

สัญญาเลขที่/ 2551

รหัสโครงการวิจัย 52107030011.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยยง รุจจนเวท สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

อาจารย์ พหล แสนสมชัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปี พ.ศ.2552

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงที่ได้สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัย จนทำให้งานสำเร็จ
ได้ด้วยดี



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยยง รุจจนเวท)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ตุลาคม พ.ศ. 2553



บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

เนระพูสีไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tacca chantrieri* Andre เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน ดอกสีเขียวม่วง รูปร่างคล้ายค้างคาว สามารถใช้เป็นไม้ประดับได้ในชื่อต้นดอกค้างคาว (bat flower) มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อน พบได้ในป่าร้อนชื้นทุกภาคของประเทศไทย ชาวบ้านนำใบอ่อนและดอกปิ้งไฟรับประทานเป็นผักกับลาบหรือน้ำพริก ส่วนเหง้านำมาต้มรับประทานเป็นอาหารบำรุงกำลัง การแพทย์พื้นบ้านของไทยระบุว่าเหง้าของเนระพูสีไทยมีสรรพคุณแก้ปวดเมื่อยเนื้อตัว แก้ปวดท้องและแก้อาหารเป็นพิษ การศึกษาเบื้องต้น (ในสัตว์ทดลอง) ของผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบและส่วนสกัด ซาโปนิน (saponin fraction) จากเหง้าเนระพูสีไทย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์ระงับปวด ฤทธิ์การอักเสบ และยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาแม้จะแสดงให้เห็นโดยปราศจากข้อสงสัยว่า เนระพูสีไทยมีฤทธิ์ระงับการอักเสบ แต่มิได้บ่งชี้ถึงกลไกการออกฤทธิ์ การวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ในเหง้าเนระพูสีไทยต่อกลไกการอักเสบ ได้แก่ การยับยั้งอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ต่อ ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase, COX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ได้สกัดแยกสารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส ใน RAW264.7 macrophage cell line ผลการทดสอบแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในลักษณะที่ผันแปรตามความเข้มข้น โดยมีค่า IC50 ที่ 12.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนสของส่วนสกัดดังกล่าวนี้ สามารถเห็นได้ชัดเจนจากการตรวจวัดระดับโปรตีน ผลการศึกษาดังที่กล่าวมานี้ ชี้แนะว่า กลไกการออกฤทธิ์ระงับการอักเสบของสารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย อย่างน้อยบางส่วน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส

การค้นพบดังกล่าวนี้ นอกจากเป็นการเพิ่มพูนองค์ความรู้ทางเภสัชวิทยา ที่ใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ระงับการอักเสบที่ได้เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้ว ยังสามารถนำข้อมูลส่วนหนึ่ง เป็นพื้นฐานในการประดิษฐ์ผลิตภัณฑ์เพื่อระงับอาการอักเสบและระงับปวดที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัยกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในตลาดปัจจุบันได้ต่อไป และยังสามารถใช้ข้อมูลนี้ เพื่อส่งเสริมการใช้พืชและการปลูกสมุนไพรเนระพูสีไทยที่หาได้ในชุมชน โดยดัดแปลงให้สามารถใช้ได้โดยง่าย เพื่อทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน

กล่าวโดยสรุป ควรมีการดำเนินการในอนาคตต่อไปดังนี้

1. วิจัยเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ระงับการอักเสบจากสารสกัดเนระพูสีไทยในเชิงพาณิชย์

2. วิจัยเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เนระพูสีไทย และภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม สำหรับการปลูกขยายพันธุ์เพื่อตอบสนองการผลิตเชิงพาณิชย์
3. ยื่นขอจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์ การใช้ประโยชน์จากเนระพูสีไทย เพื่อคุ้มครององค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยทั้งในครั้งนี้อย่างที่ผ่านมา
4. ศึกษาประสิทธิผลและผลข้างเคียงอื่นๆของสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์จากเนระพูสีไทยในมนุษย์
5. ศึกษาแนวทางการสร้างผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ จากสารสกัดเนระพูสีไทย

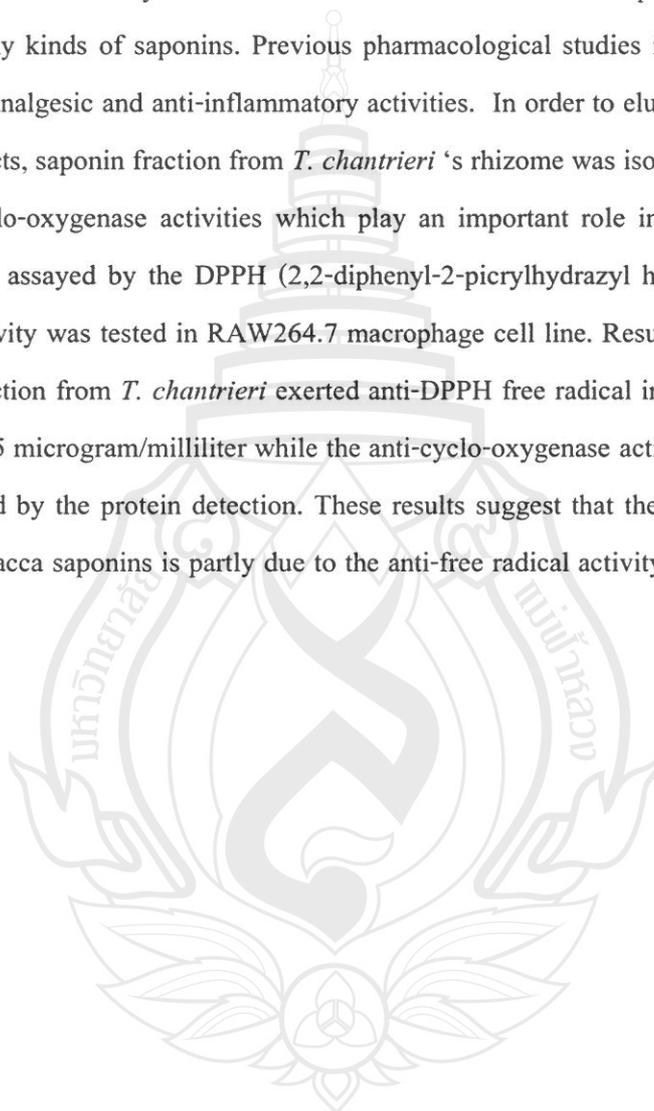


บทคัดย่อภาษาไทย

เนระพูสีไทย เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีลำต้นใต้ดิน กระจายพันธุ์ในเขตร้อน พบได้ตามธรรมชาติในป่าทุกภาคของประเทศไทย มีรายงานการค้นพบสารประกอบซาโปนินหลายชนิดในเหง้าของพืชชนิดนี้ การศึกษาทางเภสัชวิทยาที่ผ่านมาพบว่า สารประกอบซาโปนินเหล่านี้มีฤทธิ์ระงับการอักเสบและระงับปวดในสัตว์ทดลองอย่างชัดเจนยิ่ง ดังนั้นเพื่ออธิบายกลไกอันเป็นพื้นฐานของฤทธิ์ระงับการอักเสบ การศึกษาครั้งนี้ จึงได้สกัดแยกสารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส ใน RAW264.7 macrophage cell line ผลการทดสอบแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DPPH ในลักษณะที่ผันแปรตามความเข้มข้น โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 12.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสของส่วนสกัดดังกล่าวนี้สามารถเห็นได้ชัดเจนจากการตรวจวัดระดับโปรตีน ผลการศึกษาดังที่กล่าวมานี้ ชี้แนะว่า กลไกการออกฤทธิ์ระงับการอักเสบของสารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย มีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส

Abstract

Tacca chantrieri is a perennial with underground rhizome distributed in the tropics and can be naturally found in all over the country of Thailand. Isolation of chemical compounds from the plant's rhizome revealed many kinds of saponins. Previous pharmacological studies in experimental animals reported the marked analgesic and anti-inflammatory activities. In order to elucidate the basis of these pharmacological effects, saponin fraction from *T. chantrieri*'s rhizome was isolated, tested for anti-free radical and anti-cyclo-oxygenase activities which play an important role in inflammation. Anti-free radical activity was assayed by the DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) method and anti cyclo-oxygenase activity was tested in RAW264.7 macrophage cell line. Results of the study exhibited that the saponin fraction from *T. chantrieri* exerted anti-DPPH free radical in a dose-related manner with the IC₅₀ of 12.75 microgram/milliliter while the anti-cyclo-oxygenase activity of the said fraction was clearly evidenced by the protein detection. These results suggest that the mechanism of anti-inflammatory action of Tacca saponins is partly due to the anti-free radical activity and inhibition of cyclo-oxygenase.



สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
	1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	1
	1.4 คำถามหลักของงานวิจัย	3
	1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	3
	1.6 ขอบเขตการวิจัย	3
	1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน	3
	1.8 นิยามศัพท์	3
	1.9 คณะนักวิจัย	4
บทที่ 2	แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
	2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและกรอบคณมงานวิจัย	5
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 การเตรียมส่วนสกัดชาโปนิน	9
	3.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	9
	3.3 การหาความเข้มข้นของส่วนสกัดชาโปนินที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ	11
	3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2	11
บทที่ 4	ผลการศีกษาวิจัย	
	4.1 การเตรียมส่วนสกัดชาโปนิน	12
	4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	13
	4.3 การหาความเข้มข้นของส่วนสกัดชาโปนินที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ	15
	4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2	16
บทที่ 5		
	5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดจากเหง้าแระพูสีไทย	17
	5.2 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากงานวิจัย	18
	5.3 ข้อเสนอแนะ	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	20
ภาคผนวก 1. Bradford protein assay	21
ภาคผนวก 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดชาโ นินจากเหง้าเนระพูสีไทย	23
ภาคผนวก 3 ค่าดูดกลืนแสงและ รัยยะของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่อยู่รอด เมื่อบ่มกับสารละลาย TCS ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	24
ประวัตินักวิจัย และคณะ	25



สารบัญตาราง

ตารางที่ 4-1

ผลการสกัดเหง้าเนระพูสีไทย

หน้า

12



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1-1	ดอกและเหง้าเนระพูสีไทย	2
ภาพที่ 2-1	Diosgenin จากเหง้าเนระพูสีไทย	5
ภาพที่ 2-2	ผังแสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งไซโคลออกซีจีเนสของยาระงับการอักเสบ	8
ภาพที่ 3-1	ผังแสดงการเตรียมส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย	10
ภาพที่ 4-1	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย	13
ภาพที่ 4-2	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของ vitamin C	14
ภาพที่ 4-3	แสดงความอยู่รอดของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7	15
ภาพที่ 4-4	แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ COX 2 โดย ส่วนสกัดซาโปนินของเนระพูสีไทย	16



บทที่ 1. บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

เนระพูสีไทย (รูปที่ 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tacca chantrieri* Andre อยู่ในวงศ์ Tacaceae เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดิน และมีลักษณะเด่นที่ดอกสีเขียวม่วง รูปร่างคล้ายค้างคาว สามารถใช้เป็นไม้ประดับได้ในช่อดอกค้างคาว (bat flower) มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อน พบได้ในป่าร้อนชื้นทุกภาคของประเทศไทย ชาวบ้านนำใบอ่อนและดอกปิ้งไฟรับประทานเป็นผักกับลาบหรือน้ำพริก ส่วนเหง้านำมาต้มรับประทานเป็นอาหารบำรุงกำลัง การแพทย์พื้นบ้านของไทยระบุว่าเหง้าของเนระพูสีไทยมีสรรพคุณแก้ปวดเมื่อยเนื้อตัว แก้ปวดท้องและแก้อาหารเป็นพิษ ในขณะที่ชาวจีนใช้น้ำที่ต้มจากเหง้าต้มเพื่อรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ตับอักเสบ วัณโรคแห่งปอด แผลไฟไหม้ อาการอักเสบ และท้องเสีย

การศึกษาเบื้องต้น (ในสัตว์ทดลอง) ของผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบและส่วนสกัด ซาโปนิน (saponin fraction) จากเหง้าเนระพูสีไทย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์ระงับปวด ระงับการอักเสบ และยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ผลจากการศึกษาที่ผ่านมาแม้จะแสดงให้เห็นโดยปราศจากข้อสงสัยว่า เนระพูสีไทยมีฤทธิ์ระงับการอักเสบ แต่มิได้บ่งชี้ถึงกลไกการออกฤทธิ์ การวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษาผลของสารออกฤทธิ์ในเหง้าเนระพูสีไทยต่อกลไกการอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ต่อ ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase, COX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ ผลการวิจัยจะสามารถใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญจากพืชสมุนไพรชนิดนี้ และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวิจัยเพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการดูแลสุขภาพในโอกาสต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อแยกส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต่อไซโคลออกซีจีเนสของส่วนสกัดดังกล่าว

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบผลการออกฤทธิ์ของสารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทยต่อการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส (COX-2)
2. ข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการสกัดสารซาโปนิน ซึ่งสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของข้อถ้อยสิทธิ์เมื่อมีการจดสิทธิบัตรการใช้พืชสมุนไพรชนิดนี้ในภายหน้า



รูปที่ 1 ดอกและเหง้าเนระพูสีไทย

1.4 คำถามหลักของงานวิจัย

1. สารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทยมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2 หรือไม่
2. สารซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทยมีฤทธิ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระหรือไม่

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

ฤทธิ์ระงับการอักเสบของสารออกฤทธิ์จากเหง้าเนระพูสีไทยน่าจะมาจากการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2

1.6 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ ทำการสกัดเหง้าเนระพูสีไทยเพื่อให้ได้ส่วนสกัดซาโปนิน (saponin fraction) ปริมาณเพียงพอสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2

1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

1 ปี นับแต่ 1 ตุลาคม 2551 – 30 กันยายน 2552

1.8 นิยามศัพท์

อนุมูลอิสระ (free radical)

หมายถึง โมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากมีหรือขาดอิเล็กตรอนไป 1 ตัว โดยปกติธาตุต่างๆที่อยู่ในโมเลกุลที่เสถียรจะต้องมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่มีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนมาอีกหนึ่งตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียร ต้องไปแย่งอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาเป็นทอดๆ สำหรับร่างกายของคนเรานั้นความไม่เสถียรของอนุมูลอิสระถือว่าเป็นอันตรายอย่างมาก มีหลักฐานจำนวนมากบ่งชี้ว่า อนุมูลอิสระ มีผลทำให้เกิดการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อ (Conner and Grisham, 1996)

ไซโคลออกซีจีเนส (Cyclooxygenase หรือ COX, EC 1.14.99.1)

หมายถึง เอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งการสังเคราะห์ สาร prostanoids ชนิดต่างๆ ได้แก่ prostaglandins, prostacyclins และ thromboxane ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการอักเสบ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ มีผลบรรเทาการอักเสบและการปวด ยาระงับการอักเสบในกลุ่ม Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) เช่น aspirin และ ibuprofen ก็ออกฤทธิ์ได้โดยการยับยั้งการทำงานของ

ของเอนไซม์นี้ เอนไซม์นี้เดิมเรียก prostaglandin synthase (PHS) และ prostaglandin endoperoxide synthetase (PES)

ซาโปนิน (saponin)

สารประกอบที่มีโครงสร้างของ terpenes หรือ steroid เกาะกับโมเลกุลของน้ำตาล จัดเป็นสารประกอบก้ำกลัยโคไซด์ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ทำให้เกิดฟองและสารอิมัลชันเมื่ออยู่ในตัวกลางที่เป็นน้ำ

