

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยนำร่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรไทยเพื่อการพัฒนา
อุตสาหกรรมอาหารที่ยั่งยืน

**Preliminary Research Project on Bioactive Compounds from Thai medicinal
Plants for the Development of Sustainable Food Industries**

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ทิพยางค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒตรา สวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพโรศิริศาล

หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูลี ยมภักดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานฉบับสมบูรณ์
โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช
ปีงบประมาณ 2553

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) โครงการวิจัยนำร่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรไทยเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารที่
ยั่งยืน

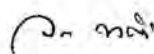
(ภาษาอังกฤษ) Preliminary Research Project on Bioactive compounds from Thai medicinal plants for the
development of sustainable food industries

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

ได้รับเงินอุดหนุนโครงการวิจัย เป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น 600,000.00 บาท

รายงานครั้งนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ซึ่งเป็นผลงานระหว่าง 1 ตุลาคม 2552 ถึง 30 กันยายน 2553

ลงชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชวศิริ)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

ปีงบประมาณ 2553

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) โครงการวิจัยนำร่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรไทยเพื่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารที่ยั่งยืน

(ภาษาอังกฤษ) Preliminary Research Project on Bioactive compounds from Thai medicinal plants for the development of sustainable food industries

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรินทร์ ชวนศิริ สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

คณะผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา สวัสดิ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูไพรศิริสาล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวลี ชมภักดี

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เเสาะหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อัลฟาไกลูโคซิเดสจากสารสกัดน้ำของสมุนไพรเสริมอาหารที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคเบาหวานและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารออกฤทธิ์โดยการใช้โพลีเมอร์เรซิน
2. เเสาะหาสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิลโคไลน์เอสเทอเรสและ/หรือบิวทิลโคไลน์เอสเทอเรสแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และพัฒนารูปแบบสารสกัดและ/หรือสารบริสุทธิ์จากสมุนไพร
3. เเสาะหาสารออกฤทธิ์จากสมุนไพร โดยติดตามฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจากระบบทดสอบในยีสต์ (yeast-based assay) และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลของสารบริสุทธิ์บางชนิดที่มีต่อวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในเซลล์ยีสต์

2. รายละเอียดของผลงานวิจัย

โครงการย่อยที่ 1 การพัฒนาวิธีการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสมุนไพรโดยใช้โพลีเมอร์เรซิน

โพลีเมอร์เรซิน (polymeric resin) สังเคราะห์จากปฏิกิริยา cross-linked polymerization ของ styrene monomer มีชื่อทางการค้าเช่น Diaion, Dowex และ Amberlite โพลีเมอร์เรซินถูกใช้เป็นเฟสคงที่ สำหรับการแยกสารอินทรีย์ที่มีขั้วออกจากระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก โดยสารที่ต้องการแยกจะถูกดูดซับบนพื้นผิวเรซิน ในขณะที่ละลายน้ำได้คิดว่า เช่น น้ำตาล เกลือแร่ จะถูกชะออกมาพร้อมกับน้ำ และสามารถเก็บสารที่ต้องการแยกโดยการชะด้วยอัลกอฮอล์ โพลีเมอร์เรซินถูกนำไปใช้การฟอกสีเครื่องคั้ม เช่น เบียร์ น้ำผลไม้ หรือแม้กระทั่งการผลิตยาปฏิชีวนะ ด้วยสมบัติที่โดดเด่นในการแยกสารออกจากระบบที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ลดขั้นตอนการทำให้

บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี และลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในขั้นตอนการ partition ในงานวิจัยนี้ศึกษาการใช้โพลิเมอร์เรซิน ในการสกัดแยกสารออกฤทธิ์สำคัญบางชนิดจากเมล็ดงา และใบมะตูม พบว่าการใช้ Diaion HP20 ร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย 85:15 MeOH:H₂O ให้อัตราส่วน sesaminol triglucoside : sesaminol diglucoside เท่ากับ 22:1 ซึ่งสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีที่ Moazzami และคณะ ซึ่งได้เพียง 17:1 สำหรับการศึกษากการสกัด aegelinoside A และ aegelinoside B ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์จากใบมะตูม พบว่า XAD-16 เป็นโพลิเมอร์เรซินที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมี adsorption capacity, desorption capacity และ Desorptio ratio สูงที่สุด

การสกัดแยก sesaminol glycoside จากกากงา

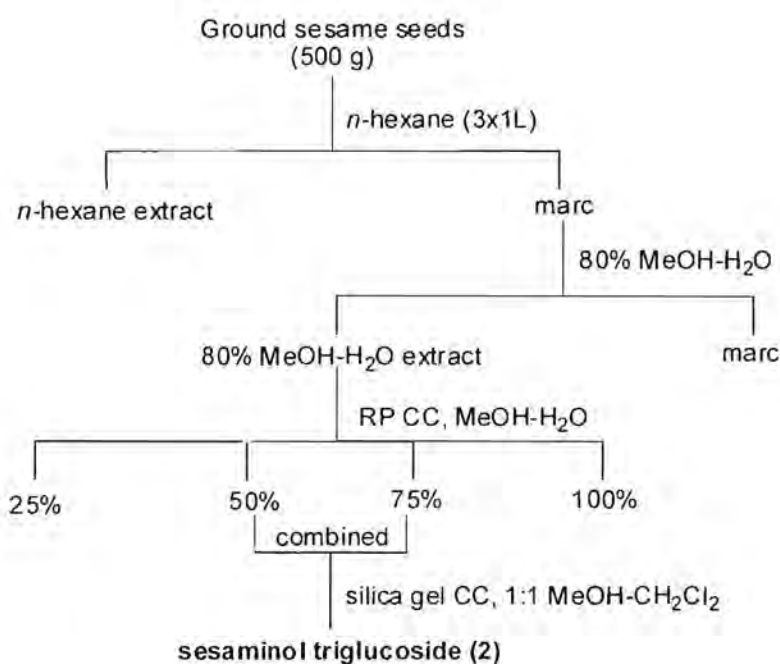
งาเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Pedaliaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Sesamum indicum* มีถิ่นกำเนิดในประเทศเอธิโอเปีย ในทวีปแอฟริกา แล้วแพร่กระจายไปยังอินเดียและจีน รวมทั้งส่วนต่าง ๆ ของโลกตามลำดับ ปัจจุบันนิยมใช้ในการประกอบอาหาร เนื่องจากในน้ำมันงามีกรดไขมันที่สำคัญต่อร่างกาย อีกทั้งมีสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้น้ำมันงาสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ไม่มีกลิ่นเหม็นหืนง่าย ซึ่งเป็นสมบัติที่ดีต่างจากน้ำมันพืชโดยทั่วไป กากงาที่เหลือจากการสกัดน้ำมันแล้ว มีการนำไปเป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ สามารถทดแทนกากธัญพืชชนิดอื่น เช่น กากถั่วเหลืองได้เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยระบุว่าส่วนของกากงามีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายชนิด โดยเฉพาะสารในกลุ่ม lignan glycoside องค์ประกอบหลักที่มักพบในสารกลุ่มนี้คือ sesaminol diglucoside (1) และ sesaminol triglucoside (2) สารในกลุ่ม sesaminol glycoside มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่างที่ที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ฯลฯ หากมีการนำกากงาที่ได้จากการสกัดน้ำมันแล้วมาสกัดต่ออีกครั้งเพื่อนำสารในกลุ่ม sesaminol glycoside มาใช้ประโยชน์ จะเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่กากงาเป็นอย่างมาก สำหรับโครงการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นพัฒนาวิธีการสกัด sesaminol glycoside จากกากงาโดยใช้โพลิเมอร์เรซิน



การเตรียมกากงา สกัดและแยก sesaminol glycoside เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐาน

สกัดแยก sesaminol glycoside จากเมล็ดงาโดยประยุกต์วิธีของ Moazzami และคณะ ดังนี้ นำงาขาว (500 g) ที่บดละเอียดแล้วมาสกัดด้วย *n*-hexane (1L) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาสารละลาย *n*-hexane ออก นำกากมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารละลาย *n*-hexane ที่สกัดได้ทั้งหมด 3 ครั้ง ระเหยตัวทำละลายด้วย rotary evaporator จะได้สารสกัด *n*-hexaneหนัก 13.8 g นำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 80% MeOH (1L) ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง นำสารละลายที่สกัดด้วย 80% MeOH มาระเหยให้แห้งจะได้สารสกัด 80% MeOHหนัก 5.7 g ละลายสารสกัด 80% MeOH อีกครั้งด้วย 25% MeOH-H₂O ค่อยๆ เติสารละลายที่ได้ลงบน flash column

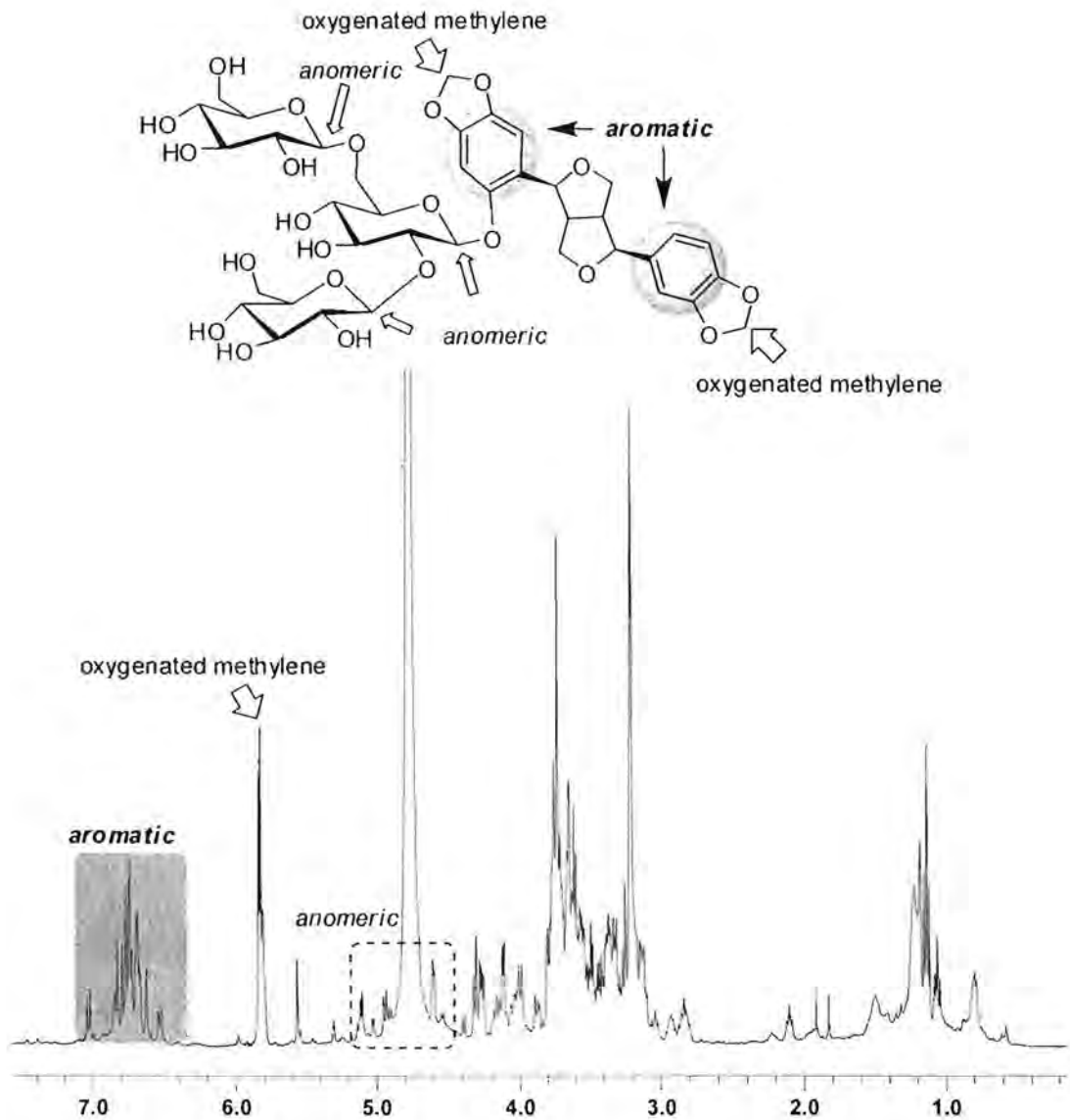
chromatography ($\phi 16 \times 12$ cm) ที่บรรจุด้วย C18 จนมีความสูง 8 cm นำสารละลายของสารสกัดเข้าสู่คอลัมน์ด้วย aspirator จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสม MeOH-H₂O 4 ระบบ (ระบบละ 500 mL) โดยมีสัดส่วน MeOH 25, 50, 75 และ 100% ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ ระบายให้แห้ง เมื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี พบว่า fraction ที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วย 50 และ 75% MeOH-H₂O มีองค์ประกอบหลักในกลุ่ม sesaminol glycoside เหมือนกัน จึงนำมารวมกันและแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย silica gel column chromatography ($\phi 5 \times 40$ cm) ชะคอลัมน์ด้วย 1:1 CH₂Cl₂-MeOH จะได้ sesaminol triglucoside หนัก 30 mg รายละเอียดของการสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 การสกัดและแยกสารมาตรฐาน sesaminol triglucoside (2) จากกากงา

การพิสูจน์โครงสร้าง sesaminol triglucoside ที่แยกได้

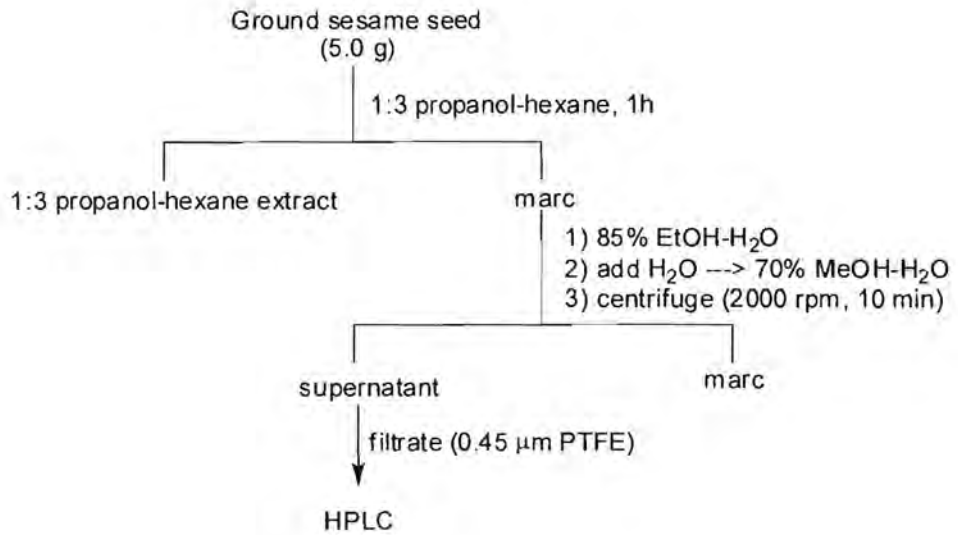
โครงสร้างของ sesaminol triglucoside (2) ที่แยกได้ยืนยันโดยเทคนิค ¹H NMR (รูปที่ 1) ซึ่งมีสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะสำหรับสารชนิดนี้ 3 ช่วงสำคัญคือ ช่วง aromatic (δ_{H} 6.6-7.2 ppm) ได้แก่สัญญาณของ 1,4,5-trisubstituted aromatic และ 1,2,4,5-tetrasubstituted aromatic ช่วงของ oxygenated methylene (δ_{H} ca 5.9 ppm) ทั้ง 2 ที่ และช่วงของ anomeric proton 3 ที่ (δ_{H} 4.3, 4.8, 5.0 ppm) เมื่อเทียบกับ chemical shift ที่มีในรายงานแล้วพบว่า โกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าสารที่แยกได้เป็น sesaminol triglucoside (2)



