

## บทที่ 4

### รายงานผลและอภิปรายผลการศึกษา

#### รายงานผลการทดลอง

#### การอ่านผลและการแปลผลจากการวิเคราะห์ผลด้วย ELISA

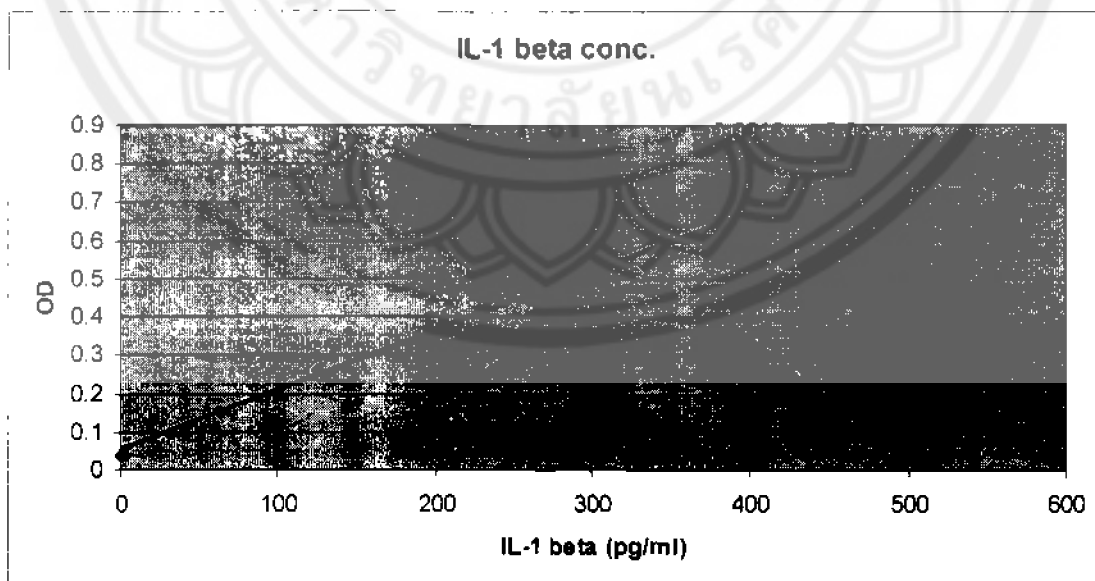
การวัดการหลัง IL-1 $\beta$  จากการวิเคราะห์ผลจากการทำ ELISA จะได้ข้อมูล คือค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  (pg/ml) และค่า optical density (OD) จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวไปเขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve)

ตารางที่ 4-1 ค่า optical density (OD) ของสารละลายมาตรฐาน ครั้งที่ 1

Conc.	OD 1	OD 2	Average
500	0.8192	0.7991	0.80915
250	0.4815	0.506	0.49375
125	0.2482	0.2663	0.25725
62.5	0.1533	0.1492	0.15125
31.25	0.0908	0.0959	0.09335
0	0.0381	0.0365	0.0373

#### วิธีการทำ Standard curve

เป็นการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  และค่า OD



รูปที่ 4-1 standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  และค่า OD ครั้งที่ 1

จาก standard curve จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  (pg/ml) และค่า OD คือ  $y = 0.0016x + 0.0555$  และได้ค่า  $R^2 = 0.9919$  จากนั้นจึงนำค่า OD เฉลี่ยของสารที่ใช้ทดสอบแต่ละตัวแทนค่าลงในสมการ เพื่อหาความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  และนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง โดยเทียบกับ negative control (NC) ซึ่งร้อยละของการยับยั้งสามารถคิดได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [( \text{sample} \times 100 ) / \text{NC}]$$

