สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

โรคเก๊าต์ (Gout) 5

แซนทีนออกซิเดส (Xanthine Oxidase) 6

ที่มาของการเกิดกรดยูริกในร่างกาย 7

กระบวนการสลายเพียวรีน (Purine Degradation) 8

ยาอัลโลพูรินอล (Allopurinol) 10

ผลข้างเคียงจากการใช้ยาอัลโลพูรินอล 11

โครมาโทกราฟี (Chromatography) 12

เทคนิคลิควิดโครมาโตกราฟีและแมสสเปกโตรเมตรี (LC/MS) 15

เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR Spectroscopy) 16

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 17

ไหมข้าวโพดหวาน (Sweet corn silk; stigma / style of *Zea mays* L. var. *Saccharata* Poaceae) 20

3 วิธีดำเนินการวิจัย 22

รูปแบบการวิจัย 22

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 22

การดำเนินการวิจัย 24

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง	44
น้ำหนักแห้งของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานและใบตำลึงแก่	44
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส	44
ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส	44
ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา	46
ผลของ pH ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา	48
ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (Crude extract) ตัวอย่าง ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส	49
ผลการศึกษาสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานและใบตำลึงแก่ต่อชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส	51
ผลการทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน (Total Phenolic content)	54
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay)	55
ผลการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing property) ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านและไม่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ด้วยวิธี Benedict's test	57
ผลการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยน้ำร้อนด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)	59
ผลการแยกและการเก็บส่วนสกัดย่อยจากสารสกัดไหมข้าวโพดหวานด้วยน้ำด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	60

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ผลการแยก และเก็บส่วนสกัดย่อย (fractions) ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านการทำ acid hydrolysis ด้วยเครื่อง HPLC 61

ผลของส่วนสกัดย่อยของไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านและไม่ผ่านปฏิกิริยา acid hydrolysis ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 62

ผลการวิเคราะห์แยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) สารตัวอย่างด้วยเครื่อง LC/MS 63

ผลการวิเคราะห์แยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) สารตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis 64

ผลการวิเคราะห์แยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของ Fractiion 6 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท 67

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมาตรฐานโดยใช้เทคนิค Spectroscopy ด้วยเครื่อง NMR 69

ผลการทดสอบ Vitexin และ Luteolin ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 76

5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 78

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 78

บรรณานุกรม 85

ภาคผนวก 97

ประวัติผู้วิจัย 110

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นแซนทีนต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา 25
2 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา 26
3 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของ pH ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา 27
4 การเตรียมสารผสมที่มีสารละลายแซนทีนที่ความเข้มข้นต่างๆ 29
5 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 30
6 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 30
7 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ 31
8 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ความเข้มข้นต่างๆ 32
9 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ความเข้มข้นต่างๆ 32
10 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ความเข้มข้นต่างๆ 33
11 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 34
12 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 34
13 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ที่ความเข้มข้นต่างๆ 35
14 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการแยกสารสกัดไหมข้าวโพดหวาน 40
15 ระบบ gradient system ของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) 40
16 การเก็บแต่ละ fraction ที่ค่า retention time ต่างๆ 40
17 น้ำหนักของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานและสารสกัดจากใบตำลึง 44

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

18 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวาน และใบตำลึงแก่ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในหลอดทดลอง 49

19 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และ % Yield ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำ เอทิลอะซีเตท และเฮกเซน 55

20 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทในส่วนสกัดย่อยที่ 6 (fraction 6) ของไหมข้าวโพดหวานด้วยวิธี FRAP เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid 57

21 ผลของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ทำปฏิกิริยากับ Benedict's reagent ก่อนและหลังการทำปฏิกิริยา Acid Hydrolysis 58

22 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานโดยวิธี TLC แล้วนำมา spray dry ด้วย Anisaldehyde's reagent และ Dragendorff's reagent 59

23 Retention time และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของการแตกตัวเป็นไอออนของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน 64

24 Retention time และค่ามวลต่อประจุ (m/z) ของการแตกตัวเป็นไอออนของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis 66

25 ค่า Chemical shift (δ,ppm) ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) Spectra ของ Vitexin ใน acetone $-d_6$ + D_2O 70

26 ค่า Chemical shift (δ,ppm) ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) Spectra ของ Luteolin ใน acetone $-d_6$ + D_2O 72

27 ค่า Chemical shift (δ,ppm) ^{1}H-NMR (400 MHz) และ ^{13}C-NMR (100 MHz) Spectra ของ Apigenin ใน acetone $-d_6$ + D_2O 74

