

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ gambogic acid จากรงทอง

การใช้เทคนิคของรงคเลขผิวบาง (TLC) เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร gambogic acid ออกจากสารต่าง ๆ ในสิ่งสกัดหยาบ ระบบตัวทำละลายที่นำมาทดลองมี 4 ระบบ คือ chloroform, chloroform : ethanol (95:5), chloroform : ethanol (97.5:2.5), chloroform : ethanol (99:1) เมื่อเปรียบเทียบกระสวนรงคเลขผิวบาง (TLC) พบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร gambogic acid ออกจากสารต่างๆในสิ่งสกัดหยาบ คือ chloroform : ethanol (97.5:2.5) มีค่า Rf=0.46 ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 9

การแยกสารบริสุทธิ์ gambogic acid ออกจากสารต่างๆในสิ่งสกัดหยาบ โดยใช้เทคนิคของสดมภ์รงคเลข และนำ eluent fraction ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิครงคเลขผิวบาง (TLC) รวมทั้งในการทำ spectra ต่าง ๆ เพื่อสรุปสูตรโครงสร้าง (รูป spectra ต่างๆได้แสดงไว้ในภาคผนวก) และผลการศึกษาคู่สมบัติทางกายภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เป็นดังนี้ คือ

$[\alpha]_D^{20}$ -510° (C = 0.1, CHCl₃)

UV λ_{max} (MeOH) (log ϵ) 290 (4.24), 360 (4.18) นาโนเมตร (nm.)

IR ν_{max} 2974, 2934, 2874, 1738, 1692, 1692, 1645, 1634,
1593, 1456, 1435, 1402, 1383, 1333, 1260, 1177,
1138, 1047, 959, 885, 808, 758 cm⁻¹

¹H NMR (500.1 MHz, CDCl₃) δ 12.74 (1H, s, 6-OH)

7.53 (1H, d, $J=6.5$ Hz, H-10)
 6.55 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-4)
 6.11 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-27)
 5.40 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-3)
 5.07 (1H, m, H-37)
 5.04 (1H, m, H-32)
 3.46 (1H, m, H-11)
 3.27 (1H, m, H-31)
 3.13 (1H, m, H-31)
 2.98 (2H, d, $J=7.0$ Hz, H-26)
 2.49 (1H, dd, $J=3.0, 9.0$ Hz, H-22)
 2.29 (1H, d, $J=13.0$ Hz, H-21)
 2.03 (2H, m, H-36)
 1.73/1.72 (3H, s, H-29)
 1.71/1.70 (3H, s, H-34)
 1.69/1.67 (3H, s, H-25)
 1.66/1.64 (3H, s, H-39)
 1.62/1.60 (3H, s, H-35)
 1.56/1.52 (3H, s, H-40)
 1.34/1.31 (3H, s, H-19)
 1.27 (3H, s, H-24)

^{13}C NMR (125.8 MHz, CDCl_3)

Carbon	δ (ppm.)
C-2	81.14, 80.88 (s)
C-3	124.62, 124.32 (d)
C-4	115.81, 115.32 (d)

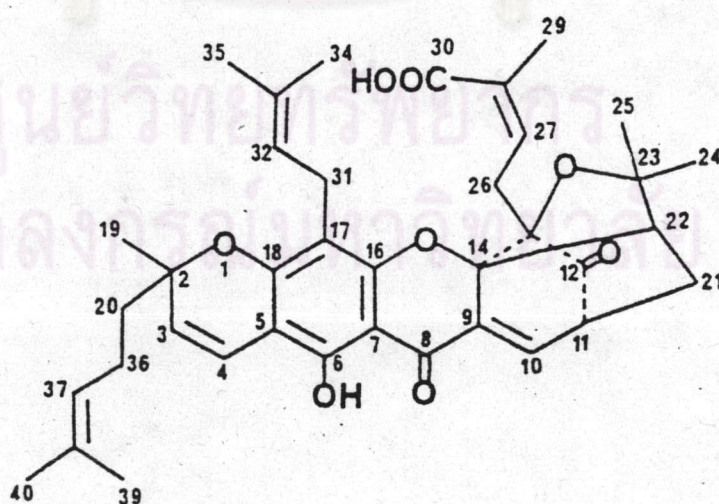
C-5	102.75, 102.57 (s)
C-6	157.50 (s)
C-7	100.40, 100.33 (s)
C-8	178.79 (s)
C-9	133.26, 133.13 (s)
C-10	135.48, 135.25 (d)
C-11	46.70 (d)
C-12	203.26 (s)
C-13	83.69, 83.54 (s)
C-14	90.98, 90.87 (s)
C-16	157.45, 157.22 (s)
C-17	107.63, 107.45 (s)
C-18	161.34 (s)
C-19	27.56, 26.82 (q)
C-20	41.87, 41.59 (t)
C-21	25.09 (t)
C-22	48.92 (d)
C-23	83.69, 83.54 (s)
C-24	28.76 (q)
C-25	29.81 (q)
C-26	29.17 (t)
C-27	138.39 (d)
C-28	127.36 (s)
C-29	20.61 (q)
C-30	171.79, 171.58 (s)
C-31	21.51 (t)
C-32	122.20 (d)
C-33	131.27 (s)

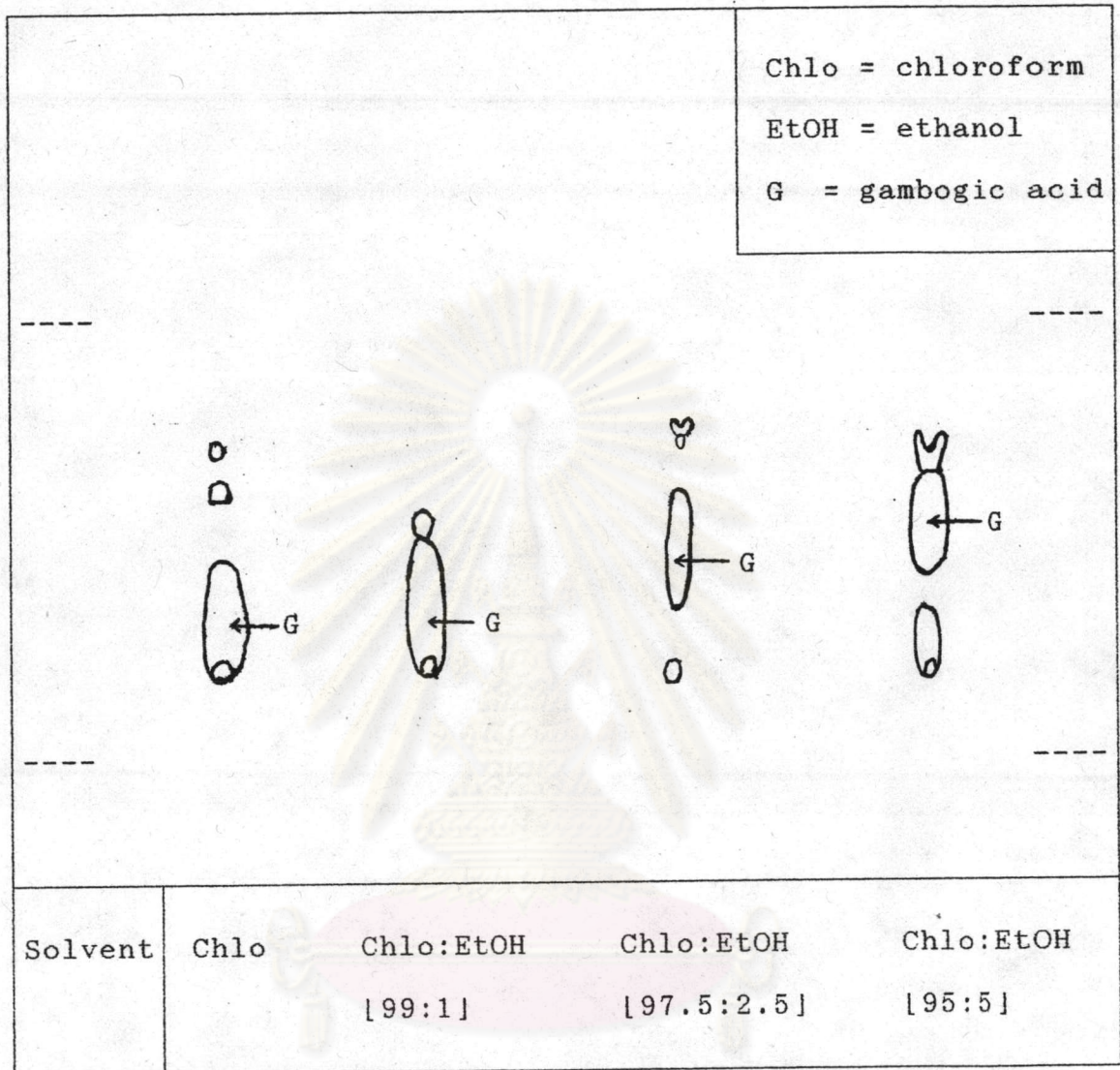
C-34	18.03, 17.96 (q)
C-35	25.62, 25.55 (q)
C-36	22.66 (t)
C-37	123.78 (d)
C-38	131.62 (s)
C-39	25.62, 25.55 (q)
C-40	17.50 (q)

eims (electron impact mass spectroscopy) m/z (rel. int.)

[M]⁺ 628(20), 600(10), 546(34), 545(100), 517(23), 473(12),
389(81), 347(8), 245(14), 215(28), 189(14), 129(12),
105(15)

จากข้อมูลที่ศึกษาพบว่าสารที่แยกได้มีสูตรโครงสร้าง ดังนี้





รูปที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบกระบวนรณรงค์เลขพิวบาง (TLC) ในการแยกสาร gambogic acid จากสารอื่นในสิ่งสกัดหยาบ โดยระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

2. ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่แยกจากกาย

สาร gambogic acid มีผลเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่มี spontaneous contraction ดังรูปที่ 10 พบว่า gambogic acid ขนาด 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์ และ 3.9×10^{-5} โมลาร์ มีผลเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้ทันทีตามขนาดที่ให้ แต่เมื่อเพิ่มขนาดเป็น 5.2×10^{-5} โมลาร์ การหดเกร็งของลำไส้จะเริ่มลดลง แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายของสาร gambogic acid อยู่ได้ไม่นาน เพียง 30-60 วินาที หลังจากนั้นจะมีผลลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่มี spontaneous contraction เมื่อระยะเวลาผ่านไป spontaneous contraction ของลำไส้เล็กกระต่ายยังคงลดลงต่อไปอีก ดังรูปที่ 10 ภายหลังจากการล้างด้วยสารละลายไทโรด (Tyrode) หลายๆ ครั้ง ลำไส้จะไม่มี spontaneous contraction กลับมาเหมือนเดิม แม้จะ incubate นานถึง 30 นาที ในการทดสอบฤทธิ์ของ ethanol 60% ในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลาย gambogic acid พบว่าไม่มีผลต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย

2.1 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกยับยั้งด้วย atropine

จากผลการวิจัย ให้สาร atropine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid ความเข้มข้นเท่าเดิม คือ 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์ 3.9×10^{-5} โมลาร์ และ 5.2×10^{-5} โมลาร์ พบว่า atropine 1×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการให้สาร gambogic acid เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 10 และผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 5 การทดลอง แสดงในรูปที่ 11

2.2 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกยับยั้งด้วย verapamil

เมื่อให้ verapamil 8×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์, 3.9×10^{-5} โมลาร์, และ 5.2×10^{-5} โมลาร์ พบว่า verapamil มีผลลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid ได้อย่างมีนัยสำคัญทาง

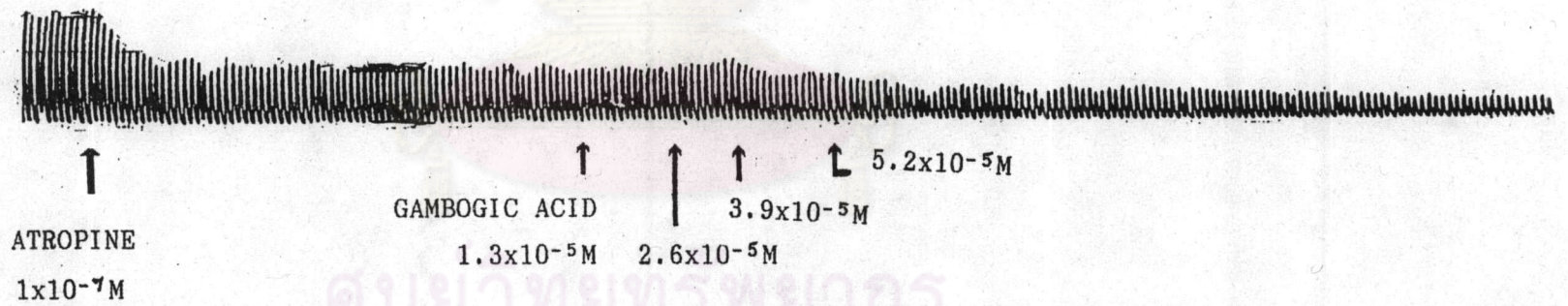
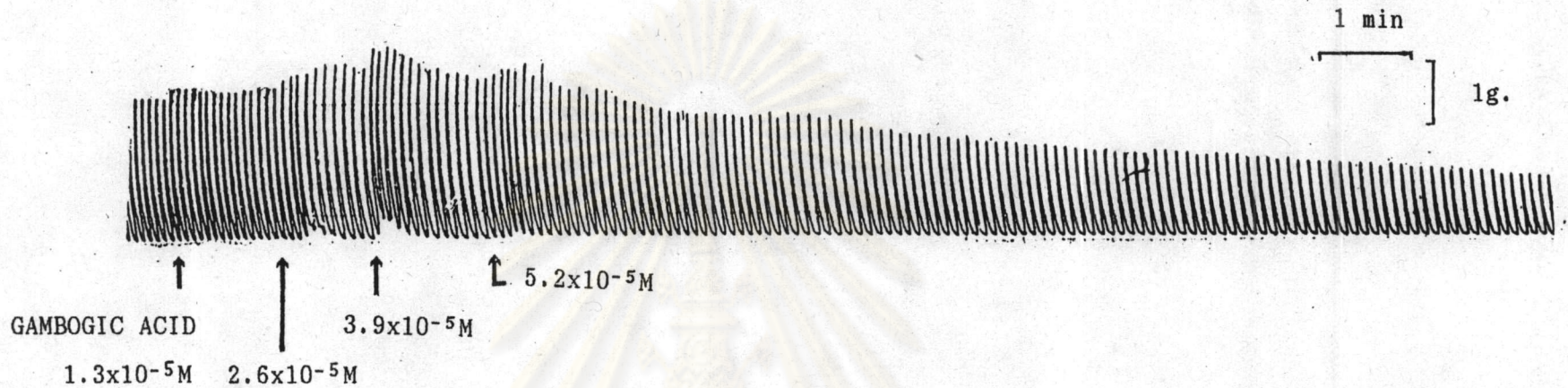
สถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการให้สาร gambogic acid เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 12 และผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 5 การทดลอง แสดงในรูปที่ 13

