhu, M. and Sun N.J. 1997. " Three Cyclohexene Oxides from *Uvaria grandiflora* " *Phytochemistry*, 45, 729-732.

Nkunya, M.H.H.; Weenen, H.; Bray, D.H.; Mgani, Q.A. and Mwasumbi, L.B. 1991. " Antimalarial activity of Tanzanian Plants and Their Active Constituents: the Genus *Uvaria* ", *Planta Med.*, 57, 341-343.

Raynaud, S.; Fourneau, C.; Lasurens, A.; Hocquemiller, R.; Loiseau, P. and Bories, C. 2000. "Squamocin and Benzyl benzoate, Acaricidal Components of *Uvaria pauci-ovulata* Bark Extracts " *Planta Med.*, 66, 173-175.

ตอนที่ 2

การทดสอบผลทางสรีรวิทยาของสารพิพอกไซด์ บริสุทธิ์จากกิ่งและใบของต้นกล้วยหมูสัง

(*Uvaria purpurea* Bl.)

ตอนที่ 2.1
การทดลองแบบนอกตัว (*In vitro* Experiment)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของพิพอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ ต่อความถี่และความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้และกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้หนูแร็ท (rat) พันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักตัวประมาณ 200-400 g. จากหน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูทั้งหมดเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมือนกัน ได้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., Thailand) และน้ำประปาสำหรับดื่ม อยู่ในห้องปรับอากาศ อุณหภูมิ 25°C ควบคุมปริมาณแสงให้มีสัดส่วนของ สว่าง:มืด เท่ากับ 12:12 ชม.

สารเคมี

1. Pipoxide
2. NaCl
3. KCl
4. $CaCl_2$
5. $MgCl_2$
6. NaH_2PO_4
7. $NaHCO_3$
8. Glucose
9. $MgSO_4.7H_2O$
10. KH_2PO_4
11. Dimethyl sulfoxide (DMSO)

ส่วนของ physiological fluid ที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี (กรัม/ลิตร)	Tyrode's solution	สารเคมี (กรัม/ลิตร)	Krebs-Ringer's solution
NaCl	8.00	NaCl	6.895
KCl	0.20	KCl	0.335
$CaCl_2$	0.20	$CaCl_2$	0.275
$MgCl_2$	0.10	$MgSO_4.7H_2O$	0.245
NaH_2PO_4	0.05	$NaHCO_3$	2.100
$NaHCO_3$	1.00	KH_2PO_4	0.135
Glucose	1.00	Glucose	1.080

ปรับให้ pH ของสารละลายดังกล่าว = 7.4

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
2. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
3. ไปเปตต์อัตโนมัติ และ tips
4. เครื่องบันทึกโพลีกราฟ (polygraph) และอุปกรณ์ประกอบ
5. circulating water bath
6. กล้องจุลทรรศน์
7. ถังแก๊ส carbogen
8. เครื่องแก้ว
9. สายยางสำหรับต่อ
10. ถุงมือยาง
11. สไลด์และแผ่นปิด
12. แท่งแก้วสำหรับทำ vaginal smear
13. organ bath
14. pH meter

วิธีการทดลอง

การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบลำไส้

อดอาหารหนู 24 ชั่วโมงก่อนการทดลอง ให้เฉพาะน้ำดื่ม ชั่งน้ำหนักหนู ทำให้เสียชีวิตโดยการดึงคอ ผ่าตัดเปิดหน้าท้องตามแนวเส้นกลางท้อง เปิดหาลำไส้เล็ก ตัดที่บริเวณ pylorus และตอนปลายของ ileum ตัด mesentery และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ติดกับลำไส้เล็กออก เอาลำไส้เล็กมาแช่ใน Tyrode's solution 37°C ที่ blow ด้วยแก๊ส carbogen ตัดแยกเอา duodenum ส่วนต้นยาวประมาณ 2 ซม. ออกมา สอด canula ฉีดล้างสิ่งตกค้างภายในออกให้หมด ใช้ตะขอ (ที่ผูกด้ายเอาไว้ที่ปลายด้านหนึ่ง) เกี่ยวปลายชิ้นลำไส้ทั้ง 2 ปลายแต่อย่าให้ lumen ปิด เอาปลายด้ายอีกด้านของตะขอด้านที่เกี่ยวกับปลายบนของชิ้นลำไส้เอาไปผูกเข้ากับ force transducer ที่ต่อเข้ากับเครื่องบันทึก polygraph และเอาปลายด้ายอีกด้านของตะขอที่เกี่ยวกับปลายล่างของชิ้นลำไส้เอาไปผูกกับปลายของ aerating tube ใน organ bath ใน organ bath ใส่ Tyrode's solution 37 °C ไว้ 20 ml. และให้แก๊ส carbogen ตลอดเวลา

แผนการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ชิ้นลำไส้ที่ใช้ในการทดลอง 1 ชิ้น เอามาจากสัตว์ทดลอง 1 ตัว

การทดลองเริ่มโดยปรับ (calibrate) เครื่องบันทึก polygraph โดยปรับให้ค่าความแรงการหดตัว (amplitude of contraction) 1 มม. (mm) = ความแรงการหดตัว 0.05 กรัม (g) และจัดให้มี preload = 0.5 g

ดำเนินการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1

1. บันทึกการหดตัวปกติของชิ้นลำไส้เป็น control contraction นาน 10 นาที

2. ใส่ solvent ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย pipoxide คือ DMSO 20 µl ลงใน organ bath บันทึกการหดตัวของชิ้นลำไส้ 10 นาที แล้วล้างออก ล้างทุกนาที 5 ครั้ง รอให้การหดตัวกลับเข้าสู่ภาวะปกติ

กลุ่มที่ 2, 3 และ 4

ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เปลี่ยนใช้สารละลาย pipoxide ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 10^{-5} M, 10^{-4} M และ 10^{-3} M แทนตามลำดับ

การเตรียมกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

ใช้หนูระยะ metoestrus ชั่งน้ำหนักหนู ทำให้เสียชีวิตโดยการดึงคอ ผ่าตัดเปิดหน้าท้องตามแนวเส้นกลางท้อง เปิดหามดลูก ตัด uterine horn ด้านขวาออกมา แช่ใน Kreb-Ringer's solution 37°C ที่ blow ด้วยแก๊ส carbogen ตัด mesentery และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ออก แล้วตัด uterine horn ส่วนบนออกมายาวประมาณ 2 ซม. ทำการแขวนชิ้นมดลูกแบบเดียวกับที่ทำกับชิ้นลำไส้ ใน organ bath ใส่ Kreb-Ringer's solution 37 °C ไว้ 20 ml. และให้แก๊ส carbogen ตลอดการทดลอง

แผนการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว โดยที่กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ชิ้นมดลูกที่ใช้ในการทดลอง 1 ชิ้นเอามาจากสัตว์ทดลอง 1 ตัว

การทดลองเริ่มโดยปรับ (calibrate) เครื่องบันทึก polygraph โดยปรับให้ค่าความแรงการหดตัว (amplitude of contraction) 1 มม. (mm) = ความแรงการหดตัว 0.2 กรัม (g) และจัดให้มี preload = 1 g

ดำเนินการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1

1. บันทึกการหดตัวปกติของมดลูก 15 นาที เป็น control contraction ใส่ solvent ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย pipoxide คือ DMSO 5 µl ลงใน organ bath บันทึกการหดตัวของมดลูก 15 นาที แล้วล้างออก ล้างทุกนาที 5 ครั้ง รอให้การหดตัวกลับเข้าสู่ภาวะปกติ

กลุ่มที่ 2, 3 และ 4

ทำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่เปลี่ยนใช้สารละลาย pipoxide ที่ละลายใน DMSO ความเข้มข้น 0.25×10^{-5} M, 0.25×10^{-4} M และ 0.25×10^{-3} M แทนตามลำดับ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าที่ได้จากการทดลองจะเสนอเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และ standard error of mean (S.E.M.) ของแต่ละกลุ่มการทดลอง การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในกลุ่มเดียวกัน ทำโดยใช้ paired t-test ส่วนค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ทำโดยใช้ unpaired t-test และ ANOVA โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ P value < 0.05

ผลการทดลอง

ผลของพิพอกไซด์ต่อการหดตัวกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ และมดลูก

ผลการทดลองดังแสดงผลในตารางที่ 5-7 และ 9-11 โดยที่กำหนดให้ความแรงการหดตัว หน่วย เป็น mm หรือ g ส่วนความถี่การหดตัวมีหน่วย เป็น ครั้ง/นาที และ

Mamp.cont = ความแรงการหดตัวเฉลี่ยก่อนใส่สารละลาย pipoxide ลงใน organ bath

Mamp.(x) = ความแรงการหดตัวเฉลี่ยหลังจากใส่สารละลาย pipoxide ความเข้มข้น x ลงใน organ bath

Mfcont = ความถี่การหดตัวเฉลี่ยก่อนใส่สารละลาย pipoxide ลงใน organ bath

Mf.(x) = ความถี่การหดตัวเฉลี่ยหลังจากใส่สารละลาย pipoxide ความเข้มข้น x ลงใน organ bath

$$\% \text{ difference of mean amp. from control (x)} = \frac{\text{Mamp.(x)} - \text{Mamp.cont}}{\text{Mamp.cont}} \times 100\,\%$$

$$\% \text{ different of mean freq. from control (x)} = \frac{\text{Mf.(x)} - \text{Mfcont}}{\text{Mf.cont}} \times 100\,\%$$

ผลของ solvent (DMSO) ต่อค่าความแรงและความถี่ของการหดตัวของลำไส้

ดังแสดงในตารางที่ 4 จากผลการเปรียบเทียบความแรงเฉลี่ย (หน่วย เป็น g) ของการหดตัวปกติของลำไส้ก่อนใส่ solvent (DMSO) ลงใน organ bath กับความแรงเฉลี่ยของการหดตัวของลำไส้ภายหลังจากใส่ DMSO โดยใช้ t-Test: Paired Two Sample for Means พบว่าไม่แตกต่างกัน (0.53 และ 0.53 g ตามลำดับ)

ส่วนการเปรียบเทียบความถี่เฉลี่ย (หน่วย เป็น ครั้ง/นาที) ของการหดตัวปกติของลำไส้ก่อนใส่ solvent (DMSO) ลงใน organ bath กับความถี่เฉลี่ยของการหดตัวของลำไส้หลังจากใส่ DMSO โดยใช้ t-Test: Paired Two Sample for Means ผลปรากฏว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือลดลงจาก 35.7 เป็น 35.4 ครั้งต่อนาที ($P < 0.05$, $n = 7$)

ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode แสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 12

ผลของสารละลายพิพอกไซด์ต่อค่าความแรงและความถี่ของการหดตัวของลำไส้

ผลของ pipoxide ความเข้มข้น 10^{-5},10^{-4} และ 10^{-3} M ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของลำไส้ ดังแสดงในตารางที่ 5, 6 และ 7 ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) และ 10^{-5},10^{-4} และ 10^{-3} M pipoxide เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode แสดงในรูปที่ 12 และ รูปที่ 13 ตามลำดับ pipoxide ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-3} M ลดความแรงของการหดตัว 24 และ 26 % ตามลำดับ ($P< 0.001$ และ 0.01, $n = 7$ และ 7 ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 แสดงผลของ solvent (DMSO) ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode (cont)
ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า - แสดงการลดลง

Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp. (DMSO added) (g)	Mfcont (ครั้ง/นาที)	Mf.(DMSO added) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. after DMSO added	% difference of mean frequency after DMSO added
1	257	0.25	0.2934	35	34.7	17.348	-0.8571
2	275	0.5963	0.5828	34	33.8	-2.2739	-0.5882
3	267	0.7271	0.662	36	35.1	-8.9563	-2.5
4	237	0.4632	0.4513	34	34	-2.571	0
5	255	0.5017	0.4716	37.5	37.1	-5.9871	-1.0667
6	329	0.4987	0.5003	37	36.9	0.3389	-0.2703
7	289	0.6723	0.7768	36.5	36	15.5513	-1.3699
Mean ± S.E.M	272.7143 ± 11.2413	0.5299 ± 0.0594	0.534 ± 0.0593	35.7143 ± 0.5329	35.3714 ± 0.5022	1.9214 ± 3.9185	-0.9503 ± 0.3123

ตารางที่ 5 แสดงผลของ 10^{-5} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ 10^{-5} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode (cont) ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า - แสดงการลดลง