1.9 คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยง รุจจนเวท

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

หน่วยงานต้นสังกัด

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ที่อยู่ติดต่อ

333 หมู่ 1 ต.ท่าสูด อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

โทรศัพท์

0 5391 6824

โทรสาร

0 5391 6821

โทรศัพท์เคลื่อนที่

089-755-6711

E-mail

chaiyong@mfu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

อาจารย์ พหล แสนสมชัย

หน่วยงานต้นสังกัด

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ที่อยู่ติดต่อ

333 หมู่ 1 ต.ท่าสูด อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

โทรศัพท์

0 5391 6830

โทรสาร

0 5391 6830

โทรศัพท์เคลื่อนที่

089-635-7096

E-mail

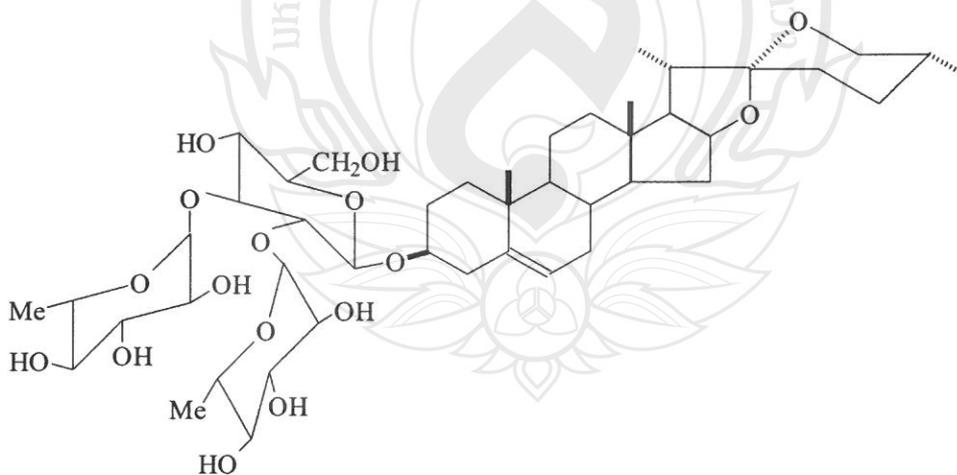
lyw11@hotmail.com

บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและกรอบผลงานวิจัย

เนระพูสีไทย

เนระพูสีไทย หรือว่านค้ำควา (*Tacca chantrieri* Andre) เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี อยู่ในวงศ์ Tacaceae มีเหง้าใต้ดิน ดอกสีเขียวม่วง คุคล้ายค้ำควา กระจายพันธุ์ในเขตร้อน พบได้ในป่าร้อนชื้นทุกภาคของประเทศไทย ชาวบ้านนำไปอ่อนและดอกปิ้งไฟรับประทานเป็นผักกับลาบหรือน้ำพริกส่วนเหง้านำมาต้มรับประทานเป็นอาหารบำรุงกำลัง การแพทย์พื้นบ้านของไทยระบุว่าเหง้าของเนระพูสีไทยมีสรรพคุณแก้ปวดเมื่อยเนื้อตัว แก้ปวดท้องและแก้อาหารเป็นพิษ ในขณะที่ชาวจีนใช้น้ำที่ต้มจากเหง้าต้มเพื่อรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ตับอักเสบ วัณโรคเหง้าปอด แผลไฟไหม้ อากรรอักเสบ และท้องเสีย การศึกษาทางพฤกษเคมีของเนระพูสีไทย มีรายงานครั้งแรกโดยศาสตราจารย์ Zhu Jun และ คณะ จาก Kunming Institute of Botany เมื่อปี 1983 (Jun et al, 1983) เป็นรายงานการค้นพบสารประกอบ steroidal saponin Diosgenin-3 β -O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranoside (รูปที่ 1) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ diosgenin รายงานนี้ได้เสนอว่า สืบเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมี เนระพูสีไทย จึงมีความใกล้เคียงกับพืชในวงศ์ Dioscoreacea และจัดอยู่ในอันดับ Liliales



รูปที่ 1 Diosgenin จากเหง้าเนระพูสีไทย

การศึกษาทางเคมีต่อมา เป็นของนักวิจัยชาวญี่ปุ่น ในปี 2002 Yokosuka และคณะ จาก Tokyo University of Pharmacy and Life Science (Yokosuka et al., 2002a) ได้รายงานการค้นพบสารประกอบ

diarylheptanoids และ diarylheptanoid glycosides จากเหง้าของเนระพูสีไทย และยังสามารถแสดงให้เห็นว่า สารประกอบเหล่านี้มี cytotoxic activity ต่อ HL 60 human promyelocytic leukemia cells, HCS 2 human oral squamous carcinoma cells, และ normal human gingival fibroblasts

ในปีเดียวกัน Yokosuka และคณะ (Yokosuka et al., 2002b) ยังได้รายงานการค้นพบ สารประกอบ spirostanol saponins ชนิดใหม่ 4 อย่าง จากเหง้าของเนระพูสีไทย และยังสามารถแสดงให้เห็นว่า สารประกอบเหล่านี้มี cytotoxic activity ต่อ HL 60 human promyelocytic leukemia cells ต่อมา นักวิจัย คณะเดียวกันนี้ยังสามารถแยก สารประกอบ glycosides ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของ campesterol อีก 7 ชนิด (Yokosuka et al., 2005)

การศึกษารูททางเภสัชวิทยา (ในสัตว์ทดลอง) ของผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบและส่วนสกัด ซาโปนิน (saponin fraction) จากเหง้าเนระพูสีไทย มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์ระงับปวด ระงับการอักเสบ และยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยในส่วนของคัดกรองฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ผู้วิจัยได้นำเสนอ (oral presentation) ในการประชุมวิชาการประจำปี การแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือกแห่งชาติครั้งที่ 5 ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2551 ที่กรุงเทพฯ และ ในส่วนฤทธิ์ระงับปวดและระงับการอักเสบ ได้นำเสนอ (oral presentation) ในการประชุม The 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2551 ที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พะเยา และในส่วนของฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนโลหิต ได้ตีพิมพ์ในวารสาร Pharmaceutical Biology (Tiamjan et al., 2007)

กระบวนการอักเสบ และยาระงับอาการอักเสบ

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาของร่างกายที่ตอบสนอง หรือผ่อนคลายความรุนแรง ของอันตราย ที่กำลังกระทำต่อร่างกาย กระบวนการอักเสบ มีความจำเป็น และสำคัญอย่างยิ่ง ต่อการมีชีวิตอยู่ เมื่อมีอันตรายแบบใดๆ กระทำต่อร่างกาย เบื้องต้น ระบบภูมิคุ้มกัน จะทำการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง เพื่อควบคุม ลด จำกัดและทำลายสาเหตุของการอักเสบในทันที ไม่ให้ลุกลามทำลายเนื้อเยื่อร่างกายต่อไป เรียกการตอบสนองเช่นนี้ว่า การอักเสบเฉียบพลัน [acute inflammation] และตามมาด้วยการซ่อมแซมความเสียหายเล็กน้อย จากการอักเสบเฉียบพลันครั้งนั้น แต่หากระบบภูมิคุ้มกัน ควบคุมสาเหตุก่อการอักเสบทันทีทันใด ไม่ได้ดี ทำให้การทำลาย ลุกลาม รุกรานอย่างต่อเนื่องนานออกไปอีก ระบบภูมิคุ้มกัน จะขยายผลการควบคุม เพิ่มกลไกเฉพาะเจาะจง เพิ่มประสิทธิภาพการทำลายสาเหตุก่อการอักเสบอีก เรียกว่า ไปกระตุ้น adaptive immune response เรียกภาวะเช่นนี้ว่า การอักเสบเรื้อรัง [chronic inflammation] มี เซลล์หรือเนื้อเยื่อถูกทำลายมากขึ้น และหากการควบคุมด้านทานยังทำไม่ได้หรือทำไม่ได้ดี การทำลายเนื้อเยื่ออย่างถาวรจะตามมา