2.3 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกยับยั้งด้วย chlorpheniramine

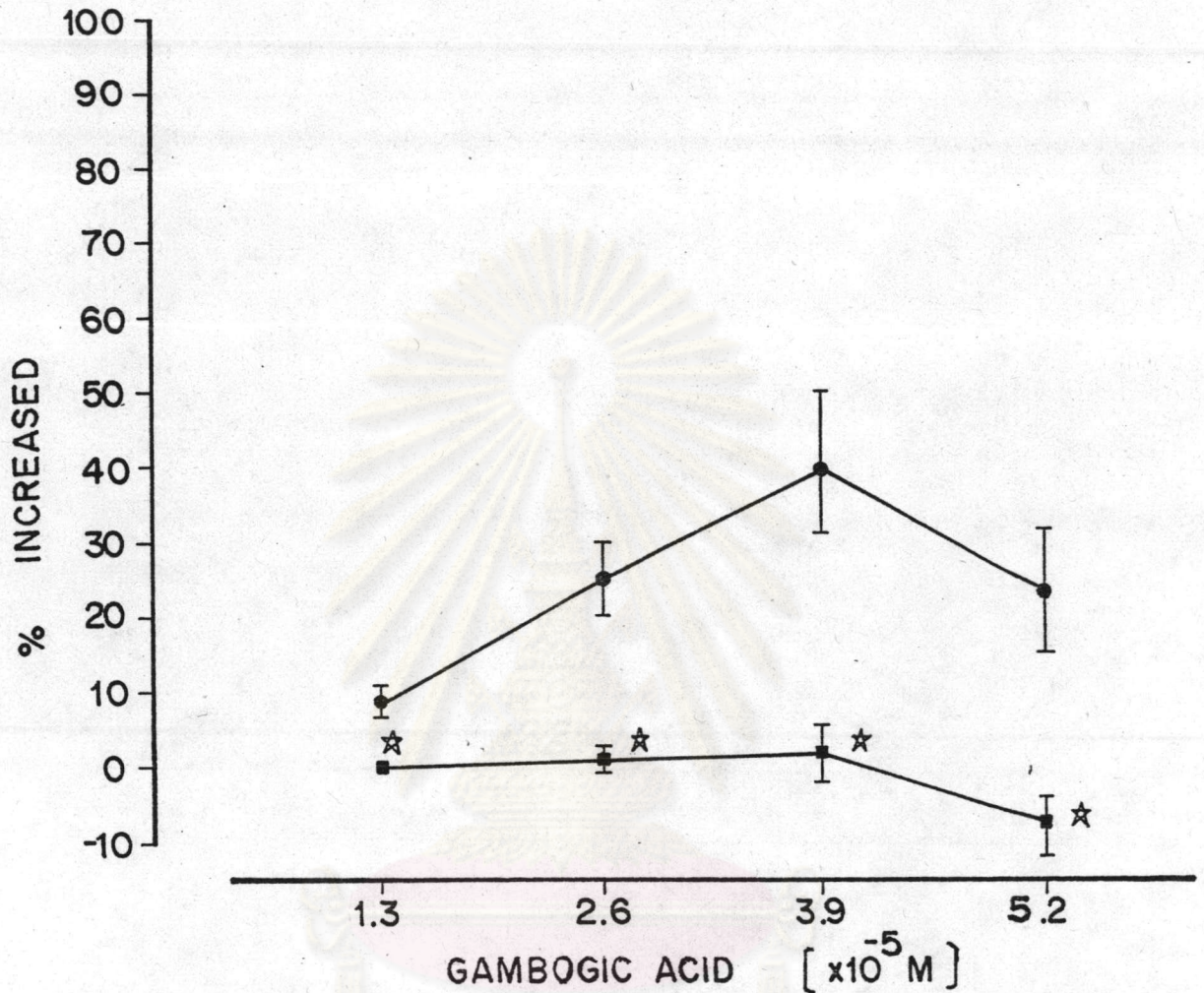
จากผลการวิจัยซึ่งแสดงในรูปที่ 14 ให้ chlorpheniramine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid เข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์ 3.9×10^{-5} โมลาร์ และ 5.2×10^{-5} โมลาร์ พบว่า chlorpheniramine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในการเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 14 และผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 5 การทดลอง แสดงในรูปที่ 15

3. ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว

ในการศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งลำไส้เล็กหนูขาวที่แยกจากกาย พบว่าลำไส้เล็กหนูขาวมี spontaneous contraction อยู่แล้ว เมื่อให้สาร gambogic acid ขนาด 6.5×10^{-6} โมลาร์ ทำให้ลำไส้หนูขาวหดเกร็งมากขึ้น เมื่อให้ความเข้มข้นของสาร gambogic acid เพิ่มมากขึ้นเป็น 9.75×10^{-6} โมลาร์ การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวยิ่งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น และการหดเกร็งของลำไส้หนูขาวเพิ่มสูงสุดเมื่อให้สาร gambogic acid 1.3×10^{-5} โมลาร์ การหดเกร็งของลำไส้หนูขาวที่เพิ่มมากขึ้นนี้ จะเพิ่มทั้งแรงหดตัว (force of contraction) และความตึงตัว (tone) ในทุกความเข้มข้น ซึ่งจะเกิดขึ้นเพียง 30-60 วินาที ในเวลาต่อมาพบว่าจะมีผลลด spontaneous contraction แต่ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวจะสูงขึ้นอย่างชัดเจน แม้จะล้างลำไส้หนูขาวด้วยสารละลายไทโรด (Tyrode) หลาย ๆ ครั้ง และ incubate นานถึง 30 นาที ลำไส้หนูขาวไม่มี spontaneous contraction กลับมาเหมือนเดิม (รูปที่ 16 ภาพบน) ในการทดสอบฤทธิ์ของ ethanol 60% ในปริมาณเท่ากับที่ใช้ละลาย gambogic acid พบว่าไม่มีผลต่อการหดเกร็งของลำไส้หนูขาว



รูปที่ 10 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย ส่วนรูปล่างเมื่อให้ atropine $1 \times 10^{-7} M$ ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid ขนาดต่างๆ อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับรูปบน

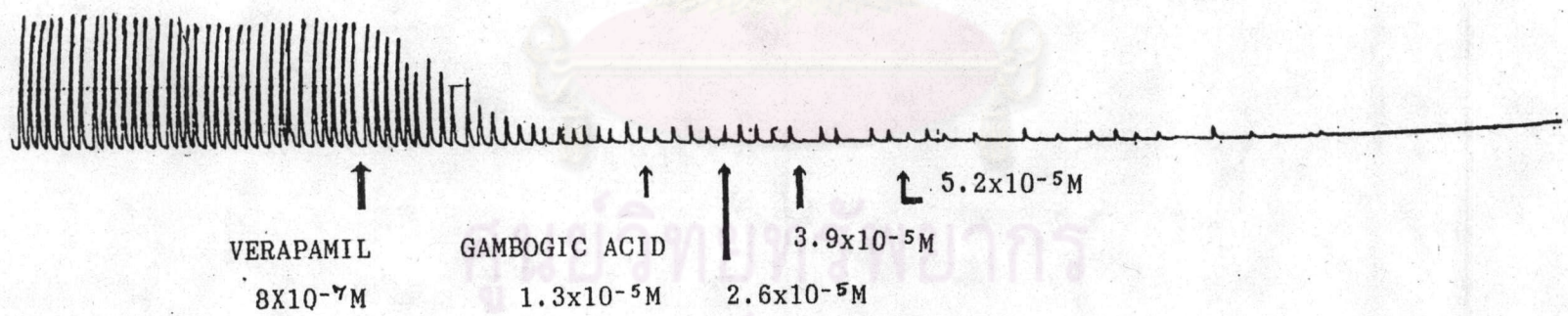
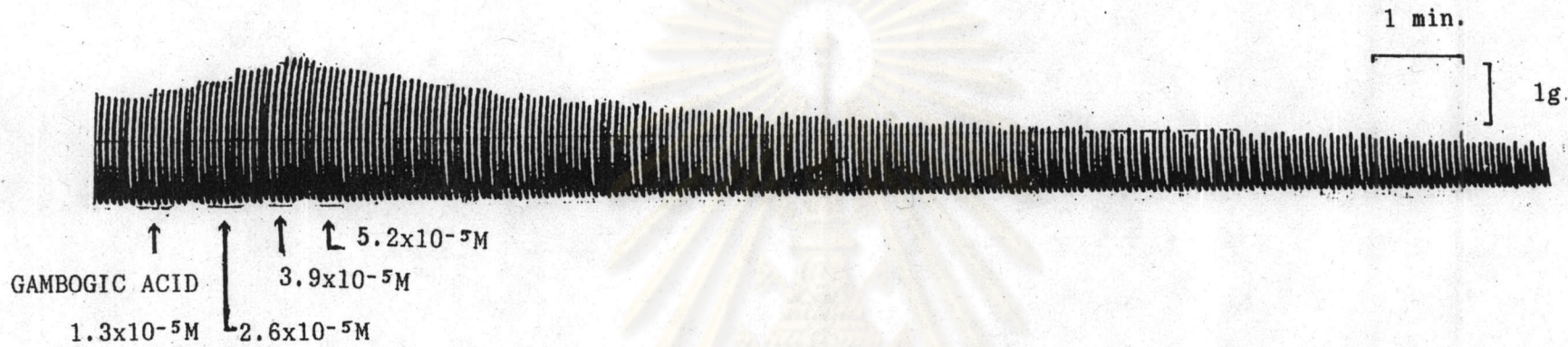


- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ได้รับ atropine 1×10^{-7} M ก่อนกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

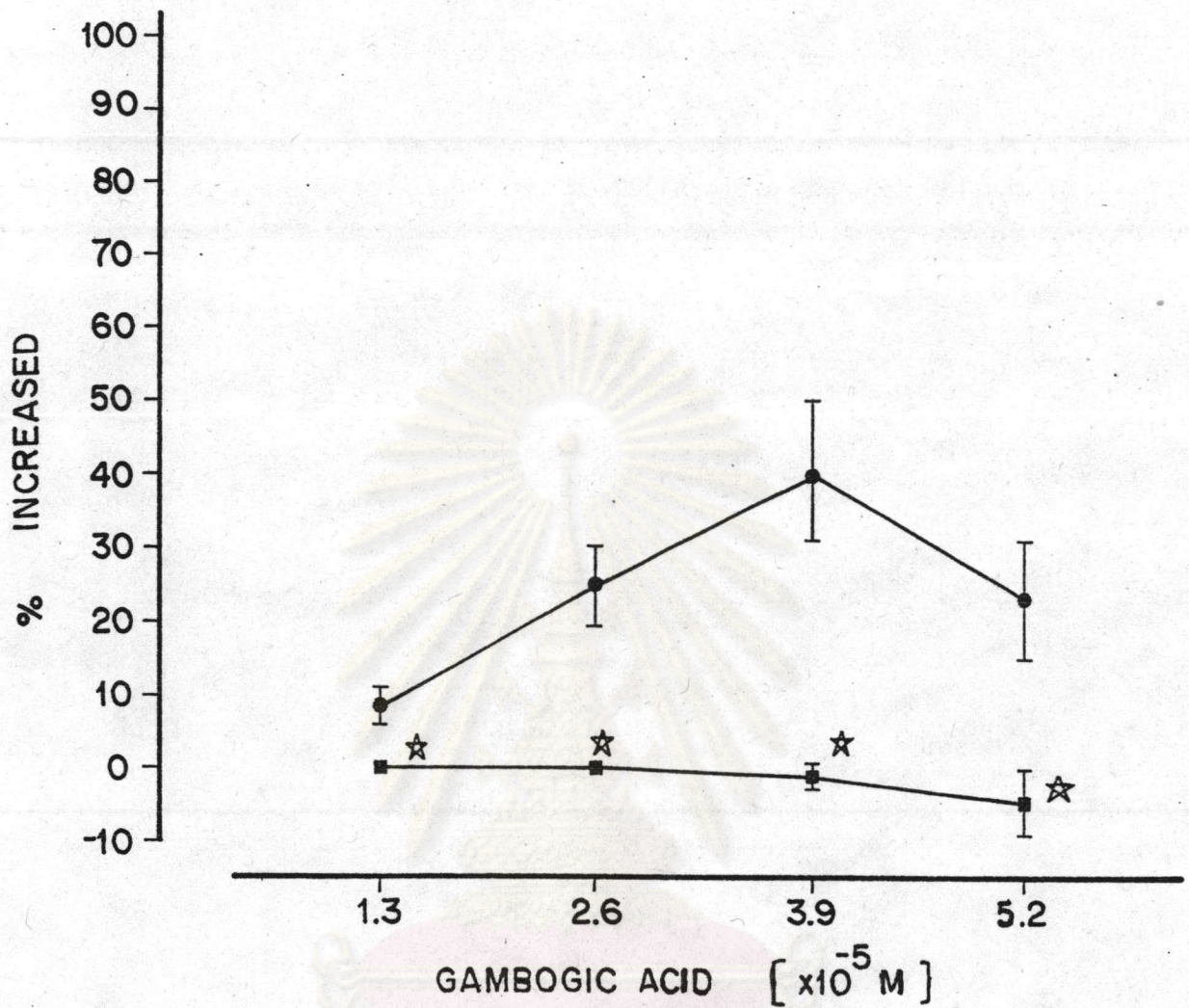
รูปที่ 11 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย
เปรียบเทียบกับ การให้ atropine ยับยั้งการหดเกร็งก่อนให้สาร
gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve
แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

★ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 5



รูปที่ 12 แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย ด้วย verapamil 8x10⁻⁷M