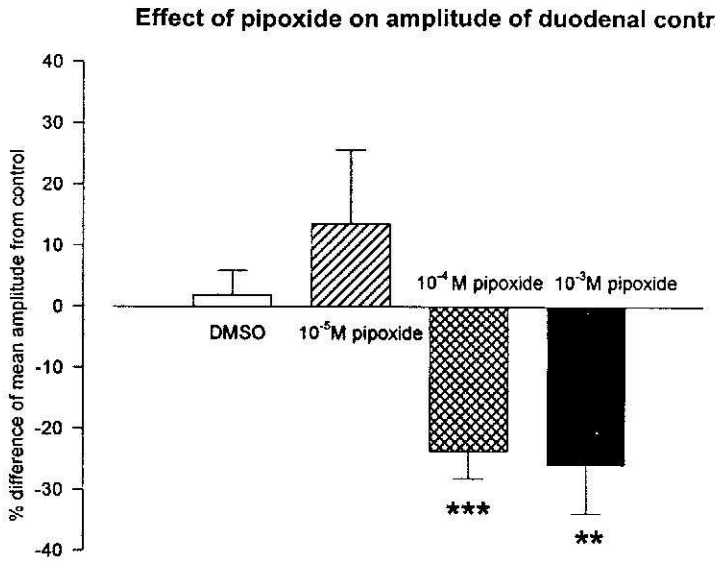
Rat no.	Body weight (g)	Mamp. cont (g)	Mamp.(10^{-5} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(10^{-5} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. after 10^{-5} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 10^{-5} M pipoxide added
1	274	0.2517	0.4604	37.5	37.7	82.9456	0.5333
2	248	0.7123	0.6802	34.5	34.9	-4.505	1.1594
3	248	0.3497	0.4199	36	36.4	20.0955	1.1111
4	242	0.8698	0.8321	38.5	37.9	-4.3395	-1.5584
5	266	0.4543	0.4777	37.5	37.7	5.1328	0.5333
6	282	0.8839	0.9205	38	37.6	4.1482	-1.0526
7	283	0.8038	0.7332	36.5	36.7	-8.7737	0.5479
Mean ± S.E.M.	263.2857 ± 6.5127	0.6179 ± 0.0989	0.6463 ± 0.0744	36.9286 ± 0.5167	36.9857 ± 0.4085	13.5291 ± 12.1128	0.182 ± 0.401

ตารางที่ 6 แสดงผลของ 10^{-4} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ 10^{-4} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode (cont)
ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp.(10^{-4} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(10^{-4} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. After 10^{-4} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 10^{-4} M pipoxide added
1	235	0.584	0.3568	36	34.8	-38.915	-3.3333
2	255	0.5841	0.4417	37	37	-24.3837	0
3	252	0.4013	0.2826	37.5	37.6	-29.59	0.2667
4	220	0.3816	0.3003	38	36.8	-21.2904	-3.1579
5	267	1.0949	1.047	36.5	36.5	-4.3731	0
6	253	0.5834	0.5006	37	36.7	-14.1967	-0.8108
7	284	0.9463	0.6306	37	36.6	-33.3605	-1.0811
Mean ± S.E.M.	252.2857 ± 7.8246	0.6537 ± 0.1015	0.5085 ± 0.1008	37 ± 0.244	36.5714 ± 0.3257	-23.7299 ± 4.4444	-1.1595 ± 0.5684

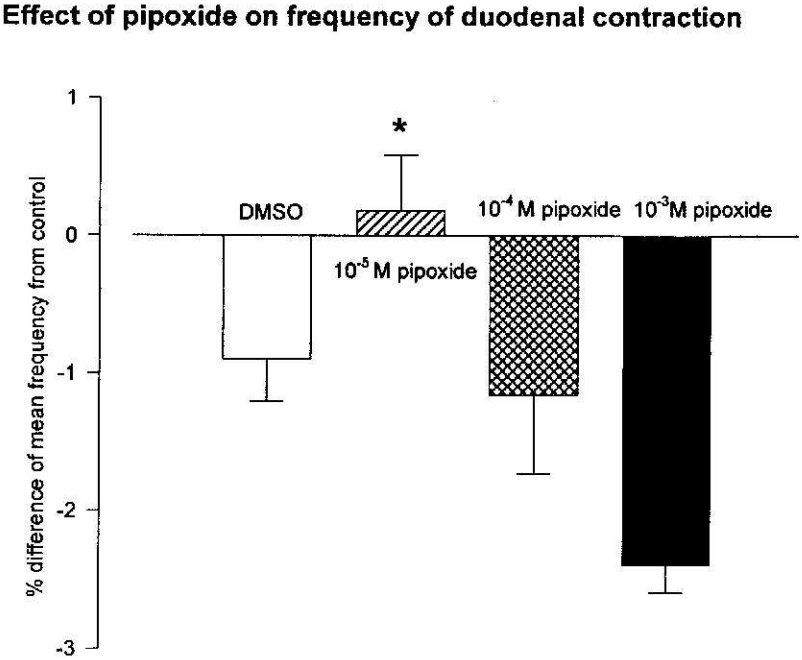
ตารางที่ 7 แสดงผลของ 10^{-3} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ เมื่อให้ 10^{-3} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Tyrode (cont)
ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp.(10^{-3} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(10^{-3} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. After 10^{-3} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 10^{-3} M pipoxide added
1	296	0.5097	0.2999	37.5	36.1	-41.1653	-3.7333
2	230	1.1832	1.0011	36.5	36.3	-15.3919	-0.5479
3	253	1.65	0.7169	37	37.1	-56.5506	0.2703
4	230	0.7399	0.4702	37	36	-36.4465	-2.7027
5	236	0.6815	0.5551	36.5	35.5	-18.5523	-2.7397
6	245	0.8635	0.9416	37	35.8	9.045	-3.2432
7	228	0.334	0.2594	37.5	36	-22.3219	-4
Mean ± S.E.M.	245.4286 ± 9.1074	0.8517 ± 0.1672	0.6063 ± 0.1108	37.0000 ± 0.1543	36.1143 ± 0.1895	-25.9119 ± 7.9912	-2.3852 ± 0.6136



รูปที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความแรงการหดตัวเฉลี่ยของลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction) ค่า + แสดงความแรงของการหดตัวที่เพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

** และ *** แสดงค่า $P < 0.01$ และ 0.001 ตามลำดับ



รูปที่ 13 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความถี่การหดตัวเฉลี่ยของลำไส้ เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 10^{-5}, 10^{-4} และ 10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction) ค่า + แสดงความถี่ของการหดตัวที่เพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

* แสดงค่า $P < 0.05$

ผลของ solvent (DMSO) **ต่อค่าความแรงและความถี่ของการหดตัวของมดลูก**

ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการเปรียบเทียบความแรงเฉลี่ย (หน่วย เป็น g) ของการหดตัวปกติของมดลูกก่อนใส่ solvent (DMSO) ลงใน organ bath กับความแรงเฉลี่ยของการหดตัวของลำไส้ภายหลังจากใส่ DMSO โดยใช้ t-Test: Paired Two Sample for Means พบว่า DMSO ทำให้ความแรงการหดตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (control = 2.8, DMSO = 2.6 g, n=7, $P < 0.05$)

ส่วนการเปรียบเทียบความถี่เฉลี่ย (หน่วย เป็น ครั้ง/นาที) ของการหดตัวปกติของมดลูกก่อนใส่ solvent (DMSO) ลงใน organ bath กับความถี่เฉลี่ยของการหดตัวของมดลูกหลังจากใส่ DMSO โดยใช้ t-Test: Paired Two Sample for Means ผลปรากฏว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (control = 0.6, DMSO = 0.5 ครั้งต่อนาที, n = 7, $P < 0.05$)

ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer แสดงในตารางที่ 8

ผลของสารละลายพิพอกไซด์ต่อค่าความแรงและความถี่ของการหดตัวของมดลูก

ผลของ pipoxide ความเข้มข้น 0.25×10^{-5}, 0.25×10^{-4} และ 0.25×10^{-3} M ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของมดลูก ดังแสดงในตารางที่ 9, 10 และ 11 ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) และ pipoxide 0.25×10^{-5}, 0.25×10^{-4} และ 0.25×10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer แสดงในรูปที่ 14 และ รูปที่ 15 ตามลำดับ pipoxide ทั้ง 3 ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งความแรงและความถี่การหดตัว

ตารางที่ 8 แสดงผลของ solvent (DMSO) ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer (cont) ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า - แสดงการลดลง

Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp. (DMSO added) (g)	Mfcont (ครั้ง/นาที)	Mf.(DMSO added) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. after DMSO added	% difference of mean frequency after DMSO added
1	268	2.4923	2.0833	0.8667	0.8	0.8667	0.8
2	284	2.8334	2.62	0.4	0.3333	0.4	0.3333
3	267	2.6909	2.53	0.7333	0.6667	0.7333	0.6667
4	255	2.4	2.35	0.4667	0.2667	0.4667	0.2667
5	246	2.8143	2.4833	0.4667	0.4	0.4667	0.4
6	260	2.4556	2.575	0.6	0.5333	0.6	0.5333
7	242	4.28	3.6556	0.6667	0.6	0.6667	0.6
MEAN ± S.E.M.	260.2857 ± 5.4192	2.8524 ± 0.2468	2.6139 ± 0.1866	0.6000 ± 0.0634	0.5143 ± 0.0723	0.6000 ± 0.0634	0.5143 ± 0.0723

ตารางที่ 9 แสดงผลของ 0.25×10^{-5} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ 0.25×10^{-5} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer (cont) ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า - แสดงการลดลง

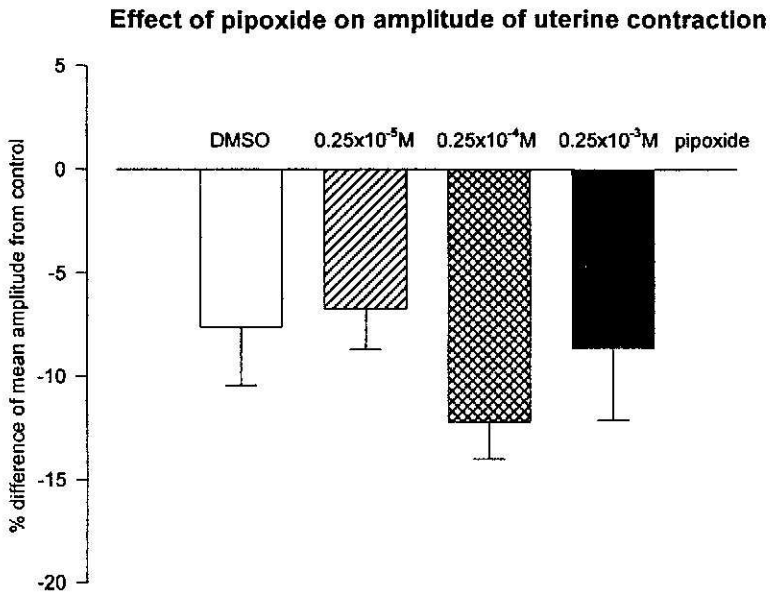
Rat no.	Body weight (g)	Mamp. cont (g)	Mamp.(0.25×10^{-5} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(0.25×10^{-5} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. after 0.25×10^{-5} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 0.25×10^{-5} M pipoxide added
1	200	2.7467	2.6	1	0.8667	-5.3396	-1.333
2	236	4.3375	4.0143	0.5333	0.4667	-7.4518	-12.4883
3	257	4.4	3.9125	0.6	0.5333	-11.0795	-11.1167
4	270	4.2286	3.6333	0.4667	0.4	-14.0766	-14.2918
5	229	3.6333	3.3474	1.4	1.2667	-7.871	-9.5214
6	234	3.5417	3.6	0.8	0.6667	1.6473	-16.6625
7	232	4.34	4.21	0.6667	0.6667	-2.9954	0
Mean ± S.E.M.	236.8571 ± 8.3906	3.8897 ± 0.2326	3.6168 ± 0.2014	0.781 ± 0.1232	0.6953 ± 0.1116	-6.7381 ± 1.9565	-9.3448 ± 2.4033

ตารางที่ 10 แสดงผลของ 0.25×10^{-4} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ 0.25×10^{-4} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer (cont) ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