## ผลการศึกษา

ตารางที่ 4-2 ค่า % inhibition ของสารตัวอย่าง ครั้งที่ 1

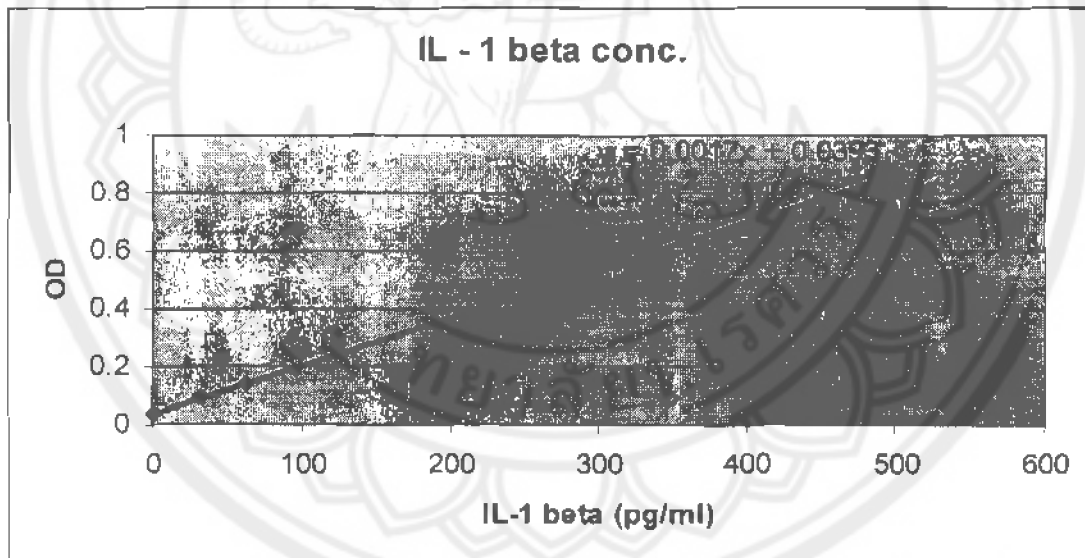
No.	OD. average	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	% inhibition
Unstimulated	0.1376	51.3	-
Negative control	0.24155	100.0	-
Dexamethasone	0.0742	11.7	89.9
AI 1	0.0485	0.0	100.0
AI 2	0.2779	139.0	-
AI 3	0.2927	148.2	-
AI 4	0.30855	158.2	-
AI 5	0.25245	123.1	-
AI 6	0.2509	122.1	-
AI 7	0.27385	136.5	-
AI 8	0.2309	109.6	5.7
AI 9	0.27365	136.3	-
AI 10	0.28865	145.5	-
AI 11	0.29145	147.5	-
AI 12	0.2049	93.4	19.7
AI 13	0.1979	89.0	23.5
AI 14	0.1194	39.9	65.7
AI 15	0.3063	156.8	-
AI 16	0.28265	142.0	-
AI 17	0.28035	140.5	-
AI 18	0.06635	6.7	94.2
AI 19	0.31575	162.7	-

จากผลการศึกษา พบว่ามีสารบางตัวที่สามารถยับยั้งการหลั่ง interleukin -1 $\beta$  ได้ดี สารเหล่านี้ ได้แก่ AI 1, 15, 16 และ 22 โดย AI 1 สามารถยับยั้งการหลั่งของ interleukin -1 $\beta$  ได้มากที่สุด มีค่า % inhibition เท่ากับ 100.00 รองลงมาเป็น AI 22, AI 16 และ AI 15 ซึ่งมีค่า % inhibition เท่ากับ 94.17, 65.65, 23.46 ตามลำดับจึงนำสารเหล่านี้มาทำการเจือจางเป็นความเข้มข้นต่างๆ แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง interleukin -1 $\beta$  อีกครั้ง ได้ผลดังนี้

## การทดลองครั้งที่ 2

ตารางที่ 4-3 ค่า optical density (OD) ของสารละลายมาตรฐานครั้งที่ 2

Conc.	OD 1	OD 2	Average
500	0.8461	0.8899	0.868
250	0.4992	0.4027	0.45095
125	0.2714	0.232	0.2517
62.5	0.1385	0.1357	0.1371
31.25	0.095	0.0935	0.09425
0	0.038	0.0391	0.03855



รูปที่ 4-2 standard curve แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  และค่า OD ครั้งที่ 2

จาก standard curve จะได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  (pg/ml) และค่า OD คือ  $y = 0.0017x + 0.0393$  และได้ค่า  $R^2 = 0.9998$  จากนั้นจึงนำค่า OD เฉลี่ยของสารที่ใช้ทดสอบ แต่ละตัวแทนค่าลงในสมการ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ IL-1 $\beta$  และนำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง โดยเทียบกับ negative control (NC) ซึ่งร้อยละของการยับยั้งสามารถคิดได้จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [( \text{sample} \times 100 ) / \text{NC}]$$

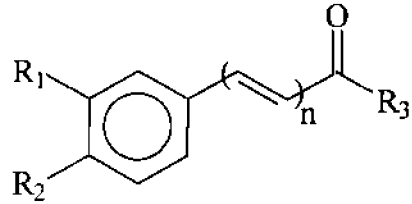
## ผลการศึกษา

ตารางที่ 4-4 ค่า % inhibition ของสารตัวอย่าง ครั้งที่ 2

No.	Conc. (mM)	Average	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	% inhibition
Unstimulated	-	0.1003	35.9	-
NC	-	0.22555	100.0	-
Dexamethasone	0.08	0.0462	4.1	96.3
piperine	0.1	0.16445	96.3	12.1
AI 1	0.1	0.0544	8.9	91.2
	0.01	0.2262	110.0	-
	0.001	0.2598	129.7	-
AI 13	0.1	0.14505	62.2	43.2
	0.01	0.17595	80.4	26.7
	0.001	0.19965	94.3	13.9
AI 14	0.1	0.11765	46.1	57.9
	0.01	0.14695	63.3	42.2
	0.001	0.203	96.3	12.1
AI 18	0.1	0.0502	6.4	94.2
	0.01	0.1466	63.1	42.4
	0.001	0.18155	83.7	23.6

จากผลการศึกษาครั้งที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของสารมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง interleukin -1 $\beta$  โดยสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงจะสามารถยับยั้งการหลั่ง interleukin -1 $\beta$  ได้มากกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ

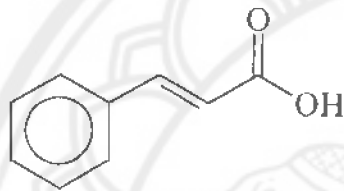
รูปโครงสร้างของไพเพอรินและอนุพันธ์ของไพเพอริน



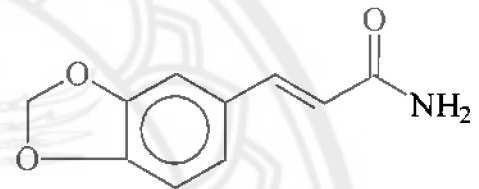
รูปที่ 5-1 แสดงโครงสร้างหลักของสารที่ทำการทดสอบ



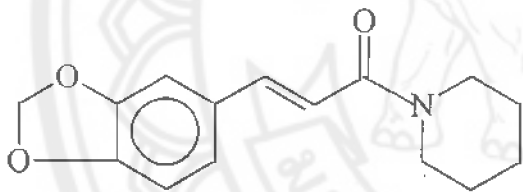
รูปที่ 5-2 แสดงโครงสร้างของ Piperine



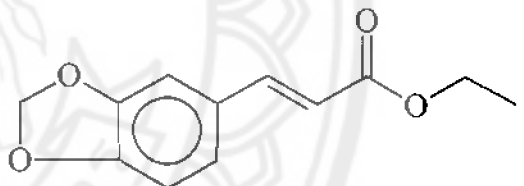
cinnamic acid



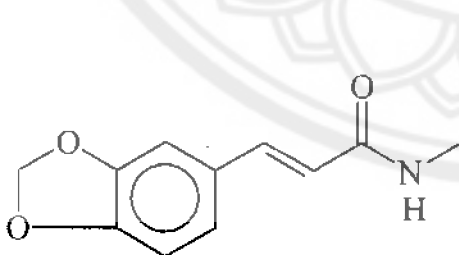
สาร 1 : AI 1



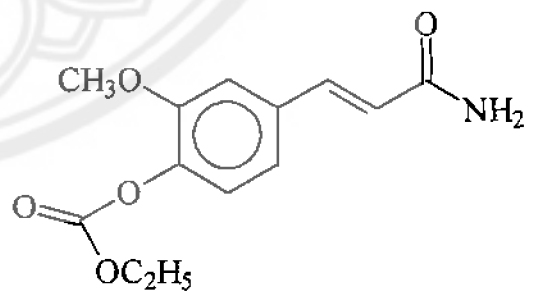
สาร 2 : AI 2



สาร 3 : AI 13



สาร 4 : AI 14



สาร 5 : AI 18

รูปที่ 5-3 แสดงโครงสร้างอนุพันธ์ของ cinnamic acid

## อภิปรายผลการศึกษา

เมื่อวิเคราะห์ถึงโครงสร้างของสาร พบว่าการลดจำนวนพันธะคู่ของสารไพเพอรินลงหนึ่งหมู่ จะได้สารอนุพันธ์ของ cinnamic acid (สาร 2) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง interleukin-1 $\beta$  ดีขึ้น จากนั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง R<sub>3</sub> เป็นหมู่แทนที่ต่างๆ เช่น amine group, hydroxy group และ alcohol group พบว่าหมู่แทนที่ที่ต่างกันจะมีความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง interleukin-1 $\beta$  ได้ต่างกัน โดยจากผลการทดลองพบว่าอนุพันธ์ของ cinnamic acid ที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R<sub>3</sub> เป็น -NH<sub>2</sub> (สาร 1) มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีค่า % inhibition เท่ากับ 100.00 และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่ -CH<sub>3</sub> เข้าไปที่ตำแหน่ง N ของสารที่ 1 (สาร 4) มีค่า % inhibition เท่ากับ 65.65 จากนั้นมีการเปลี่ยนแปลงหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R<sub>3</sub> เป็น -O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (สาร 3) พบว่าค่า % inhibition เท่ากับ 23.46 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสารอนุพันธ์ ester จะต่ำกว่าการสารอนุพันธ์ amide (สาร 1 และ 4) แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการยับยั้งก็ยังคงมากกว่าสารไพเพอริน ที่มีค่า % inhibition เท่ากับ 12.1 และสามารถเรียงลำดับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง R<sub>3</sub> ตามความสามารถในการการออกฤทธิ์จากมากไปน้อย ได้ดังนี้ -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> ตามลำดับ

นอกจากนั้นจากการสังเกต พบว่าที่ตำแหน่ง R<sub>1</sub> และ R<sub>2</sub> ของสาร 1 ซึ่งแทนที่ด้วยวงแหวนของ -O-CH<sub>2</sub>-O- เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตำแหน่ง R<sub>1</sub> เป็น -O-CH<sub>3</sub> และตำแหน่ง R<sub>2</sub> เป็น -O-O=C-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (สาร 5) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่เป็นวงเปิด (open ring) พบว่า ค่า % inhibition เมื่อเทียบกับสาร 1 แตกต่างกันไม่มาก