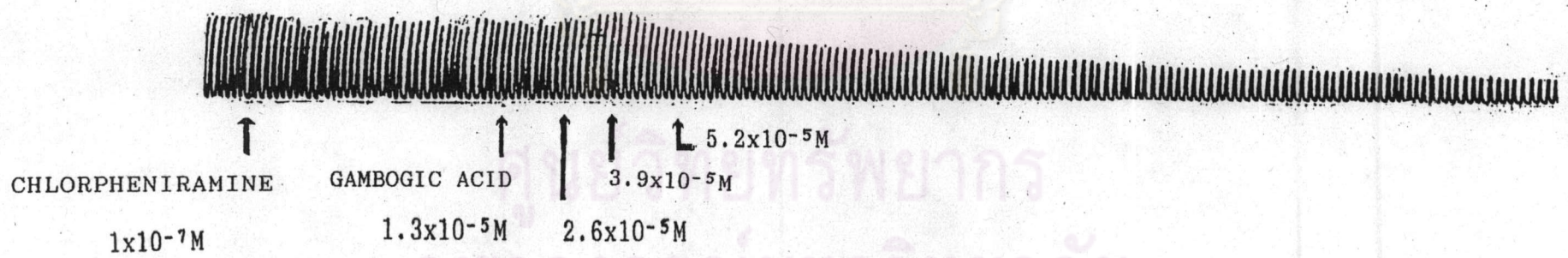
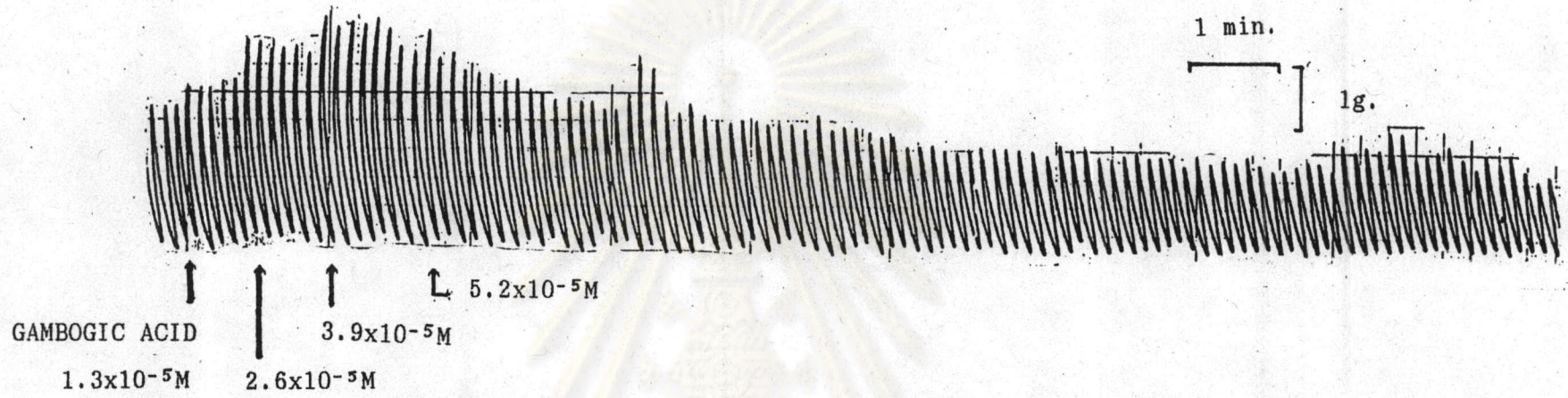


- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ได้รับ verapamil 8×10^{-7} M ก่อนกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

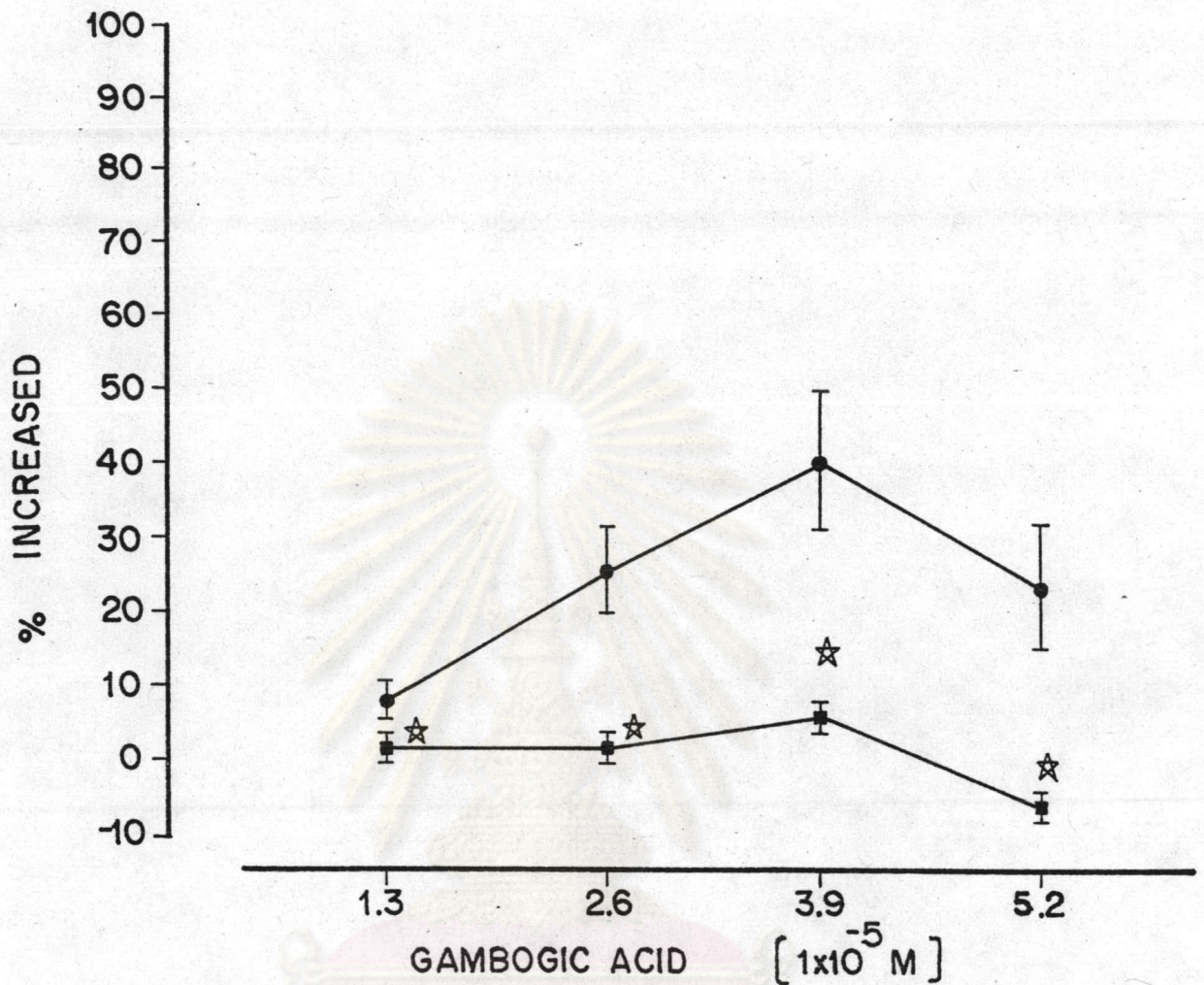
รูปที่ 13 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย เปรียบเทียบกับการให้ verapamil ยับยั้งการหดเกร็งก่อนให้สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

★ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 5



รูปที่ 14 แสดงการยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย ด้วย chlorpheniramine $1 \times 10^{-7} M$



- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่ได้รับ chlorpheniramine 1×10^{-7} M ก่อนกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

รูปที่ 15 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่าย เปรียบเทียบกับการให้ chlorpheniramine ยับยั้งการหดเกร็งก่อนให้สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

☆ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 5

3.1 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกยับยั้งด้วย atropine

เมื่อให้ atropine 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์ และ 1.3×10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ พบว่าสามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในการเพิ่มความแรงของ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ทุกความเข้มข้นของสาร gambogic acid แต่อย่างไรก็ตามยังมีการเพิ่มความตึงตัว (tone) ของลำไส้เล็กหนูขาวเมื่อได้รับสาร gambogic acid ดังแสดงในรูปที่ 16 และ ผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง แสดงในรูปที่ 17

3.2 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกยับยั้งด้วย verapamil

จากผลการวิจัยซึ่งแสดงในรูปที่ 18 เมื่อให้ verapamil ขนาด 8×10^{-7} โมลาร์ เป็นตัวยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว พบว่าการหดเกร็งของลำไส้ลดลงมาก จากนั้นกระตุ้นการหดเกร็งของลำไส้เล็ก โดยให้สาร gambogic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์ และ 1.3×10^{-5} โมลาร์ ตามลำดับ พบว่า verapamil 8×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในการเพิ่มความแรงหดตัว (force of contraction) ของลำไส้เล็กหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ทุกความเข้มข้นของสาร gambogic acid แต่อย่างไรก็ตามยังมีการเพิ่มความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวเมื่อได้รับสาร gambogic acid ดังแสดงในรูปที่ 18 และ ผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง แสดงในรูปที่ 19

3.3 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ยับยั้งด้วย chlorpheniramine

เมื่อให้ chlorpheniramine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์ และ 1.3×10^{-5} โมลาร์ พบว่า chlorpheniramine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ มีผลยับยั้ง

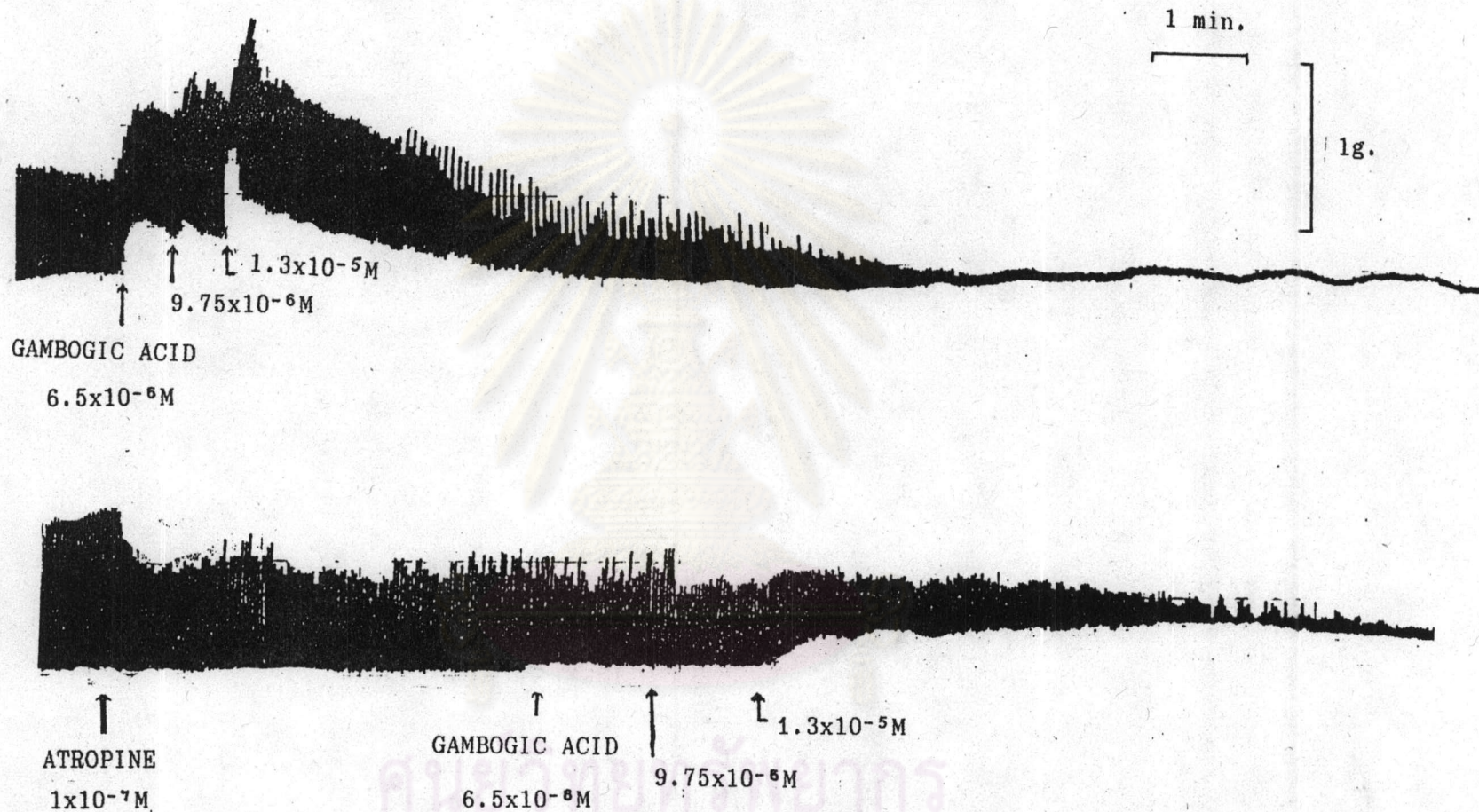
ยังการหดเกร็งของลำไส้หนูขาวทั้งแรงหดตัว และความตึงตัวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid ในทุกความเข้มข้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวซึ่งได้รับสาร gambogic acid เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 20 และผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง แสดงในรูปที่ 21

3.4 ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกยับยั้งด้วย cyproheptadine