รูปที่ 1 ^1H NMR spectrum (CD_3OD) ของ sesaminol triglucoside (2)

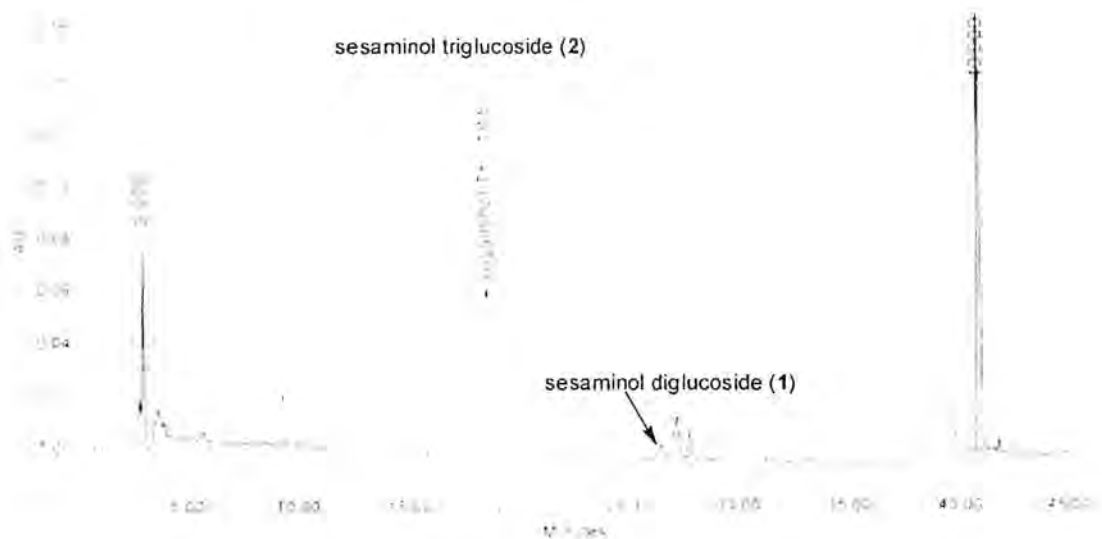
การวิเคราะห์ sesaminol glycoside ในกากงา

การวิเคราะห์ปริมาณ sesaminol glycoside ในเมล็ดงาได้ประยุกต์ใช้วิธีของ Moazzami และคณะ มีรายละเอียดการเตรียมตัวอย่างและวิธีวิเคราะห์ดังนี้ นำงาที่บดละเอียดแล้ว 5.0 g มาสกัดด้วย 1:3 propanol-hexane (30 mL) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองเอาสารละลายออก นำกากงาที่ผ่านการสกัดแล้วมาสกัดด้วย 85% EtOH- H_2O (8.25 mL) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำอีก 1.75 mL จนสัดส่วนของตัวทำละลายเป็น 70% EtOH- H_2O นำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่าน syringe filter (0.45 μm PTFE membrane) เอาเฉพาะสารละลายใส (supernatant) นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ sesaminol glycoside จากถั่วงา

สำหรับตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้ว พบว่ามี sesaminol triglucoside (2) ประมาณ 10 เท่า ของ sesaminol diglucoside (1)



รูปที่ 2 HPLC chromatogram ของการวิเคราะห์สารกลุ่ม sesaminol glycoside

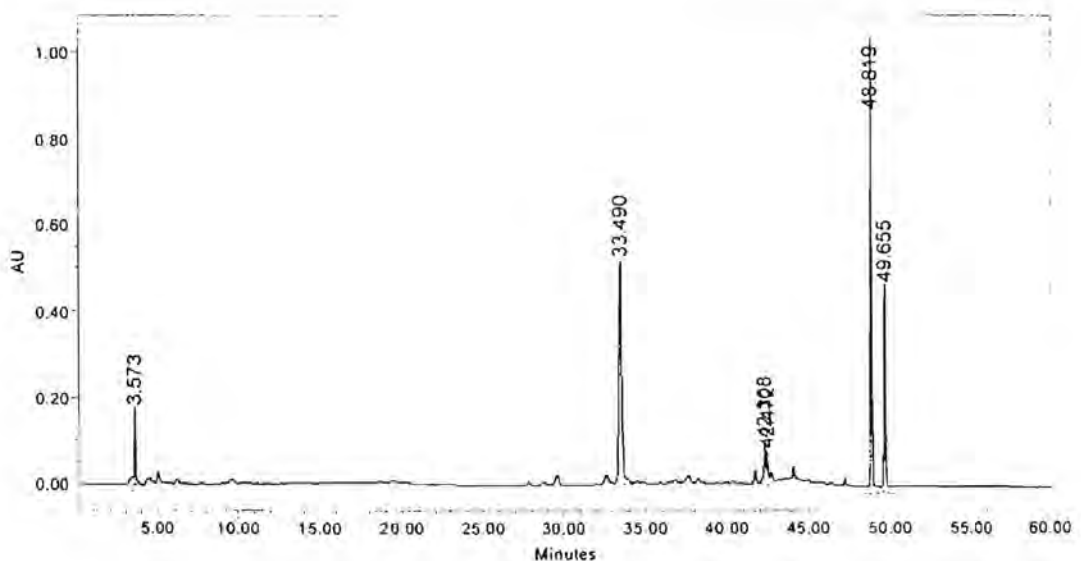
การสกัดแยกสาร sesaminol glycoside ด้วยโพลีเมอริกเรซิน

ในขั้นตอนนี้จะเป็นการศึกษาเพื่อลดขั้นตอนของการสกัด sesaminol glycoside เปรียบเทียบกับวิธีของ Moazzami และคณะ โดยนำเมล็ดงามาสกัดไขมันออกด้วย 3:1 hexane:propanol นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำกากงามาสกัดด้วย 85:15 MeOH:H₂O นาน 1 ชั่วโมง เช่นกัน นำส่วนของสารละลายที่สกัดได้เทลงในคอลัมน์ที่บรรจุ Diaion HP20 ที่ชุ่มด้วยน้ำ ชะด้วยน้ำและ 85:15 MeOH:H₂O นำส่วนที่ชะด้วย 85:15 MeOH:H₂O ไประเหยแห้งและวิเคราะห์ด้วย ¹H NMR สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ก็ดำเนินการเช่นกันเพียงแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็น 85:15 EtOH:H₂O และ 85:15 propanol:H₂O ในทุกขั้นตอนที่มีการใช้ระบบตัวทำละลายดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ด้วย ¹H NMR พบว่าการสกัดด้วยโพลีเมอริกเรซินให้ sesaminol glycoside ออกมาเช่นเดียวกับวิธีของ Moazzami และคณะ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าการสกัดทั้ง 4 วิธี ให้อัตราส่วนของ sesaminol triglucoside: sesaminol diglucoside ในช่วง 15-22:1 ซึ่งถือว่าใกล้เคียงกัน และพบว่าการสกัดด้วย 85:15 MeOH:H₂O โดยใช้โพลีเมอริกเรซินให้อัตราส่วนของ sesaminol triglucoside: sesaminol diglucoside สูงที่สุดคือ 22:1

ตารางที่ 1 อัตราส่วน sesaminol triglucoside และ sesaminol diglucoside จากการสกัดโดยการใช้โพลีเมอริกเรซิน เปรียบเทียบกับวิธีของ Moazzami และคณะ

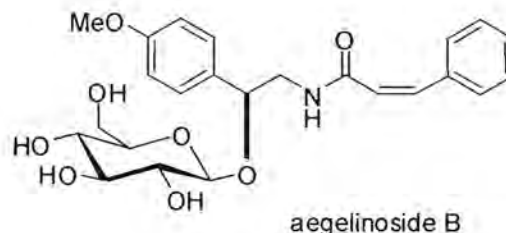
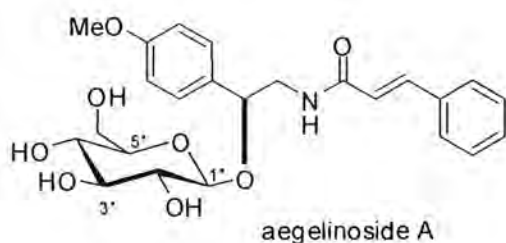
วิธีการสกัด	อัตราส่วน sesaminol triglucoside : sesaminol diglucoside
วิธีของ Moazzami และคณะ	17:1
สกัดด้วย 85:15 MeOH:H ₂ O	22:1
สกัดด้วย 85:15 EtOH:H ₂ O	15:1
สกัดด้วย 85:15 propanol:H ₂ O	17:1



รูปที่ 3 HPLC chromatogram ของเมล็ดงาที่สกัดด้วย โพลีเมอริกเรซินและใช้ตัวทำละลาย 85:15 MeOH:H₂O

การสกัดแยก aegelinoside A และ aegelinoside B จากใบมะตูม

มะตูม (*Aegle marmelos*) เป็นไม้ผลยืนต้นพื้นเมืองในพื้นที่ป่าดิบแล้งบนเนินเขาและที่ราบในอินเดีย ตอนกลางและพบโดยทั่วไปในประเทศไทย มะตูมใช้เป็นยารักษาอาการท้องร่วง ท้องเดิน โรคลำไส้ ตามแห้ง ไข้หวัด ธรรมดา และยังใช้รักษาอาการท้องผูกเรื้อรัง นอกจากนี้ใบมะตูมยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคเบาหวาน โดยมีสารออกฤทธิ์คือ aegelinoside A และ aegelinoside B เนื่องจากสารดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ อีกทั้งการแยกสารดังกล่าวมีขั้นตอนที่ซับซ้อน การสกัดแยกสารดังกล่าวด้วยการลดขั้นตอนและมีความเจาะจงมากขึ้นจะช่วยให้สามารถแยกสารดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ



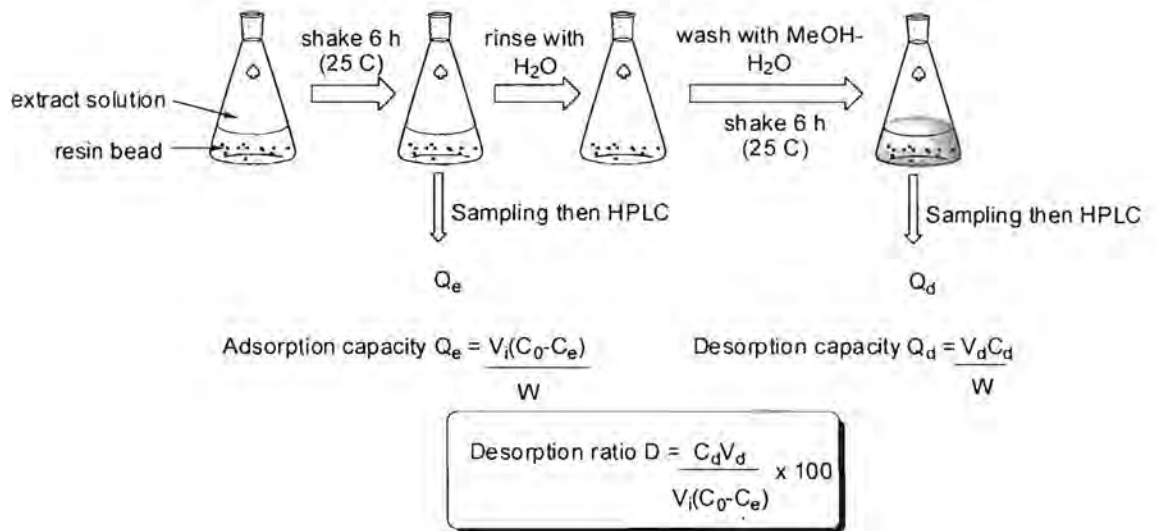
การศึกษาการดูดซับสารสำคัญจากใบมะตูมโดยใช้โพลีเมอร์จีน

การศึกษานี้เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยก สำหรับ polymeric resin ที่จะมีทั้งหมด 5 ชนิด คือ Diaion HP 20, XAD-4, XAD-7, XAD-16 และ XAD-1180 ซึ่งนิยมใช้ในการแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยมีสมบัติ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติทางเคมีและกายภาพของ polymeric resin ที่ใช้ในการวิจัย

Trade name	Structure	Pore	Surface area	Porosity	Particle size	Density
		radius (Å)	(m ² /g)	(mL/g)	(mm)	(g/mL)
Diaion HP20	SDVB	260	500	1.30	0.25-0.84	1.01
XAD-7	acrylic	90	450	1.14	0.25-0.84	1.24
XAD-1180	SDVB	300	600	1.68	0.25-0.84	1.04
XAD-4	SDVB	50	725	0.98	0.25-0.84	1.08
XAD-16	SDVB	100	800	1.82	0.25-0.84	1.08

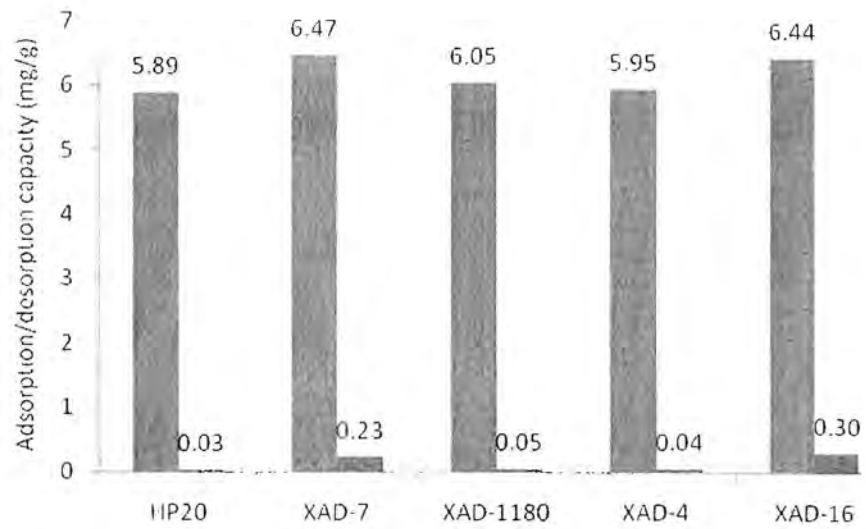
ประสิทธิภาพของ โพลีเมอริกเรซินแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัยหลัก คือ adsorption capacity (Q_e), desorption capacity (Q_d) และ desorption ratio (D) โดยทั่วไป โพลีเมอริกเรซินที่ดีและมีประสิทธิภาพในการดูดซับควรมีค่าทั้ง 3 ที่สูง เพราะนอกจากจะดูดซับได้ดีแล้ว เมื่อชะล้างสารสำคัญออกจากเรซินควรจะสามารถชะล้างได้มาก (Q_d มาก) และเหลือตกค้างน้อยที่สุด (D มาก) การศึกษาประสิทธิภาพของโพลีเมอริกเรซินแต่ละชนิด สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 3