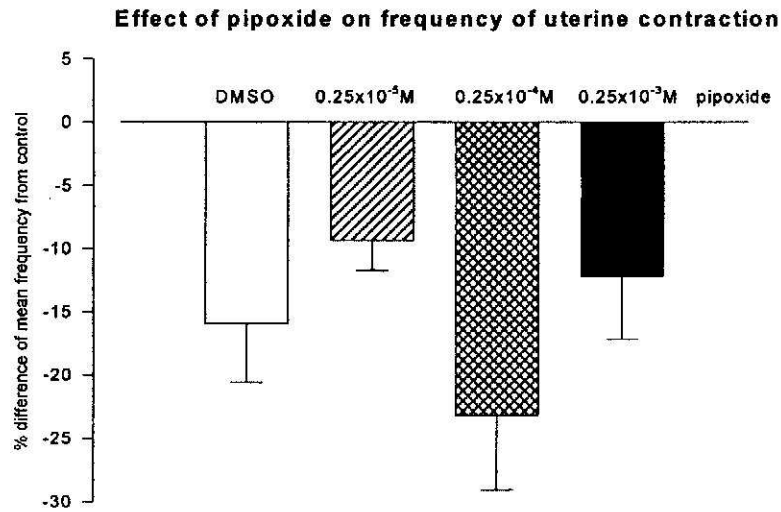
Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp.(0.25×10^{-4} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(0.25×10^{-4} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. After 0.25×10^{-4} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 0.25×10^{-4} M pipoxide added
1	250	3.2857	2.825	0.4667	0.2667	-14.0219	-42.8541
2	267	1.8176	1.7708	1.1333	1.1333	-2.5891	0
3	264	3.8375	3.45	0.5333	0.4	-10.0977	-24.9953
4	269	1.7824	1.5563	1.1333	1.0667	-12.6854	-5.8766
5	234	3.1455	2.6	0.7333	0.4667	-17.3412	-36.3562
6	260	2.56	2.1571	0.6667	0.4667	-15.7367	-29.9985
7	269	3.7222	3.2429	0.6	0.4667	-12.8783	-22.2167
Mean ± S.E.M.	259 ± 4.8697	2.8787 ± 0.3199	2.5146 ±0.272	0.7524 ± 0.1036	0.6095 ± 0.1296	-12.1929 ± 1.8241	-23.1853 ± 5.8719

ตารางที่ 11 แสดงผลของ 0.25×10^{-3} M pipoxide ต่อความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก และแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงความแรงและความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก เมื่อให้ 0.25×10^{-3} M pipoxide กับค่าที่ได้จากในช่วง control contraction โดยใช้สารละลาย Krebs-Ringer (cont) ค่า + แสดงการเพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

Rat no.	Body weight (g)	Mamp.cont (g)	Mamp. (0.25×10^{-3} M pipoxide) (g)	Mf.cont (ครั้ง/นาที)	Mf.(0.25×10^{-3} M pipoxide) (ครั้ง/นาที)	% difference of mean amp. after 0.25×10^{-3} M pipoxide added	% difference of mean frequency after 0.25×10^{-3} M pipoxide added
1	278	3.4095	3.025	1.4	1.6	-11.2778	14.2857
2	278	3.8313	3.6615	1.0667	0.8667	-4.4299	-18.7494
3	229	3.3429	2.9692	0.9333	0.8667	-11.1767	-7.136
4	242	3.3421	3.25	1.2667	1.0667	-2.7558	-15.7891
5	242	2.2706	1.6733	1.1333	1	-26.3034	-11.7621
6	276	3.8833	3.9889	0.8	0.6	2.7178	-25
7	278	4.5786	4.2455	0.9333	0.7333	-7.2756	-21.4293
Mean ± S.E.M.	260.4286 ± 8.2169	3.5226 ± 0.2666	3.2591 ±0.3208	1.0762 ± 0.0789	0.9619 ± 01216	-8.6431 ±3.4799	-12.2257 ±4.9572



รูปที่ 14 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความแรงการหดตัวเฉลี่ยของมดลูกเมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 0.25×10^{-5}, 0.25×10^{-4} และ 0.25×10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction) ค่า + แสดงความแรงของการหดตัวที่เพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง



รูปที่ 15 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงของความถี่การหดตัวเฉลี่ยของมดลูก เมื่อให้ solvent (DMSO) และสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 0.25×10^{-5}, 0.25×10^{-4} และ 0.25×10^{-3} M เมื่อเทียบกับค่าการหดตัวปกติ (control contraction) ค่า + แสดงความถี่ของการหดตัวที่เพิ่มขึ้น และค่า – แสดงการลดลง

อภิปรายผลการทดลอง

ผลของพิพอกไซด์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้

ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้นั้น ลำไส้ที่ใช้ทดลองเป็นลำไส้เล็กส่วน duodenum ที่แยกจากตัว แล้วนำออกมาทดลองใน organ bath โดยปกติ Interstitial cells of Cajal (ICCs) ในลำไส้เล็กเป็นตัวให้ pacemaker activity ที่รับผิดชอบการสร้าง slow wave และ slow wave นี้ จะแพร่ต่อไปสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ พบ slow wave และ spike potential ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่ควบคู่กับ ICCs แต่จะไม่พบ slow wave ที่กล้ามเนื้อเรียบลำไส้ที่ไม่มี ICCs (Johnson,L.R. and Gerwin,T.A. 2001)

ICCs สามารถ connect กับ ICCs เซลล์อื่นๆ สามารถฟอร์ม gap junction กับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็ก และยังได้รับ nerve innervation จาก enteric neurons

slow wave activity หรือ basic electrical activity จะพบปรากฏอยู่เสมอที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กไม่ว่าจะมีการหดตัวหรือไม่ก็ตาม

Typical slow wave ประกอบด้วย 4 ส่วนคือ (1) rapid depolarization (upstroke) เกิดจากการเคลื่อนของ Ca^{2+}influx ผ่านทาง dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} channels (2) partial repolarization เกิดจาก voltage- and Ca^{2+}-dependent inactivation of Ca^{2+}channels ที่นำ inward current และจากการ activate K^+ channels ที่นำ outward current (3) sustained plateau เกิดจาก balanced ของ inward กับ outward current (4) progressive และ complete repolarization ไปสู่ resting membrane potential เกิดจากการค่อยๆเพิ่มขึ้นของ cytosolic free Ca^{2+}($[Ca^{2+}]_i$) ซึ่ง $[Ca^{2+}]_i$ ที่เพิ่มขึ้นนี้เกิดจาก Ca^{2+}influx กับ Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release ซึ่งนำไปสู่การค่อยๆ inactivate Ca^{2+} channels และการ activate Ca^{2+}-dependent K^+ channels ทำให้เกิด repolarization (Johnson,L.R. 1994)

contractile tissue ของลำไส้เล็กประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อเรียบชนิด unitary และมี phasic contraction ทั้งนี้ contractile activity ของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็กนี้ถูกควบคุมการทำงานโดยระดับของ free intracellular Ca^{2+} ที่ระดับของ Ca^{2+} ต่ำ ($< 10^{-7}$ M) จะไม่ทำให้เกิด interaction ของ contractile proteins แต่ที่ระดับ Ca^{2+} สูงกว่านี้ contractile proteins จะมี interaction กันและมีการหดตัวเกิดขึ้น

การเพิ่มของ free intracellular Ca^{2+} มีความสัมพันธ์กับ electrical activity ของเยื่อเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell membrane) ในกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก Ca^{2+} เข้าเซลล์ทาง voltage-dependent Ca^{2+} channel เมื่อ channel เหล่านี้ถูกกระตุ้น จะเกิด action potential หรือ spike potential ขึ้นซึ่งจะเกิดซ้อน (superimpose) บน slow wave สำหรับ slow wave เองไม่ได้ทำให้เกิดการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญแต่เป็นตัวกำหนดเวลาสำหรับให้ spike potential เกิดขึ้น เพราะว่าจะเห็น spike เฉพาะในระหว่าง (during) peak ของ depolarization ของ slow wave

ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก พบว่าการหดตัวเกิดขึ้นเมื่อ depolarization ที่เกิดโดย slow wave สูงเกินกว่าค่า threshold for contraction เมื่อ depolarization ของ slow wave สูงเกินกว่า electrical threshold ก็จะเกิดลักษณะที่เรียกว่า "a burst of spike potentials ขึ้นบน slow wave"

ส่วนสารละลาย pipoxide ความเข้มข้น 10^{-4} M และ ความเข้มข้น 10^{-3} M มีผลลดความแรงการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า $P < 0.001$, และ < 0.01 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับ control solution แต่ไม่มีผลต่อความถี่ของการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ ในกรณีที่ความเข้มข้นสูงของ pipoxide (10^{-4} M และ 10^{-3} M) ไม่มีผลต่อความถี่การหดตัวอาจเป็นเพราะมีการเกิดภาวะ desensitization ก็ได้ ซึ่งกลไกที่แท้จริงควรมีการศึกษาโดยรายละเอียดต่อไปอีก สำหรับในกรณีที่ความเข้มข้นสูงของ pipoxide (10^{-4} M และ 10^{-3} M) มีผลลดความแรงการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ control solution นั้นอาจเกิดเนื่องมาจาก pipoxide ไปมีผลลดความถี่ของ spike potential บน slow wave ทำให้ความแรงการหดตัวลดลง อย่างไรก็ตามกลไกที่แท้จริงควรมีการศึกษาต่อไป

ผลของพิพอกไซด์ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

จากการทดลองพบว่า สารละลาย pipoxide ทั้ง 3 ความเข้มข้นคือ 0.25×10^{-5}, 0.25×10^{-4} และ 0.25×10^{-3} M ไม่มีผลต่อความแรงและความถี่การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกเมื่อเทียบกับ control solution ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากว่าเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูกอาจไม่มี receptor สำหรับจับกับ pipoxide หรืออาจจะเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้นของ pipoxide ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีค่าต่ำเกินไปที่จะทำให้กล้ามเนื้อมดลูกในระยะ metoestrus เกิดการตอบสนองโดยเปลี่ยนแปลงความแรงหรือความถี่ในการหดตัวได้

ตอนที่ 2.2

การศึกษาทดลองแบบในตัว (*In vivo* Experiment)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบผลของพิพอกไซด์ขนาดต่างๆ ต่อความดันเลือดแดงเฉลี่ยในหนูขาวที่สลบ ความดันเลือดแดงวัดโดยตรงทาง carotid artery
2. เพื่อทดสอบผลของพิพอกไซด์ขนาดต่างๆ ต่อการทำงานของไตในหนูขาวที่สลบ การทำงานของไตประกอบด้วย ปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงไต อัตราการกรองของไต อัตราการไหลของน้ำปัสสาวะ และอัตราการขับทิ้งโซเดียมและโปแตสเซียม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้หนูแร็ท (rat) เพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 25 ตัว น้ำหนักตัวระหว่าง 200-400 กรัม จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูทั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่อุณหภูมิ 25°C โดยควบคุมปริมาณแสงให้มีสัดส่วนของมืด:สว่างเท่ากับ 12:12 ชั่วโมง เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., Thailand) และน้ำดื่มเป็นน้ำประปาสะอาด

สารเคมี

1. Ammonium Sulfamate ($H_6N_2O_3S$)
2. Anthrone ($C_{14}H_{10}O$)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
4. Heparin
5. Hydrochloric acid (HCl)
6. Inactin [5-ethyl-5(L-methylpropyl)-2 thiobarbituric acid]
7. Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)
8. N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochloride,N-1-NED ($C_{12}H_{16}Cl_{12}H_2$)
9. Para-aminohippuric acid (Sodium salt, $C_9H_9N_2O_3Na$)
10. Pipoxide
11. Polyfructosan
12. Sodium chloride (NaCl)
13. Sodium hydroxide (NaOH)
14. Sodium nitrite ($NaNO_2$)
15. Sulfuric acid (H_2SO_4)

16. Trichloroacetic acid ($C_{13}CCOOH$)

17. Zinc sulfate ($ZnSO_4 . 7H_2O$)

อุปกรณ์

1. เครื่องโพลีกราฟ (polygraph)
2. ตัวแปลงสัญญาณความดันเลือด (pressure transducer)
3. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge)
4. เตียงผ่าตัดสัตว์ทดลอง (operating table)
5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (homeothermic blanket control unit)
6. เครื่องวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก (electronic rectal temperature probe)
7. ชุดเครื่องมือผ่าตัด (surgical set)
8. เครื่องชั่ง (gravimeter)
9. เครื่องผสมสาร (mixer)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
11. เครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump)
12. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (autopipette)
13. ท่อโพลีเอธิลลีน (polyethylene) เบอร์ 50, 200, 240
14. เครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer)
15. เครื่องปั่นแยก (microhematocrit centrifuge)
16. หลอดทดลอง (test tube)
17. กระบอกตวง (cylinder)
18. บีกเกอร์ (beaker)
19. กระบอกฉีดยา (syringe)
20. dulem tube
21. eppendorf tube
22. disposable filter ขนาด 0.2 μm

วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

1. ชั่งน้ำหนักหนู แล้วทำการสลบหนูโดยฉีด inactin ขนาด 100 มก./กก.น้ำหนักตัว (mg/kg BW) เข้าช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.)