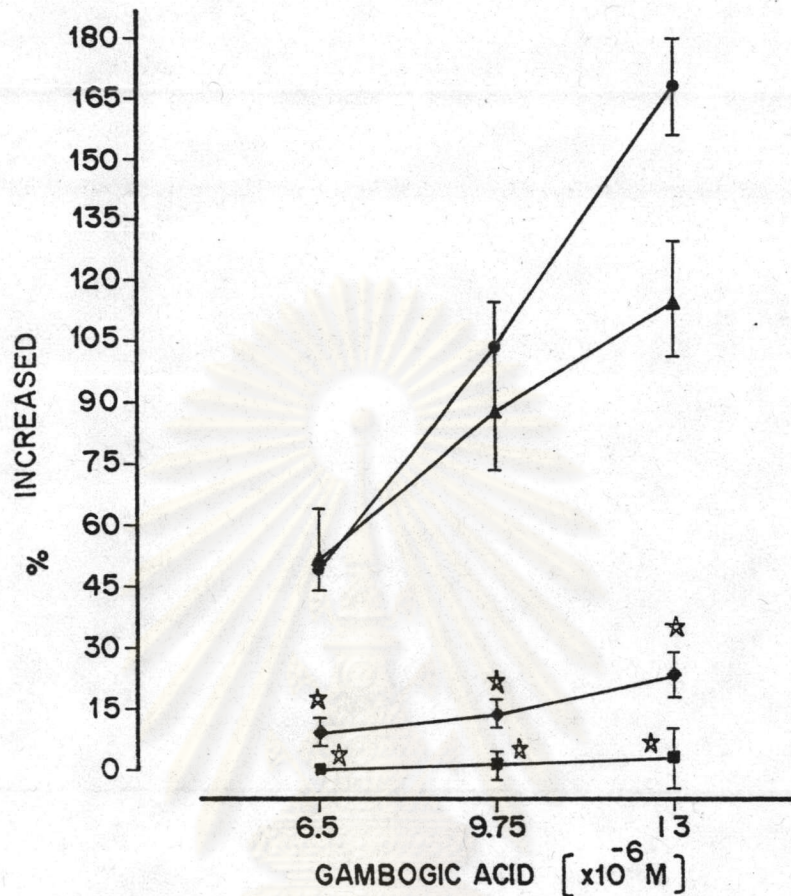
เมื่อให้ cyproheptadine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.5×10^{-6} โมลาร์ และ 1.3×10^{-5} โมลาร์ พบว่า cyproheptadine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งฤทธิ์การเพิ่มการหดเกร็งของลำไส้หนูขาวที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid ทั้งแรงหดตัว และความตึงตัวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในทุกความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 22 และผลรวมที่เกิดจากการทดลองทั้งหมด 6 การทดลอง แสดงในรูปที่ 23

4. ผลของสาร gambogic acid ต่อแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากหนูถีบจักร

ในการศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการบีบตัวกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากกาย กระเพาะอาหารของหนูถีบจักรมี spontaneous contraction เมื่อให้สาร gambogic acid แบบ cumulative dose ขนาด 6.5×10^{-6} โมลาร์ ทำให้กระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรเพิ่มแรงบีบตัวมากขึ้น เมื่อให้ความเข้มข้นของสาร gambogic acid เพิ่มมากขึ้นเป็น 9.75×10^{-6} โมลาร์, 1.3×10^{-5} โมลาร์ แรงบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรยิ่งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นและแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรเพิ่มสูงสุดเมื่อให้สาร gambogic acid 3.25×10^{-5} โมลาร์ ทุกความเข้มข้นของสาร gambogic acid ที่ใช้ ทำให้แรงบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรเพิ่มขึ้นชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 24 และฤทธิ์ของสาร gambogic acid อยู่ได้นานมากกว่า 10 นาที แต่เมื่อล้างกระเพาะอาหารหนูถีบจักรด้วยสารละลายไทโรด (Tyrode) หลาย ๆ



รูปที่ 16 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในขนาดต่างๆ ที่เพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว ส่วนรูปล่างเมื่อให้ atropine $1 \times 10^{-7} M$ ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับรูปบน

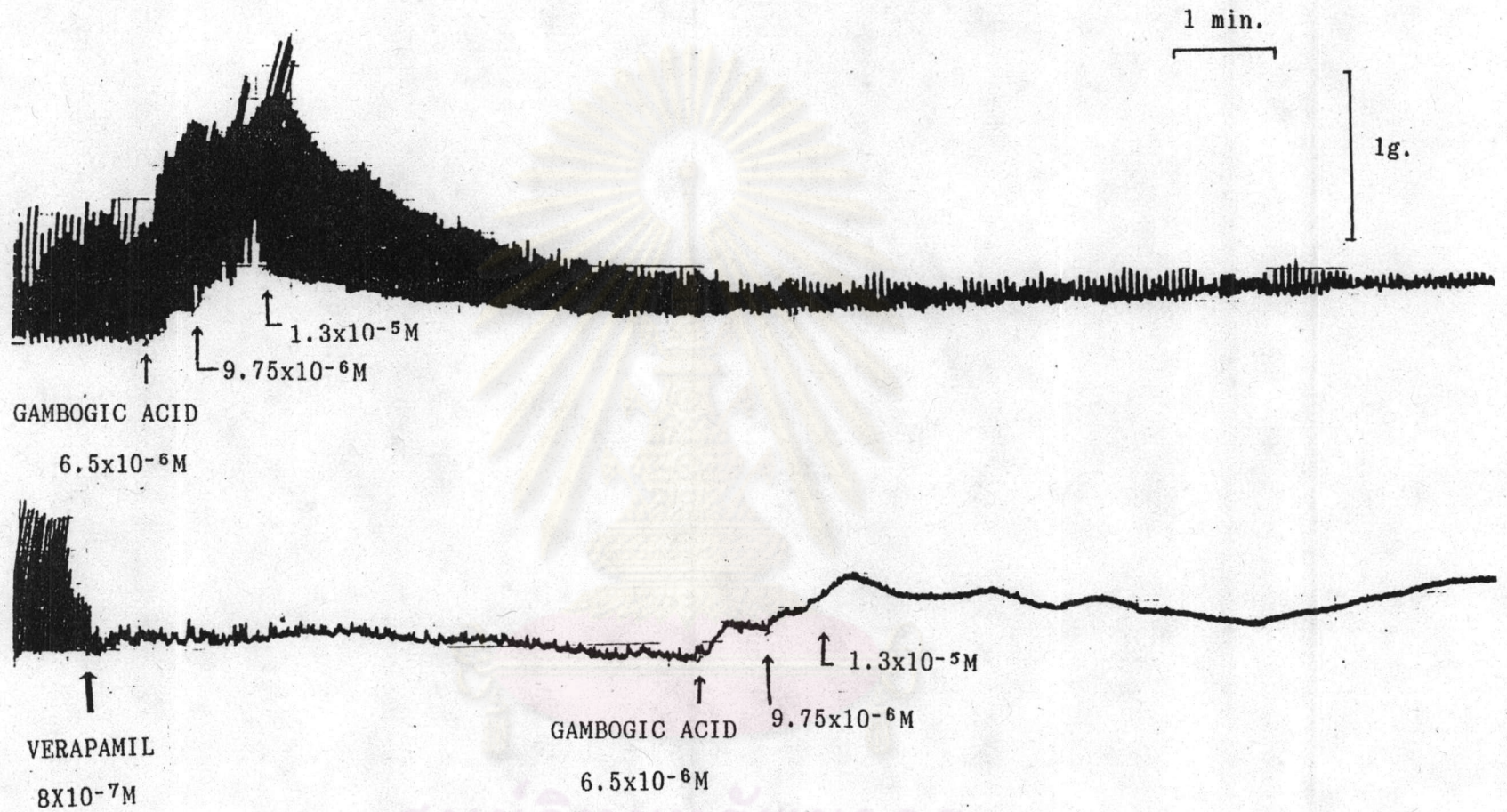


- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ▲—▲ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ atropine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ◆—◆ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ atropine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

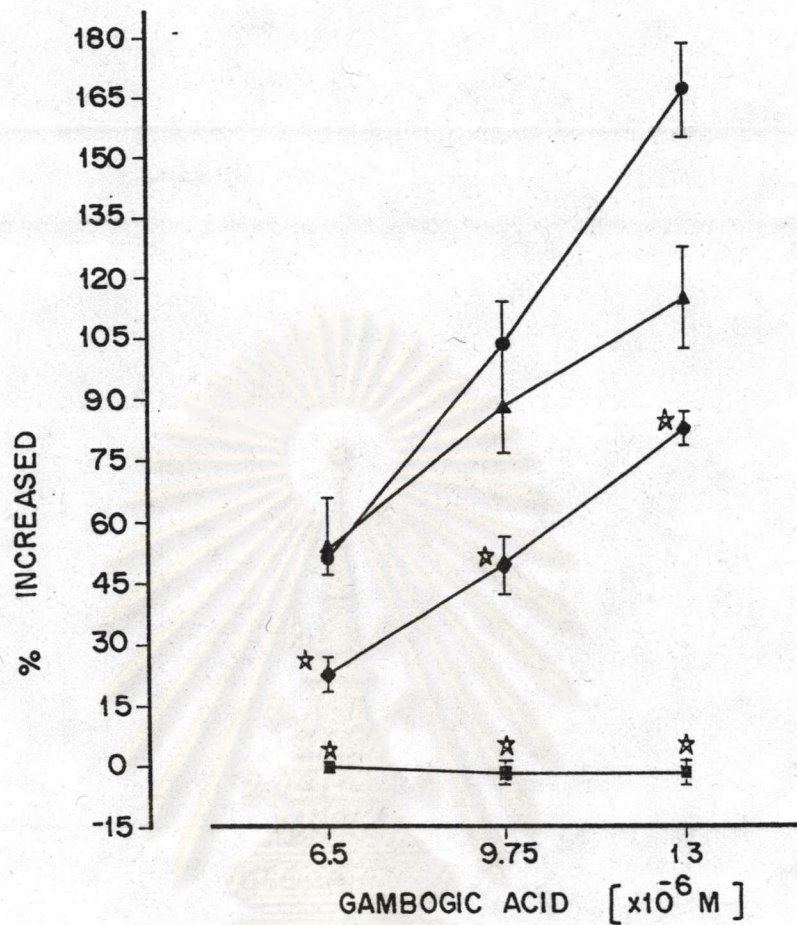
รูปที่ 17 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว เปรียบเทียบกับการให้ atropine ยับยั้งการหดเกร็ง ก่อนให้สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

★ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 6



รูปที่ 18 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในขนาดต่าง ๆ ที่เพิ่มการหดตัวของลำไส้เล็กหนูขาว (รูบน) ส่วนรูปล่างเมื่อให้ verapamil $8 \times 10^{-7} M$ แล้วให้สาร gambogic acid พบว่าทำให้ลำไส้หนูขาวหดเกร็งตัวน้อยกว่าการให้สาร gambogic acid เพียงอย่างเดียว แต่ความตึงตัวของลำไส้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

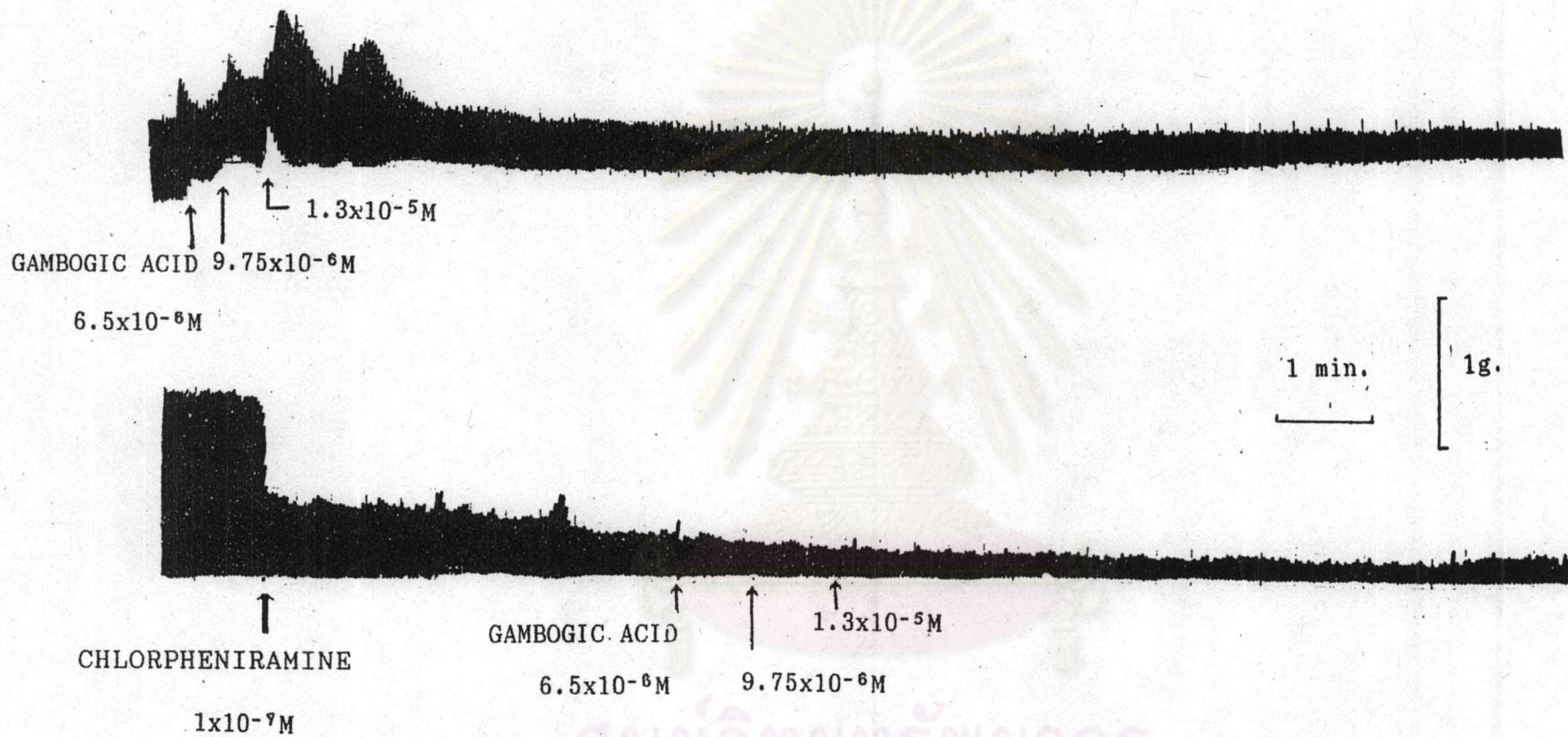


- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ▲—▲ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ verapamil 8×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ◆—◆ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ verapamil 8×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