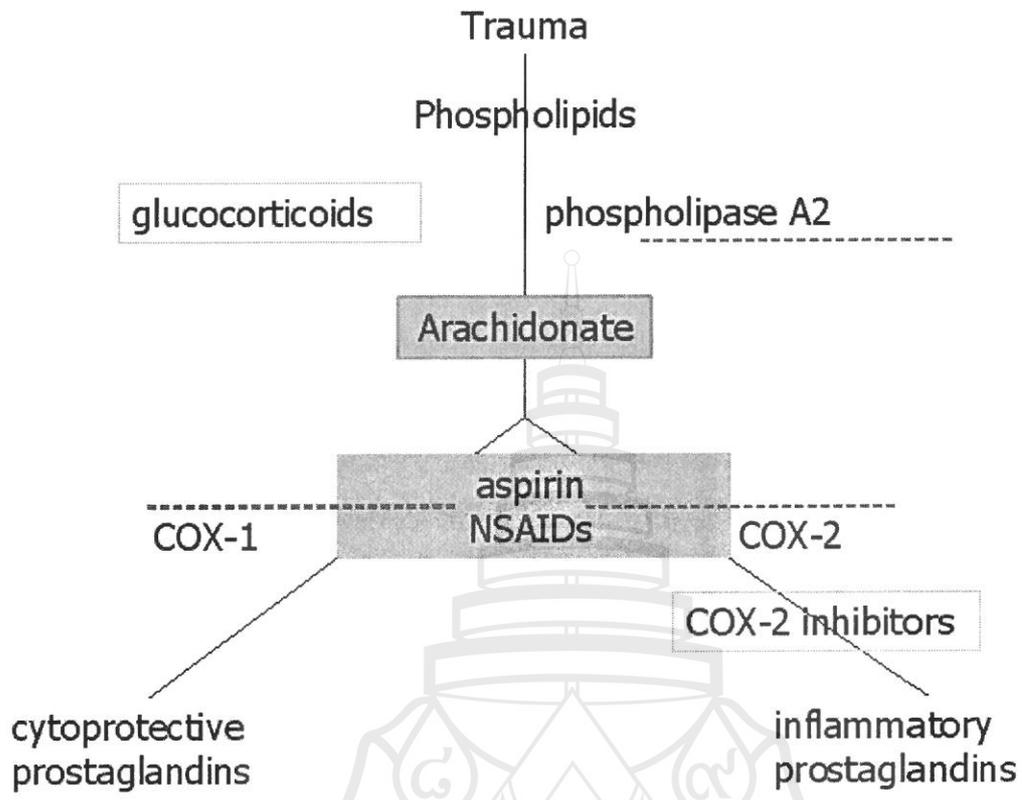
ปัจจุบัน ยาที่ใช้ระงับการอักเสบได้แก่ยาในกลุ่มสเตียรอยด์ และยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ หรือเรียกสั้น ๆ ว่า NSAIDs ยากลุ่มหลังนี้จัดเป็นยาที่มีฤทธิ์ระงับปวด ลดไข้ และต้านการอักเสบ ผลข้างเคียงที่พบได้บ่อยจากการใช้ยา คือ ผลต่อระบบทางเดินอาหาร ซึ่งมักพบอาการปวดแสบท้อง เกิดแผล และมีเลือดออกในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ยังพบผลข้างเคียงต่อไต และระบบการแข็งตัวของเลือด ทำให้เกิดการบวม น้ำไปจนถึงภาวะไตพิการ และเพิ่มการมีเลือดออกในกระเพาะอาหาร สาเหตุสำคัญเกิดจากการที่ยาไปยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase หรือที่เรียกว่า COX ซึ่งทำหน้าที่สร้างสารสื่อกลางโพรสตาแกลนดิน ที่ทำหน้าที่ปกป้องเยื่อทางเดินอาหาร ควบคุมการทำงานของไต และทำให้เลือดแข็งตัวในบริเวณที่เกิดบาดแผล เพื่อให้เลือดหยุดไหล ในขณะที่ยาระงับการยับยั้งเอนไซม์ COX ก็จะทำให้เกิดผลในการรักษา คือ ระงับปวด และต้านการอักเสบ แต่จะเกิดขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบ

ในปัจจุบันมีการค้นพบว่า การเกิดผลในการรักษาและผลข้างเคียงนั้น มาจากการยับยั้งเอนไซม์ COX ที่ต่างชนิดกัน (รูปที่ 2) นั่นคือผลข้างเคียงเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ซึ่งพบตามปกติในบริเวณเยื่อทางเดินอาหาร ที่ไต และในเกล็ดเลือด ในขณะที่ผลการรักษาเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ซึ่งจะสร้างขึ้นในบริเวณที่ร่างกายหรือเซลล์ได้รับบาดเจ็บ เช่น การอักเสบ การเกิดบาดแผล การติดเชื้อ เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนายาใหม่ ๆ ที่มีผลยับยั้งเฉพาะเอนไซม์ COX-2 มากกว่า COX-1 เพื่อลดผลข้างเคียงต่าง ๆ ที่กล่าวข้างต้น ปัจจุบันจึงมีการจัดแบ่งกลุ่มยา NSAIDs ใหม่เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มยา NSAIDs ที่มีอยู่เดิม หรือ Classical NSAIDs ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ COX-1 ได้เท่ากับเอนไซม์ COX-2 เมื่อใช้ยาในขนาดรักษาจะมีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร ไต และเกล็ดเลือด ตัวอย่างเช่น แอสไพริน อินโดเมธาซิน ไอบูโพรเฟน ไดโคลฟีแนก และไพรอซิกแคม เป็นต้น

2. ยาที่เลือกยับยั้ง เอนไซม์ COX-2 ยากลุ่มนี้เมื่อใช้ขนาดรักษาจะเลือกยับยั้ง เอนไซม์ COX-2 มากกว่า เอนไซม์ COX-1 (ประมาณ 2 ถึง 100 เท่า) ยาจึงมีผลข้างเคียงต่าง ๆ น้อยกว่ายากลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเช่น นาบิวมีโทน (Nabumetone), เมลลอกซิคแคม (Meloxicam), นิมซูลाइด์ (Nimesulide), อีโทโดแลก (Etoricoxib)

3. ยาที่เจาะจงยับยั้งเอนไซม์ COX-2 หรือเรียกเป็นกลุ่ม COXIBs ซึ่งเมื่อใช้ยาในขนาดรักษา แม้จะใช้ขนาดสูงขึ้น จะไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ COX-1 (ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ COX-2 สูงกว่า เอนไซม์ COX-1 มากกว่า 100 เท่าขึ้นไป) จึงไม่พบผลข้างเคียงต่อทางเดินอาหาร ไต และเกล็ดเลือด ตัวอย่างเช่น ซีรีค็อกซิบ (Cerecoxib) และ เอเรอโรค็อกซิบ (Etoricoxib) เป็นต้น



รูปที่ 2 แสดงการออกฤทธิ์ยับยั้งไซโคลออกซีจีเนสของยาระงับการอักเสบ

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมส่วนสกัดซาโปนิน

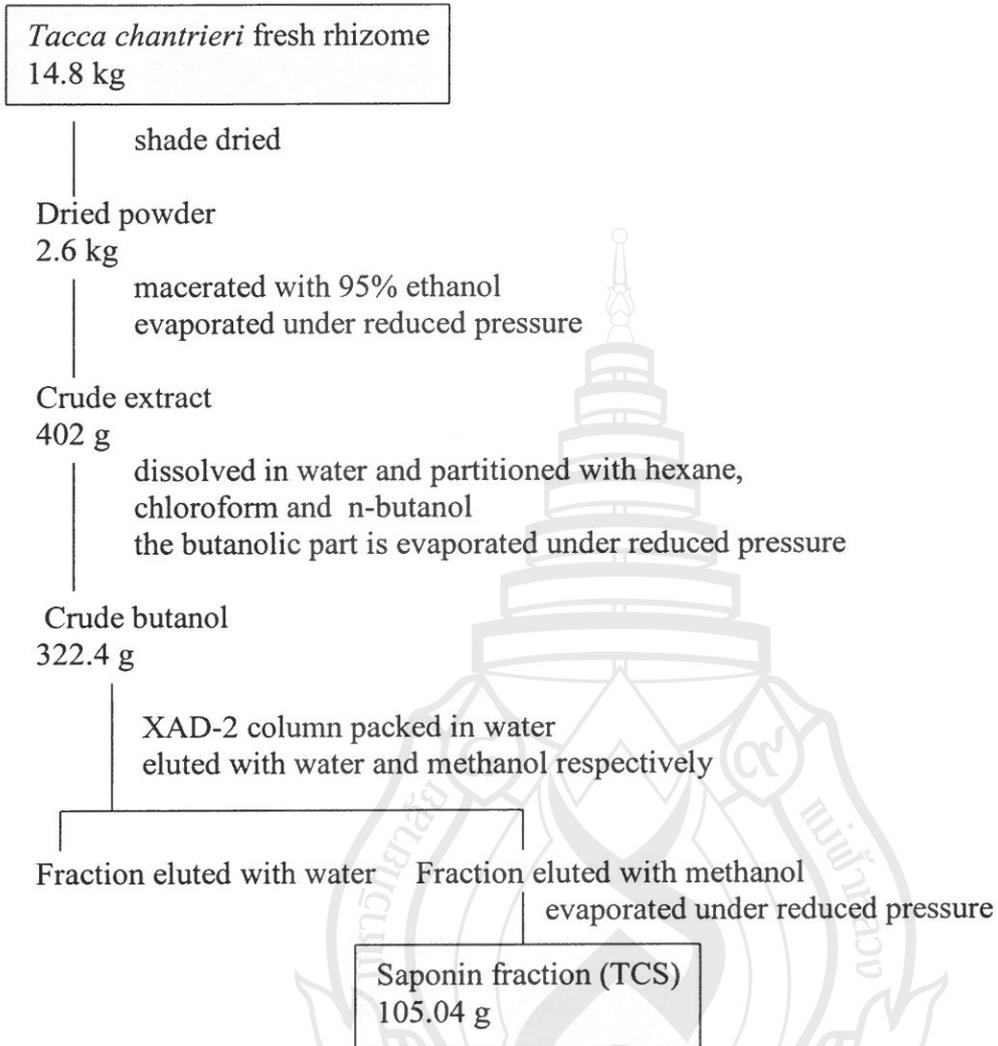
เก็บรวบรวมเหง้าของเนระพูสีไทยจากป่าบริเวณคอยแง่ม มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ในเดือน มีนาคม-พฤษภาคม 2552 พิสูจน์เอกลักษณ์ เก็บตัวอย่างพืชสดและแห้งเพื่อยืนยันในอนาคต หั่นเหง้าของ เนระพูสีไทยสด เป็นชิ้นเล็กๆ ตากแห้งในที่ร่มแล้วบดเป็นผงหยาบสกัดผงแห้ง ด้วย 95% EtOH แล้ว ระบายเอาอัลกอฮอล์ออก ภายใต้อุณหภูมิห้อง สกัดสารที่ได้นี้ด้วย hexane, chloroform และ butanol ตามลำดับ นำเอาส่วนสกัด butanol มาแยกโดยใช้ Amberlite XAD-7 (Sigma) column และชะด้วย H₂O และ MeOH ระบายส่วนสกัดที่ชะด้วย methanol นี้ภายใต้อุณหภูมิห้อง และทำให้แห้งสนิทโดยใช้ lyophilizer ได้เป็นส่วนสกัดซาโปนิน (TCS) ดังแสดงผังการสกัดในรูปที่ 1