28 ผลการทดสอบสารประกอบที่พบในสารสกัดไหมข้าวโพดหวานต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 76

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1 แผนภาพขบวนการสลายเพียวรีน 9

2 โครงสร้างของยาอัลโลพูรินอล 10

3 กลไกการทำงานของยาอัลโลพูรินอล 11

4 กระบวนการโครมาโทกราฟี แสดงการเคลื่อนที่ของเฟสเคลื่อนที่และองค์ประกอบของสารที่สนใจ 13

5 ส่วนประกอบที่สำคัญของแมสสเปกโตรเมตรี 14

6 หลักการทำงานของเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ แสดงการเบี่ยงเบนของมวลที่เคลื่อนที่ผ่านสนามแม่เหล็กที่ตั้งฉากกับกระดาษ 15

7 โครงสร้างทางเคมีของ 4-aminopyrazolo-(3-4-d) pyrimidine และ 2-chloro-6 (methyl amino) purine 16

8 ส่วนประกอบของเครื่อง NMR spectrometer 17

9 ไหมข้าวโพดหวาน (ส่วนของเกสรตัวเมีย style) 21

10 แสดงหลักการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วย Benedict's test 37

11 การเกิดกรดยูริกเมื่อเวลาผ่านไปของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เป็นตัวเร่ง(เส้นทึบ) ค่าความชันของเส้นตรงที่ลากสัมผัสเส้นโค้งที่ได้จากการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดยูริก กับเวลาที่ t = 0 (เส้นประ) เป็นค่าอัตราเร็วเริ่มต้น (V_o) ของปฏิกิริยา 45

12 กราฟ Line-weaver burk ระหว่าง 1/V กับ 1/[S] จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความเข้มข้นเท่ากับ Km/Vmax และจุดตัดบนแกน 1/V มีค่าเท่ากับ 1/V max ดังนั้น 1/[S] เท่ากับ -1/Km และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เลือกใช้คือ 0.06 mM 46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

13 กราฟแสดงความเข้มข้นต่างๆ ของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเมื่อให้ความเข้มข้นของสารตั้งต้นแซนทีนคงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นน้อยหรือไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากไม่มีสับสเตรทแซนทีนเหลือพอที่จะเข้าทำปฏิกิริยา ดังนั้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 0.2 unit/ml 47

14 ค่า pH ต่างๆ ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเป็นตัวเร่ง พบว่า ที่ pH 7.5 เป็นค่าที่ทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยามีค่าสูงสุด (optimum pH) โดยพิจารณาจาก pH ที่ต่ำกว่าและสูงกว่าจะพบว่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาลดลง ดังนั้นเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.5 48

15 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวาน และใบตำลึงแก่ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยาอัลโลพูรินอล (mean ± SD, n = 3) 50

16 ผลของสารมาตรฐานยาอัลโลพูรินอลต่อชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยเขียนกราฟ Line weaver – burk plot (mean ± SD, n = 3); ■ xanthine only, ◆ with 20 µg/ml 51

17 ผลของสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานต่อชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส โดยเขียนกราฟ Line weaver – burk plot (mean ± SD, n = 3); ■ xanthine only, ◆ with 20 µg/ml corn-silk 52

18 ผลของสารสกัดหยาบจากใบตำลึงแก่ต่อชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส Line weaver – burk plot (mean ± SD, n = 3); ■ xanthine only, ◆ with 20 µg/ml Coccinia grandis 53

19 กราฟรมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm 54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

20 กราฟมาตรฐานการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน ascorbic acid ในการรีดิวซ์ Fe^{3+} - TPTZ ได้เป็น Fe^{2+}-TPTZ (mean ± SD, n=3)..... 56

21 ผลการทดสอบ Benedict's ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านและไม่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis. A; สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis B; สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน C; Benedict's reagent D; สารละลาย glucose. 58

22 Chromatogram ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ทำการแยกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Column C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm ODS-3). Mobile phase: a Gradient elution with H_2O / acetonitrile (95: 5 v/v, → 5: 95 v/v). Flow rate: 1 ml/min. detection: UV 214 nm เก็บทั้งหมด 6 fractions ที่ elution time (1.5 – 3.5, 3.5 – 6.0, 6.0 – 9.0, 9.0 – 12.0, 12.0 – 16.0, 27.0 – 29.0) ตามลำดับ 60