2. นำสัตว์ทดลองที่สลบดีแล้ววางบนเตียงผ่าตัด ซึ่งให้ความร้อนและควบคุมอุณหภูมิของร่างกายด้วยเครื่อง homeothermic blanket control unit โดยวัดอุณหภูมิทางทวารหนักให้คงที่ที่ 37°C

3. สอดท่อหลอดลม (tracheaostomy) เพื่อใช้เป็นทางผ่านของอากาศในการหายใจ และดูดระบายเสมหะ โดยใช้ท่อโพลีเอธิลลีนเบอร์ 240 (PE-240)

4. สอดท่อหลอดเลือดแดง (arterial catheterization) โดยใช้ท่อโพลีเอธิลลีนเบอร์ 50 (PE-50) ที่บรรจุให้เต็มด้วย heparinized saline โดยสอดทางหลอดเลือดแดง carotid artery ส่วนปลายท่ออีกด้านต่อกับตัวแปลงสัญญาณความดันเลือด (pressure transducer) เพื่อบันทึกความดันเลือดตลอดการทดลองด้วยเครื่องโพลีกราฟ และเพื่อใช้เป็นทางเก็บตัวอย่างเลือด

5. สอดท่อหลอดเลือดดำ (venous catheterization) โดยใช้ท่อโพลีเอธิลลีนเบอร์ 50 (PE-50) สอดทางหลอดเลือดดำคอ (jugular vein) เพื่อฉีดสารที่ใช้วิเคราะห์หาเคลียรานซ์ (clearance markers) ของอัตราการกรองผ่านโกลเมอรูลัส (glomerular filtration rate, GFR) และพลาสมาที่ไหลผ่านไต (renal plasma flow, RPF) และเพื่อฉีดสารละลายพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ส่วนปลายท่ออีกด้านต่อเข้ากับเครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง เพื่อให้สัตว์ทดลองได้รับสารละลายในอัตรา 0.02 มล./นาที/100 กรัมน้ำหนักตัว

6. สอดท่อกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder canulation) เพื่อใช้เก็บปัสสาวะ โดยใช้ท่อโพลีเอธิลลีนเบอร์ 200 (PE-200) ซึ่งลนไฟที่ปลายด้านหนึ่งของท่อให้หนาขึ้นเพื่อใช้ด้ายผูกติดกับกระเพาะปัสสาวะ

7. การเก็บตัวอย่างเลือด จะเก็บทางหลอดเลือดแดง carotid artery (ตามระยะเวลาในข้อ 2) โดยเก็บเลือดในหลอดแก้วขนาดความจุ 0.7 มล. จนเต็ม นำไปปั่นแยกเอาเฉพาะพลาสมาเก็บไว้ แล้วคืนเม็ดเลือดแดงกลับสู่สัตว์ทดลองโดยการละลายใน 0.9% NaCl ให้ตามปริมาณที่เก็บ และตัวอย่างเลือดอีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นแยกเพื่อหาค่า hematocrit

8. หลังจบการทดลองฉีด saturated magnesium sulphate เข้าทางหลอดเลือดดำ เพื่อให้สัตว์ทดลองตายอย่างสงบ

9. ผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อตัดเอาไตทั้งสองข้างออกมา นำมาลอกส่วนที่เป็นไขมันและผนังหุ้ม (capsule) ออก ซับน้ำให้แห้ง นำไปชั่งน้ำหนัก จดบันทึกค่าที่ได้เพื่อใช้ในการคำนวณ

แผนการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มและกลุ่มที่ได้รับ pipoxide 3 กลุ่ม ที่ได้รับปริมาณสารแตกต่างกัน 1, 10 และ 100 เท่า หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองดังกล่าวข้างต้นแล้ว สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับสารที่ใช้เป็นตัวบอกค่าการทำงานของไต (clearance marker) จากการคำนวณค่าเคลียรานซ์ ของสารนั้นๆ ซึ่งประกอบด้วย 8% polyfructosan (PFS) ใช้ในการประมาณค่าอัตราการกรองของไต และ1% para-aminohippuric acid (PAH) ใช้ในการประมาณค่าปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงไต สารทั้งหมดละลายใน 0.9% NaCl และฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำอย่างต่อเนื่องในอัตรา 0.02 มล./นาที/100 กรัมน้ำหนักตัว ตลอดการทดลอง ซึ่งอัตราดังกล่าวจะเป็นการชดเชยการสูญเสียของเหลวจากร่างกายสัตว์ทดลองและทำให้การกระจายของปริมาณสารที่ใช้เป็นดัชนีการวัดค่าการทำงานของไตกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

หลังจากให้สารละลายข้างต้นแล้ว จะรอให้สารกระจายตัวในส่วนต่างๆ ของของเหลวในร่างกายอย่างทั่วถึง เรียกช่วงนี้ว่าเป็น equilibration period ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 60 นาที จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงการทดลอง (experimental period) ซึ่งจะใช้เวลา 180 นาที เก็บตัวอย่างปัสสาวะเป็นช่วงๆ แต่ละช่วงใช้เวลานาน 30 นาที โดยใช้ eppendorf ความจุ 1.5 มล. ที่จดบันทึกน้ำหนักก่อนนำไปใช้ และเมื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะได้ตามเวลาแล้ว นำมาชั่งน้ำหนักและจดบันทึกอีกครั้งเพื่อนำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณหาค่าอัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate) เก็บตัวอย่างเลือดตลอดการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ๆ ละ 0.7 มล. โดยเก็บในนาทีที่ 15, 90 และ 165 ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ส่วนหนึ่งไปปั่นแยกเพื่อหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) เลือดส่วนที่เหลือจะแยกเก็บเฉพาะพลาสมาเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต่างๆ ได้แก่ PFS, PAH, Na^+ และ K^+

การออกแบบทดลอง (experimental design) แสดงในรูปที่ 16 และรูปที่ 17 ประกอบด้วย

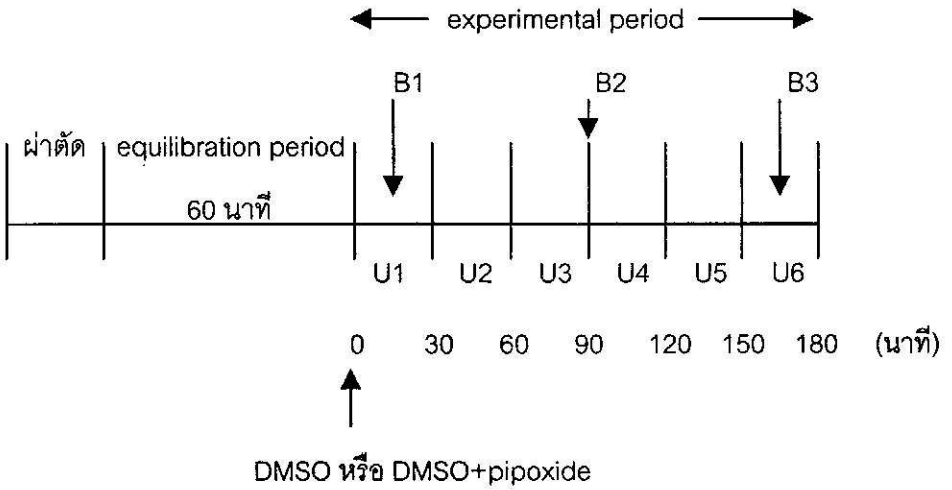
1. กลุ่มควบคุม (control group) จำนวน 6 ตัว ซึ่งได้รับสารที่ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) คือ dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาณ 0.5 มล./กก.น้ำหนักตัว ฉีดให้ทางหลอดเลือดดำ jugular แบบ bolus injection และตามด้วยการฉีดสารที่เป็น clearance markers และ DMSO แบบต่อเนื่อง (continuous infusion) เป็นเวลา 180 นาที

2. กลุ่มทดลอง (treatment group) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามปริมาณพิพอกไซด์ที่ให้

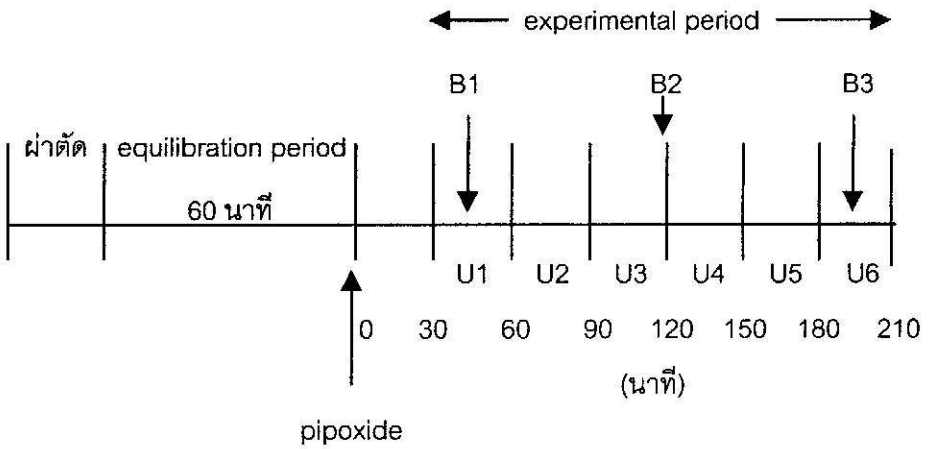
2.1 กลุ่มทดลองที่ 1 จำนวน 6 ตัว สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับสารพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ปริมาณ 0.5 มล./กก.น้ำหนักตัว แบบ bolus injection คิดเป็นปริมาณสารพิพอกไซด์ที่ให้ 1 มก./กก.น้ำหนักตัว และตามด้วยการฉีดสารที่เป็น clearance markers และพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ขนาด 0.05 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 180 นาที

3. กลุ่มทดลองที่ 2 จำนวน 7 ตัว ซึ่งได้รับสารพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ปริมาณ 0.5 มล./กก.น้ำหนักตัว แบบ bolus injection คิดเป็นปริมาณสารพิพอกไซด์ที่ให้ 10 มก./กก.น้ำหนักตัว และตามด้วยการฉีดสารที่เป็น clearance markers และพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ขนาด 0.5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 180 นาที

4. กลุ่มทดลองที่ 3 จำนวน 6 ตัว ซึ่งได้รับสารที่เป็น clearance markers และพิพอกไซด์ที่ละลายใน DMSO ขนาด 5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว แบบต่อเนื่องเป็นเวลา 210 นาที สัตว์ทดลองในกลุ่มนี้จะไม่ได้รับปริมาณพิพอกไซด์แบบ bolus injection เนื่องจากสารละลายพิพอกไซด์มีความเข้มข้นมากและไม่สามารถกรองตะกอนออกได้เมื่อละลายใน 0.9% NaCl อย่างไรก็ตามได้ขยายช่วงเวลาการทดลองออกไปอีก 30 นาทีเพื่อให้สารที่มีความเข้มข้นสูงนี้มีเวลากระจายตัวนานขึ้น



รูปที่ 16 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไตโดยวิธีเคลียรานซ์ในสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 (B1-B3 เวลาที่การเก็บตัวอย่างเลือด และ U1-U6 คือช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะ)



รูปที่ 17 แผนภาพขั้นตอนการศึกษาผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไตโดยวิธีเคลียรานซ์ในสัตว์ทดลองกลุ่มทดลองที่ 3 (B1-B3 เวลาที่การเก็บตัวอย่างเลือด และ U1-U6 คือช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะ)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างปัสสาวะ และพลาสมา

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ polyfructosan (PFS)