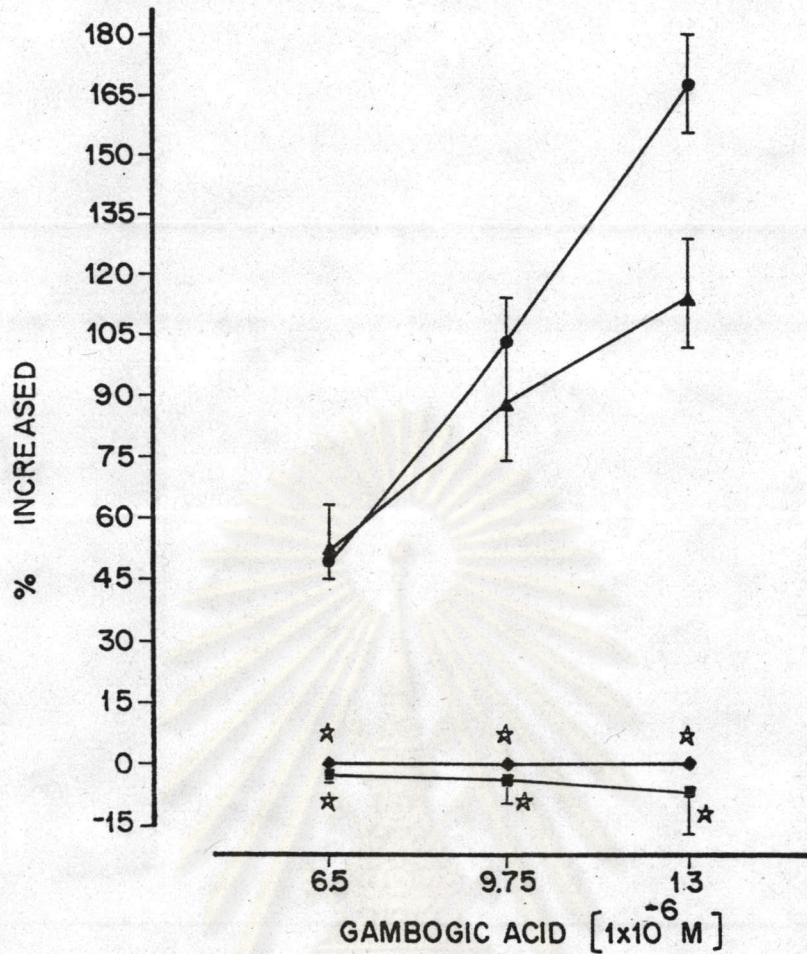
รูปที่ 19 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว เปรียบเทียบกับการให้ verapamil ยับยั้งการหดเกร็ง ก่อนให้สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

* แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 6



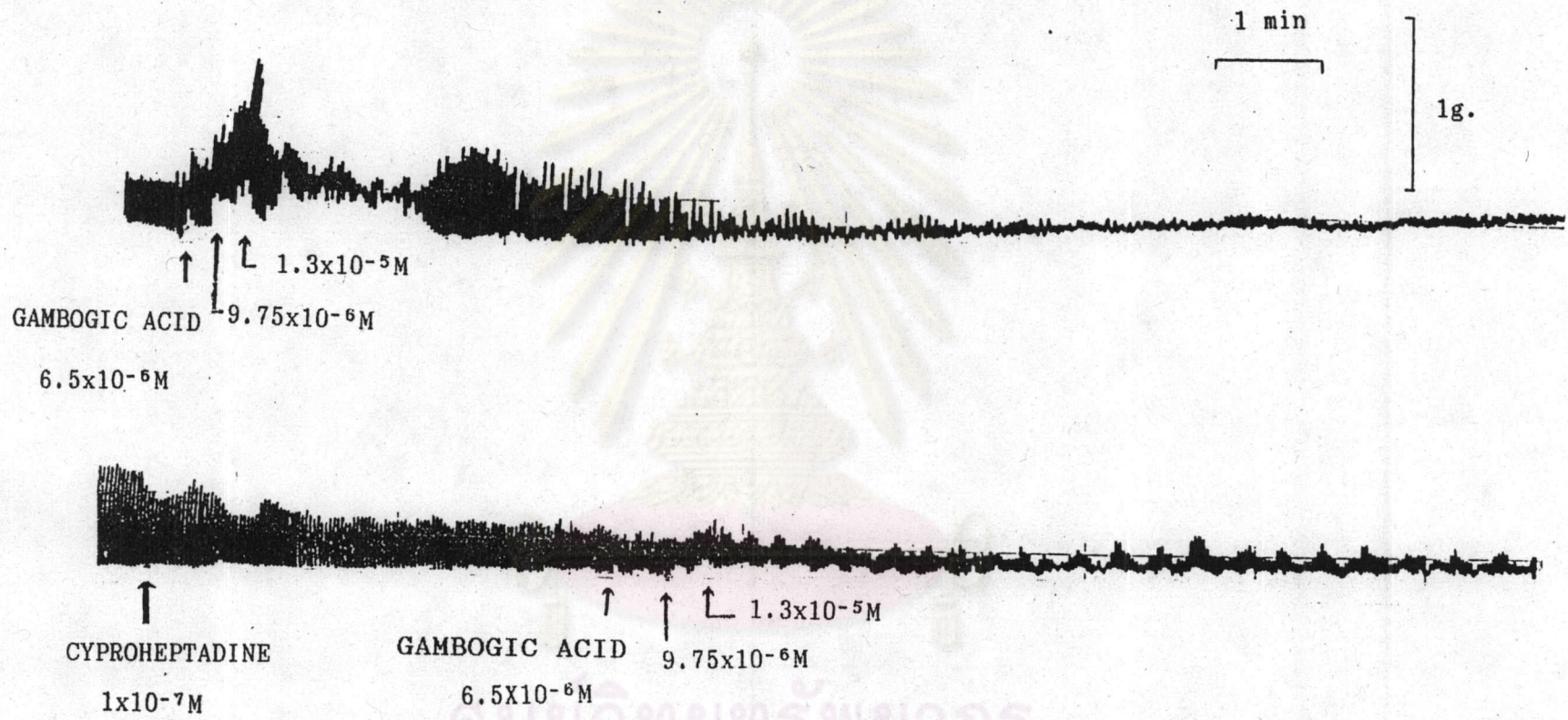
รูปที่ 20 (รูปบน) แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว (รูปล่าง) เมื่อให้ chlorpheniramine 1x10⁻⁷M ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่า chlorpheniramine 1x10⁻⁷M สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic ในการเพิ่มการหดเกร็ง และความตึงตัวของลำไส้ได้



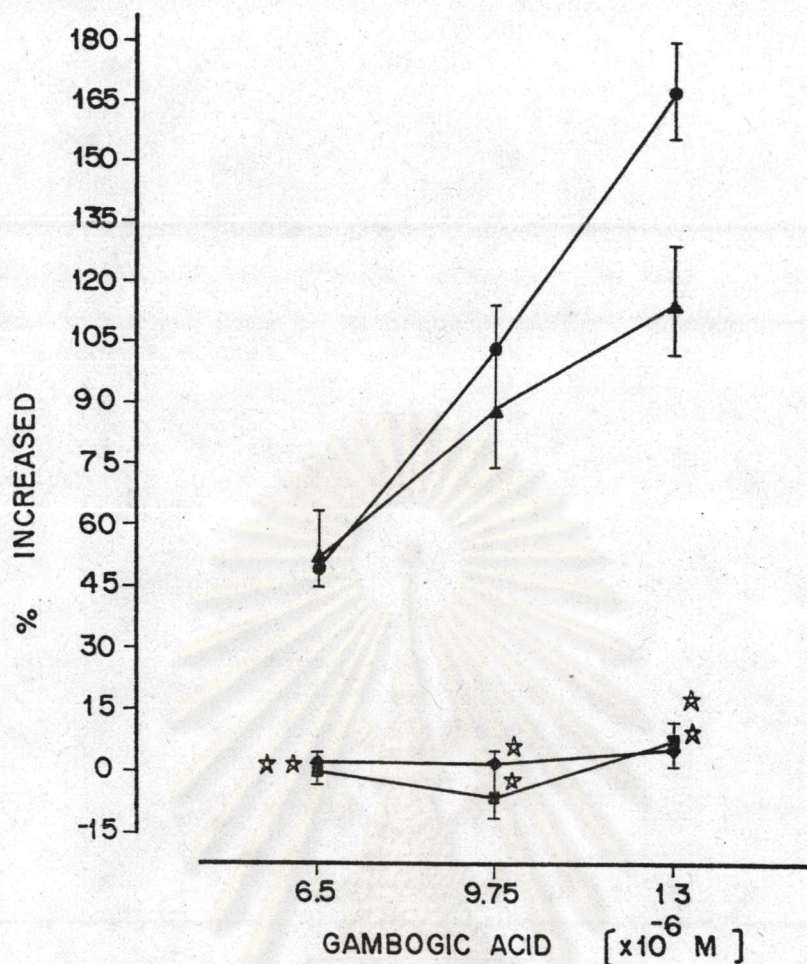
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ▲—▲ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ chlorpheniramine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ◆—◆ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ chlorpheniramine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

รูปที่ 21 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว เปรียบเทียบกับการให้ chlorpheniramine ยับยั้งการหดเกร็ง ก่อนให้ สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

☆ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
 จำนวนการทดลอง = 6



รูปที่ 22 (รูปบน) แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่แยกออกจากกาย (รูปล่าง) เมื่อให้ cyproheptadine $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่าสามารถยับยั้งการหดเกร็ง และความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวอย่างชัดเจน



- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ▲—▲ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- การหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ cyproheptadine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid
- ◆—◆ ความตึงตัวของลำไส้เล็กหนูขาวที่ได้รับ cyproheptadine 1×10^{-7} M ก่อนการกระตุ้นด้วยสาร gambogic acid

รูปที่ 23 แสดงผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาว เปรียบเทียบกับการให้ cyproheptadine ยับยั้งการหดเกร็ง ก่อนให้ สาร gambogic acid ในลักษณะ cumulative dose-response curve แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

★ แสดงค่าที่ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 6

ครั้ง กระเพาะอาหารก็ไม่สามารถที่จะมี spontaneous contraction กลับมาเหมือนเดิม

4.1 ผลของสาร gambogic acid ต่อแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่ถูกยับยั้งด้วย atropine

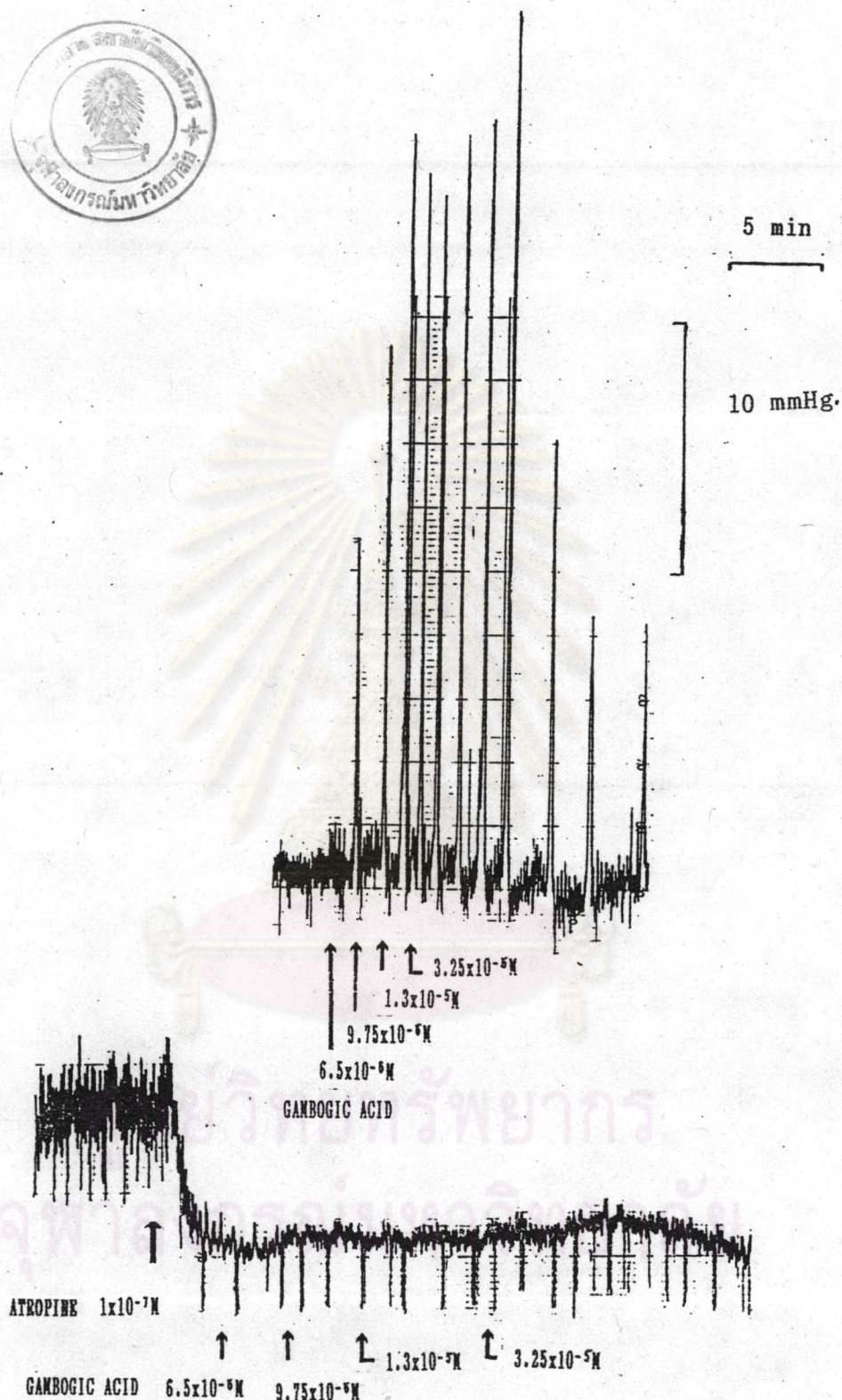
จากผลการวิจัยซึ่งแสดงในรูปที่ 24 ให้ atropine ความเข้มข้น 1×10^{-7} โมลาร์ เพื่อยับยั้งการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร แล้วกระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร แล้วกระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหารโดยใช้สาร gambogic acid แบบ cumulative dose ขนาด 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์ 1.3×10^{-5} โมลาร์ และ 3.25×10^{-5} โมลาร์ พบว่า atropine สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ gambogic acid ได้อย่างชัดเจน ที่ทุกความเข้มข้นของสาร gambogic acid ดังแสดงในรูปที่ 24

4.2 ผลของสาร gambogic acid ต่อแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่ถูกยับยั้งด้วย verapamil