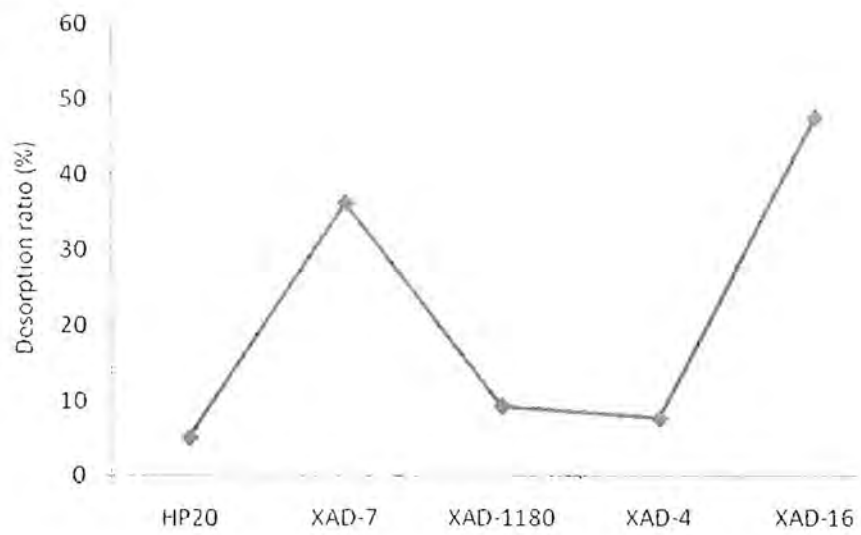
where V_i = initial volume of extract solution (mL)
 V_d = desorption volume of extract solution (mL)
 C_0 = initial concentration of extract solution (mg/mL)
 C_e = equilibrium concentration (after adsorption) of extract solution (mg/mL)
 C_d = desorption concentration of extract solution (mg/mL)
 W = weight of resin bead (g)

แผนภาพที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับของโพลีเมอริกเรซิน

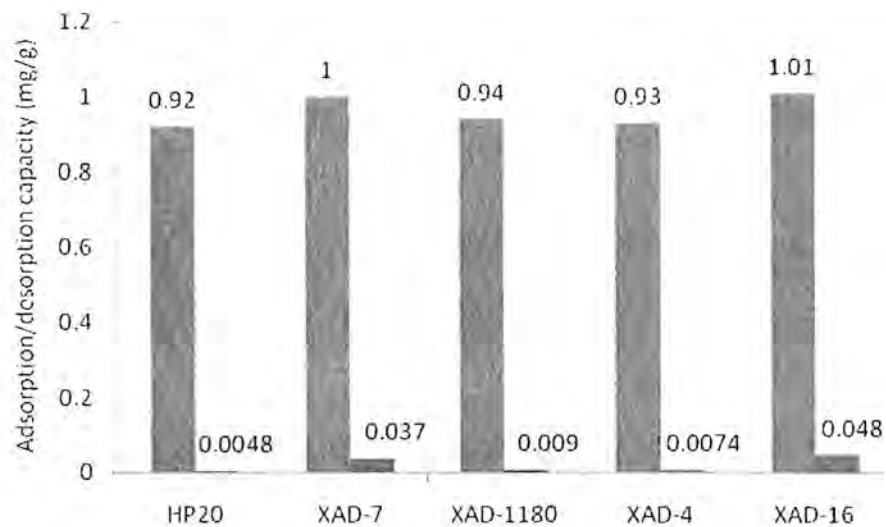
สำหรับสารสกัดจากใบมะตูม ได้เลือกศึกษาประสิทธิภาพของโพลีเมอริกเรซินแต่ละชนิด ในการดูดซับ aegelinoside A และ aegelinoside B ซึ่งเป็นสารชนิดใหม่



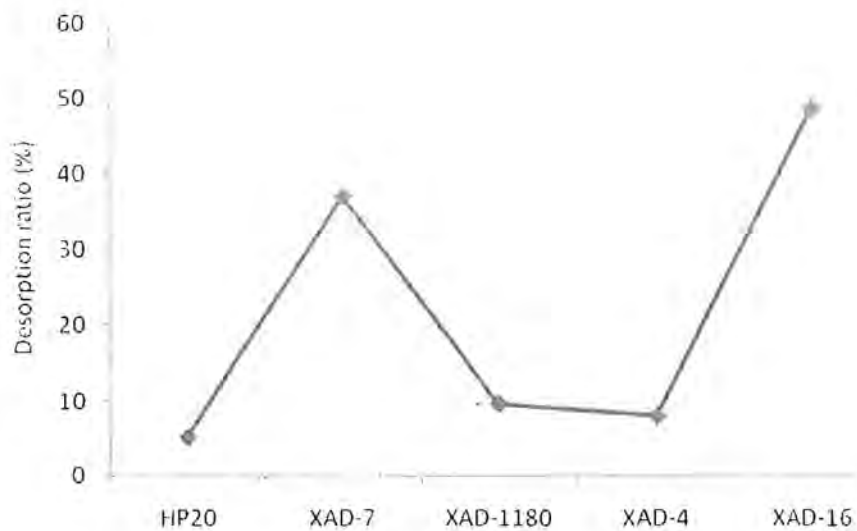
รูปที่ 4 ค่า adsorption capacity และ desorption capacity ของ aegelinoside A บน โพลีเมอริกเรซินชนิดต่างๆ



รูปที่ 5 ค่า desorption ration ของ aegelinoside A บน โพลีเมอริกเรซินชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 6 ค่า adsorption capacity และ desorption capacity ของ aegelinoside B บนโพลีเมอริกเรซินชนิดต่างๆ



รูปที่ 7 ค่า desorption ration ของ aegelinoside B บน โพลีเมอริกเรซินชนิดต่างๆ

จากการวิจัยพบว่า ในบรรดาโพลีเมอริกเรซินทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนั้น XAD-16 มี adsorption capacity, desorption capacity และ Desorption ratio สูงที่สุด ต่อการดูดซับ aegelinoside A และ aegelinoside B ทั้งนี้อาจเกิดจาก XAD-16 มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากที่สุด ($800 \text{ m}^2/\text{g}$) และความพรุนสูง (1.82 mL/g) ซึ่งเอื้ออำนวยให้สารตัวอย่างถูกดูดซับได้มาก อย่างไรก็ตาม XAD-16 ยังมี desorption ration ต่อ aegelinoside A และ aegelinoside B ค่อนข้างต่ำ คือ 47.7 และ 48.7 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่ายังมีปริมาณสารตัวอย่างคั่งค้างอยู่ในโครงสร้างของเรซิน ค่อนข้างสูง

โครงการย่อยที่ 2 การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีโนเอสเทอเรสจากเถาไม้กระทืบโรง

ส่วนที่ 1: การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีโนเอสเทอเรส

นำพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณฤทธิ์บำรุงเลือดและบำรุงกำลัง 12 ชนิด ตากแห้งและบดให้มีขนาดเล็ก สกัดโดยแช่ในเมทานอลเป็นเวลา 2 วัน กรองและระเหยแห้งตัวทำละลาย จะได้สิ่งสกัดเพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งเอนไซม์เอเซทิล โคลีโนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีโนเอสเทอเรส

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีโนเอสเทอเรส พบว่า สิ่งสกัดจากเถาไม้กระทืบโรง มีฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์เอเซทิล โคลีโนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีโนเอสเทอเรสสูงถึง 70 และ 96% ตามลำดับ จึงได้เลือกพืชชนิดนี้ ศึกษาหาสารออกฤทธิ์ฯ ต่อไป

ส่วนที่ 2: การศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โคลีโนเอสเทอเรสจากเถาไม้กระทืบโรง

2.1 การสกัดเถาไม้กระทืบโรง และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโคลีโนเอสเทอเรสเบื้องต้น

สกัดเถาไม้แห้งของต้นไม้กระทืบโรง (5.8 กิโลกรัม) ด้วยเมทานอลโดยใช้ Soxhlet นำสารละลายที่สกัดได้มา สกัดแบบแบ่งส่วน (liquid-liquid extraction) ด้วยเฮกเซน นำสารละลายชั้นเฮกเซนไประเหยตัวทำละลายออก จะได้สิ่งสกัดเฮกเซน (21.2 กรัม) ส่วนสารละลายชั้นเมทานอลนำไปสกัดแบบแบ่งส่วนต่อด้วยไคคลอโรมีเทนและ บิวทานอลอิมตัวตามลำดับ จะได้สิ่งสกัดไคคลอโรมีเทน (42.0 กรัม) และบิวทานอล (434.08 กรัม) วิธีการสกัด สามารถสรุปได้ดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 การสกัดเถาไม้กระทืบโรง

นำสิ่งสกัดเมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เอซิติล โคลีนเอสเทอเรสด้วยวิธี microplate method ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการยับยั้งเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสของสิ่งสกัดต่างๆ จากเถาของม้ากระทืบโรง

ลำดับ ที่	สิ่งสกัด	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
1	เมทานอล (M)	77.5
2	เฮกเซน (H)	38.6
3	ไดคลอโรมีเทน (D)	69.8
4	บิวทานอลอิ่มตัวด้วยน้ำ (B)	78.1

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่าสิ่งสกัดบิวทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดที่สุด จึงศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดบิวทานอลด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีต่อไป

2.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดบิวทานอล

2.2.1 การแยกสิ่งสกัดบิวทานอลเป็นส่วนย่อย เพื่อหาส่วนย่อยที่น่าสนใจ

นำสิ่งสกัดบิวทานอลมาละลายในน้ำในปริมาณที่น้อยที่สุด กรองส่วนที่ไม่ละลายทิ้งไป นำสารละลายนี้ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้เรซิน diaion HP-20 เป็นเฟสคงที่และชะคอลัมน์ด้วยน้ำ (deionized water) เมทานอลและเอซีโตน ตามลำดับ จะได้ส่วนย่อยน้ำ เมทานอลและเอซีโตน ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์เอซิติล โคลีนเอสเทอเรสของส่วนย่อยเหล่านี้ ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งเอนไซม์เอซิติล โคลีนเอสเทอเรสของส่วนย่อยน้ำ เมทานอลและเอซีโตน

ส่วนย่อย	ลักษณะกายภาพ	น้ำหนัก (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ อะเซทิลโคลีนเอสเทอเรส
น้ำ	สารละลายสีน้ำตาลเข้ม	20.8	40.5
เมทานอล	สารละลายสีน้ำตาลเข้ม	80.2	66.0
เอซีโตน	สารละลายสีน้ำตาลเข้ม	4.0	26.0

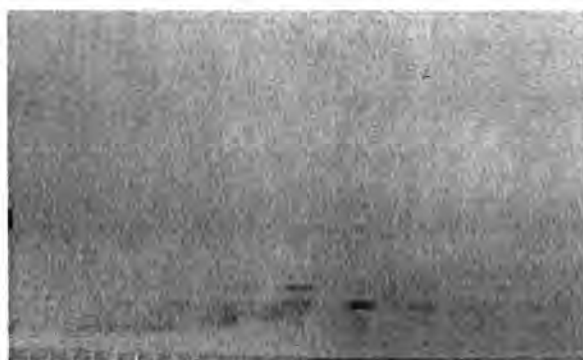
จากผลการทดลองพบว่า ส่วนย่อยเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุดที่สุด จึงนำส่วนย่อยเมทานอลไปแยกสารด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบสุญญากาศ ชะคอลัมน์ด้วยเอทิลเอซิติล เอทิลเอซิติล:เมทานอล 90:10, เอทิลเอซิติล:เมทานอล:น้ำ 80:20:2 และ 70:30:3 ตามลำดับ และเมทานอล ตรวจสอบองค์ประกอบเคมีในแต่ละ

ส่วนย่อย โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง สามารถรวมได้ทั้งหมด 6 ส่วนย่อย คือ B1 ถึง B6 ผลการแยกส่วนย่อยนี้ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนย่อยต่างๆ จากการแยกส่วนย่อยเมทานอล

ชื่อส่วนย่อย	ตัวทำละลาย (เอทิลแอลกอฮอล์:เมทานอล:น้ำ)	น้ำหนัก
B1	1:0:0	47.0
B2	9:1:0	11.6
B3	8:2:0.2	31.2
B4	7:3:0.3	16.3
B5	6:4:1	17.7
B6	0:1:0	4.1

นำส่วนย่อย B1 ถึง B6 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิล โคลีนเอสเทอเรสและบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส ด้วยวิธี TLC method พบว่าส่วนย่อย B1 มีองค์ประกอบที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มากที่สุด (พบ clear spot) ดังแสดงในรูปที่ 1 จึงเลือกส่วนย่อย B1 มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป



ก.



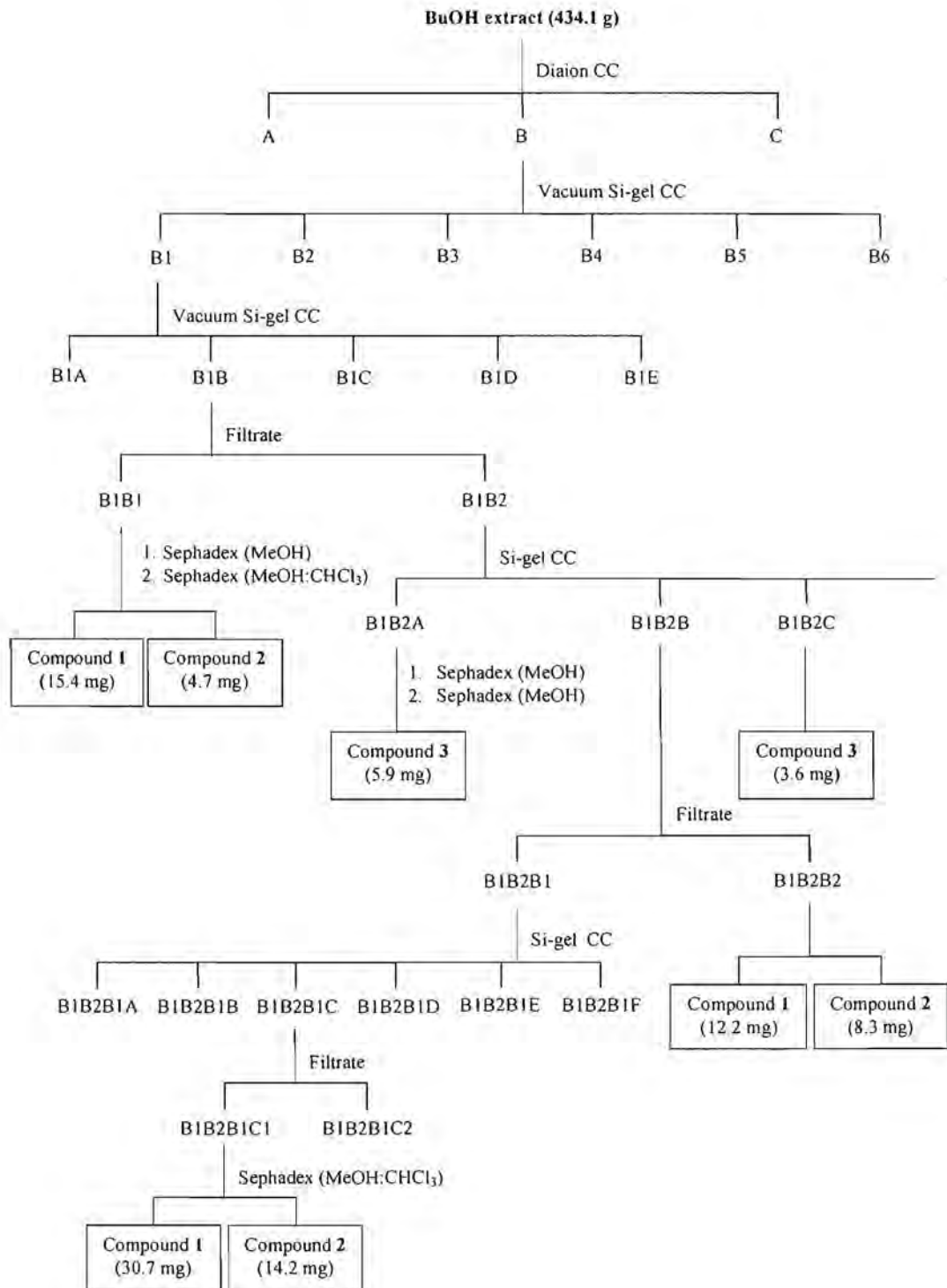
ข.