การหาความเข้มข้นของ PFS ในตัวอย่างปัสสาวะ และพลาสมาใช้วิธี anthrone method ของ Fuhr, *et al.* (1955) โดยนำสารตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่นและวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 620 nm ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) แล้วหาความเข้มข้นของสาร PFS ในสารตัวอย่างโดยการอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ PFS กับค่าการดูดกลืนแสง ดังนี้

ตัวอย่างพลาสมา

สารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา 25 µl

↓

เติม 0.5 M NaOH 100 µl และ

0.25 M $ZnSO_4$ 250 µl

↓

ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นแยก

ที่ 5000 รอบ/นาที นาน 5นาที

↓

ดูดสารละลายใสส่วนบน 250 µl

↓

เติม Anthrone reagent 5 ml

↓

ต้มในน้ำร้อนที่ 56°C 10 นาที

↓

แช่ในน้ำแข็ง

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

ตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะ 10 µl

↓

ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 99 µl

↓

ผสมให้เข้ากัน

↓

สารละลายมาตรฐานและตัว

อย่างปัสสาวะที่เจือจางแล้ว

10 µl

↓

เติม Anthrone reagent 5 ml

↓

ต้มในน้ำร้อนที่ 56°C 10 นาที

↓

แช่ในน้ำแข็ง

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH)

การหาความเข้มข้นของสาร PAH ในตัวอย่างปัสสาวะ และพลาสมาด้วยวิธีของ Smith, *et al.* (1945) โดยการนำสารตัวอย่างเจือจางใน 3.2% trichloroacetic acid และวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง แล้วหาความเข้มข้นของสาร PAH ในสารตัวอย่างโดยการอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ PAH กับค่าการดูดกลืนแสง ดังนี้

ตัวอย่าง พลาสมา

สารละลายมาตรฐาน และตัวอย่างพลาสมา 50 µl

↓

ทำให้เจือจางด้วย 3.2% TCA 1100 µl

ผสมให้เข้ากันและปั่นแยกนาน 5นาที

↓

ดูดสารละลายใสส่วนบน 1000 µl

↓

เติม 0.2N HCl 200 µl

0.1% $NaNO_2$ 100 µl

↓

ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

↓

เติม $H_6N_2O_3S$ 100 µl

↓

ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

↓

เติม N-1-NED 100 µl

ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

ตัวอย่างปัสสาวะ

ตัวอย่างปัสสาวะ 10 µl

↓

ทำให้เจือจางครั้งที่ 1 ด้วย 3.2%

TCA 1100 µl แล้วผสมให้เข้ากัน

↓

สารละลายมาตรฐาน 50 µl และตัวอย่างปัสสาวะครั้งที่1 10 µl ทำให้เจือจางครั้งที่2ด้วย 3.2%TCA 1100 µl ผสมให้เข้ากัน

แล้วดูดสารละลาย 1100 µl

↓

เติม 0.2N HCl 200 µl

0.1% $NaNO_2$ 100 µl

↓

ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

↓

เติม $H_6N_2O_3S$ 100 µl

↓

ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

↓

เติม N-1-NED 100 µl

ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

↓

อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโซเดียม (sodium) **และ โปแทสเซียม** (potassium)

การหาความเข้มข้นของโซเดียม และโปแทสเซียม ในตัวอย่างปัสสาวะ และพลาสมา โดยการอ่านค่าจากเครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer) ถ้าความเข้มข้นของโซเดียม และ โปแทสเซียมในตัวอย่างปัสสาวะสูงเกินกว่าที่เครื่องจะอ่านได้ต้องทำให้เจือจางด้วย deionized water แล้วจึงอ่านค่าอีกครั้ง

การคำนวณ

การคำนวณค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MABP)

ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย คำนวณจากค่าความดันเลือดแดงช่วงหัวใจบีบตัว (systolic pressure) และช่วงหัวใจคลายตัว (diastolic pressure) ที่อ่านได้จากเครื่องโพลีกราฟ แล้วแทนค่าตามสูตร

$$MABP = DP + (SP-DP)/3$$ หน่วยเป็น มม.ปรอท

เมื่อ SP = ค่าความดันช่วงหัวใจบีบตัว (systolic pressure) หน่วยเป็น มม.ปรอท

DP = ค่าความดันช่วงหัวใจคลายตัว (diastolic pressure) หน่วยเป็น มม.ปรอท

การคำนวณหาอัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, V)

การคำนวณหาค่าอัตราการไหลของปัสสาวะทำโดยนำค่าความแตกต่างของน้ำหนัก eppendorf ก่อนบรรจุปัสสาวะ กับน้ำหนักหลังบรรจุปัสสาวะ มาประมาณปริมาณปัสสาวะ โดยน้ำหนักปัสสาวะ 1 กรัม มีค่า 1 มล. แล้วหารด้วยจำนวนเวลาที่เก็บตัวอย่างคือ

$$V\ (\text{ไมโครลิตร/นาที}) = \frac{\text{ความแตกต่างของน้ำหนัก eppendorf (กรัม)}}{\text{ระยะเวลาที่เก็บปัสสาวะ (นาที)}} \times 1000$$

การคำนวณค่าเคลียรานซ์

ค่าเคลียรานซ์ของสารใด ๆ (สาร X) **คำนวณได้จากสูตร**

$$C_x = [U_x]\ V / [P_x]$$ หน่วยเป็น มล./นาที

โดยที่ X = สารตัวอย่าง เช่น PFS, PAH, Na^+, K^+

C_x = เคลียรานซ์ของสาร X หน่วยเป็น มล./นาที

$[U_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในตัวอย่างปัสสาวะ หน่วยเป็น มก. /มล.

$[P_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในตัวอย่างพลาสมา หน่วยเป็น มก. /มล.

V = อัตราการไหลของปัสสาวะ หน่วยเป็น มล./นาที

การคำนวณค่าอัตราการกรองของไต และปริมาณพลาสมาที่ไหลผ่านไต

ค่าอัตราการกรองของไต หรือ glomerular filtration rate (GFR) ใช้ค่าเคลียรานซ์ของ PFS (C_{PFS}) (Berglund, 1965) ส่วนปริมาณพลาสมาที่ไหลผ่านไต ใช้ค่าเคลียรานซ์ของ PAH (C_{PAH}) โดยการคิดค่า extraction ratio ของ PAH เท่ากับ 0.90 (Schafer, 1998)

การคำนวณค่า fractional excretion (FE) ของโซเดียม และโปแทสเซียม

$FE_X = (C_X/GFR) \times 100$ หน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์

โดยที่ X = Na^+ หรือ K^+

C_X = เคลียรานซ์ของสาร X หน่วยเป็น มล./นาที

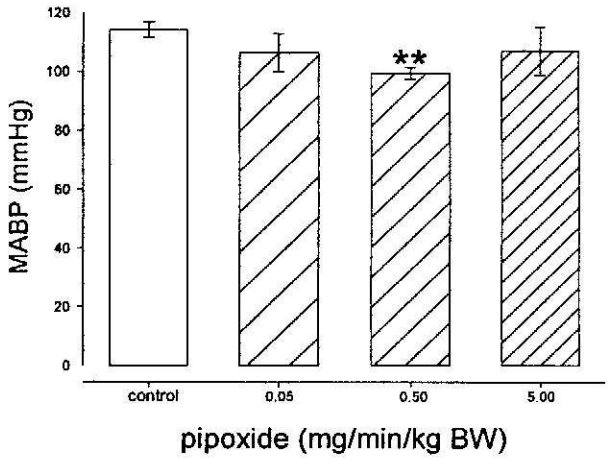
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าที่ได้จากการศึกษาผลของพิพอกไซด์ต่อความดันเลือดแดง และการทำงานของไตโดยวิธีเคลียรานซ์เป็นค่าเฉลี่ย และค่าผิดพลาดมาตรฐาน (mean ± S.E.M.) ของแต่ละกลุ่มการทดลอง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Student's unpaired t-test โดยจะยอมรับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P < 0.05$

ผลการทดลอง

ผลของพิพอกไซด์ต่อค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย

รูปที่ 18 แสดงผลค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MABP) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารละลายพิพอกไซด์ทั้งสามขนาด ในช่วงเวลาทดลอง 3 ชั่วโมงนั้น ค่า MABP ของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 114 ± 3 มม. ปรอท (n = 6) ส่วนในกลุ่มทดลองที่ให้สารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.05 และ 5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว พบว่าค่านี้ลดลงเป็น 106 ± 6 และ 107 ± 8 มม. ปรอท (n = 6 ทั้งสองกลุ่ม หรือลดลง 8 และ 7 มม.ปรอท ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลของ MABP ในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว มีค่าเท่ากับ 99 ± 2 มม. ปรอท (n = 7) หรือลดลง 15 มม.ปรอท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 18 แสดงผลของพิพอกไซด์ต่อค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MABP) ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองซึ่งได้รับสารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.05 0.5 และ 5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับ ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M.

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กับกลุ่มทดลองที่ค่า $P < 0.01$ (student unpaired t-test)

ผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไตหนู

ตารางที่ 12 แสดงผลของพิพอกไซด์ทั้งสามความเข้มข้นต่อการทำงานของไตหนู พบว่าอัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, V), อัตราการกรองของไต (GFR), พลาสมาที่ไหลผ่านไต (RPF), ความเข้มข้นของโซเดียมในพลาสมา (plasma sodium concentration, P_{Na}) โซเดียมที่ถูกขับทิ้งในปัสสาวะ (urinary sodium excretion, $U_{Na}V$) fractional sodium excretion (FE_{Na}) ความเข้มข้นของโปแทสเซียมในพลาสมา (plasma potassium concentration, P_K) โปแทสเซียมที่ถูกขับทิ้งในปัสสาวะ (urinary potassium excretion, U_KV) และ fractional potassium excretion (FE_K) ของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับพิพอกไซด์ขนาด 0.05 0.5 และ 5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 12 ผลของสารละลายพิพอกไซด์ขนาดต่างๆ ต่อการทำงานของไตหนู

	กลุ่มควบคุม	พิพอกไซด์ *(มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว)*			Level of significant
		0.05	0.5	5	
Number of rats	6	6	7	6	-
Kidney weight (KW) *(g/100g body weight)*	0.68±0.02	0.74±0.05	0.71±0.02	0.72±0.02	NS
Hematocrit *(%)*	45.2±0.7	45.2±0.9	43.8±0.4	45.4±1.0	NS
Urine flow rate (V) *(μl/min/gKW)*	31.2±4.0	25.2±4.8	27.7±3.8	32.5±5.7	NS
GFR *(ml/min/gKW)*	1.96±0.12	1.67±0.19	1.73±0.07	1.76±0.12	NS
RPF *(ml/min/gKW)*	4.41±0.38	3.79±0.41	4.76±0.22	4.44±0.25	NS
P_{Na} *(mmol/l)*	139.7±3.4	131.7±3.2	138.4±1.4	140.2±4.3	NS
$U_{Na}V$ *(mmol/min/gKW)*	2.92±0.46	2.90±0.23	3.57±0.63	3.76±0.77	NS
FE_{Na} *(%)*	1.04±0.18	1.36±0.16	1.54±0.31	1.58±0.32	NS
P_K *(mmol/l)*	3.30±0.10	3.32±0.08	3.23±0.07	3.36±0.07	NS
U_KV *(mmol/min/gKW)*	1.28±0.12	0.94±0.10	1.22±0.05	1.07±0.10	NS
FE_K *(%)*	19.9±1.3	18.3±1.6	22.6±1.6	18.9±2.1	NS

ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. ทดสอบโดยใช้ Student's unpaired t-test ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (NS = non – significant difference) เมื่อเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุม