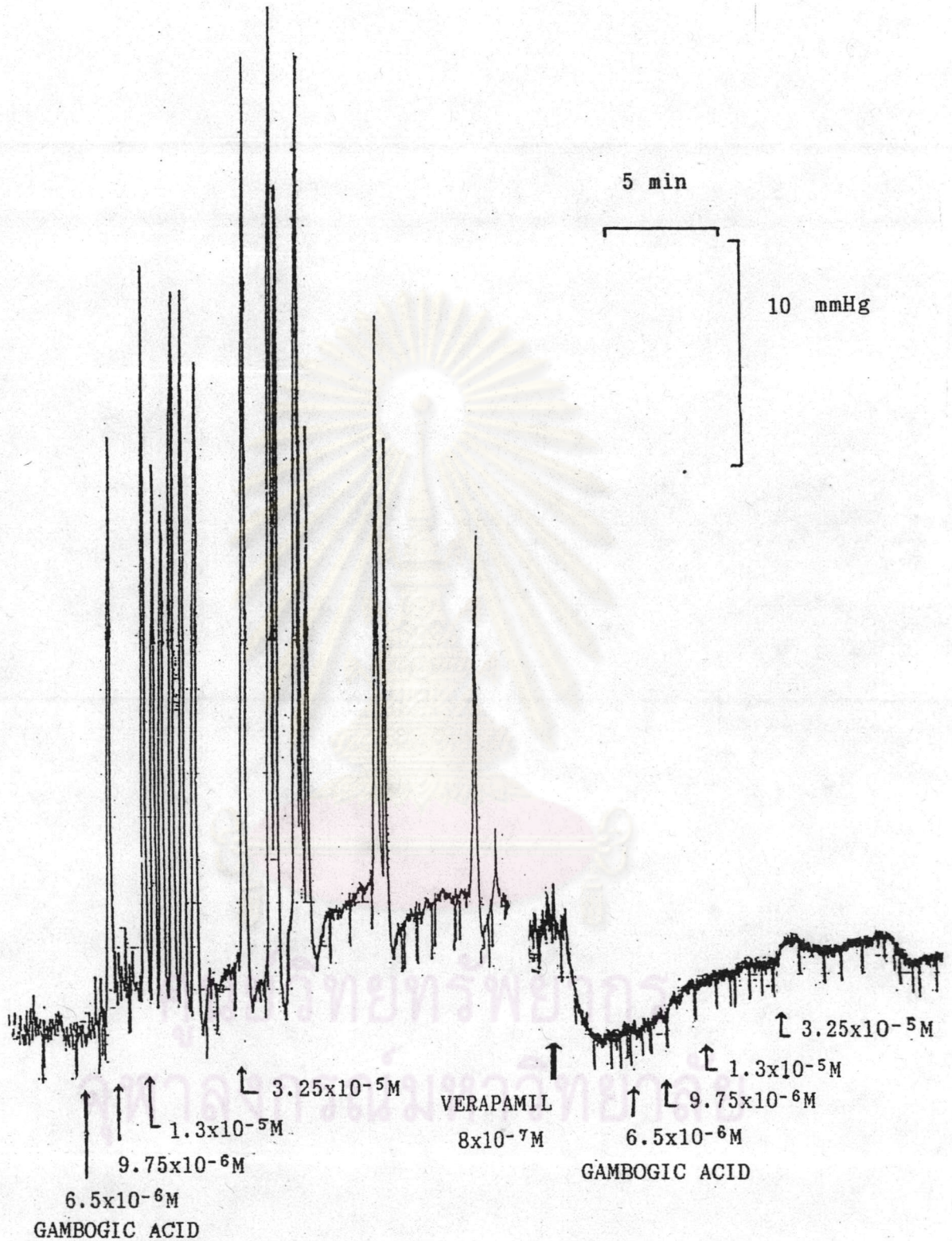
เมื่อยับยั้งแรงบีบตัวของกระเพาะอาหาร โดยให้ verapamil 8×10^{-7} โมลาร์ แล้วกระตุ้นการหดเกร็งของกระเพาะอาหารโดยให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์, 1.3×10^{-5} โมลาร์ และ 3.25×10^{-5} โมลาร์ พบว่า verapamil 8×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ในการเพิ่มแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 25

4.3 ผลของสาร gambogic acid ต่อแรงบีบตัวของกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่ถูกยับยั้งด้วย chlorpheniramine

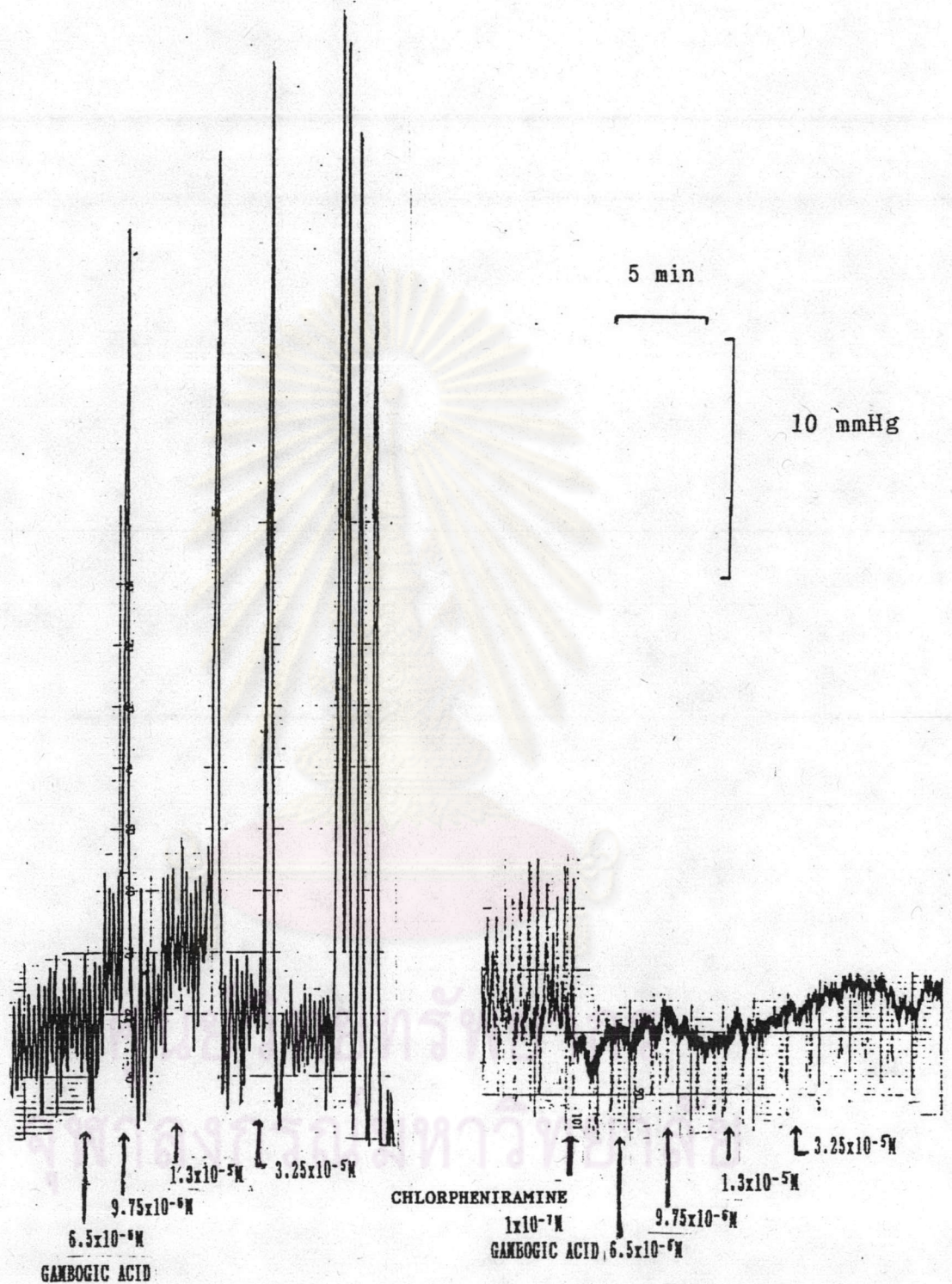
จากผลการวิจัยซึ่งแสดงในรูปที่ 26 ให้ chlorpheniramine ขนาด 1×10^{-7} โมลาร์ เป็นตัวยับยั้งการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร จากนั้นกระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะอาหาร โดยให้สาร gambogic acid ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์, 1.3×10^{-5} โมลาร์ และ 3.25×10^{-5} โมลาร์ พบว่า chlorpheniramine 1×10^{-7} โมลาร์ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ได้อย่างชัดเจน ที่ทุกความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 24 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการบีบตัวของกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากกาย ส่วนรูปล่าง เมื่อให้ atropine $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่าสามารถยับยั้งการบีบตัว กระเพาะอาหารหนูถีบจักรอย่างชัดเจน



รูปที่ 25 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการบีบตัวของกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากกาย (รูปซ้าย) เมื่อให้ verapamil $8 \times 10^{-7} M$ ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่า verapamil $8 \times 10^{-7} M$ สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสาร gambogic acid ได้ (รูปขวา)



รูปที่ 26 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid ที่เพิ่มการบีบตัวของกระเพาะอาหาร หนูถีบจักรทั้งกระเพาะที่แยกออกมาจากกาย (รูบซ้าย) เมื่อให้ chlorpheniramine $1 \times 10^{-7} M$ (รูบขวา) ก่อนให้สาร gambogic acid พบว่าสามารถยับยั้งการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรอย่างชัดเจน

5. ผลของสาร gambogic acid ต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กหนูถีบจักรในสภาพปกติ

การทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของ gambogic acid ต่อการบีบตัวของลำไส้ หนูถีบจักรสภาพปกติจากการเคลื่อนที่ของผงถ่าน โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้ สารละลาย tragacanth ทางปาก กลุ่มที่ 2 ให้สาร gambogic acid 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก จากผลการทดลองในตารางที่ 2 พบว่า กลุ่มควบคุม ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางเฉลี่ย $59.73 \pm 2.08\%$ และกลุ่มที่ 2 ซึ่งได้รับสาร gambogic acid 50 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ทางปาก ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางเฉลี่ย $83.64 \pm 1.65\%$ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่มควบคุม พบว่า สาร gambogic acid เพิ่มการบีบตัวของลำไส้เล็กหนูถีบจักรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และ ไม่พบอาการผิดปกติใดๆระหว่างการทดลองในหนูทั้ง 2 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงผลของ gambogic acid ต่อการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้
เล็กของหนูถีบจักร

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้สารละลาย tragacanth ทางปาก

กลุ่มที่ 2 ให้สาร gambogic acid 50 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม ทางปาก

ผลแสดงในรูป mean±SEM จำนวนการทดลองแสดงเป็นค่าในวงเล็บ

	กลุ่มที่ 1 (n=20)	กลุ่มที่ 2 (n=20)
ความยาวลำไส้ (ซม.)	47.38±1.81	43.20±1.30
ระยะทางผงถ่าน (ซม.)	28.23±1.46	36.39±1.64
% การเคลื่อนที่ผงถ่าน	59.73±2.08	83.64±1.65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ผลของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ในหนูขาว

6.1 ผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่กระตุ้นด้วย potassium chloride

ผลการให้ potassium chloride 80 mM. จะทำให้ vas deferens หดเกร็ง โดยเกิด phasic contraction ตามด้วย tonic contraction พบว่า gambogic acid สามารถลด phasic contraction ของ vas deferens ที่กระตุ้นด้วย potassium chloride 80 mM. โดยพบว่าจะลดลงตามความเข้มข้นของ gambogic acid ที่ให้จากผลการทดลองที่แสดงในรูป 27 แต่พบว่า gambogic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์ มีผลให้ tonic contraction ของ vas deferens เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ gambogic acid เป็น 6.5×10^{-5} โมลาร์ ไม่มีผลต่อ tonic contraction แต่ gambogic acid ขนาดความเข้มข้น 1.3×10^{-4} โมลาร์ มีผลลด tonic contraction อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของ verapamil ซึ่งพบว่ามีผลลดได้ทั้ง phasic และ tonic contraction ของ vas deferens และลดลงตามขนาดของ verapamil ที่ให้ คือความเข้มข้น 8×10^{-7} โมลาร์ และ 4×10^{-6} โมลาร์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 27 และรวบรวมผลการทดลองทั้งหมดในรูปที่ 28

6.2 ผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่กระตุ้นด้วย barium chloride

ผลการให้ barium chloride ขนาด 1×10^{-3} โมลาร์ จะทำให้ vas deferens หดเกร็ง โดยเกิด phasic contraction แล้วตามด้วย spontaneous หรือ rhythmic contraction เกิดตามเป็นระยะเวลานาน จากการทดลอง พบว่า gambogic acid เข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์ สามารถลด phasic contraction แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนความถี่ของ rhythmic contraction เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สาร gambogic acid ความเข้มข้น 2.6×10^{-5} โมลาร์ และ 6.5×10^{-5} โมลาร์ สามารถลด phasic contraction อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตามขนาดที่ให้ และสามารถลดความถี่ของ rhythmic contraction แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และ

gambogic acid ขนาด 1.3×10^{-4} โมลาร์ สามารถลด phasic contraction และ rhythmic contraction ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ gambogic acid มีผลลดการหดเกร็งของ rhythmic contraction ตามขนาดที่ให้อย่างชัดเจน ดังรูปที่ 29

verapamil มีผลลดการหดเกร็ง phasic contraction ลงได้เด่นชัดมากกว่าผลของสาร gambogic acid พบว่า verapamil ความเข้มข้น 8×10^{-7} โมลาร์ สามารถลดความถี่ของ rhythmic contraction แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ verapamil ความเข้มข้น 4×10^{-6} โมลาร์ สามารถลดความถี่ของ rhythmic contraction อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ verapamil ยังมีผลเพิ่มการหดเกร็งของ rhythmic contraction อย่างชัดเจน จากผลการทดลอง พบว่าทั้ง gambogic acid และ verapamil มีฤทธิ์ลด phasic contraction ลงได้ตามขนาดที่ให้ ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 28

6.3 ผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย noradrenaline


ผลการให้ noradrenaline ขนาด 3×10^{-5} โมลาร์ จะทำให้ vas deferens หดเกร็ง โดยเกิด phasic contraction ตามด้วย tonic และ rhythmic contraction เกิดตามเป็นระยะเวลาสั้น จากการวิจัยพบว่า เมื่อให้ gambogic acid เข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์, 6.50×10^{-5} โมลาร์ และ 1.3×10^{-4} โมลาร์ สามารถลด phasic และ tonic contraction โดยจะลดลงตามขนาดของ gambogic acid ที่ให้ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รวมทั้งสามารถลด rhythmic contraction ได้ตามขนาดของ gambogic acid ที่ให้ ส่วน verapamil ความเข้มข้น 8×10^{-7} โมลาร์ และ 4×10^{-6} โมลาร์ สามารถลดทั้ง phasic และ tonic contraction โดยจะลดลงตามขนาดที่ให้ ดังรูปแสดงในรูปที่ 31 และผลการทดลองรวมในรูปที่ 32