รูปที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซทิล โคลีนเอสเทอเรส (ภาพ ก) และบิวทิลโคลีนเอสเทอเรส (ภาพ ข) ของส่วนย่อย B1-B6 เทียบกับสารมาตรฐาน eserine (std.) ด้วยวิธี TLC method

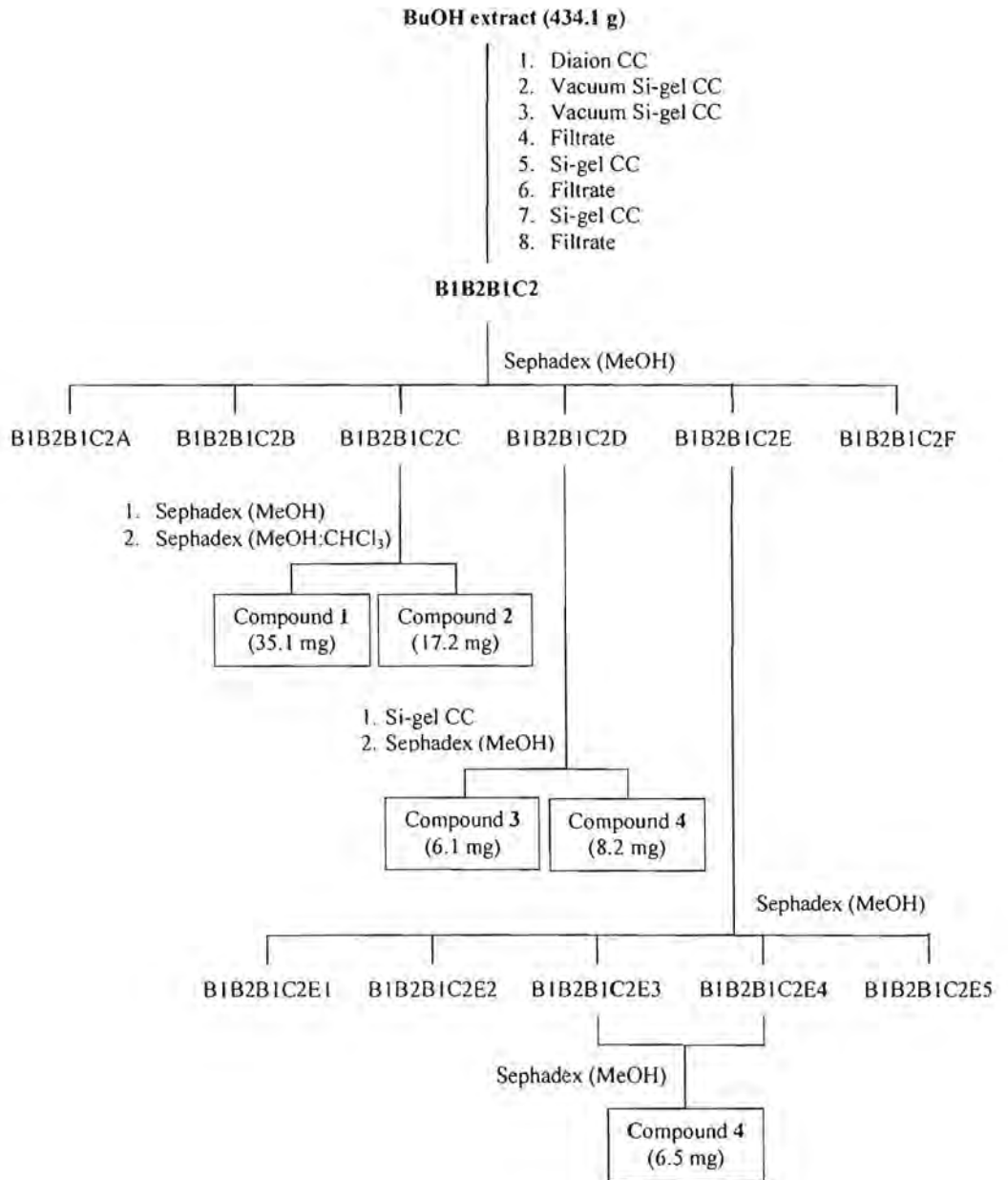
2.2.2 การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อย B1

นำส่วนย่อย B1 (40 กรัม) มาแยกสารด้วยวิธีทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้วัฏภาคคงที่เป็นซิลิกาเจลหรือ Sephadex LH-20 ดังแสดงในแผนภาพที่ 2 และ 3 สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 4 ชนิด นำสารบริสุทธิ์ไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลกับข้อมูลของสารในเอกสารอ้างอิง พบว่า

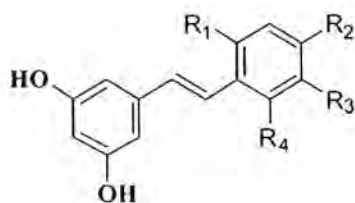
สารทั้ง 4 ชนิดที่แยกได้ คือ resveratrol (1), isorhapontigenin (2), pinosylvin (3) และ gnetol (4) (รูปที่ 2) และได้สรุปข้อมูลไว้ในตารางที่ 4-7 และสเปกตรัมของสารแสดงดังรูปที่ 3-10



แผนภาพที่ 2 การแยกสารบริสุทธิ์ 1-3 จากส่วนย่อย B1 ของสิ่งสกัดบิวทานอลจากเถาวัล้กระทืบโรง



แผนภาพที่ 3 การแยกสารบริสุทธิ์ 1-4 จากส่วนย่อย B1B2B1C2 ของสิ่งสกัดบิวทานอล



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	OH	H	H	: resveratrol (1)
H	OH	OMe	H	: isorhapontigenin (2)
H	H	H	H	: pinosylvin (3)
OH	H	H	OH	: gnetol (4)

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1-4 ที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอลของเถาไม้กระเทียมโรง

ตารางที่ 4 ข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของสาร 1 เทียบกับข้อมูลของ resveratrol จากเอกสารอ้างอิง [1]

ตำแหน่ง	สาร 1 (methanol- d_4)		Resveratrol (DMSO- d_6)	
	δ_c	δ_H (int, mult, J in Hz)	δ_c	δ_H (int, mult, J in Hz)
1	141.3	-	139.2	-
2	105.8	6.40 (1H, d , 2.0)	104.3	6.37 (1H, d)
3	159.6	-	158.5	-
4	102.6	6.11 (1H, t , 2.0)	101.7	6.11 (1H, s)
5	159.6	-	158.5	-
6	105.8	6.40 (1H, d , 2.0)	104.3	6.37 (1H, d)
7	127.0	6.75 (1H, d , 16.0)	125.6	6.78 (1H, d , 16.4)
8	130.4	6.91 (1H, d , 16.0)	127.8	6.90 (1H, d , 16.4)
1'	129.4	-	128.0	-
2'	128.8	7.30 (1H, d , 8.4)	127.8	7.39 (1H, d)
3'	116.4	6.71 (1H, d , 8.4)	115.5	6.73 (1H, d)
4'	158.3	-	157.2	-
5'	116.4	6.71 (1H, d , 8.4)	139.2	6.73 (1H, d)
6'	128.8	7.30 (1H, d , 8.4)	104.3	7.39 (1H, d)
OH-3	-	-	-	9.17 (2H, s)
OH-5	-	-	-	
OH-4'	-	-	-	9.52 (1H, s)

ตารางที่ 5 ข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของสาร 2 เทียบกับข้อมูลของ isorhapontigenin จากเอกสารอ้างอิง [2]

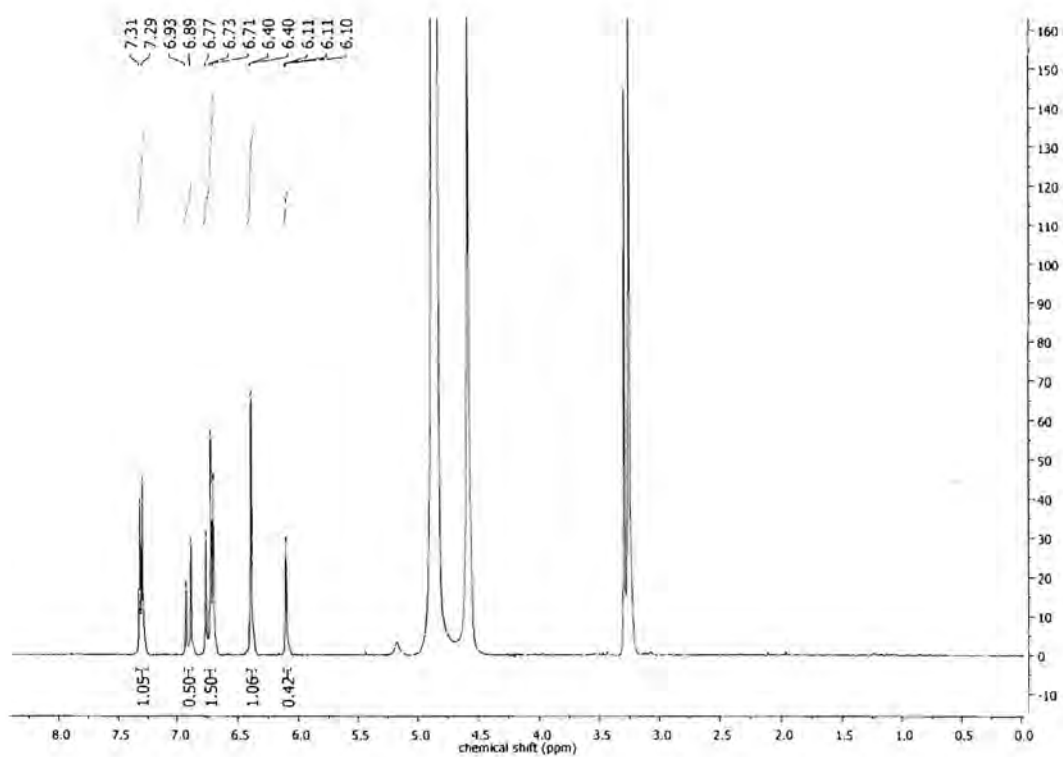
ตำแหน่ง	สาร 2 (methanol- d_4)		Isorhapontigenin (acetone- d_6)	
	δ_c	δ_H (int, mult, J in Hz)	δ_c	δ_H (int, mult, J in Hz)
1	141.2	-	140.6	-
2	105.8	6.46 (1H, <i>d</i> , 2.0)	105.7	6.61 (1H, <i>br d</i> , 1.8)
3	159.8	-	159.4	-
4	102.6	6.17 (1H, <i>t</i> , 2.0)	102.8	6.35 (1H, <i>br t</i> , 1.8)
5	159.8	-	159.4	-
6	105.8	6.46 (1H, <i>d</i> , 2.0)	105.7	6.61 (1H, <i>br d</i> , 1.8)
7	127.3	6.82 (1H, <i>d</i> , 16.0)	127.5	6.92 (1H, <i>d</i> , 16.4)
8	129.6	6.96 (1H, <i>d</i> , 16.0)	129.1	7.00 (1H, <i>d</i> , 16.4)
1'	131.0	-	130.4	-
2'	110.3	7.10 (1H, <i>d</i> , 1.2)	112.4	7.12 (1H, <i>d</i> , 2.0)
3'	149.1	-	147.3	-
4'	147.6	-	148.3	-
5'	116.3	6.77 (1H, <i>d</i> , 8.0)	113.3	6.90 (1H, <i>d</i> , 8.1)
6'	121.2	6.95 (1H, <i>dd</i> , 1.2, 8.0)	119.9	6.97 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 2.0)
OMe-3'	56.3	3.90 (3H, <i>s</i>)	56.2	3.80 (3H, <i>s</i>)

ตารางที่ 6 ข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของสาร 3 เทียบกับข้อมูลของ Pinosylvin จากเอกสารอ้างอิง [3]

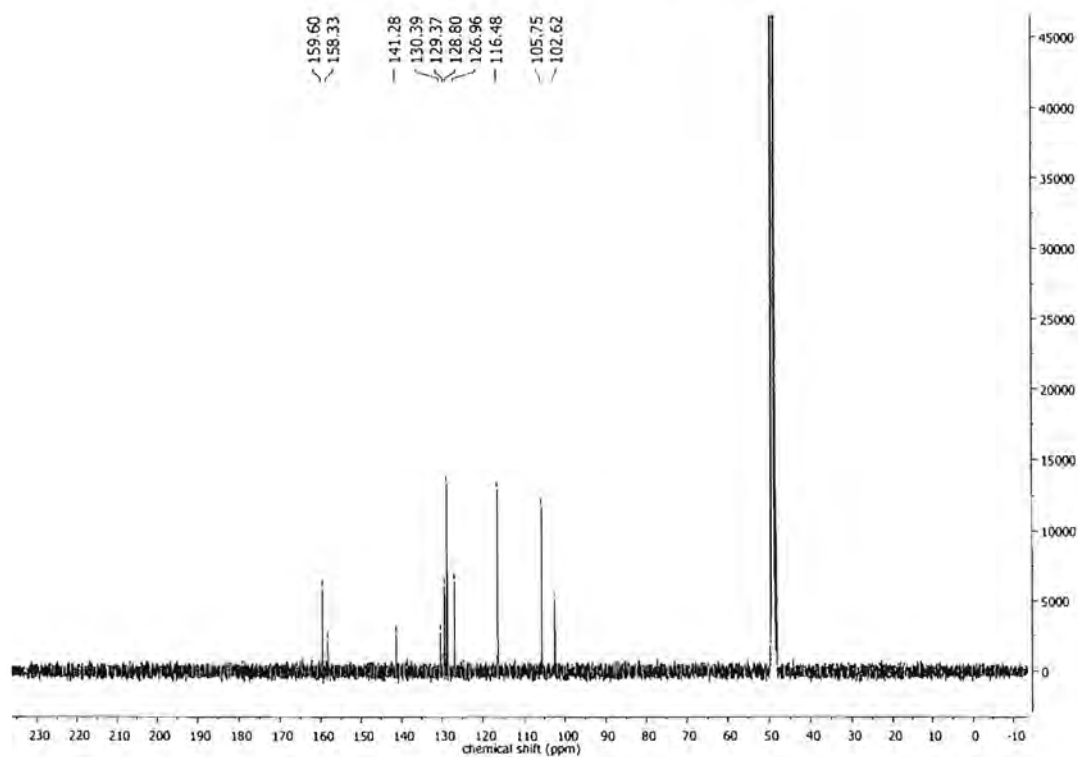
ตำแหน่ง	สาร 3 (methanol- d_4)		Pinosylvin (methanol- d_4)	
	δ_C	δ_H (int, mult, J in Hz)	δ_C	δ_H (int, mult, J in Hz)
1	140.7	-	140.0	-
2	106.5	6.49 (1H, d , 2.0)	106.2	6.54
3	159.7	-	156.9	-
4	103.1	6.19 (1H, t , 2.0)	102.4	6.26
5	159.7	-	156.9	-
6	106.5	6.49 (1H, d , 2.0)	106.2	6.54
7	129.9	7.00 (1H, d , 16.0)	128.0	6.88
8	129.5	7.05 (1H, d , 16.0)	129.5	6.97
1'	138.7	-	136.9	-
2'	127.5	7.51 (2H, d , 8.0)	126.6	7.42
3'	129.7	7.33 (2H, t , 8.0)	128.7	7.30
4'	128.5	7.23 (1H, t , 8.0)	127.8	7.22
5'	129.7	7.33 (2H, t , 8.0)	128.7	7.30
6'	127.5	7.51 (2H, d , 8.0)	126.6	7.42

ตารางที่ 7 ข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์ของสาร 4 (gnetol)