อภิปรายผลการทดลอง

ผลของพิพอกไซด์ต่อความดันเลือด

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 7 พบว่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.05 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว ซึ่งเป็นขนาดต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองนี้พบว่าทำให้ค่านี้ลดลง 8 มม. ปรอท อย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายพิพอกไซด์เพิ่มขึ้น 10 เท่า คือเป็น 0.5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว จะทำให้ความดันเลือดลดลงประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับการให้ในขนาดต่ำสุด คือลดลง 15 มม. ปรอท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเพิ่มขนาดของพิพอกไซด์เป็น 100 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดคือ 5.0 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว ไม่ได้ทำให้ค่าความดันเลือดลดลงมากขึ้น ในขณะเดียวกันกลับพบว่าค่านี้ลดลงเพียง 8 มม. ปรอท เท่านั้นทั้งนี้อาจเกิดจากการออกแบบการทดลองในกลุ่มทดลองที่ 3 นี้ ที่ไม่ได้ให้พิพอกไซด์แบบ bolus injection เช่นเดียวกับในกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 และการให้พิพอกไซด์แบบ continous infusion เพิ่มขึ้นอีก 30 นาที เพื่อชดเชย (ดังแสดงในรูปที่ 6 ของการออกแบบการทดลอง) อาจไม่ทำให้ปริมาณพิพอกไซด์ในเลือดสูงพอจนกระทั่งเห็นผลการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 การที่ไม่สามารถให้สารในขนาดความเข้มข้นสูงสุดที่ออกแบบไว้ในการทดลองตอนเสนอโครงการได้ เนื่องจากในการเตรียมสารละลายพิพอกไซด์นั้นต้องละลายในตัวทำละลายหรือ solvent คือ DMSO ก่อน จากนั้นจึงนำมาละลายต่อใน vehicle control solution (0.9 % NaCl) สำหรับ bolus injection และ 8% PFS + 1% PAH ใน 0.9 % NaCl สำหรับ continuous infusion ซึ่งพบว่ามีการตกตะกอนเกิดขึ้น ดังนั้นในการให้สารละลายพิพอกไซด์เข้าทางหลอดเลือดดำจึงต้องกรองผ่าน disposable filter ที่ขนาดรู 0.20 ไมโครเมตร ก่อนทุกครั้ง ดังนั้นปริมาณพิพอกไซด์ที่ออกฤทธิ์คือปริมาณเฉพาะที่ละลายใน vehicle control solution เท่านั้น ในกรณี bolus injection ของกลุ่มทดลองที่ 3 ที่ไม่สามารถทำได้เนื่องจากมีปริมาณตะกอนเกิดขึ้นมากจนไม่สามารถกรองได้

อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้สรุปได้ว่า พิพอกไซด์สามารถออกฤทธิ์ลดความดันเลือดแดงเฉลี่ยในหนูขาวที่สลบ เนื่องจากความดันเลือดแดงเฉลี่ย หรือ MABP เป็นผลซึ่งเกิดจากค่า 2 ค่า คือปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจต่อหน่วยเวลา (cardiac output หรือ CO) และค่าความต้านทานโดยรวมของหลอดเลือด (total peripheral resistance หรือ TPR) ค่า CO นั้นสามารถประมาณได้จากค่าอัตราการเต้นของหัวใจ (heart rate หรือ HR) และ ค่าปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจเมื่อหัวใจบีบตัว 1 ครั้ง (stroke volume หรือ SV) จากการทดลองนี้ พบว่า สารละลายพิพอกไซด์ขนาด 0.5 มก./นาที/กก.น้ำหนักตัว มีผลทำให้ความดันเลือดในหนูขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงอาจเป็นไปได้ว่าพิพอกไซด์อาจออกฤทธิ์ทำให้ค่า TPR, CO, HR หรือ SV ค่าใดค่าหนึ่งลดลงหรือทั้งสองหรือสามค่าในสี่ค่าดังกล่าวลดลง โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าอื่นๆ ที่เหลือ หรือจะเป็นการผสมผสานของการลดลงที่มากกว่าการเพิ่มขึ้นของค่าทั้งสี่ ที่ทำให้ภาพรวมของ MABP ลดลง จากผลการศึกษาในตอนที่ 2.1 (*in vitro* experiment) พิพอกไซด์ทำให้ความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบลำไส้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรือเกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบดังกล่าว ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าพิพอกไซด์อาจมีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือดคลายตัวได้เช่นกัน ส่วนกลไกการออกฤทธิ์ของพิพอกไซด์ในการลดความดันเลือดนั้นอาจเป็นไปได้ตั้งแต่ 1) ระดับ

การยับยั้งการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดหดตัว 2) ระดับการออกฤทธิ์ต่อตัวรับที่ผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด 3) ระดับการสร้าง second messenger ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด และ 4) ผลต่อการสร้าง humoral factor(s) ที่มาออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) หรือกลไกโดยทางอ้อมอื่นๆ ได้อีกเช่นกัน เนื่องจากกลไกการควบคุมความดันเลือดในร่างกายโดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีความสลับซับซ้อนมาก ทั้งที่เกิดจากระบบประสาทและฮอร์โมน และสารอื่นที่ร่างกายสร้างขึ้นและมี half life ในร่างกายสั้นมากด้วย

ในรายงานการวิจัยนี้ขอเสนอสมมุติฐานของการลดลงของความดันเลือดที่เกิดจากพิพอกไซด์ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (หรือการลดลงของ TPR) ว่ามีความเป็นไปได้มากกว่าการลดลงของ CO เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นใน isolated atrium ของหัวใจหนูขาวพบว่าสารละลายพิพอกไซด์มีแนวโน้มเพิ่มความแรงในการบีบตัวของหัวใจและเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ (ไม่ได้รายงานผลการทดลองในโครงการวิจัยนี้)

ผลของพิพอกไซด์ต่อการทำงานของไต

ผลของพิพอกไซด์ต่อปริมาณพลาสมาที่ไหลผ่านไต (RPF) **อัตราการกรองของไต** (GFR) **และอัตราการไหลของปัสสาวะ** (V)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 9 พบว่าสารละลายพิพอกไซด์ทั้ง 3 ขนาดความเข้มข้นที่ให้ในหนูเป็นเวลา 3 ชั่วโมงนั้น ไม่ได้ทำให้ค่า RPF, GFR และ V แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มควบคุม ในภาวะปกตินั้นไตจะมีกระบวนการ autoregulation คือสามารถควบคุมปริมาณ RPFและ GFR ให้คงที่เมื่อความดันเลือดเปลี่ยนแปลงในช่วง 80-180 มม. ปรอทซึ่งจะมีประโยชน์ต่อไตเองในการรักษาระดับเกลือแร่และของเหลวในร่างกายให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด ในกลุ่มทดลองที่สองที่พบว่าสารละลายพิพอกไซด์ทำให้ความดันเลือดลดลงเป็น 99 ± 2 มม. ปรอท (n = 7) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่มีค่า 114 ± 3 มม. ปรอท (n = 6) ซึ่งการลดลงโดยเฉลี่ย 15 มม. ปรอท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินี้ไม่ทำให้ค่า RPFและ GFR เปลี่ยนแปลงไปด้วยแต่อย่างใด แสดงว่าในขณะนั้นไตยังคงมีกระบวนการ autoregulation อย่างสมบูรณ์ หรือพิพอกไซด์ไม่ได้ทำให้กลไก autoregulation ของไตเกิดการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด

ส่วนผลของพิพอกไซด์ต่ออัตราการไหลของปัสสาวะนั้น พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อทั้งค่า RPF และ GFR ไม่เปลี่ยนแปลง คือปริมาณพลาสมาที่มายังไตและอัตราการกรองของไตไม่เปลี่ยนแปลง อัตราการไหลของปัสสาวะจึงไม่เปลี่ยนแปลงด้วย

ผลของพิพอกไซด์ต่ออัตราการขับทิ้งโซเดียมและโปแตสเซียม

ในภาวะปกติโซเดียมจะถูกขับทิ้งประมาณ 1% เมื่อเทียบกับปริมาณที่กรองออกมา ซึ่งผลการทดลองในกลุ่มควบคุมค่าสัดส่วนการขับทิ้งโซเดียมเมื่อเทียบกับปริมาณการกรอง (fractional sodium excretion, FE_{Na}) จะเท่ากับ 1.04% ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งจัดว่าอยู่ในระดับปกติ เป็นที่น่าสังเกตว่าในกลุ่มที่ได้รับพิพอกไซด์ทั้ง 3 ขนาดนั้น ค่า FE_{Na} มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น 30-50% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพิพอกไซด์ ขนาด 0.5 มก./นาที/กก. น้ำหนักตัว ทำให้ความดันเลือดลดลง 15 มม.ปรอท อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3 แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง RPF และ GFR หรือแม้กระทั่งอัตราการขับปัสสาวะ พบว่าการขับทิ้งโซเดียมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เป็นที่น่าสนใจว่าแนวโน้มการออกฤทธิ์ของพิพอกไซด์ (ถ้าหากมีการทดลองเพิ่มเติมจนกระทั่งพิสูจน์ได้ว่ามีนัยสำคัญทางสถิตินั้น) จะสามารถยับยั้งการดูดกลับโซเดียมที่หลอดไตฝอย (renal tubule) ส่วนใดส่วนหนึ่งมากกว่าการเกิดจากการลดปริมาณการกรองลง ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับกลไกการออกฤทธิ์ของยาขับปัสสาวะบางตัว

สำหรับผลของพิพอกไซด์ต่ออัตราการขับทิ้งโปแตสเซียมนั้นพบว่า ทั้งค่า potassium excretion rate, U_KV และค่า fractional potassium excretion (FE_K) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 9 ทั้งนี้หากแนวโน้มของพิพอกไซด์ทำให้การขับทิ้งของโซเดียมเพิ่มขึ้น กลไกนี้ไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับการขับทิ้งโปแทสเซียมที่เกิดขึ้นที่เซลล์หลอดไตฝอย

สรุปผลการทดลองและอภิปรายทั่วไป

สารพิพอกไซด์บริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบของต้นกล้วยหมูสังนี้ จะถูกนำมาละลายใน dimethyl sulfoxide หรือ DMSO เพื่อทำเป็น stock solution ก่อนที่นำมาละลายใน Tyrode และ Krebs-Ringer solution (ใน *in vitro* experiment) และ 0.9% NaCl (ใน *in vivo* experiment) เป็นที่น่าสังเกตว่าสารพิพอกไซด์จะละลายหมดใน DMSO แต่จะตกตะกอนเมื่อนำมาละลายต่อใน physiological solution ใน *in vitro* experiment ตะกอนที่เกิดขึ้นจะปล่อยให้อยู่ใน organ bath แต่สำหรับ ใน *in vivo* experiment นั้นจะกรองตะกอนผ่าน disposable filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำเฉพาะสารละลายใสมาใช้ทดสอบ ในกรณีนี้อาจทำให้ความเข้มข้นของสารพิพอกไซด์ที่ออกฤทธิ์ต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ ลดลงจากความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ใน *in vitro* experiment ความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ใน organ bath คือ 0.25×10^{-5} M ทำให้ความถี่ในการหดตัวเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะยังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของความแรงในการหดตัว ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหากมีการใช้พิพอกไซด์เป็น agonist หรือ antagonist ในทางสรีรวิทยาจะสามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-5} M ได้หลายเท่า สำหรับใน *in vivo* experiment ปริมาณสารพิพอกไซด์ที่ให้แบบ bolus injection ขนาด 10 มก./กก.น้ำหนักตัว ตามด้วยแบบ continuous infusion ขนาด 0.5 มล./กก.น้ำหนักตัว เป็นขนาดต่ำที่สุดที่ทำให้ความดันเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจะเท่ากับระดับความเข้มข้นเดียวกับสารที่ใช้ลดความดันเลือด ชื่อ candesartan ซึ่งออกฤทธิ์เป็น angiotensin receptor antagonist (Cervenka, *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามในรายงานเดียวกัน candesartan ที่ความเข้มข้นลดลง 5 เท่าก็ยังให้ผลลดความดันเลือดเช่นกัน ส่วนพิพอกไซด์ในการทดลองนี้นั้นไม่ได้ละลายหมด ดังนั้นความเข้มข้นที่ออกฤทธิ์อาจจะต่ำกว่าที่เตรียมตอนแรกเพราะมีการกรองตะกอนออก ถ้าหากมีการสังเคราะห์อนุพันธุ์ของพิพอกไซด์จากส่วนที่สกัดได้จากธรรมชาติ เพื่อทำให้ละลายได้มากขึ้นใน physiological solution จะเป็นประโยชน์มากในการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่อไป

เป็นที่น่าสังเกตว่าการเลือกใช้ตัวทำละลายหรือ solvent ของพิพอกไซด์ในโครงการวิจัยนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากพิพอกไซด์ละลายได้น้อยมากหรือไม่ละลายใน solvent ที่ใช้เป็นตัวทำละลายยาทั่วไป เช่น 0.9% NaCl, ethanol, propylene glycol เป็นต้น แต่ละลายได้ดีมากใน DMSO และ chloroform ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ DMSO เป็น solvent เนื่องจากมีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับ DMSO ตั้งแต่ ค.ศ. 1952 จนถึงปัจจุบันในทางเคมีและทางคลีนิค และพบว่านอกจากจะใช้เป็นตัวทำละลายยา (drug solvent) อีกประเภทหนึ่งที่แพร่หลายแล้ว DMSO ยังใช้เป็น analgesic, anti-inflammatory agents และ penetrant carrier เพื่อเร่งการดูดซึมยาอีกด้วย (Merck Index, 1989)