6.4 ผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย serotonin (5-HT)

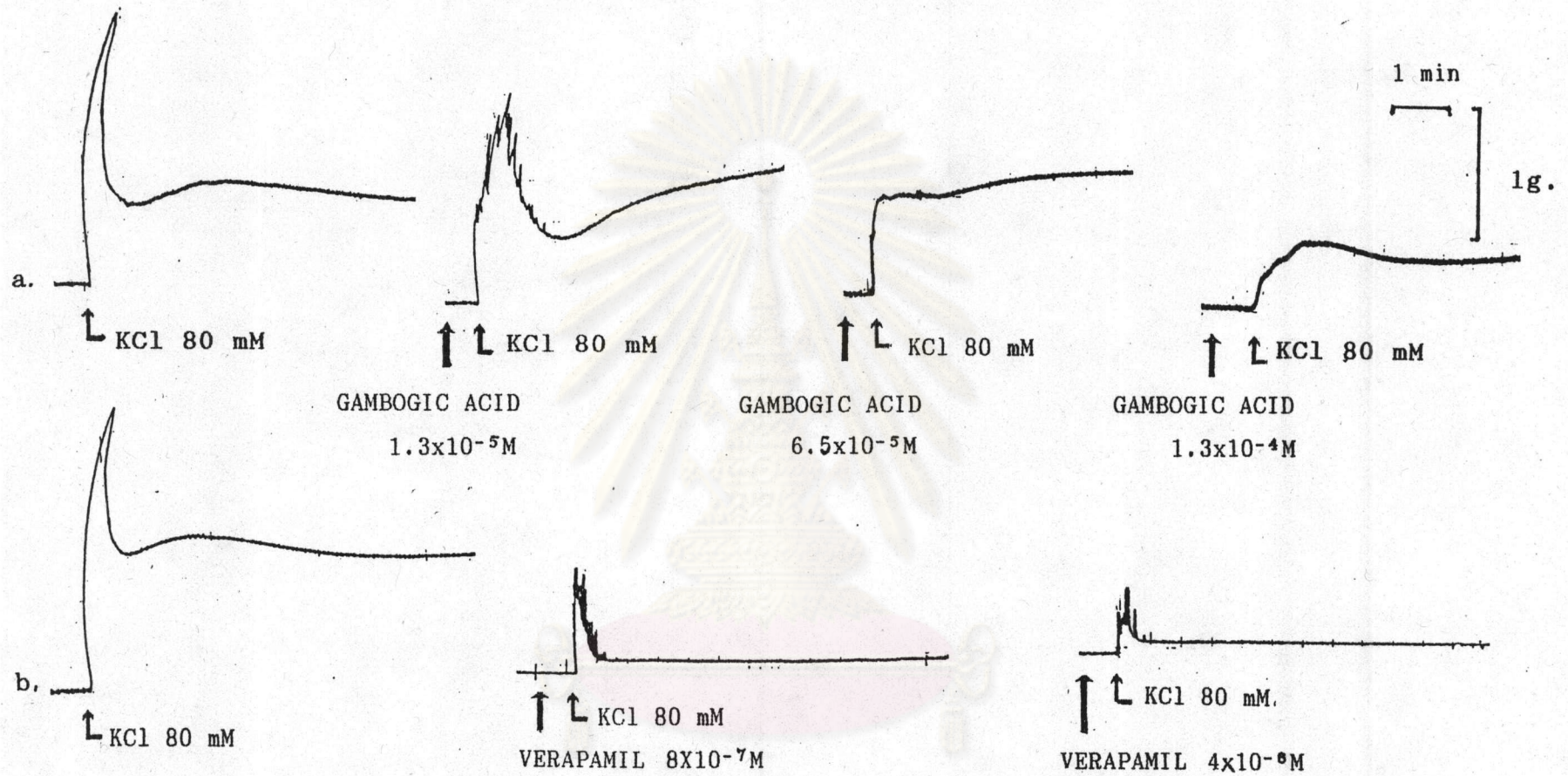
จากผลการทดลอง พบว่า serotonin ความเข้มข้น 1×10^{-4} โมลาร์ ทำให้ vas deferens หดเกร็ง โดยเกิด phasic contraction ตามด้วย rhythmic contraction เกิดตามเป็นระยะเวลาสั้น จากการทดลองพบว่าเมื่อ

ให้สาร gambogic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์ และ 1.3×10^{-4} โมลาร์ สามารถลด phasic contraction และความถี่ของ rhythmic contraction ลงได้ตามขนาดของ gambogic acid ที่ให้ ดังแสดงในรูปที่ 33

verapamil ความเข้มข้น 8×10^{-7} โมลาร์ และ 4×10^{-6} โมลาร์ สามารถลดทั้ง phasic contraction และความถี่ของ rhythmic contraction โดยลดลงตามขนาดที่ให้ และพบว่า verapamil สามารถลดทั้ง phasic contraction และความถี่ของ rhythmic contraction ได้ชัดเจนมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 33 และได้รวบรวมผลการทดลองเขียนรูปกราฟเปรียบเทียบในรูปที่ 34



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

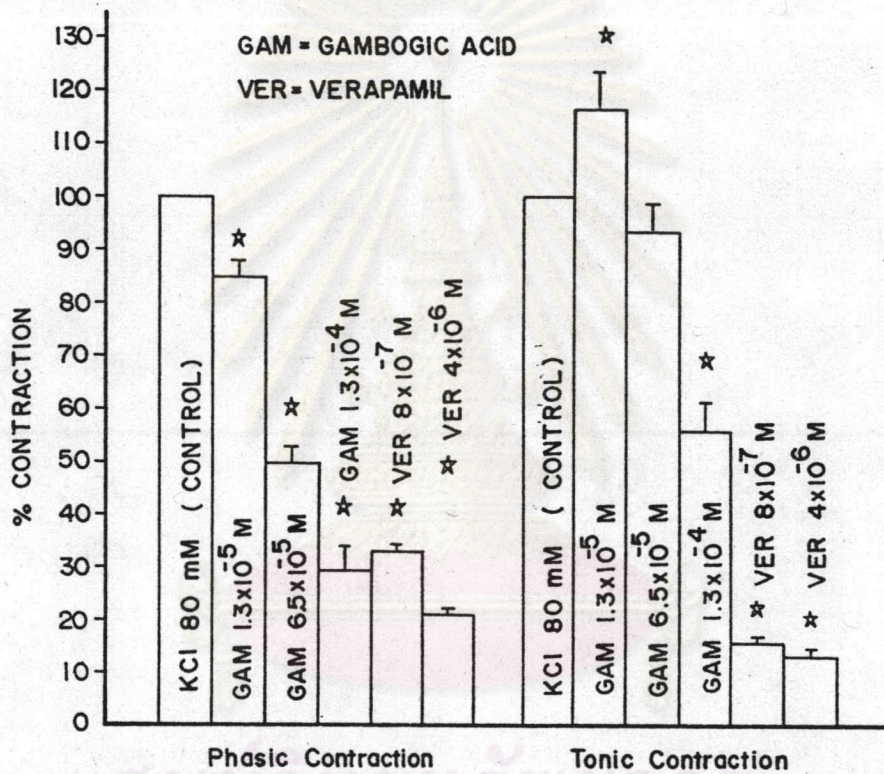


รูปที่ 27 แสดงฤทธิ์ของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อใช้ KCl 80 mM. เป็น

ตัวกระตุ้น (จำนวนการทดลอง = 6)

a. เมื่อให้ gambogic acid $1.3 \times 10^{-5} \text{M}$, $6.5 \times 10^{-5} \text{M}$ และ $1.3 \times 10^{-4} \text{M}$ ก่อนให้ KCl

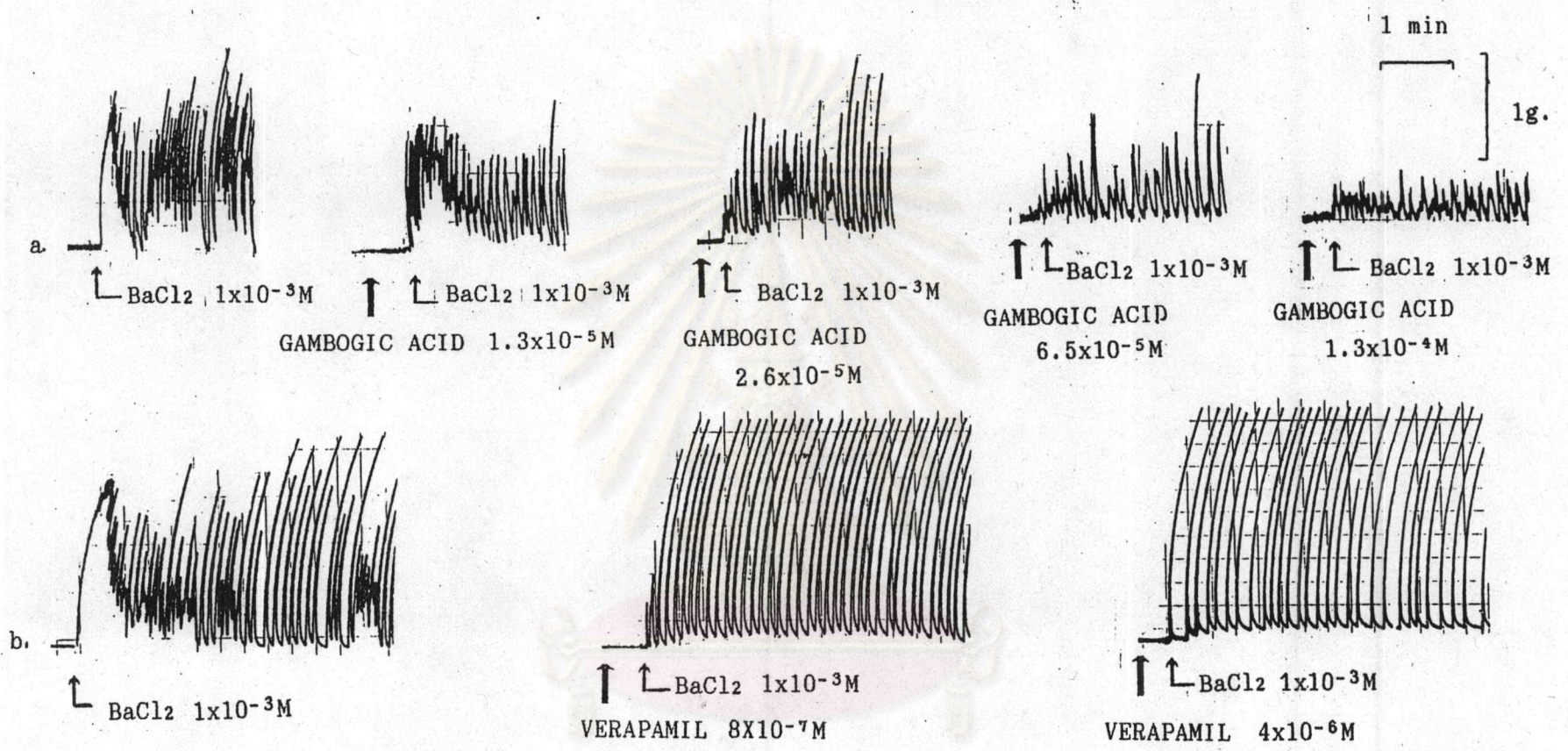
b. เมื่อให้ verapamil $8 \times 10^{-7} \text{M}$ และ $4 \times 10^{-6} \text{M}$ ก่อนให้ KCl



รูปที่ 28 แสดงผลของ gambogic acid, verapamil ต่อการหดเกร็งแบบ phasic และ tonic contraction ของ vas deferens ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย KCl 80 mM ตามการทดลอง ในรูปที่ 27 แต่ละจุดในกราฟ แสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

จำนวนการทดลอง = 6

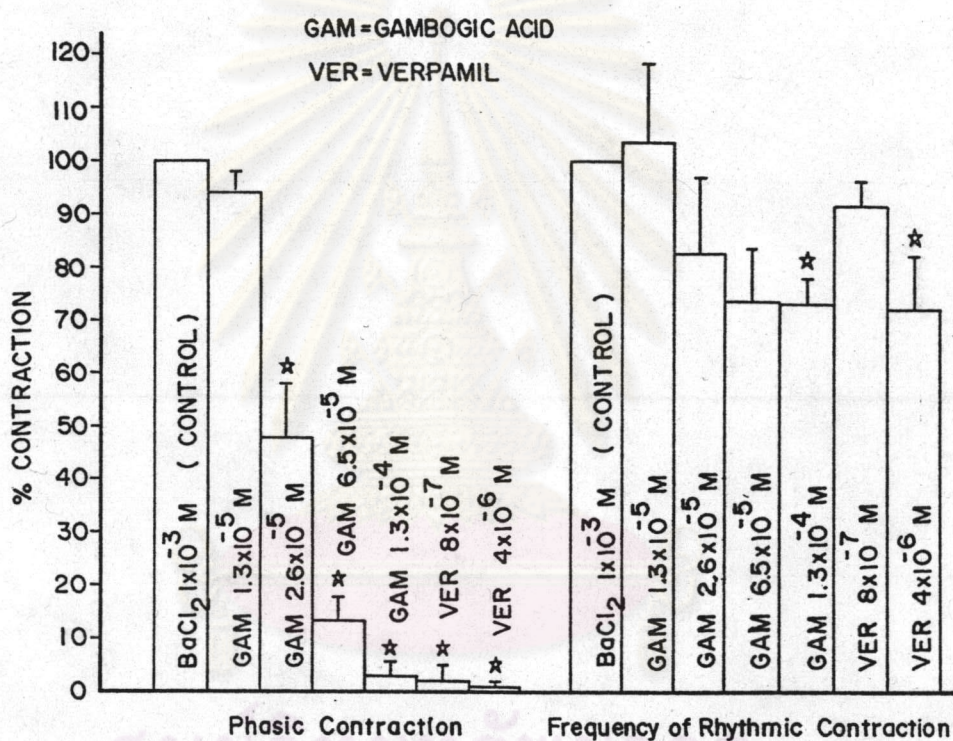


รูปที่ 29 แสดงฤทธิ์ของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่แยกจากกายหนูขาว เมื่อใช้ BaCl₂ 1x10⁻³M