3.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) โดยใช้ microplate 96 หลุม (Lee *et al.*, 1998) ดังนี้ ละลาย DPPH 5 มก. ใน methanol 2 มล. เก็บในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลาย ทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ใน microplate ทั้ง 96 หลุม แต่ละหลุมเติม สารละลาย DPPH 5 ไมโครลิตร เขย่า เพื่อให้สารละลายผสมกันดี ห่อด้วย aluminium foil เพื่อป้องกันแสง หลังจากนั้น 30 นาที นำ plate ไป อ่านค่า optical density (OD) ของสารละลาย โดยใช้เครื่อง ELISA Reader (EL340 Biokinetic reader, Bio-Tek Instrumentation, USA) ที่ความยาวคลื่น 517 nm. โดยใช้สารละลาย DPPH ใน methanol เป็น control คำนวณ ร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - \text{OD}(\text{DPPH} + \text{sample}) / \text{OD}(\text{DPPH})] \times 100\%$$

นำข้อมูลที่ได้มา plot เป็นกราฟที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสาร ทดสอบและร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ สมการของความสัมพันธ์เชิงเส้นดังกล่าวนี้ สามารถใช้ คำนวณหาค่า half inhibitory concentration (IC₅₀) ได้ ค่า IC₅₀ นี้คือความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถ ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ในการทดสอบนี้ ใช้ vitamin C เป็นสารละลายมาตรฐาน เปรียบเทียบกับสารทดสอบ



รูปที่ 1 ฟังแสดงการเตรียมส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย

3.3 การหาความเข้มข้นของส่วนสกัดซาโปนินที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมสารละลาย TCS ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml ใน DMSO (Dimethylsulfoxide) จากนั้นเจือจางใน DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 50, 25, 20, 15, 10, 5, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ Mouse macrophage RAW 264.7 cell line เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS Penicillin และ streptomycin ในตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมี 5% CO_2 เลี้ยงเซลล์ 10^4 เซลล์ใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเติม DMEM ที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะเปลี่ยน Chromophore ที่สีเหลืองให้เป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร คำนวณเป็นร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงใน DMEM ที่มี 1% DMSO

3.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2

เลี้ยงเซลล์ RAW264.7 macrophage 10^6 เซลล์ใน T25 flask 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเปลี่ยนเป็น DMEM ที่มี Lipopolysaccharide (LPS) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ และส่วนสกัด TCS ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เลี้ยงต่อไปให้ครบ 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์ในแต่ละการทดลองโดยใช้ Scraper นำเซลล์มาล้างด้วย ice cold PBS จากนั้นแตกเซลล์ด้วย RIPA buffer (Lysis buffer) ที่มี protease inhibitor แช่ในอ่างน้ำแข็ง 20 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเพื่อแยกเศษเซลล์ออก นำ cell homogenate มาหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford Bradford (1976) รายละเอียดในภาคผนวก 1

นำโปรตีนจากเซลล์ที่ได้ปริมาณ 20 ไมโครกรัม แยกโดย 12% SDS-PAGE electrophoresis (120 V, 2 hours) จากนั้นถ่ายลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (0.1 mA, 1 hour) นำมาตรวจหาปริมาณของ COX2 โดย anti-COX2 polyclonal antibody (1:500) และ Goat anti-rabbit IgG peroxidase conjugate (Santa Cruz) 1: 10,000 นำไปแสดงผลโดย Enhanced chemiluminescence (ECL)

บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย

4.1 การเตรียมส่วนสกัดซาโปนิน

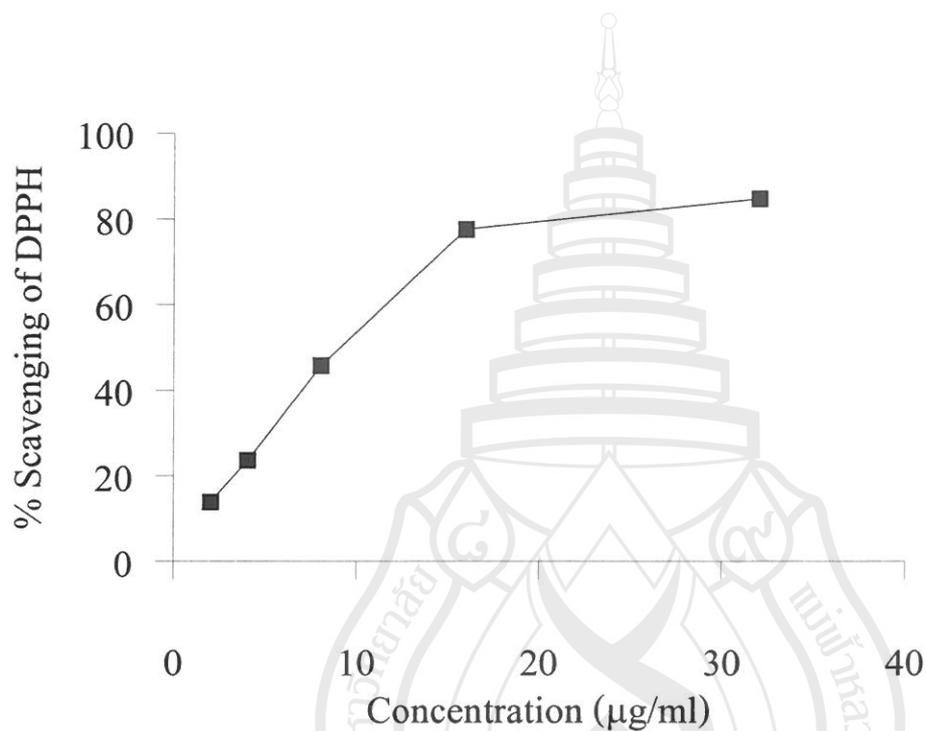
เหง้าเนระพูสีไทยสด 14.8 กก. เมื่อหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบแห้งและบดเป็นผงแล้ว ได้ผงแห้ง 2.6 กก. คิดเป็นร้อยละ 17.6 และเมื่อสกัดด้วยเอทานอลแล้วได้สารสกัดหยาบ(*Tacca chantrieri* ethanolic extract, TCE) 402 กรัม คิดเป็นร้อยละ 15.5 ของน้ำหนักแห้ง เมื่อสกัดแยกส่วนที่ละลายในเฮกเซนและคลอโรฟอร์มออกไปแล้วได้สารสกัดด้วย n-butanol (*Tacca chantrieri* total saponins) 322 กรัม คิดเป็นร้อยละ 12.40 ของน้ำหนักผงแห้ง ซึ่งเมื่อผ่าน XAD-7 column แล้ว แยกเป็นส่วนที่ชะด้วยน้ำได้ 147 กรัม หรือ ร้อยละ 5.64 และส่วนที่ชะด้วย MeOH (TCS) 105 กรัม หรือ ร้อยละ 4.07 ของน้ำหนักผงแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการสกัดเหง้าเนระพูสีไทย