ในการทดลองแบบ *in vitro* experiment เพื่อศึกษาผลของ DMSO ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบนั้น พบว่าในกล้ามเนื้อเรียบลำไส้เล็ก DMSO ที่ความเข้มข้น 0.1% ใน physiological solution มีผลลดความถี่การหดตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าจะไม่มีผลต่อความแรงการหดตัว และ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.025% มีผลลดทั้งความถี่และความแรงการหดตัวกล้ามเนื้อเรียบมดลูกอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ รายงานผลของ DMSO ที่ความเข้มข้นต่ำ (1% by volume) ต่อ neuromuscular transmission ของกบ ทำให้ time course of decay ของ miniature endplate currents (MEPCs) ยาวนานขึ้น (McLarnon *et al.*,1986) ซึ่งแสดงว่า DMSO ออกฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าที่ผนังเซลล์กล้ามเนื้อได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการออกฤทธิ์ของ DMSO (ขนาด 0.2%) ต่อการหดตัวกล้ามเนื้อเรียบของ sphincter of Oddi ว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ baseline amplitude, frequency และ peak amplitude of contraction ที่เกิดจากการให้ hydrogen peroxide ได้ (Cullen, *et al.*, 1997) :ซึ่งผลการวิจัยโดยใช้ DMSO ครั้งนี้จะสอดคล้องกับรายงานดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามในโครงการวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบเฉพาะผลของสารละลายพิพอกไซด์ใน DMSO กับ physiological solution ที่มี DMSO ปริมาณเท่ากัน ดังนั้นจึงผลการทดลองหรือการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่บันทึกได้จึงมาจากผลของพิพอกไซด์เท่านั้น

ในทำนองเดียวกัน ใน *in vivo* experiment ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO เมื่อเทียบค่า MABP และค่าการทำงานของไต กับกลุ่มปกติที่ได้รับเพียง clearance markers ที่ละลายใน 0.9% NaCl (ตารางที่ 10) พบว่า DMSO ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง hemodynamics และ kidney function บางประการได้แก่ การเพิ่มขึ้นของค่า hematocrit (จาก 42.6 เป็น 45.2%) และค่า mean arterial blood pressure (จาก 100 เป็น 114 mmHg) สำหรับการทำงานของไตนั้น จะพบว่าค่าที่เพิ่มขึ้นได้แก่ urine flow rate (จาก 12.1 เป็น 31.2 µl/min/gKW), GFR (จาก 1.34 เป็น 1.96 ml/min/gKW) และ plasma sodium concentration (จาก 126.9 เป็น 139.7 mmol/l) ส่วนค่าที่ลดลงได้แก่ ค่า fractional sodium excretion (จาก 2.15 เป็น 1.04 %)

ผลของ DMSO ต่อ cardiovascular system และ renal function ในรายงานย้อนหลังไป 30-40 ปีนั้นมีทั้งรายงานการเปลี่ยนแปลงไปทางบวกและลบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดยา วิธีการที่ให้ยา การออกแบบการทดลอง และชนิดเนื่อเยื่อที่ใช้ทดลองแบบ *in vitro* และ species ที่ใช้ในการทดลองแบบ *in vivo* ตัวอย่างเช่นรายงานการทดลองที่ใกล้เคียงกับการทดลองนี้ แต่ทำในสุนัขนั้น DMSO ในขนาด 100 mg/kg ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ cardiac output, stroke volume, central venous pressure และการลดลงของ heart rate อย่างมีนัยสำคัญ (Clifford, *et al.*, 1983) แต่มีรายงานว่า DMSO ในขนาดที่สูงถึง 2 g/kg ที่ให้ในสุนัขที่สลบทำให้ค่า systemic diastolic pressure และค่า vascular resistance ลดลง (Hameroff, *et al.*, 1981) และในรายงานการทดลองที่ให้ DMSO สูงระหว่าง 2-8 g/kg ในสุนัขทำให้ค่า cardiac index เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า left and right ventricular blood flow เพิ่มด้วย แต่ค่า kidney blood flow ลดลง (Kassell, *et al.*, 1983) อย่างไรก็ตามในการทดลองแบบ in vivo ของการวิจัยโครงการนี้ ปริมาณ DMSO ที่ให้ตลอดการทดลองประมาณ 0.8 ml/kg หรือคิดเป็น 0.88 g/kg (DMSO 1 litre = 1.10 kg) จึงเป็นไปได้ว่าจะเป็นขนาดที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ arterial blood pressure ถึง 14 mmHg ซึ่งการเปลี่ยนแปลง systemic arterial pressure นี้ น่าจะส่งผลต่อ renal hemodynamics ด้วย แต่จากการทดลองพบว่าค่า renal plasma flow ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ถ้าจะคำนวณค่า renal blood flow (RBF) จากค่า renal plasma flow (RPF) และค่า hematocrit ที่เพิ่มนั้น

จะพบว่า ค่า RBF จะเพิ่มขึ้นถ้า hematocrit เพิ่มขึ้น ตามสูตร RBF = RPF (100/100-hematocrit) ส่วนการเพิ่มขึ้นของค่า GFR หากไม่ได้เป็นผลอย่างมีนัยสำคัญจากการเพิ่มขึ้นของค่า RPF ก็จะเป็นผลโดยตรงของ DMSO ต่อค่าสัมประสิทธิ์การกรอง (filtration coefficient หรือ K_f)

ตารางที่ 13 ผลของ dimethyl sulfoxide (DMSO) ต่อความดันเลือดแดงและการทำงานของไตหนู

	Vehicle solvent (clearance markers in 0.9% NaCl)	DMSO group	P value
Number of rats	6	6	-
Kidney weight (KW) *(g/100g body weight)*	0.76 ±0.03	0.68 ±0.02	<0.05
Hematocrit *(%)*	42.6 ±0.6	45.2 ±0.7	<0.05
Mean arterial blood pressure *(mmHg)*	99.6 ± 2	114.0 ± 2.6	<0.05
Urine flow rate (V) *(μl/min/gKW)*	12.1 ±3.0	31.2 ±4.0	<0.01
GFR *(ml/min/gKW)*	1.34 ±0.07	1.96 ±0.12	<0.01
RPF *(ml/min/gKW)*	4.31 ±0.50	4.41 ±0.38	NS
P_{Na} *(mmol/l)*	129.8 ± 3.5	139.7 ±3.4	<0.05
$U_{Na}V$ *(mmol/min/gKW)*	3.68 ±0.56	2.92 ±0.46	NS
FE_{Na} *(%)*	2.15 ±0.35	1.04 ±0.18	<0.001
P_K *(mmol/l)*	3.25 ±0.10	3.30 ±0.10	NS
U_KV *(mmol/min/gKW)*	1.23 ±0.03	1.04 ± 0.13	NS
FE_K *(%)*	21.8 ±2.8	19.9 ± 1.3	NS

ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ±S.E.M. ทดสอบโดยใช้ Student's unpaired t-test

ค่า P ที่แสดงเป็นค่าเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ DMSO ละลายใน vehicle solvent และกลุ่มที่ได้รับ vehicle solvent (clearance markers in 0.9% NaCl)

สำหรับค่า urine flow rate ที่เพิ่มขึ้นจากการให้ DMSO เกือบ 3 เท่า ในการทดลองนี้อาจจะเป็นผลจากการที่ค่า GFR เพิ่มขึ้น มีรายงานการเพิ่มของทั้ง GFR และ urine flow rate จากการให้ DMSO (ขนาด 16.5-111 µg/kg/hr, iv) ใน newborn rabbit เช่นกัน (Rijtema, *et al.*, 1999) ในการทดลองนี้การเพิ่ม urine flow rate จะทำให้เกิดการสูญเสียของเหลวออกจากร่างกายมากกว่าปกติ ทำให้ค่า hematocrit สูงขึ้นและ plasma sodium concentration สูงขึ้นด้วย (ตารางที่ 13)

เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า fractional sodium excretion (C_{Na}/GFR) กลับลดลงในการทดลองนี้ในขณะที่ urine flow rate เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่า renal tubular cell สามารถดูดกลับโซเดียมได้มากขึ้น ส่งผลให้การขับทิ้งโซเดียมลดลงประมาณ 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเพิ่มการดูดกลับโซเดียมที่เกิดจากการให้ DMSO ในการทดลองนี้ ยืนยันได้จากระดับ plasma sodium concentration ที่เพิ่มจาก 129.8 mmol/l ในกลุ่ม vehicle solvent เป็น 139.7 mmol/l เมื่อได้รับ DMSO (P value <0.05)

สำหรับ potassium excretion เมื่อได้รับ DMSO นั้น จะเห็นได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ในภาวะปกติกลไกหนึ่งในการดูดกลับโซเดียมของ renal tubular epithelial cell จะเป็นการแลกเปลี่ยนกับการคัดหลั่งโปแตสเซียม ซึ่งในกรณีนี้อาจสรุปได้ว่าการกลไกดูดกลับโซเดียมที่เพิ่มขึ้นหลังได้รับ DMSO ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการขนส่งโปแตสเซียมแต่อย่างใด

เอกสารอ้างอิง

Berglund, F. 1965. Renal clearance of inulin, polyfructosan–S– and a polyethylene glycol (PE6 1000) in the rat. **Acta Physiol Scand.** 64 : 218-244.

Cervenka,L., Wang, C.T. and Navar, L.G. 1998. Effects of acute AT1 receptor blockade by candesartan on arteial pressure and renal function in rats. **Am J Physiol (Renal Physiol. 43)** 274 : F940-F954.

Clifford, D.H., Lee, D.C. and Lee, M.O. 1983. Effects of dimethyl sulfoxide and acupuncture on the cardiovascular system of dogs. **Ann N Y Acad Sci.** 411(1) : 84-93

Cullen, J.J., Ledlow, A., Murray, J.A. and Conklin, J.L. 1997. Effect of hydroxyl radical (OH) on sphincter of Oddi motility. **Digestion.** 58(5) : 452-457.

Fuhr, J., Kaczmarczyk, K. and Kruttgen, D. 1955. Eine einfache colormetrisch method zur inulinbestimmung fumieren-Cl; rarance-untersuchungen bei stoffwechselgesunden und diabetkem. **Klinische Wochenschrift.** 33 : 729-730.

Hameroff, S.R., Otto, C.W., Kanel., J., Weinstein, P.R. and Blitt, C.D. 1981. Acute cardiovascular effects of dimethyl sulfoxide. **Crit Care Med** 9(12) : 855-857.

Johnson, L.R. 1994. Physiology of Gastrointestinal Tract, vol1, 3rd ed., Raven Press, New York. pp 977-979.

Johnson, L.R. and Gerwin, T.A. 2001. Gastrointestinal physiology 6th ed., Mosby, Inc. Missouri. pp 17-21 and 47-54.

Kassell, N.F., Sprowell., J.A. Boarini, D.J. and Olin, J.J. 1983. Effect of dimethyl sulfoxide on the cerebral and systemic circulations of the dogs. **Neurosurgery.** 12(1) : 24-28.

McLarnon, J.G., Saint, D.A. and Quastel, D.M. 1986. The actions if dimethyl sulfoxide on neuromuscular transmission. **Mol Pharm.** 30 (6) : 631-638.

Merck Index, The. 1989. 11th ed. Merck & CO., Inc. USA.

Rijtema, M., Mosig, D., Drukker, A. and Guignard, J.P. 1999. The effects of dimethyl sulfoxide on renal function of the newborn rabbit. **Biol Neonate.** 76(6) : 355-361.

Smith, H.W., Finklestein, N., Aliminosa, L., Crawford, B. and Grabra, M. 1945. The renal clearance of substituted hippuric acids derivatives and other aromatic acids in dog and man. **J Clin Invest.** 24 : 388-404.