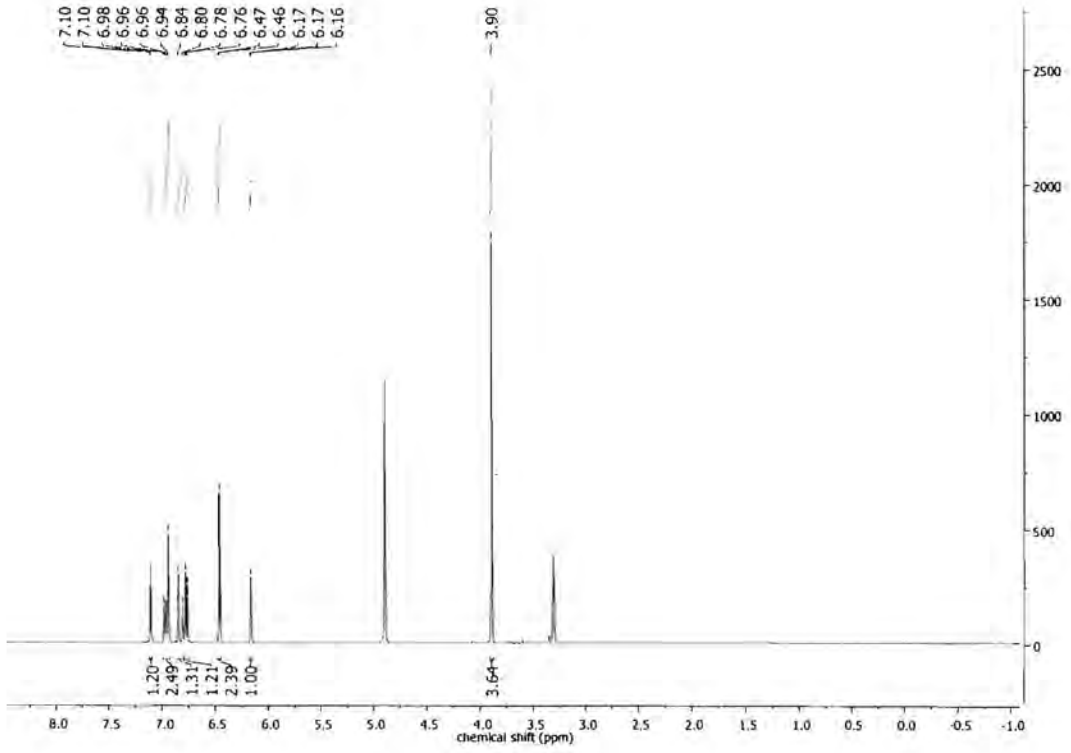
ตำแหน่ง	สาร 4 (methanol- <i>d</i> ₄)	
	δ_c	δ_H (int, mult, <i>J</i> in Hz)
1	143.2	-
2	105.7	6.46 (1H, <i>d</i> , 2)
3	159.5	-
4	102.2	6.14 (1H, <i>t</i> , 2)
5	159.5	-
6	105.7	6.46 (1H, <i>d</i> , 2)
7	132.0	7.47 (1H, <i>d</i> , 16.8)
8	121.7	7.39 (1H, <i>d</i> , 16.4)
1'	113.2	-
2'	158.1	-
3'	107.9	6.33 (1H, <i>d</i> , 8)
4'	128.8	6.83 (1H, <i>t</i> , 8)
5'	107.9	6.33 (1H, <i>d</i> , 8)
6'	158.0	-



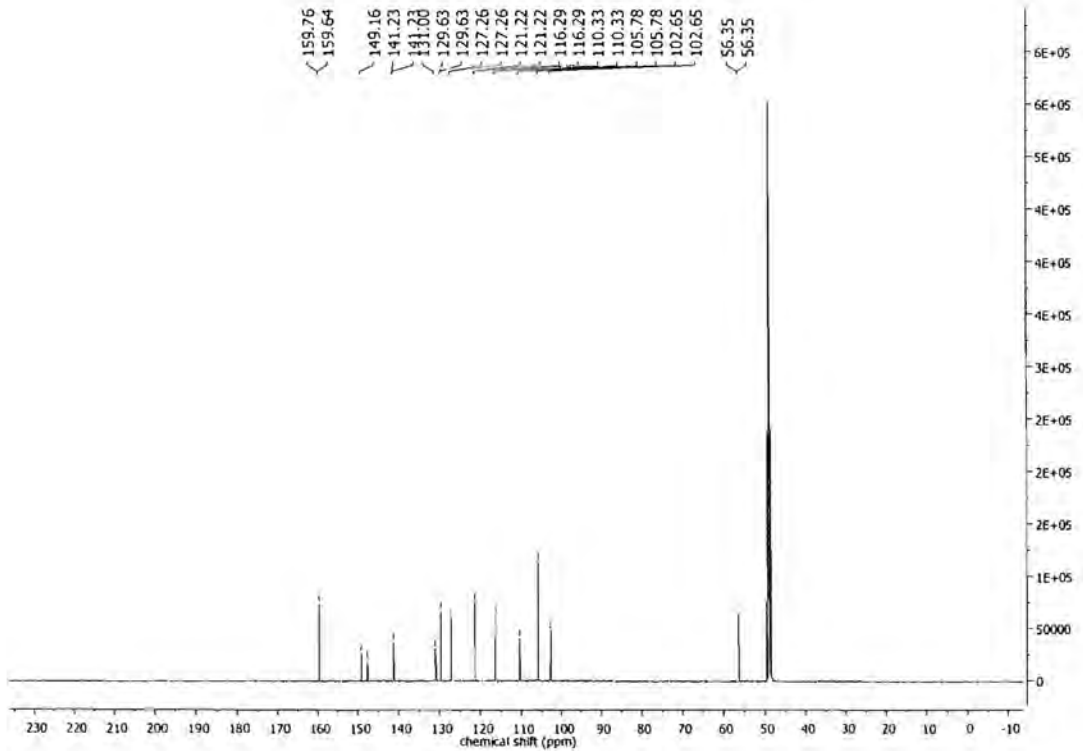
รูปที่ 3 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1



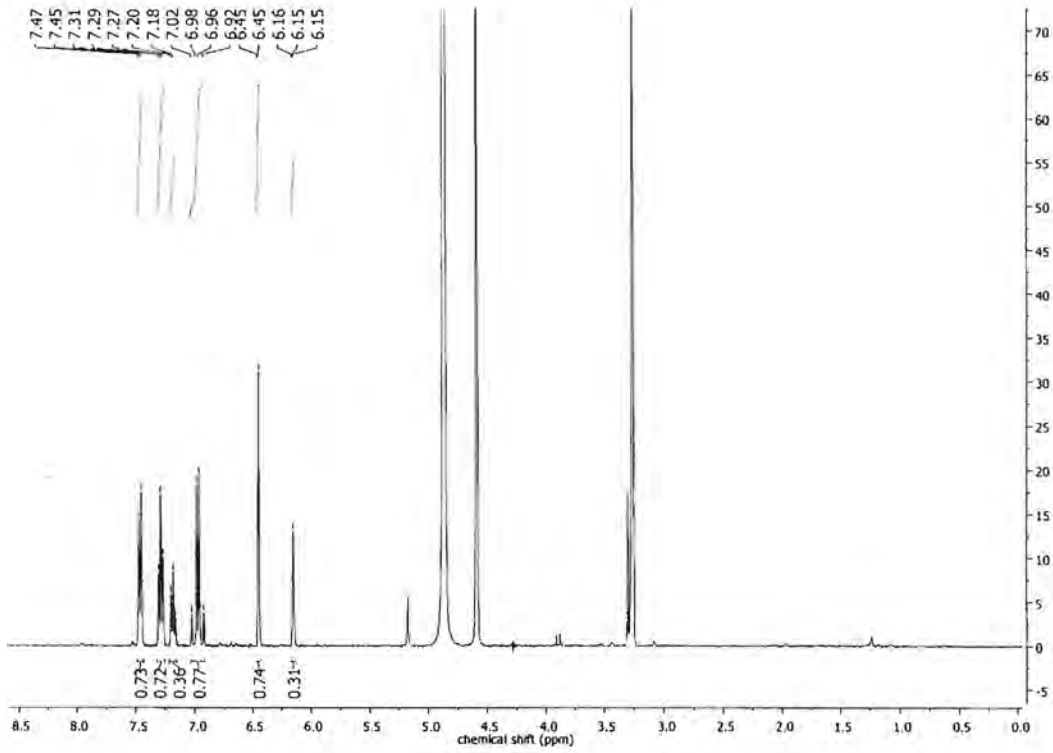
รูปที่ 4 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1



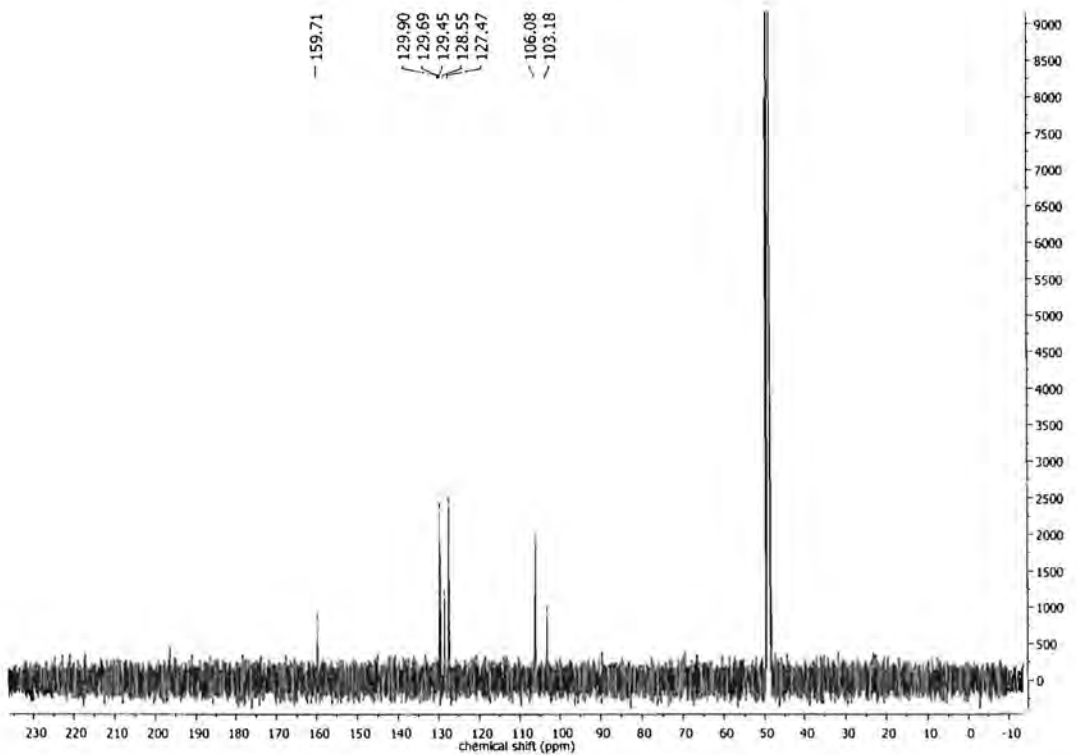
รูปที่ 5 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2



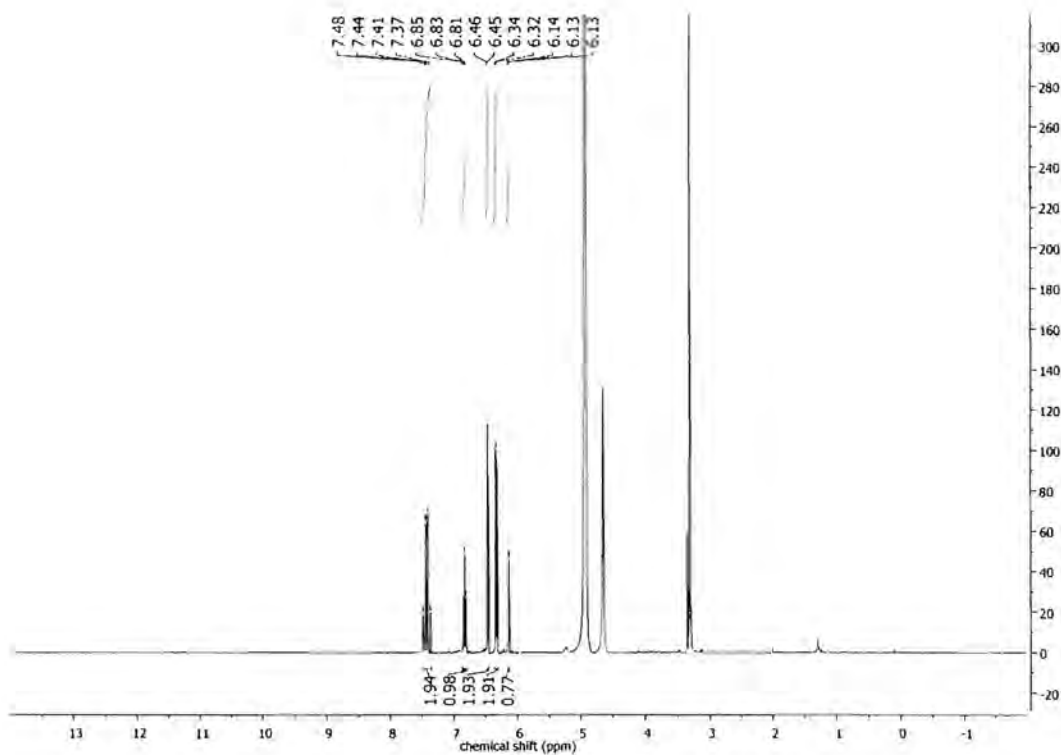
รูปที่ 6 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2



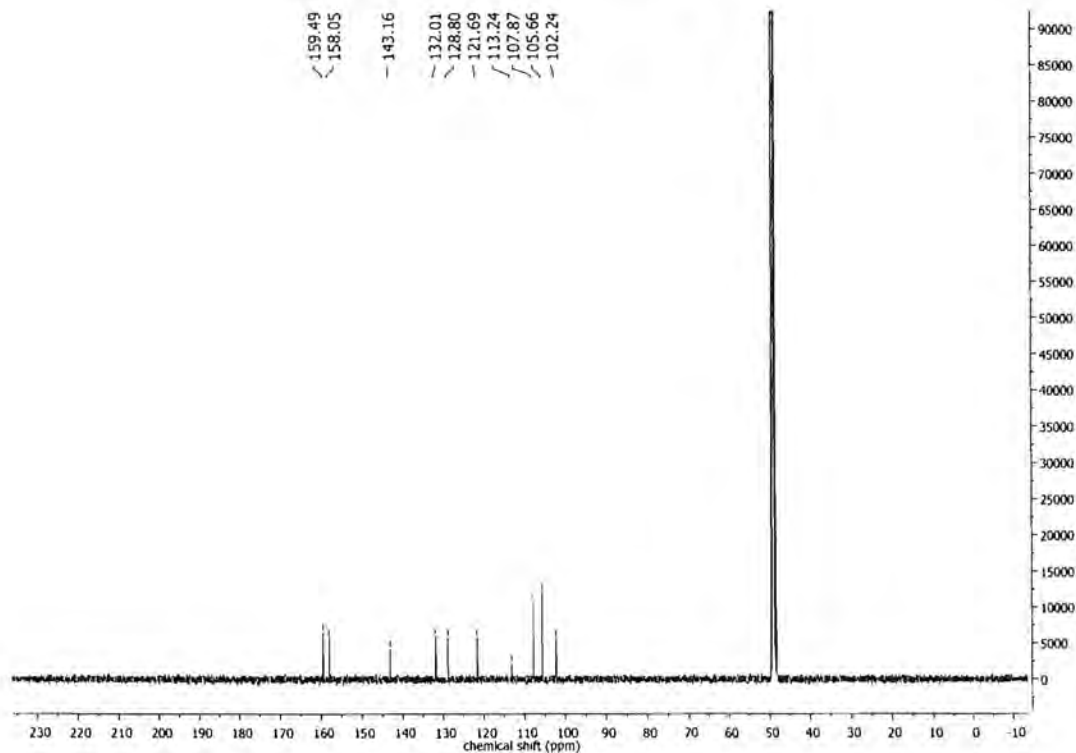
รูปที่ 7 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3



รูปที่ 8 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3



รูปที่ 9 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4



รูปที่ 10 คาร์บอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4

เอกสารอ้างอิง

1. Liu, R., Chu, X. and Sun, A. "Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography" *J. Chromatogr. A* **2005**, *1097*, 33-39.
2. Silayo, A., Ngadjui, B. T. and Abegaz, B. M. "Nine new homoisoflavonoids from the bulbs of *Scilla nervosa* subsp. *rigidifolia*" *Phytochemistry* **1999**, *52*, 947-955.
3. Bachelor, F. W., Loman, A. A. and Snowdon, L. R. "Synthesis of pinosylvin and related heartwood stilbenes" *Can. J. Chemistry* **1970**, *48*, 1554.