Material	Weight (g)	per cent
Fresh rhizome	14,800	---
Dried powder	2600	100.00
Crude extracts	402	15.50
Total saponins	322	12.40
Active saponins (TCS)	105	4.07

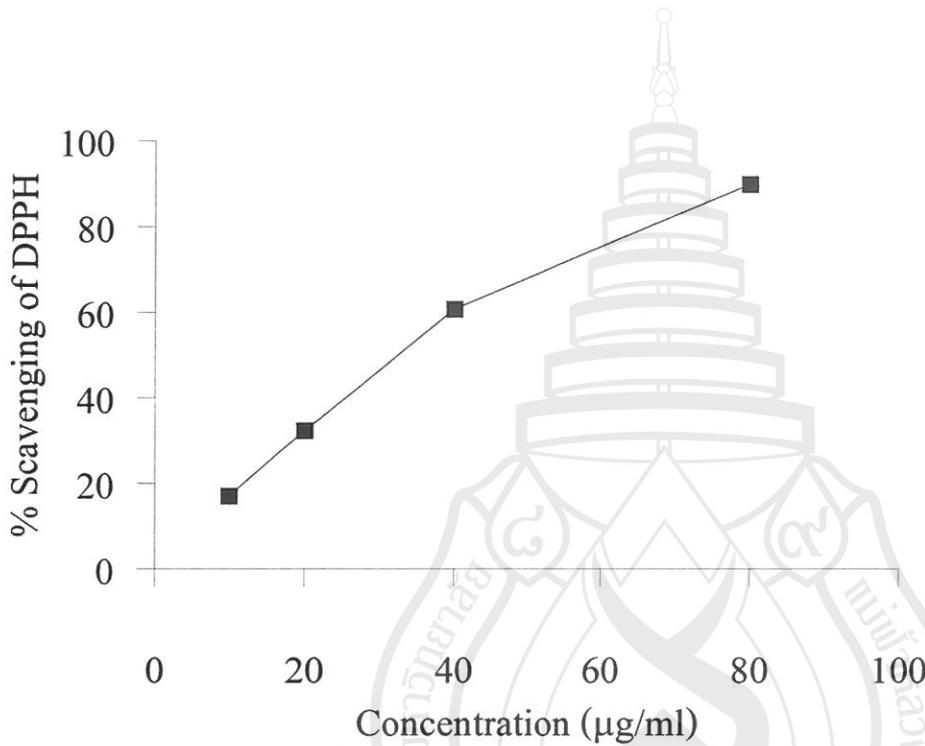
4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนสกัดชาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ ดังแสดงเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและฤทธิ์ยับยั้ง ในรูปที่ 1 โดยมีค่า IC50 ที่คำนวณได้ เท่ากับ 12.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 1 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสกัดชาโปนินจากเหง้าเนระพูสีไทย
จุดที่ plot เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ครั้ง

Vitamin C ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการทดสอบครั้งนี้ สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ ดังแสดงเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นและฤทธิ์ยับยั้ง ในรูปที่ 2 โดยมีค่า IC50 ที่คำนวณได้ เท่ากับ 37.48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

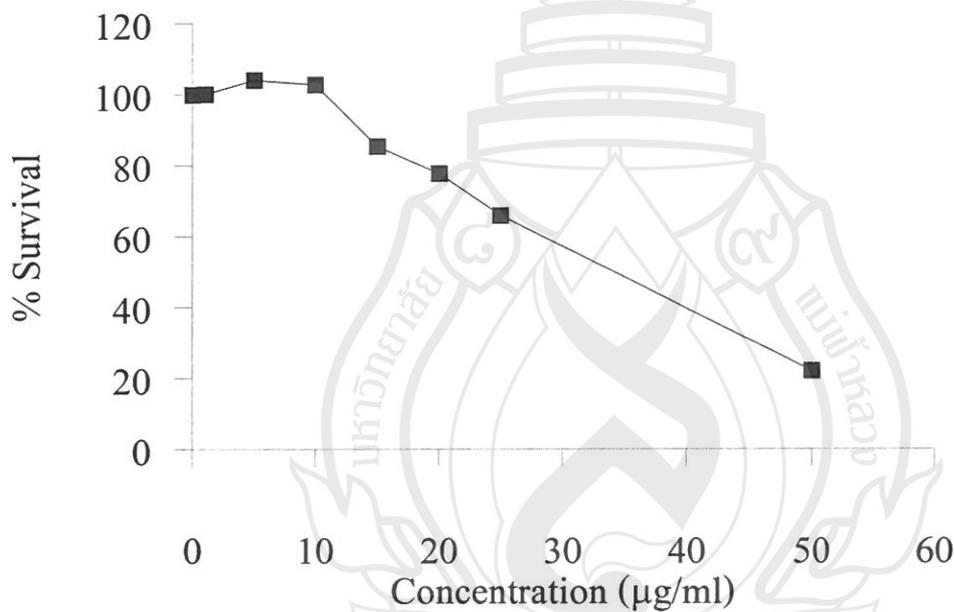


รูปที่ 2 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของ vitamin C
จุดที่ plot เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ครั้ง

4.3 การหาความเข้มข้นของส่วนสกัดซาโปนินที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

เมื่อบ่มกับส่วนสกัด TCS ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ส่วนสกัด TCS ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TCS ทำให้เกิดการตายของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3 ในการทดลองสามารถสังเกตได้จาก Chromophore ที่มีสีเหลืองจาง เปลี่ยนเป็น soluble formazan สีม่วง ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ดังนั้น ความเข้มข้นของ TCS ที่สามารถใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต่อไป ต้องไม่เกิน 10 $\mu\text{g/ml}$

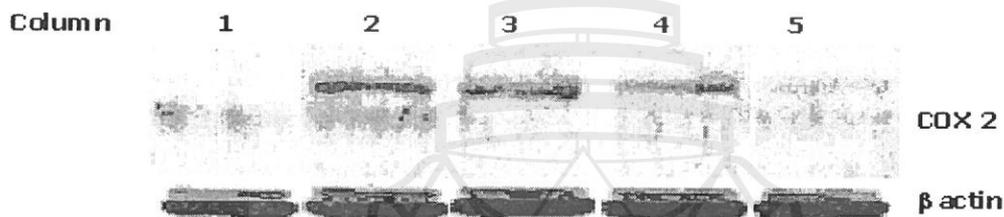


รูปที่ 3 แสดงความอยู่รอดของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 เมื่อบ่มกับสารละลาย TCS ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
จุดที่ plot เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ครั้ง

4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2

เนื่องจาก TCS มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตั้งที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 $\mu\text{g/ml}$ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ TCS ตั้งแต่ 0.1, 0.5, 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$. การใส่สารละลายส่วนสกัด TCS ลงไปในเซลล์ทดสอบก่อนกระตุ้นด้วย LPS พบว่าส่วนสกัด TCS ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ COX2 ได้อย่างสมบูรณ์

การยับยั้งการแสดงออกของ COX 2 บน SDS-PAGE ของ ส่วนสกัด TCS ที่ 0.1, 0.5 และ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ แสดงให้เห็นดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ COX 2 โดย ส่วนสกัดชาโปนินของระพู่สีไทย
แถวบนบน การแสดงออกของ COX 2 ปรากฏให้เห็นเป็นแถบสี
แถวบนล่าง แถบสีที่เกิดจาก β -actin ที่ใช้เป็นสารควบคุมในการทดลอง
แถวตั้งที่ 1 control (ไม่มี LPS)
แถวตั้งที่ 2 LPS
แถวตั้งที่ 3 LPS + TCS 0.1 $\mu\text{g/ml}$
แถวตั้งที่ 4 LPS + TCS 0.5 $\mu\text{g/ml}$
แถวตั้งที่ 5 LPS + TCS 1.0 $\mu\text{g/ml}$

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของส่วนสกัดจากเหง้าชะงาดไทย

ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถสกัดแยกส่วนสกัดซาโปนินได้ 105 กรัม จากเหง้าชะงาดไทยสด 14.8 กก. หรือคิดเป็น ร้อยละ 4.07 จากน้ำหนักผงเหง้าแห้ง