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ-นามสกุล นางศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา สกุลเดิม สรสุชาติ

Mrs. Siriphun Hiranyachattada (Sorrasuchart)

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ จังหวัด สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074 288212, 074 288218 และ 074 446680 โทรสาร 074 446680

E-mail address hsiriphu@ratree.psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

2522	วท.บ. (ชีววิทยา)	สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย
2526	วท.ม. (สรีรวิทยา)	สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
2540	Ph.D. (Renal Physiology)	สถาบัน The University of Melbourne, Australia

ประวัติการทำงาน

2526-2543	อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2540-2543	หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2543-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งงานอื่น ๆ

ประธานกรรมการบริหารหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสรีรวิทยา

กรรมการร่างหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาสรีรวิทยา

งานวิจัยที่ได้รับทุน

1. Regulation of renal proximal fluid reabsorption by angiotansin II. ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 2543-2545 (หัวหน้าโครงการ)

2. Physiological effect of pipoxide isolated from *Uvaria perpurea*. ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (หัวหน้าโครงการ)

3. The effects of *Trichinella spiralis* infection on renal function in rats. ทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2541-2542 (หัวหน้าโครงการ)

4. Effect of angiotensin II receptor antagonist on rat renal vascular resistance. ทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2542-2543 (ผู้ร่วมวิจัย)

5. Effect of cisplatin on rat renal function : a dose-response study. ทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (ที่ปรึกษาโครงการ)

6. Investigation of diuretic effects of *Ananas comosus* rhizome extract in rat. ทุนกระทรวงสาธารณสุขและ UNICEF 2528-2530 (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

1. **Hiranyachattada, S.**, Nualplub, S. and Yuenyongsawad, S. (2000). Investigation of diuretic effect of *Ananas comosus* rhizome extract in rat. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 22(2) : 199-207.

2. Hiranyachattada, P., **Hiranyachattada, S.**, Nualplub, S., Pubumpen, S. and Nontasut, P. (2000). The effects of *Trichinella spiralis* infection on renal function in rats. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 31(3) : 1-4.

3. Smart, M.L., **Hiranyachattada, S.** and Harris, P.J. (1999). Effects of angiotensin II receptor blockade on proximal fluid uptake in the rat kidney. *British J. Pharmacol.* 126 : 697-700.

4. Eitle, E., **Hiranyachattada, S.**, Hui, W. and Harris, P.J. (1998). Inhibition of proximal tubular fluid absorption by nitric oxide and atrial natriuretic peptide in rat kidney. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol)*. 274(43) : C1075-C1080.

5. Harris, P.J., Cooper, M.E., **Hiranyachattada, S.**, Berka, J.L., Kelly, D.J., Nobes, M. and Wookey, P.J. (1997). Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney. *Am. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol)*. 272 : F13-F21.

6. **Hiranyachattada, S.** and Harris, P.J. (1996). Modulation by locally produced luminal angiotensin II of proximal tubular sodium reabsorption via an AT_1 receptor. *British J. Pharmacol.* 119 : 617-618.

7. Harris, P.J., **Hiranyachattada, S.**, Kneen, M.M., Eitle, E. and Walker, L.L. (1996). Hormonal control of proximal tubular sodium transport. In: *Studies in Honour of John Artherton Young*, pp. 139-144. Eds., A. Dinudom and P. Komwatana. University of Sydney, NSW.

8. Harris, P.J., **Hiranyachattada, S.**, Antoine, A.M., Walker, L, Reilly, A.M. and Eitle, E. (1996). Regulation of renal tubular sodium transport by angiotensin II and atrial natriuretic factor. *Clin. and Exp. Pharmacol. and Physiol.* Suppl 3 : S112-S118.

9. Sophasan, S. and **Sorrasuchart, S.** (1984). Factors inducing postobstructive diuresis in rats. *Nephron* 38:125-133.

นักวิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล นาย ฉัตรชนก กะราลัย

Mr. Chatchanok Karalai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288444 โทรสาร 074- 212918

E-mail address kchatcha@ratree.psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

2516	วท.บ. (เคมี)	สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย
2518	วท.ม. (เคมีอินทรีย์)	สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย
2525	Dr.rer.nat. (เคมีอินทรีย์)	มหาวิทยาลัย Hannover ประเทศเยอรมันนี

ประวัติการทำงาน

2518-2537	อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2538-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยที่ได้รับทุน

1. การสังเคราะห์และการหาโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนชนิดใหม่ของโลหะทรานซิชันกับลิแกนด์วงแหวนขนาดใหญ่ Schiff base ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2543-2544 (ผู้ร่วมวิจัย)

2 Physiological effect of pipoxide isolated from *Uvaria perpurea*. ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (ผู้ร่วมวิจัย)

3. การสังเคราะห์สารประกอบ Crocynol และอนุพันธ์ ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2542-2543 (หัวหน้าโครงการ)

4. The sythesis and structure of transition metal complexes of novel pandant-arm macrocyclic ligands ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2542 (ผู้ร่วมวิจัย)

5. การสังเคราะห์สารประกอบ kukoamine B ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2539-2541 (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

1. W. Wongratchasee, S. Chantrapromma, H.K. Fun, A. Usman, C. Karalai, C. Ponglimanont and K. Chantrapromma. (2002), Ring Contraction in a dinuclear zinc(II) complex of a Robson Macrocycle. *Acta Cryst.* E58, m344-m346.

2. S. Chantrapromma, H. K. Fun, I. A. Razak, N. Saewon, C. Karalai, C. Ponglimanont and K. Chantrapromma. (2001). Disorder in Methyl 4-(3,5-dimethoxy-2-methylphenoxy)-2,6-dihydroxy-3-iodo-5-methylbenzoate. *Acta Cryst.*, E57, 1047-1049.

3. S. Laphookhieo, C. Karalai, S. Chantrapromma, H. K. Fun, A. Usman, Y. Rat-a-pa and K. Chantrapromma. (2001). Atomic Charges of Cerbinal. *Acta Cryst.*, C57, 1352-1353.

4. C. Karalai, N. Saewon, K. Chantrapromma, S. Chantrapromma, H. K. Fun and I. A. Razak (2001). 1-[4-(3,5-Dimethoxy-2-methylphenoxy)-2,6-dihydroxy-3-methylphenyl]ethanone. *Acta Cryst.*, E57, o18-o19.

5. S. Chantrapromma, H. K. Fun, I. A. Razak, N. Saewon, C. Karalai and K. Chantrapromma. (2000). 2-(4-Acetyl-3,5-dihydroxy-2- methylphenoxy)- 4,6-dimethoxy-3-methyl benzoic acid. *Acta Cryst.*, C56, e598-e599.

6. K. Chantrapromma, Y. Rat-a-pa, V. Seechamnanturakit, V. Lojanapiwat and C. Karalai. (2000). New Chalcone and Dihydrochalcone from *Uvaria dulcis*, dunal. *Phytochemistry*, 53,511-513.

7. S. Chantrapromma, N. Chawaleuchai, C. Karalai, K. Chantrapromma, H. K. Fun, K. Chinnakali and I. A Razak. (1998). 2,3-Dihydro-6,7-dimethyl-2- phenyl-4*H*-benzopyran-4-one. *Acta Cryst.* C54, IUC9800007.

8. C. Karalai, P. Wiriyachitra, B. Sorg, and E. Hecker. (1995). Medicinal Plants of Euphorbiaceae Occurring and Utilized in Thailand. V. Skin Irritants of the Daphnane and Tigliane Type in Latex of *Excoecaria bicolor* and the Uterotonic Activity of the Leaves of the Tree, *Phytotherapy Research*, 9, 482-488.

9. C. Karalai, P. Wirayachitra, B. Sorg and E. Hecker. (1994). Improved Access to Highly Unsaturated Skin Irritants of the Daphnane type from Latex of *Excoecaria oppositifolia*. *Planta Medica*, 60, 566-568.

10. C. Karalai, P. Wiriyachitra, H.J. Opferkuch and E. Hecker. (1994). Medicinal plants of Euphorbiaceae occuring and utilized in Thailand. III. Cryptic and Free Skin Irritants of the Daphnane and Tigliane Types in Latex of *Excoecaria agallocha*. *Planta Media*, 60, 351-355.

11. T. Schafer, B.Sorg, C. Karalai, and E. Hecker. (1994). On the Chemistry of Resiniferonol, II. Preparation and Bioactivities of 15,16-Dihydrosimplexin and Methods for its Tritium Labeling. Z. *Naturforsch.*, 49b, 128-134.

นักวิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล นาง ชนิตา พงษ์ลิมานนท์

Mrs. Chanita Ponglimanont

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288440 โทรสาร 074- 212918

E-mail address kchanita@ratree.psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

2516	B.S. (เคมี)	มหาวิทยาลัยมินนีโซตา ประเทศสหรัฐอเมริกา
2518	M.S. (เคมีอินทรีย์)	มหาวิทยาลัยมินนีโซตา ประเทศสหรัฐอเมริกา

ประวัติการทำงาน

2518-2522	อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2523-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2534-2540	หัวหน้าภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยที่ได้รับทุน

1. องค์ประกอบทางเคมีจากดอกตีนเป็ดฝรั่ง ทุนมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2542-2543 (หัวหน้าโครงการ)

2. Physiological effect of pipoxide isolated from *Uvaria perpurea*. ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

1. W. Wongratchasee, S. Chantrapromma, H.K. Fun, A. Usman, C. Karalai, **C. Ponglimanont** and K. Chantrapromma. (2002). Ring Contraction in a dinuclear zinc(II) complex of a Robson Macrocycle. *Acta Cryst.* E58, m344-m346.

2. S. Chantrapromma, H. K. Fun, I. A. Razak, N. Saewon, C. Karalai, **C. Ponglimanont** and K. Chantrapromma. (2001). Disorder in Methyl 4-(3,5-dimethoxy-2-methylphenoxy)-2,6-dihydroxy-3-iodo-5-methylbenzoate. *Acta Cryst.*, E57, 1047-1049.

3. K. Chantrapromma, R. Sortiruk, S. Chantrapromma , **C. Ponglimanont**, H.K. Fun and K. Chinnakali. (1998) 2,6-Dihydroxy-4-(6′- hydroxy-2′,4′-dimethoxy-methylbenzoyloxy)-3-methylbenzoate. *Acta Cryst*, C54, 1494-1496.

4. K. Chantrapromma, V. Seechamnanturakit, **C. Ponglimanont** , C Pakawatchai, H.K. Fun, and K. Sivakumae. (1997). 2,3-Dihydro-5- hydroxy-6,7-dimethoxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Onysilin). *Acta. Cryst,* C53, 734-736.2

นักวิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล นางญาณิศา รัตอาภา

Mrs. Yanisa Rat -a-pa

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288442 โทรสาร 074- 212918

ประวัติการศึกษา

2520	วท.บ (เคมี)	จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ประเทศไทย
2525	วท.ม. (เคมีอินทรีย์)	จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย ประเทศไทย

ประวัติการทำงาน

2537-ปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยที่ได้รับทุน

1. พิพอกไซด์และอนุพันธ์จากกล้วยหมูสัง ทุนมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2541 (หัวหน้าโครงการ)

2. Physiological effect of pipoxide isolated from *Uvaria perpurea*. ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (ผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

1. S. Laphookhieo, C. Karalai, S. Chantrapromma, H. K. Fun, A. Usman, Y. Rat-a-pa and K. Chantrapromma. (2001). Atomic Charges of Cerbinal. *Acta Cryst.* C57, 1352-1353.

2. K. Chantrapromma, Y. Rat-a-pa, V. Seechamnanturakit, V. Lojanapiwat and C. Karalai. (1999), New Chalcone and Dihydrochalcone from *Uvaria dulcis*, dunal. *Phytochemistry*, 53,511-513.

นักวิจัยหลัก

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศันสนีย์ นามสกุล สวัสดิพงษ์

Miss Sansanee Sawatdipong

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ จังหวัด สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074 288208 074 446680 โทรสาร 074 446680

E-mail address ssansane@ratree.psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

2519	วท.บ. (ชีววิทยา)	สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
2522	วท.ม. (ชีววิทยา)	สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศไทย
2533	พ.บ. (แพทยศาสตร์)	สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเทศไทย

ประวัติการทำงาน

2523-ปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งงานอื่นๆ

กรรมการวิชาการคณะวิทยาศาสตร์

งานวิจัยที่ได้รับทุน

1. Physiological effect of pipoxide isolated from *Uvaria perpurea*. ทุนวิจัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2543-2544 (ผู้ร่วมวิจัย)