โครงการย่อยที่ 3 การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระชายเหลือง *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr.

โดยยีสต์กลายพันธุ์ $\Delta zds1$ เบสแอสเสย์

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไทยโดยยีสต์กลายพันธุ์ $\Delta zds1$ เบสแอสเสย์ ซึ่งเป็นวิธิตดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่มีลักษณะจำเพาะที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ $\Delta zds1$ ได้ จากการคัดกรองเบื้องต้นพบสารสกัดจากพืช 4 สายพันธุ์ จาก 69 สายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์สูง กระชายเหลืองจัดเป็นพืชในสกุลขิงข่าเป็นหนึ่งในพืชทั้งหมดที่มีศักยภาพในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ จึงได้นำกระชายเหลืองมาแยกสารบริสุทธิ์โดยติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธียีสต์เบสแอสเสย์ เมื่อแยกสิ่งสกัดโคลโลโรมีเทนโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้ฟลาโวนอยด์ที่เคมียารงานแล้ว 3 ชนิด (A, B และ C) และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าสารทั้ง 3 ชนิดออกฤทธิ์ดีในการยับยั้งการรวมของอนุหนุที่ถูกชักนำด้วย EPP (ร้อยละการยับยั้ง 64 – 80 ที่เวลา 30 นาที หลังทานอนุหนุด้วย EPP) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร A ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมสูงที่สุด มีความคงตัว (stability) ของฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อเก็บสารไว้ที่สภาวะและที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นระยะเวลา 3 เดือน

บทนำ

การค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ๆ เพื่อพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ ยังคงเป็นงานวิจัยที่อยู่ในความสนใจกันทั่วโลก ทั้งนี้เนื่องจากยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเช่น ยารักษาโรคมะเร็ง การคัดต่อของเชื้อโรค รวมทั้งการเกิดมีโรคภัยชนิดใหม่ๆ ที่ไม่ปรากฏในอดีต ยังคงมีปัญหาหลายประการ เช่น มีผลข้างเคียงสูง

ในการเจริญเติบโตของเซลล์ตามปกติเกิดจากการถูกควบคุมจากหลากหลายวิถีของการส่งสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ วิธีการส่งสัญญาณของระดับ Ca^{2+} ในเซลล์เป็นหนึ่งในวิถีต่างๆ ที่มีบทบาทต่อการควบคุมการทำงานของหลายๆ ระบบของเซลล์ ได้แก่ การกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันชนิด T cell กระบวนการคัดหลังของสาร การหดตัวของกล้ามเนื้อ การหลั่งสารสื่อประสาทและอื่นๆ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง (Clapham, 1995) ในปี ค.ศ. 2000 Shitamukai และคณะ ได้ค้นพบการเปลี่ยนแปลงของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์หนึ่ง ($\Delta zds1$) ให้มีความไวสูงต่อระดับ Ca^{2+} ในเซลล์ และโดยอาศัยผลจากการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างยาและโมเลกุลเป้าหมาย (molecular targets) มีความเหมือนกันมากระหว่าง ในยีสต์แลในมนุษย์ ดังนั้นหากใช้ยีสต์เป็นระบบการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สารดังกล่าวถ้าแสดงผลในยีสต์ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นสูงขั้นพื้นฐาน สารดังกล่าวน่าจะแสดงผลเช่นเดียวกันในมนุษย์ด้วย ด้วยเหตุนี้ Shitamukai และคณะ ได้เสนอว่า ยีสต์สายพันธุ์พิเศษดังกล่าวภายใต้สภาวะที่วิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมถูกกระตุ้น สามารถใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ในระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับวิธีการส่งสัญญาณของระดับ Ca^{2+} ในเซลล์ได้ โดยที่ระบบที่ใช้ยีสต์ดังกล่าวนี้มีหลักการแตกต่างไปจากระบบคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป ดังนั้นหากใช้ระบบนี้ในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงน่าจะได้สารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ที่ไม่เคยถูกค้นพบโดยวิธีเดิม โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำจะได้ ได้แก่ สารต้านการอักเสบ สารกดภูมิคุ้มกัน หรือสารต้านมะเร็ง เป็นต้น (Shitamukai และคณะ, 2000)

กระชายเหลืองจัดอยู่ในวงศ์ขิงข่า (Zingiberaceae) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schltr. (รูปที่ 1) กระชายเหลืองเป็นพืชที่มีการใช้ในการประกอบอาหารและเป็นสมุนไพร ในรากและเหง้ากระชายเหลืองประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ pinene, camphene, thujene, limonene และการบูร น้ำมันหอมระเหยของกระชายเหลืองประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด เช่น 1,8-cineol, camphor, d-borneol และ methyl cinnamate ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่พบปริมาณน้อย ได้แก่ d-pinene, zingiberene, zingiberone, curcumin และ zedoarin นอกจากนี้ยังพบสารอื่น ได้แก่ กลุ่มไดไฮโดรซาลิโคน boesenbergin A กลุ่มฟลาโวน, ฟลาวาโนน และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ alpinetin, pinostrobin) และ pinocembrin และกลุ่มซาลิโคน (ได้แก่ 2,4,6-trihydroxychalcone และ cardamonin (Mongkolsuk และ Dean, 1964, Jaipetch และคณะ, 1982, Tuntiwachwuttikul และคณะ, 1984, Mahidol และคณะ, 1984)



ก

ข

ค

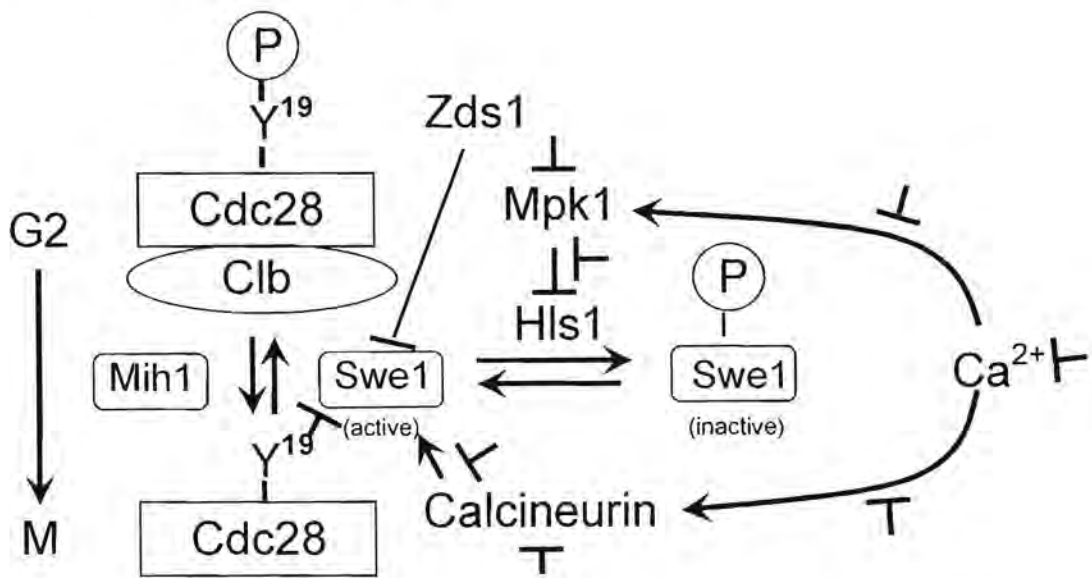
รูปที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของกระชายเหลือง (*B. pandurata* (Roxb.) Schltr.) ก: ต้น ข: ดอก ค: เหง้าและราก

การคัดกรองหาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย

ในยีสต์ *S. cerevisiae* วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (รูปที่ 2) ควบคุมขั้นตอนการแบ่งเซลล์ในระยะ mitosis โดยการควบคุมการทำงานของโปรตีน Swe1 ซึ่งเป็นโปรตีนไคเนส (protein kinase) ชนิดหนึ่ง โปรตีน Swe1 ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylate) ให้โปรตีน Cdc28 ซึ่งจับอยู่กับโปรตีน cyclin เป็นโปรตีนเชิงซ้อน cyclin-dependent protein kinase ทำหน้าที่เป็น cell cycle engine เมื่อโปรตีน Cdc28 ในโปรตีนเชิงซ้อนดังกล่าวถูกเติมหมู่ฟอสเฟต จะทำให้ cyclin-dependent protein kinase อยู่ในภาวะที่ไม่มีแอกทิวิตี เป็นผลให้เซลล์หยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ G2 (Booher และคณะ 1993; Mean, 1994) วิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นโดย 2 วิธีคู่ขนานคือ การส่งสัญญาณผ่าน calcineurin และ Mpk1 โดยทั้งสองวิธีนี้ทำงานร่วมกันในการ

กระตุ้นการทำงานของโปรตีน Swe1 (Mizunuma และคณะ, 1998) ในเซลล์ปกติ มีโปรตีน Zds1 ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง (negative regulator)การทำงานของโปรตีน Swe1 (Bi และ Pringle, 1996) ทำให้เกิดความสมดุลระหว่างสัญญาณการกระตุ้นและยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1

ในยีสต์สายพันธุ์กลายที่ไม่มียีน *ZDS1* ($\Delta zds1$) พบว่าเมื่อนำมาเลี้ยงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง เซลล์จะไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ถูกกระตุ้น ซึ่งเป็นผลมาจากในยีสต์สายพันธุ์กลายนี้ไม่มี *ZDS1* ($\Delta zds1$) ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Swe1 จึงทำให้โปรตีน Swe1 อยู่ในภาวะที่ทำงานได้ เป็นผลทำให้เซลล์หยุดหรือชะลอการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ G2 ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูง (Shitamukai และคณะ 2000) แต่ถ้ามีโมเลกุลขนาดเล็กไปยับยั้งที่ส่วนใดส่วนหนึ่งของวิถีการส่งสัญญาณของแคลเซียมจะทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายดังกล่าวสามารถเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมสูงได้



รูปที่ 2 แบบจำลองวิถีการถ่ายทอดสัญญาณของแคลเซียม (Ca^{2+} signaling pathway) ในยีสต์ *S. cerevisiae* (ดัดแปลงจาก Mizunuma และคณะ 1998)

วัสดุสารเคมีและวิธีการทดลอง

สายพันธุ์ยีสต์และวิธีการเลี้ยง

ยีสต์สายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YNS17 ($\Delta zds1$), (*MATa zds1::TRP1 erg3::HIS3 pdr1::hisG URA3 hisG pdr3::hisG*) (Chanklan และคณะ 2008) ถูกใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ในการทดลองคามวิธีที่ดัดแปลงจาก Shitamukai และคณะ 2000) เซลล์ยีสต์ YNS17 ถูกเลี้ยงในอาหารเหลว YPAUD (YPD (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone and 20 g/L glucose) with 0.4 g/L adenine sulfate and 0.2 g/L uracil) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างพืชสมุนไพรเก็บจากสวนสมุนไพร โครงการพระราชดำริเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา กระจายเหลืองได้ตัวอย่างมาจากจังหวัดนครปฐม ตัวอย่างพืชได้ฝากเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างกระจายเหลือง (รหัสตัวอย่าง BKF152279) ได้นำไปฝากเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จตุจักร กรุงเทพฯ

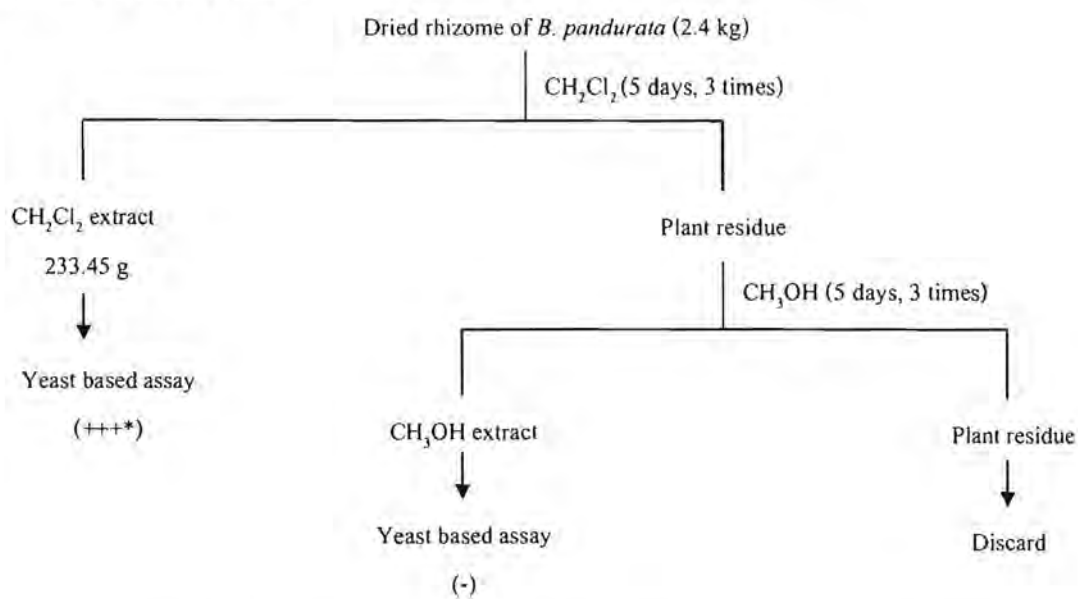
1. วิธีการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิธีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ในยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$) จากส่วนสกัดอย่างหยาบจากพืช

นำตัวอย่างพืชมาล้างให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาบดละเอียด สกัดโดยการแช่ตัวอย่างพืช 50 กรัม ในเมทานอล 500 มิลลิลิตร นาน 3 วัน (ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง) และนำสิ่งสกัดที่ได้มารวมกันแล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ นำสิ่งสกัดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยยีสต์สายพันธุ์กลาย YNS17 สำหรับในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งวิธีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ YNS17 ในอาหารกึ่งแข็ง YPAUD (YPAUD soft-agar) ในจานเพาะเชื้อ โดยที่หยดสารทดสอบ (สารสกัดอย่างหยาบ) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วตรวจสอบผลการทดลองเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ FK506 เป็นชุดควบคุมผลบวกและ ethanol เป็นชุดควบคุมผลลบ