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เป็นเทคนิคที่ทำได้โดยง่ายและให้ผลทดสอบที่แม่นยำ ผลการทดสอบโดยวิธีนี้สามารถเทียบเคียงได้กับการทดสอบโดยเทคนิคอื่นๆ อาทิเช่น วิธี ABTS (Sanchez-Moreno, 2002) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นกับความสามารถของอิเล็กตรอนในการสะเทินอนุมูลอิสระ ในการศึกษาครั้งนี้ อนุมูลอิสระจากสาร DPPH ได้ถูกกำจัดโดย hydrogen ion จากส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าชะงาดไทย ทำให้เกิดเป็นโมเลกุล DPPH ที่เสถียร มีการเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลือง ซึ่งสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปนี้ได้โดยวิธี spectrophotometry (Blois, 1958). ค่า IC₅₀ ของส่วนสกัดซาโปนิน ที่คำนวณได้ เท่ากับ 12.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเทียบได้ประมาณ 1/3 ของค่า IC₅₀ ของ vitamin C ที่คำนวณได้ (37.48 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ในการศึกษาครั้งนี้ ยังได้ใช้ lipoprotein (LPS) กระตุ้นให้ เซลล์ macrophage สร้างโปรตีน COX-2 หลังจากนั้นจึงเติม antibody เพื่อจับกับ COX-2 ตรวจจับสารประกอบเชิงซ้อนนี้โดยการทำให้เกิดสีแล้ววัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ถ้าไม่มีสีเกิดขึ้นแสดงว่า ไม่มี COX-2 ขณะที่ถ้ามีสีเข้มหมายถึงการมี COX-2 ปรากฏ ในการทดลองนี้ใช้ beta-actin เป็นสารทดสอบควบคุมการทดลอง

จากการทดสอบ พบว่า สามารถตรวจวัดการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ macrophage RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ที่มีไม่มีส่วนสกัด TCS และที่มีส่วนสกัด TCS ในความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 ไมโครกรัม /มล แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มี TCS 1 ไมโครกรัม /มล หรือมากกว่าซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่า ส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าชะงาดไทยสามารถยับยั้งฤทธิ์ของเอนไซม์ COX-2 ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งในกระบวนการอักเสบ

กล่าวโดยสรุป งานวิจัยนี้ ชี้ให้เห็นว่า ส่วนสกัดซาโปนินจากเหง้าชะงาดไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ระงับการอักเสบของชะงาดไทยในสัตว์ทดลองที่ได้เคยรายงานมาก่อนนี้ อย่างน้อยบางส่วน เป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ทั้งสองแบบนี้

5.2 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจากงานวิจัย

1. การค้นพบว่า สารซาโปนินในเหง้าเนระพูสีไทยมีฤทธิ์ระงับการอักเสบโดยผ่านกลไกการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (COX-2) จากการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการเพิ่มพูนองค์ความรู้ทางเภสัชวิทยา ที่ใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ระงับการอักเสบที่ได้เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้
2. สามารถนำข้อมูลส่วนหนึ่ง เป็นพื้นฐานในการประดิษฐ์ผลิตภัณฑ์เพื่อระงับอาการอักเสบและระงับปวดที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัยกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในตลาดปัจจุบันได้ต่อไป
3. สามารถใช้ข้อมูลจากงานวิจัยนี้ ส่งเสริมการใช้พืชสมุนไพรเนระพูสีไทยที่หาได้ในชุมชน โดยคัดแปลงให้สามารถใช้ได้โดยง่าย เพื่อทดแทนการนำเข้าแผนปัจจุบัน



5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการวิจัยเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ระงับการอักเสบจากสารสกัดเนระพูสีไทยในเชิงพาณิชย์
2. ควรวิจัยเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เนระพูสีไทย และภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม สำหรับการปลูกขยายพันธุ์เพื่อตอบสนองการผลิตเชิงพาณิชย์
3. ควรยื่นขอจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์ การใช้ประโยชน์จากเนระพูสีไทย เพื่อคุ้มครององค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยทั้งในครั้งนีและที่ผ่านมา
4. ควรทำการศึกษาประสิทธิผลและผลข้างเคียงอื่นๆของสารสกัดหรือผลิตภัณฑ์จากเนระพูสีไทยในมนุษย์



บรรณานุกรม

- Conner, E.M., Grisham, M.B. 1996 Inflammation, free radicals, and antioxidants, *Nutrition* 12(4): 274-277.
- Jun Z, Chang-Xiang C, Run-min L, Chong-ren Y. Studies on the chemical components of the *Tacca Chanteraeri* Andre. *Acta Botanica Sinica* 1983; Nov 25 (6): 568-573.
- Yokosuka Y, Mimaki Y, Sakagami H, Sashida Y, 2002a. New diarylheptanoids and diarylheptanoid glycosides from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products* 65, 283-289.
- Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, 2002b. Spirostanol saponins from the rhizomes of *Tacca chantrieri* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 61(1), 73-78.
- Yokosuka A, Mimaki Y, Sakuma C, Sashida Y, 2005. New glycosides of the campesterol derivative from the rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Steroids* 70 (4), 257-265.
- Tiamjan, R., Panthong A., Taesotikul, T., Rujjanawate, C., Taylor W.C., Kanjanapothi, D. 2007. Hypotensive Activity of *Tacca chantrieri* and Its Hypotensive Principles. *Pharmaceutical Biology* 45 (6): 481-485.
- Lee S. K., Zakaria H. M., Cheng H. S., Luyengi L., Gamez E. J. C., Mehta R., Kinghorn A. D., and Pezzuto J. M. (1998), Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinat. Chem. High Through-put Screen.* 1, 35-46.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
- Sanchez-Moreno C (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *J Food Sci Tech Int.*, 8(3): 121-137.
- Blois MS (1958). Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.

ภาคผนวก 1.

Bradford protein assay

Principle

The assay is based on the observation that the absorbance maximum for an acidic solution of Coomassie Brilliant Blue G-250 shifts from 465 nm to 595 nm when binding to protein occurs. Both hydrophobic and ionic interactions stabilize the anionic form of the dye, causing a visible color change. The assay is useful since the extinction coefficient of a dye-albumin complex solution is constant over a 10-fold concentration range.

Equipment

In addition to standard liquid handling supplies a visible light spectrophotometer is needed, with maximum transmission in the region of 595 nm, on the border of the visible spectrum (no special lamp or filter usually needed). Glass or polystyrene (cheap) cuvettes may be used, however the color reagent stains both. Disposable cuvettes are recommended.

Procedure

Reagents

1. Bradford reagent: Dissolve 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml 95% ethanol, add 100 ml 85% (w/v) phosphoric acid. Dilute to 1 liter when the dye has completely dissolved, and filter through Whatman #1 paper just before use.
2. (Optional) 1 M NaOH (to be used if samples are not readily soluble in the color reagent).

Assay

1. Warm up the spectrophotometer before use.
2. Dilute unknowns if necessary to obtain between 5 and 100 μg protein in at least one assay tube containing 100 μl sample

3. If desired, add an equal volume of 1 M NaOH to each sample and vortex (see Comments below). Add NaOH to standards as well if this option is used.
4. Prepare standards containing a range of 5 to 100 micrograms protein (albumin or gamma globulin are recommended) in 100 μ l volume.
5. Add 5 ml dye reagent and incubate 5 min.
6. Measure the absorbance at 595 nm.

Analysis

Prepare a standard curve of absorbance versus micrograms protein and determine amounts from the curve. Determine concentrations of original samples from the amount protein, volume/sample, and dilution factor, if any.

Comments

The dye reagent reacts primarily with arginine residues and less so with histidine, lysine, tyrosine, tryptophan, and phenylalanine residues. Obviously, the assay is less accurate for basic or acidic proteins. The Bradford assay is rather sensitive to bovine serum albumin, more so than "average" proteins, by about a factor of two. Immunoglobulin G (IgG - gamma globulin) is the preferred protein standard. The addition of 1 M NaOH was suggested by Stoscheck (1990) to allow the solubilization of membrane proteins and reduce the protein-to-protein variation in color yield.

References

- Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
- Stoscheck, CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 182: 50-69 (1990).