23 Chromatogram ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysisที่ทำการแยกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Column C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm ODS-3). mobile phase : a gradient elution with H_2O / acetonitrile (95: 5 v/v, → 5: 95 v/v). flow rate: 1 ml/min. detection: UV 214 nm เก็บได้ทั้งหมด 6 fractions ที่ elution time (1.5 – 3.5, 3.5 – 6.0, 6.0 – 9.0, 9.0 – 12.0, 12.0 – 16.0, 27.0 – 29.0) ตามลำดับ 61

24 HPLC fractions ต่างๆ (Fr. 1, 2, 3, 4, 5, 6) ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านและไม่ผ่านการทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยใช้ยาอัลโลพูรินอล (10 µg/ml) เป็น standard inhibitor แสดงเป็นค่า (mean ± SD, n = 3)..... 62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

25 Chromatogram fraction ที่ 6 ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่วิเคราะห์แยกองค์ประกอบของสารด้วยเครื่อง HPLC ใช้ Column C18 (4.6 x 250 mm, 5µm). Mobile phase: a gradient elution with H_2O / CH_3CN (95: 5 v/v, → 5: 95 v/v). flow rate: 1 ml/min..... 63

26 Chromatogram fraction ที่ 6 ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ที่วิเคราะห์แยกองค์ประกอบของสารด้วยเครื่อง LC/MS ใช้ Column C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm). Mobile phase: a gradient elution with H_2O / CH_3CN (95: 5 v/v, → 5: 95 v/v). flow rate: 1 ml/min. 65

27 Standards: vitexin (A), Luteolin (B), vitexin (C). HPLC system: column, RP-C18 column (250 x 4.6 mm i.d, 5 µm) ; mobile phase, methanol: acetoitrile: acetic acid: phosphoric acid: H_2O (200:100:10:10:200, V/V); detecting wavelength, 352 nm; flow rate, 0.60 ml/min 67

28 Fraction 6 extract (A), vitexin standard (B). HPLC system: column, RP-C18 column (250 x 4.6 mm i.d, 5 µm); mobile phase, methanol-acetoitrile-acetic acid-phosphoric acid-H_2O (200:100:10:10:200, V/V); detecting wavelength, 352 nm; flow rate, 0.60 ml/min 68

29 Fraction 6 extract (A), Luteolin standard (B). HPLC system: column, RP-C18 column (250 x 4.6 mm i.d, 5 µm) ; mobile phase, methanol-acetoitrile-acetic acid-phosphoric acid-H_2O (200:100:10:10:200, V/V); detecting wavelength, 352 nm; flow rate, 0.60 ml/min 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

30 Fraction 6 extract without apigenin (A), Apigenin standard (B). HPLC system: column, RP-C18 column (250 x 4.6 mm i.d, 5 µm); mobile phase, methanol-acetoitrile-acetic acid-phosphoric acid-H_2O (200:100:10:10:200, V/V); detecting wavelength, 352 nm; flow rate, 0.60 ml/min 69

31 โครงสร้างเคมีของสารมาตรฐาน Vitexin (8-C-glucopyranosyl-apigenin)..... 71

32 โครงสร้างเคมีของสารมาตรฐาน Luteolin 73

33 โครงสร้างเคมีของสารมาตรฐาน Apigenin..... 75

34 สารมาตรฐาน (Luteolin Apigenin และ Vitexin) และยาอัลโลพูรินอลต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (mean ± SD, n=3)..... 77

35 สเปกตรา ^{1}H-NMR ของ Apigenin..... 104

36 สเปกตรา ^{13}C-NMR ของ Apigenin..... 105

37 สเปกตรา ^{1}H-NMR ของ Vitexin 106

38 สเปกตรา ^{13}C-NMR ของ Vitexin 107

39 สเปกตรา ^{1}H-NMR ของ Luteolin 108

40 สเปกตรา ^{13}C-NMR ของ Vitexin 109

อักษรย่อ

UV	=	Ultraviolet
pH	=	power of hydrogen ion concentration
MS	=	Mass spectrometry
M	=	Molar
µg/ml	=	Microgram/Milliliter
ml	=	Milliliter
SD	=	Standard Deviation
µg	=	Microgram
mM	=	Millimolar
XO	=	Xanthine oxidase
LC-MS	=	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Mg/dL	=	Milligram/deciliter
MSU	=	Monosodium urate monohydrate
XOI	=	Xanthine Oxidase Inhibitor
AHS	=	Allopurinol Hypersensitivity Syndrome
m/z	=	Mass-to-charge ratio
K_m	=	Michaelis constant
V_{max}	=	Maximum Velocity
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
RF	=	Radio frequency coil
nm	=	Nanometer
TLC	=	Thin layer chromatography
IC_{50}	=	50% Inhibition concentration