2. การสกัด การแยกสารจากกระจายเหลือง และการพิสูจน์ทราบสูตรโครงสร้างทางเคมี

จากผลการคัดกรองเบื้องต้นพบว่ากระจายเหลืองเป็นหนึ่งในพืช 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งวิธีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ เนื่องจากกระจายเหลืองเป็นพืชที่หาได้ง่ายและใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงอาหาร ในการทดลองนี้จึงนำกระจายเหลืองมาสกัดและแยกหาสารออกฤทธิ์ ในการสกัดกระจายเหลืองได้ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันสองชนิดคือ ไดคลอโรโรมีเทนและเมทานอล โดยแช่กระจายเหลืองแห้งบดละเอียดหนัก 5 กิโลกรัม ในไดคลอโรโรมีเทนนาน 5 วัน (ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง) นำส่วนที่เหลือเป็นกากมาสกัดด้วยเมทานอล (ทำเช่นเดียวกับตัวทำละลายชนิดแรก) จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบสุญญากาศ และนำสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งวิธีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์ในยีสต์ต่อไป ส่วนการแยกสารจากกระจายเหลืองให้บริสุทธิ์ได้อาศัยการทดสอบการออกฤทธิ์กับระบบคัดกรองในยีสต์เป็นแนวทางในการแยก (แผนภาพที่ 1) แยกสิ่งสกัด ไดคลอโรโรมีเทน

ด้วยวิธีการสกัดด้วยโครมาโทกราฟีอย่างหยาบ จะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลเอซิเทต เมทานอล ได้ทั้งหมด 5 ส่วนย่อย (ตารางที่ 1)



แผนภาพที่ 1 วิธีการสกัดกระชายเหลืองและผลการทดสอบเบื้องต้นกับยีสต์ เบสแอสเสย์

+ = positive (growth)

- = negative (no growth)

+++ , ++ , + = positive (compared to FK506 used as a positive control, which gave +++)

* = positive (ring like growth)

ตารางที่ 1 การแยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์อย่างหยาบ

Fraction	Solvent system	Remarks	Yeast-based assay	Weight (g)
BPA1	100% Hexane	yellow oil	C	2.31
BPA2	5-20% EtOAc-Hex	yellow crystal	++*	29.5
BPA3	40% EtOAc-Hex	brownish oil	+++*	30.17
BPA4	60% EtOAc-Hex	brownish wax	C	3.72
BPA5	80-100% EtOAc-Hex 5-50% MeOH-EtOAc	brownish wax	-	13.52

+ = positive (growth) - = negative (no growth)

+++, ++, + = positive (compared to FK506 used as a positive control, which gave +++)

* = positive (ring like growth) C = clear zone (cytotoxic effect)

ผลการแยกสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของกระชายเหลืองอย่างหยาบ พบว่าได้ส่วนย่อย 5 ส่วน ตามคำรีเฟกทีฟอินเด็กซ์ของทินแลเซอร์โครมาโทกราฟีและมี 2 ส่วนที่ให้ผลบวกในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ คือ BPA2 และ BPA3 (ตารางที่ 1) จึงได้นำทั้ง 2 ส่วนมาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์โดยการติดตามผลด้วยยีสต์เบสแอสเสย์ต่อไป

แยก BPA2 ด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์ ได้สารสีขาว (สาร A) 9.65 กรัม (ตารางที่ 2) ผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยทินแลเซอร์โครมาโทกราฟี พบว่ามีสารเพียงจุดเดียวและให้ผลที่ดีในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ จึงได้นำไปยืนยันความบริสุทธิ์และพิสูจน์หาสูตร โครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (NMR และ MS) นอกจากนี้ได้แยก BPA3 ซึ่งให้ผลบวกต่อยีสต์แอสเสย์เช่นกัน (แผนภาพที่ 2)

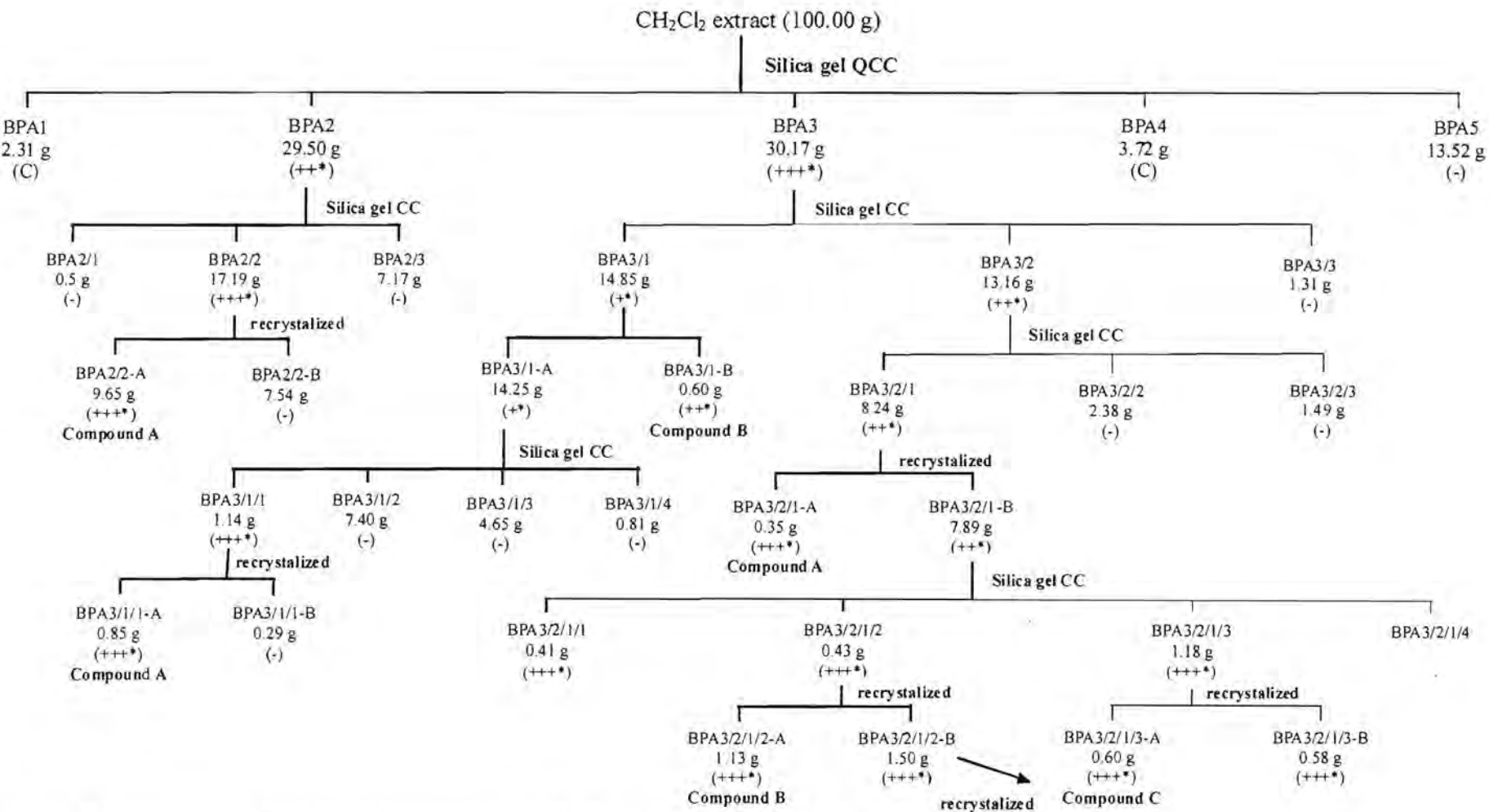
ตารางที่ 2 การแยกส่วนของ BPA2 ด้วยซิลิกาเจลคอลลัมน์

Fraction	Solvent system	Remarks	Yeast-based assay	Weight (g)
BPA2/1	5-10% EtOAc-Hex	yellow solid	-	0.5
BPA2/2-A	10% EtOAc-Hex	white plates	+++*	9.65
BPA2/2-B	10% EtOAc-Hex	yellow oil	-	7.54
BPA2/3	20-40% EtOAc-Hex	yellow solid	-	7.17

+ = positive (growth) - = negative (no growth)

+++, ++, + = positive (compared to FK506 used as a positive control, which gave +++)

* = positive (ring like growth)



แผนภาพที่ 2 การแยกสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนของกระชายเหลืองด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

+ = positive (growth)

- = negative (no growth)

* = positive (ring like growth)

C = clear zone (cytotoxic/suspect)

+++, ++, + = positive (compared to FK506 used as a positive control which gave +++)

3. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3.1 การศึกษาระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$)

ได้แปรความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ นำสารละลายในแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบกับยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งแข็งที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

3.2 การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยวิธีการเหนี่ยวนำ EPP ให้เกิดการบวมในหูหนู

การแพทย์ตามภูมิปัญญาไทย ได้ใช้กระชายเหลืองเพื่อลดการบวมอักเสบ (Wuthithamavet, 1997) คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ต่อการลดการอักเสบ งานวิจัยส่วนนี้ได้รับความอนุเคราะห์การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูถีบจักร โดย รศ.ดร.อำไพ ปั่นทอง และ อ.ดร.จิตติกานต์ วงศ์คำ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศึกษาโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมของหูหนูด้วยสาร EPP ด้วยวิธีการทาสารดังกล่าวที่บริเวณด้านในและด้านนอกของหูหนูตามวิธีของ Brattsand และคณะ (1982) จากนั้นทาทับด้วยสารบริสุทธิ์ที่ละลายใน 5% Tween-80 (ที่ปริมาณสาร 1 มิลลิกรัม/20 ไมโครลิตร /หู) ทันทีก่อนที่จะเกิดการบวมของหู สำหรับชุดควบคุมได้ใช้เอซีโทนแทนสารบริสุทธิ์ วัดความหนาของหูด้วย vernier calipers ที่เวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที หลังจากการทาด้วยสารดังกล่าว คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตรด้านล่าง

$$\% \text{ การยับยั้ง} = (C-T)/C \times 100$$

C = edema thickness of control rat

T = edema thickness of tested rat

3.3 การศึกษาความคงตัวของสารบริสุทธิ์ที่เก็บที่อุณหภูมิและเก็บในภาวะต่าง ๆ

ศึกษาโดยการทดลองเก็บสารบริสุทธิ์ไว้ที่ภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงยูวี (2 ชั่วโมงต่อวัน นาน 3 เดือน) ภายใต้แสงแดด (2 ชั่วโมงต่อวัน นาน 3 เดือน) เก็บในตู้มืด และเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ เช่น -20, 0, 60 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จากนั้นเก็บตัวอย่างสารดังกล่าวทุกๆ สองสัปดาห์ (ระยะเวลา 3 เดือน) มาทดสอบสมบัติในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$

ผลการทดลอง

1. ผลการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$) จากส่วนสกัดอย่างหยาบจากพืช

จากการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย YNS17 ($\Delta zds1$) ซึ่งเป็นวิธีการคัดกรองที่มีความจำเพาะ (รูปที่ 3) จากสารสกัดด้วยเอทานอลของพืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 69 ชนิด พบว่าสารสกัดจากพืช 4 ชนิด (ตารางที่ 3) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียม (Boonkerd และคณะ, 2011) ในงานวิจัยนี้ได้เลือกสารสกัดจากกระชายเหลืองซึ่งเป็นพืชที่มีการใช้ในการประกอบอาหารในครัวเรือนและมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ดังกล่าว ดังนั้นจึงสนใจที่จะนำพืชชนิดนี้มาแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย และทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป



รูปที่ 3 ลักษณะของงานเพาะเชื้อในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งวิถีการสังเคราะห์ของแคลเซียม โดยวิธี Δzds /yeast-based assay

เซลล์บ่งชี้ $\Delta zds1$ ความเข้มข้น 6.0×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YPAUD ที่เติม CaCl_2 ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ หยดสารสกัดอย่างหยาบของพืชสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บนผิวอาหาร โดยมี FK506 ความเข้มข้น 0.5 ไมโคร โมลาร์เป็นชุดควบคุมผลบวกและ ethanol เป็นชุดควบคุมผลลบ บ่มงานเพาะเชื้อที่ 30°C เป็นเวลา 2 วัน (Wangkanwan และคณะ 2009) P: ชุดควบคุมผลบวก FK506 N: ชุดควบคุมผลลบ ethanol BPA: สารสกัดอย่างหยาบของกระชายเหลือง

หมายเหตุ ผลการทดสอบเป็นบวก (positive) และลบ (negative) อ่านผลจากการเจริญและไม่เจริญของยีสต์สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 รายชื่อพืชสมุนไพรและส่วนของพืชที่ใช้ในการคัดกรองด้วยวิธี yeast growth-based assay

List	Plant family/ Species	Code	Plant Part	Voucher number ^a	Activity
Acanthaceae					
1	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Nees.	APA	Whole plant	BKF 152277	+++
2	<i>Barleria inzulina</i> Lindl.	BIN	Whole plant	-	-
3	<i>Barleria strigosa</i> Willd.	BST	Leaf	CY & NP 31	-
4	<i>Justicia adhatoda</i> L.	JAD	Leaf	-	-
5	<i>Justicia grossa</i> C.B. Clarke.	JGR	Leaf	-	-
6	<i>Justicia betonica</i> L.	JBE	Leaf	-	-
Annonaceae					
7	<i>Anaxagorea javanica</i> Blume.	AJA	Leaf	CY & NP 18	-
8	<i>Uvaria vietnamensis</i> Ast. ex.C. meade.	UVI	Leaf	-	-
9	<i>Polyalthia suberosa</i> (Roxb) Thwaites.	PSU	Leaf	-	-
10	<i>Mitrephora tomentosa</i> Hook. F Thomsan.	MTO	Leaf	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

List	Plant family/ Species	Code	Plant Part	Voucher number ^a	Activity
Araceae					
11	<i>Aglaonema tenuipes</i> Engl.	ATE	Leaf	-	-
Araliaceae					
12	<i>Polyscias fruticosa</i> (L.) Harms.	PFR	Leaf	-	-
13	<i>Scheffiera leucantha</i> R. Vig.	SLE	Leaf	-	-
Apocynaceae					
14	<i>Holarrhna pubescens</i> Wall. ex. G. Don	HPU	Leaf	-	-
Bignoniaceae					
15	<i>Oroxylum indicum</i> (L.) Vent.	OIN	Leaf	-	-
16	<i>Crecentia cujete</i> L.	CCU	Leaf	-	-
Bixaceae					
17	<i>Rixa orellana</i> L.	ROE	Leaf	-	-
Cieaceae					
18	<i>Myxopryrum smilacifolium</i> (Wall) Blume	MSM	Leaf	-	-
Compositae					
19	<i>Elephantopus mollis</i> Kunth	EMO	Leaf	-	-
20	<i>Eupatorium stoechadosmum</i> Hance	EST	Leaf	-	-
21	<i>Artemisia lactiflora</i> Wall. ex D.C.	ALA	Leaf	-	-
Elaegnaceae					
22	<i>Elaegnus latifolia</i> L.	ELA	Leaf	-	-
Euphorbiaceae					
23	<i>Croton stellatopilosus</i> Ohba	CST	Leaf	-	-
24	<i>Croton caudatus</i> Geieslen	CCA	Leaf	-	-
25	<i>Alchornea rugosa</i> (Lour). Mull. Arg.	ARU	Leaf	-	-
26	<i>Excoeoaria cochinchinesis</i> Lour. Var. <i>cochinchinensis</i>	ECO	Leaf	-	-
27	<i>Antidesma bunius</i> (L) spreng var. <i>bunius</i>	ABU	Leaf	-	-
28	<i>Phyllanthus pulcher</i> Wall. Ex Mill. ARG.	PPU	Leaf	CY & NP 42	-
29	<i>Sauropus thorelii</i> Beille	STH	Leaf	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