ภาคผนวก 2

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของส่วนสกัดชาโพนินจากเหง้าเนระพูสีไทย

Conc. (ug /ml)	experiment 1	experiment 2	experiment 3	Mean	SD
1	5.80	4.20	6.90	5.63	1.36
2	12.64	17.52	11.61	13.92	3.16
4	24.02	21.78	25.24	23.68	1.75
8	43.79	47.51	46.20	45.83	1.89
16	77.29	80.12	75.61	77.67	2.28
32	82.95	84.18	87.30	84.81	2.24
64	95.58	94.71	96.20	95.50	0.75

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ vitamin C

Conc. (ug /ml)	experiment 1	experiment 2	experiment 3	Mean	SD
5	13.14	10.02	14.02	12.39	2.10
10	18.23	17.67	15.34	17.08	1.53
20	32.78	30.24	33.89	32.30	1.87
40	57.61	61.74	62.98	60.78	2.81
80	87.65	95.64	86.48	89.92	4.99
160	94.85	95.88	92.14	94.29	1.93

ภาคผนวก 3

ค่าดูดกลืนแสงและ ร้อยละของเซลล์ mouse macrophage RAW 264.7 ที่อยู่รอด เมื่อบ่มกับสารละลาย TCS ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50 ไมโครกรัม/มล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Conc ($\mu\text{g/ml}$)	Optical density (O.D.)			% Survival			Mean	S.D.
	Exp.1	Exp.2	Exp.3					
0	0.92	0.82	0.854	100	100	100	100	0
1	0.87	0.877	0.843	95	107	99	100	6
5	0.829	0.907	0.952	90	111	111	104	12
10	0.831	0.898	0.926	90	110	108	103	11
15	0.717	0.714	0.778	78	87	91	85	7
20	0.669	0.667	0.676	73	81	79	78	4
25	0.573	0.546	0.589	62	67	69	66	3
50	0.195	0.19	0.186	21	23	22	22	1

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการ

ดร.ไชยยง รุจจนเวท

วัน เดือน ปี และสถานที่เกิด 17 ตุลาคม พ.ศ.2500 กรุงเทพมหานคร

วุฒิการศึกษา B.Sc. (Medical Technology) ChiangMai University พ.ศ. 2528
M.Sc. (Pharmacology) ChiangMai University พ.ศ. 2531
Ph.D. (Pharmacology) ChiangMai University พ.ศ. 2540

งานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร

1. **Rujjanawate, C.** Apisariyakul, A. 1989. Effect of paraquat on skeletal contractile responses in albino rats. *Thai J Pharmacol* 11: 25-32.
2. Marles, R., Durst, T., Kobaisy, M., Soucy-Breau, C., Abou-Zaid, M., Arnason, J.T., Kacew, Sam., Kanjanapothi, D., **Rujjanawate, C.**, Meckes, M., Lozoya, X. 1995. Pharmacokinetics metabolism and toxicity of the plant-derived phototoxin α -terthienyl, *Pharmacology & Toxicology* 77: 164-168.
3. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. 2000. The gastroprotective effect of the aqueous extract of roselle. *Thai J Phytopharmacy* 7(2): 1-6.
4. Kawpinit, D., **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Panthong, A., Taesotikul, T. 2000. *Gynostemma pentaphyllum* makino: a plant with therapeutic potentials. *ACGC Chemical Research Communications* 11: 60-61.
5. **Rujjanawate, C.**, Amornlerdpison, D., Kanjanapothi, D. 2001. Gastroprotective effect of Thai propolis. *Thai J Pharmacol* 23(1): 9-15.
6. **Rujjanawate, C.**, Amornlerdpison, D., Kanjanapothi, D. 2001. Gastroprotective effect of Thai roselle mucilage. *Thai J Pharmacol* 23(2-3): 95-100.
7. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Panthong, A. 2003. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. *J. Ethnopharmacology* 89(1): 91-95.
8. Wisitpongphan, W., Ruangyuttikarn, W., **Rujjanawate, C.**, Panthong, A., Vinitketkumnuen, U., Lertprasertsuk, N. 2003. Toxicity tests of RangJert (*Thunbergia laurifolia* Linn.) leaves aqueous extract in rats. *Thai J Phytopharmacy* 10(2): 23-36.
9. Kanjanapothi, D., Panthong, A., Lertprasertsuke, N., Taesotikul, T., **Rujjanawate, C.**, Kaewpinit, D., Sudthayakorn, R., Choochote, W., Chaithong, U., Jitpakdi, A., Pitasawat, B. 2004. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). *J. Ethnopharmacology* 90(2-3): 359-365.
10. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. 2004. The anti-gastric ulcer effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Phytomedicine* 11(5): 431-435.
11. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. 2004. Analgesic effect of *Sapindus rarak* Pericarp. *J. Trop. Med. Plants*. 5(1): 11-14.
12. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacology* 102: 120-122.

13. **Rujjanawate, C.**, Kanjanapothi, D., Amornlerdpison, D. 2005. Antiulcerogenic activity of *Microspora floccosa*. J. Trop. Med. Plants. 6(2): 153-157.
14. Peerapornpisal, Y., Amornlerdpison, D., **Rujjanawate, C.**, Ruangrit, K., and Kanjanapothi, D., 2006. Two endemic species of macroalgae in Nan river, Northern Thailand as therapeutic agents. Science Asia 32 Supplement I: 71-76.
15. Tiamjan, R., Panthong A., Taesotikul, T., **Rujjanawate, C.**, Taylor W.C., Kanjanapothi, D. 2007. Hypotensive Activity of *Tacca chantrieri* and Its Hypotensive Principles. Pharmaceutical Biology 45 (6): 481-485.
16. Pojanagaroon, S., **Rujjanawate, C.**, Kittakoop, P 2009. Adaptogenic Active Fraction in Krachai-Dam (*Kaempferia parviflora* Wall ex Baker) Hexane Extract of Rhizomes, Thai. Agri. Res. J. 27(3): 256-274.

หนังสือ

1. ไพฑูรย์ ดอกบัวแก้ว, **ไชยยง รุจจนเวท**. พิเคราะห์ตำรายาพื้นบ้านล้านนา ฉบับวัดศรีเกิด. เชียงใหม่ : โรงพิมพ์มีงเมือง, 2546
2. ไพฑูรย์ ดอกบัวแก้ว, **ไชยยง รุจจนเวท**. เหล้าล้านนา : สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, โรงพิมพ์มีงเมือง, 2546
3. **ไชยยง รุจจนเวท**, บรรณาธิการ. 20 ปี สวนสมุนไพร สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน), 2549
4. **Chaiyong Rujjanawate**, Editor. 20th Aniversary HRH Princess Chakri Sirindhorn Herbs Garden. PTT Public Company Limited, 2006.
5. ไพฑูรย์ ดอกบัวแก้ว, **ไชยยง รุจจนเวท**. ตำรายาสมุนไพรของไทยใหญ่ในล้านนา เล่ม 1 : สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, โรงพิมพ์มีงเมือง, 2550
6. **ไชยยง รุจจนเวท**. (2551). การอดอาหารและการจำกัดแคลอรี, ใน เทวัญ ชานีรัตน์ และคณะ (บรรณาธิการ), อาหารเพื่อสุขภาพ (หน้า 565-590). กรุงเทพฯ : กรมการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข
7. **Chaiyong Rujjanawate**, Editor. The Essence of Thai Herbs. PTT Public Company Limited, 2008.
8. ไพฑูรย์ ดอกบัวแก้ว, **ไชยยง รุจจนเวท**. ตำรายาสมุนไพรของไทยใหญ่ในล้านนา เล่ม 2: สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, โรงพิมพ์มีงเมือง, 2551
9. ไพฑูรย์ ดอกบัวแก้ว, **ไชยยง รุจจนเวท**. ตำรายาสมุนไพรของไทยใหญ่ในจีน: สถาบันวิจัยสังคม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, โรงพิมพ์มีงเมือง, 2551

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ร่วมวิจัย

นาย พหล แสนสมชัย

ตำแหน่ง

คุณวุฒิ (สาขาความชำนาญ)

หน่วยงานต้นสังกัด

ที่อยู่ติดต่อ

โทรศัพท์

โทรสาร

โทรศัพท์เคลื่อนที่

E-mail

อาจารย์

ปริญญาโท ทางชีวเคมีเทคโนโลยี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ต.ท่าสูด อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

0 5391 6830

0 5391 6830

089-635-7096

lyw11@hotmail.com