เป็นตัวกระตุ้น (จำนวนการทดลอง = 6)

a. เมื่อให้ gambogic acid 1.3x10⁻⁵M, 2.6x10⁻⁵M, 6.5x10⁻⁵M และ 1.3x10⁻⁴M ก่อนให้ BaCl₂

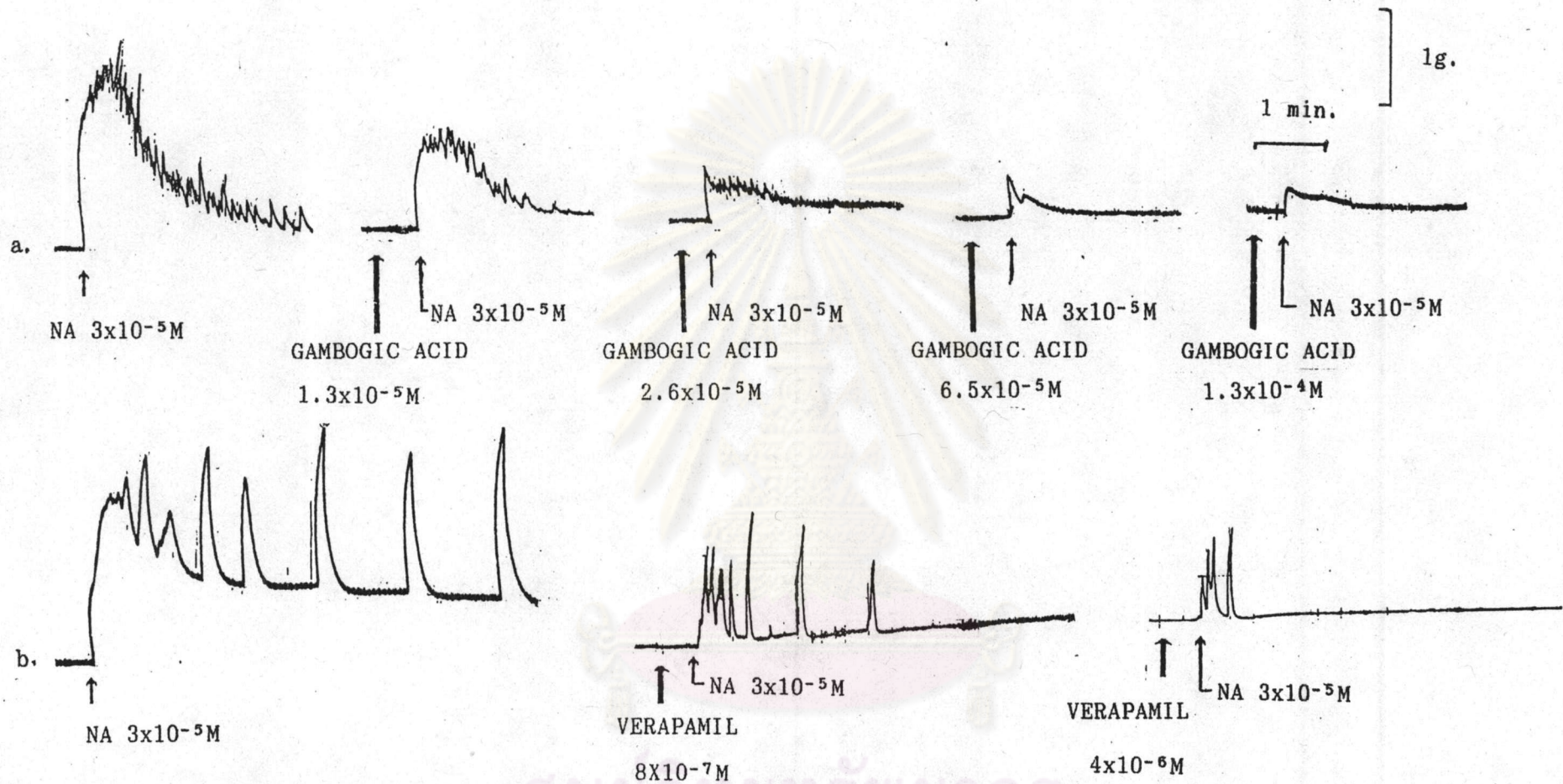
b. เมื่อให้ verapamil 8x10⁻⁷M และ 4x10⁻⁶M ก่อนให้ BaCl₂



รูปที่ 30 แสดงผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งแบบ phasic และความถี่ของ rhythmic contraction ของ vas deferens ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย BaCl₂ 1x10⁻³M ตามการทดลองใน รูปที่ 29 แต่ละจุดในกราฟแสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

★ แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

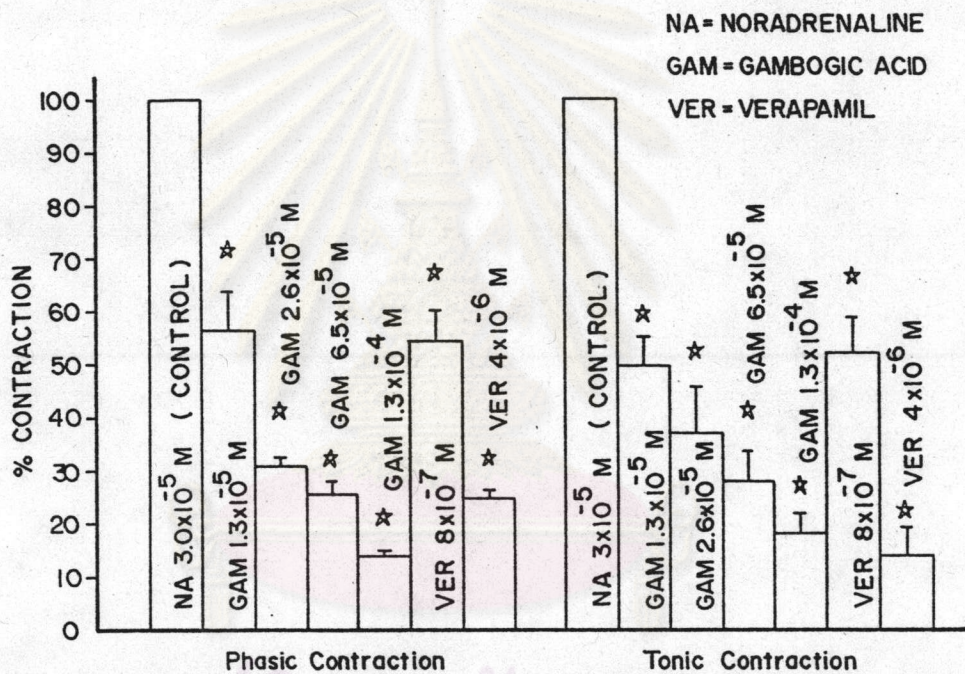
จำนวนการทดลอง = 6



รูปที่ 31 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens โดยใช้ส่วนของ prostatic และ epididymal halves ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย Noradrenaline $3 \times 10^{-5} \text{M}$ (จำนวนการทดลอง = 6)

a. เมื่อให้ gambogic acid $1.3 \times 10^{-5} \text{M}$, $2.6 \times 10^{-5} \text{M}$, $6.5 \times 10^{-5} \text{M}$, $1.3 \times 10^{-4} \text{M}$

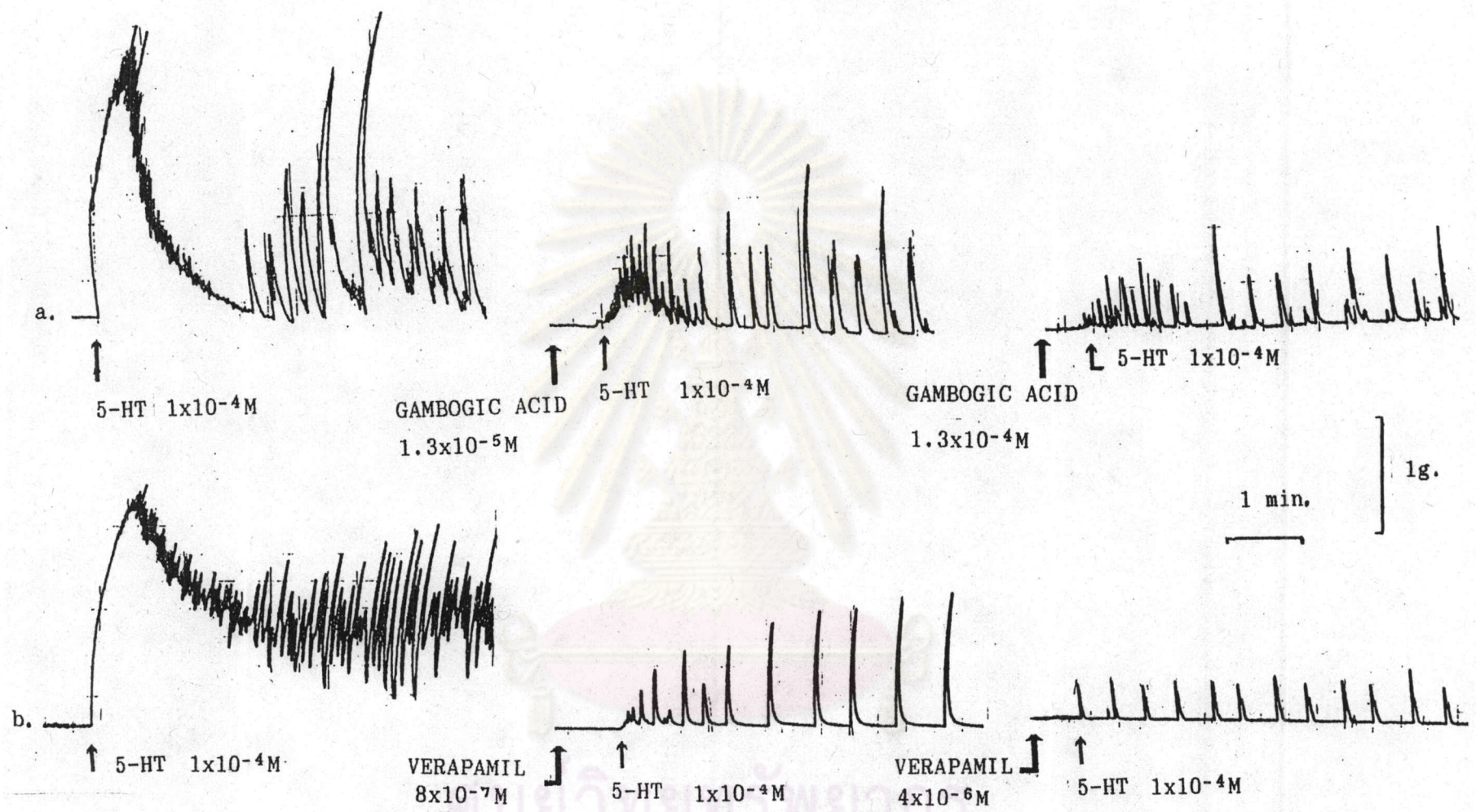
b. เมื่อให้ verapamil $8 \times 10^{-7} \text{M}$, และ $4 \times 10^{-6} \text{M}$



รูปที่ 32 แสดงผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งแบบ phasic และ tonic ของ vas deferens ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย noradrenaline 3×10^{-5} M ตามการทดลองที่แสดงในรูปที่ 31 แต่ละจุด ในกราฟแสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

☆ แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

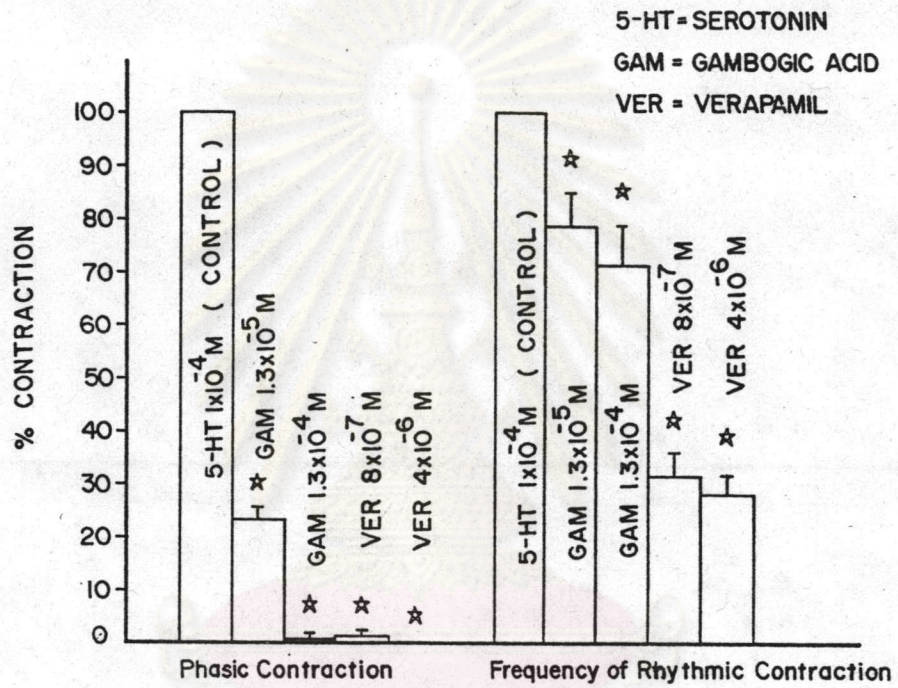
จำนวนการทดลอง = 6



รูปที่ 33 แสดงฤทธิ์ของสาร gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็งของ vas deferens โดยใช้ส่วนของ prostatic และ epididymal halves ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย serotonin (5-HT) $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ (จำนวนการทดลอง = 6)

a. เมื่อให้ gambogic acid $1.3 \times 10^{-5} \text{ M}$ และ $1.3 \times 10^{-4} \text{ M}$

b. เมื่อให้ verapamil $8 \times 10^{-7} \text{ M}$ และ $4 \times 10^{-6} \text{ M}$



รูปที่ 34 แสดงผลของ gambogic acid และ verapamil ต่อการหดเกร็ง แบบ phasic contraction และความถี่ rhythmic contraction ของ vas deferens ที่แยกจากหนูขาว เมื่อกระตุ้นด้วย serotonin(5-HT) 1.0×10^{-4} M ตามการทดลองที่แสดงในรูปที่ 33 แต่ละจุดในกราฟแสดงค่า $\bar{x} \pm \text{SEM}$

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

จำนวนการทดลอง = 6