List	Plant family/ Species	Code	Plant Part	Voucher number ^a	Activity
Flacourtiaceae					
30	<i>Hydnocarpus anthelminthicus</i> Pierre.	HAN	Leaf	-	-
31	<i>Hydnocarpus ilicifolius</i> King.	HIL	Leaf	-	-
Guttiferae					
32	<i>Garcinia gracilis</i> Pierre	GRA	Leaf	-	-
Labiatae					
33	<i>Vitex negundo</i> L.	VNE	Leaf	-	-
34	<i>Clerodendrum paniculatum</i> L. var <i>paniculatum</i>	CPA	Leaf	CY & NP 46	-
Lauraceae					
35	<i>Cinnamomum porrectum</i> (Roxb.) Kostrem	CPO	Leaf	-	-
36	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl	CCM	Leaf	-	-
Leeaceae					
37	<i>Leea rubra</i> Blume ex Speng	LRU	Leaf	-	-
Leguminosae					
38	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottler	CDI	Leaf	-	-
Magnoliaceae					
39	<i>Magnolia rajanjana</i> (Craib) Figlar	MRA	Leaf	-	-
40	<i>Bauhinia sirindhorn</i> K. & S.S. Larsen	BSI	Leaf	CY & NP 4	-
Moraceae					
41	<i>Antiaris toxicaria</i> lesch. Subsp. <i>toxicaria</i>	ATO	Leaf	-	-
42	<i>Ficus tinctoria</i> G. Forst. subsp. <i>gibbesa</i> (Blume). Coiner	FTI	Leaf	-	-
Myrsinaceae					
43	<i>Maesa ramentaceae</i> (Roxb) A.D.C.	MRA	Leaf	-	-
44	<i>Ardisia crenata</i> Sims var. <i>crenata</i>	ACR	Leaf	-	-
Mytaceae					
45	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	SCU	Leaf	-	-
Ochnaceae					
46	<i>Ochna intergerrima</i> (Lour.) Mer.	OIN	Leaf	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

	Plant family/ Species	Code	Plant Part	Voucher number ^a	Activity
Rubiaceae					
47	<i>Oxyceros horridus</i> Lour.	OHO	Leaf	-	-
Palmaceae					
48	<i>Caryota mitis</i> Lour.	CMI	Leaf	-	-
Phormiaceae					
49	<i>Dianella ensifolia</i> (L.) DC.	DEN	Leaf	-	-
Sapindaceae					
50	<i>Allophylus cobbe</i> (L.)	ACO	Leaf	-	-
51	<i>Lepisanthes fruticosa</i> (Roxb.) Leenh.	LFR	Leaf	-	-
52	<i>Lepisanthes senegalensis</i> Poirlet	LSE	Leaf	-	-
Simaroubaceae					
53	<i>Picrasma jaranica</i> Blume.	PJA	Leaf	-	-
54	<i>Brucea javanica</i> (L.) Merr.	BJA	Leaf	-	-
Sterculiaceae					
55	<i>Mansonia gagei</i> J.R. Drumm ex. Prain	MGA	Leaf	-	-
56	<i>Helicteres isora</i> L.	HIS	Leaf	CY & NP 70	-
Vitaceae					
57	<i>Cissus quadrangularis</i> L.	CQU	Leaf	CY & NP 48	-
Zingiberaceae					
58	<i>Alpinia (Languas) conchigera</i> Griff.	ACO	Rhizomes	-	-
59	<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	AGA	Rhizomes	-	-
60	<i>Alpinia mulica</i> Roxb.	AMU	Rhizomes	-	-
61	<i>Alpinia purpurata</i> (Vielle.) Schum.	APU	Rhizomes	-	-
62	<i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>xanthioide</i> T. L. Wu & S. J. Chen.	AVI	Rhizomes	-	-
63	<i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schltr.	BPA	Rhizomes	BKF 152279	++*
64	<i>Curcuma longa</i> (L.)	CLO	Rhizomes	-	-
65	<i>Hedychium coronarium</i> J. Konig.	HCO	Rhizomes	-	-
66	<i>Kaempferia galanga</i> (L.)	KGA	Rhizomes	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

	Plant family/ Species	Code	Plant Part	Voucher numera	Activity
67	<i>Kaempferia parviflora</i> Wall. Ex Baker	KPA	Rhizomes	BKF 152278	++*
68	<i>Zingiber montanum</i> (<i>cassumunar</i> Roxb.) (Koen.) Thelade	ZMO	Rhizomes	-	-
69	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	ZOF	Rhizomes	-	-

-, +, ++ and +++ indicate no growth, weak growth, medium growth and potent growth, respectively.

* indicates the formation of a ring-like growth zone

^aThe BKF voucher specimens were deposited at the Bangkok Forest Herbarium (BKF), Royal Forest Department, Bangkok, Thailand The CY & NP voucher specimens were deposited at Chulalongkorn University Herbarium, Bangkok, Thailand.

* YNS17 ($\Delta zds1$ mutant) yeast cells were cultivated on YPAUD soft agar containing 150 mM $CaCl_2$ and incubated at 30 °C for 2 d.

2. ผลการแยกจนได้สารบริสุทธิ์และการพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ที่ได้

ผลการแยกหาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายจากกระชายเหลืองโดยตรวจติดตามการแยกด้วยยีสต์เบสแอสเสย์ พบว่า ได้สาร 3 ชนิด (สาร A B และ C) ซึ่งมีฤทธิ์ที่ตีในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียม โดยมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญของยีสต์ซึ่งแสดงดังตารางที่ 3 ได้พิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 3 ชนิดด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (NMR และ MS) พบว่าสาร 3 ชนิดดังกล่าวเป็นฟลาโวนอยด์ที่เกยมีรายงานมาแล้ว คือ pinostrobin (A), alpinetin (B) และ pinostrobin chalcone (C)

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

3.1 ผลการศึกษาระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$)

จากผลการทดสอบศึกษาระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$) พบว่าสาร A แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณแคลเซียมได้ดีที่สุด รองลงมาคือสาร C และ B ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบระดับแอกติวิตีของสารบริสุทธิ์โดยระบบยีสต์สายพันธุ์กลาย ($\Delta zds1$) ที่มี CaCl_2 ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์*

ความเข้มข้น ไมโครโมลาร์ (μM)	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้		
	สาร A	สาร B	สาร C
2,000	+++*	+++*	+++*
1,750	+++*	+++*	+++*
1,500	+++*	+++*	+++*
1,250	++	++	+++*
1,000	++	+	+++*
500	+	-	++
250	+	-	-
125	-	-	-

+ = positive (growth) - = negative (no growth)

+++, ++, + = positive (compared to FK506 used as a positive control, which gave +++)

* = positive (ring like growth)

* สายพันธุ์กลาย $\Delta zds1$ ที่เลี้ยงในอาหาร YPAUD ที่มี CaCl_2 ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยวิธีการเหนี่ยวนำด้วยสาร EPP ในหูหนู ของสารบริสุทธิ์จากกระชายเหลือง

ในส่วนของการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ได้นำสารบริสุทธิ์ดังกล่าวมาทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยวิธีการเหนี่ยวนำด้วยสาร EPP ในหูหนู พบว่าสาร B แสดงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้สูงสุดภายใน 30 นาที หลังจากเหนี่ยวนำด้วย EPP ตามด้วยสาร C และ A โดยมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 80, 71 และ 64 ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายเหลืองโดยการเหนี่ยวนำด้วย EPP ให้เกิดการบวมในหูหนู

สารที่แยกได้	Dose (mg/ear)	Edema thickness		% การยับยั้ง	
		30 นาที	60 นาที	30 นาที	60 นาที
Vehicle (acetone)	-	147 ± 12	210 ± 15	-	-
Phenylbutazone	1	57 ± 3***	117 ± 3*	61	44
สาร A	1	53 ± 12***	127 ± 34*	64	40
สาร B	1	30 ± 15***	103 ± 9*	80	51
สาร C	1	43 ± 15***	110 ± 20*	71	48

Ethyl phenylpropionate (EPP)-induced rat ear edema model

Values are mean ± SEM (n = 3)

Significant from control * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

4. ผลการทดสอบความคงตัวของสารบริสุทธิ์จากกระชายเหลืองที่มีฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์

ผลการทดสอบความคงตัวของสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย (*Δzds1*) พบว่าสารบริสุทธิ์ให้ผลในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายในทุกๆ ภาวะที่เก็บได้คล้ายเหมือนที่เก็บในภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการคัดกรองเบื้องต้นได้พืช 4 ชนิดจากทั้งหมด 69 ชนิดที่แสดงฤทธิ์สูงในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย กระชายเหลืองซึ่งจัดเป็นพืชในสกุลขิงข่าเป็นหนึ่งในพืชทั้งหมดที่มีศักยภาพในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์ ได้แยกสารบริสุทธิ์จากกระชายเหลืองโดยการติดตามผลด้วยยีสต์ สิ่งสกัดโคคลอโรมีเทนของพืชดังกล่าวถูกนำมาแยกให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้ฟลาโวนอยด์ที่เคยมีรายงานแล้ว 3 ชนิด (สาร A B และ C) คือ pinostrobin, alpinetin และ pinostrobin chalcone ตามลำดับ จากผลในตารางที่ 4 พบว่าฤทธิ์ยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของแคลเซียมในยีสต์ของสาร A มากกว่าสาร C มากกว่าสาร B ตามลำดับ และพบว่าสาร C มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสาร A และสาร B

จากรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่ผ่านมาพบว่า pinostrobin มีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหาร (Bharmapravati และคณะ, 2003) นอกจากนี้เมื่อใช้สารสกัดจากรากกระชายรักษาอาการแผลในกระเพาะอาหารในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดดังกล่าวนอกจากจะฆ่าเชื้อสาเหตุของโรคแล้วยังมีฤทธิ์ลดการอักเสบของแผล ทำให้แผลหายเร็วขึ้น เนื่องจาก pinostrobin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบทั้งในระบบ COX-I และ COX-II จึงอาจอธิบายฤทธิ์ที่เสริมกันได้ ต่อมา Ashidi และคณะ (2007) ทดสอบฤทธิ์ pinostrobin ใน

มะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ (CCRF-CEM) พบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของมะเร็งเม็ดเลือดขาว และยังสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ไมโทคอนเดรียที่มีบทบาทสำคัญในการตายแบบอะพอพโทซิส และในปี 2006 Smolarz และคณะ ทำการคัดกรองหาสารสกัดจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวในมนุษย์ พบว่า pinostrobin มีฤทธิ์ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Jurkat และ HL-60) มีการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) โดยมีการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ pinostrobin เป็นที่ 10 นาโนโมลาร์เซลล์ตาย 25-60% ที่ 100 นาโนโมลาร์เซลล์ตาย 45-76% และที่ 1 ไมโครโมลาร์เซลล์ตาย 70-88%

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ พบว่าสาร B แสดงฤทธิ์ยับยั้งการบวมของหนูหนูได้สูงสุดภายใน 30 นาที หลังจากเหน็บด้วย EPP ตามด้วยสาร C และ A โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 80, 71 และ 64 ตามลำดับ และฤทธิ์ยับยั้งการบวมของหนูหนูของสารบริสุทธิ์ B และ C มีฤทธิ์สูงกว่า phenylbutazone ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมผลบวก ในขณะที่ฤทธิ์ดังกล่าวของสาร A ใกล้เคียงกับ phenylbutazone อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ใช้หนูทดลองเพียง 3 ตัวต่อชุดทดลอง ดังนั้นในการต่อยอดผลงานวิจัยนี้ จะได้ศึกษาฤทธิ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสาร B และ C ในหนูขาว 6 ตัวต่อชุดทดลองต่อไป

เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลาย (*Δzds1*) พบว่าสารบริสุทธิ์มีความคงตัวและให้ผลในการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณแคลเซียมในยีสต์สายพันธุ์กลายในทุกๆ ภาวะที่เก็บ เช่น ภายใต้อุณหภูมิ ภายใต้อุณหภูมิ และที่อุณหภูมิต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วได้ดีเหมือนที่เก็บในภาวะปกติที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

ผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานสำหรับการต่อยอดการวิจัยเพื่อศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารบริสุทธิ์ที่ได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Ashidi, J.S., Houghton, P.J., Hylands, P.J., Sieber, S. and Efferth, T. 2007. Molecular mechanism of action of the flavanone pinostrobin from *Cajanus cajan* leaves in cancer cells. *Planta Med.* **73**: 797-1034.
- Bharmapravati, S., Mahady, G.B. and Pendland, S.L. 2003. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to extracts of *Boesenbergia pandurata* and pinostradin. The 3rd World Congress on Medicinal plants and Aromatic plants for Human Welfare, Chiang Mai, Thailand.
- Booher, R.N., Deshaies, R.J., and Kirschner M.W. 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J.* **12**: 3417-3426.
- Boonkerd, S., Yompakdee, C., Miyakawa, T. and Chavasiri, C. 2011. Screening of Thai medicinal plants for inhibitors of Ca²⁺ signaling using a yeast cell growth-based assay. *RJPBCS.* **2**(2): 549-559.

- Brattsand, R., Thalen, A., Roempke, K., Kallstrom, L. and Gruvstad, E. 1982. Influence of 16 α , 17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *J. Ster. Biochem.* 16: 779-786.
- Chanklan R, Aihara E, Koga S, Takahashi H, Mizunuma M, and Miyakawa T. 2008. Inhibition of Ca²⁺ signal-dependent growth regulation by radicicol in budding yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 132-138 (2008).
- Clapham, D.E. 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80: 259-268.
- Jaipetch, T., Kanghae, S., Pancharoen, O., Patrick, V.A., Reutrakul, V., Tuntiwachwuttikul, P., and White, A.H. 1982. Constituents of *Boesenbergia pandurata*. *Aust. J. Chem.* 35: 351-361.
- Mahidol, C., Tuntiwachwuttikul, P., Reutrakul, V. and Taylor, W. C. 1984. Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*). III Isolation and synthesis of (\pm)-boesenbergin B. *Aust. J. Chem.* 37: 1739-1745.
- Means, A.R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation. *FEBS Lett.* 347(1): 1-4.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E. and Miyakawa, T. 1998. Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature.* 392: 303-306.
- Mongkolsuk, S., and Dean, F.M. 1964. Pinostrobin and alpinetin from *Kaempferia pandurata*. *J. Chem. Soc.* 4654-4655.
- Shitamukai A., Mizunuma M., Hirata D., Takahashi H., Miyakawa, T. 2000. A Positive Screening for Drugs that Specifically Inhibit the Ca²⁺-Signaling Activity on the Basis of the Growth Promoting Effect on a Yeast Mutant with a Peculiar Phenotype. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(9): 1942-1946.
- Smolarz, H.D., Mendyk, E., Bogucka-Kocka, A. and Kocki, J. 2006. Pinostrobin--an anti-leukemic flavonoid from *Polygonum lapathifolium* L. ssp. *nodosum* (Pers.) Dans. *J. Biosci.* 61(1-2): 64-8.
- Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., Reutrakul, V. and Byrne, L. T. 1984. (1'*RS*, 2'*SR*, 6'*RS*)-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-[3'-methyl-2'-(3''-methylbut-2''-enyl)-6'-phenyl-cyclohex-3'-enyl] methanone (Panduratin A)-a constituent of the red rhizomes of a variety of *Boesenbergia pandurata*. *Aust. J. Chem.* 37: 449-453.
- Wutthithamavet, W. 1997. Thai traditional medicine (revised ed.), Odean Store Press, Bangkok p. 268.

ผลผลิตที่เกิดขึ้น

3.1 ผลงานที่ตีพิมพ์แล้ว (published) จำนวน 1 บทความดังนี้

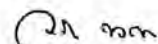
Aree, T.; Tip-pyang, S.; Saowanhip, P. "6-Butyryl-5-hydroxy-4-phenylseselin" *Acta Cryst. Sect. E*, 2010, E66, o2464-o2465 (JIF 0.411)

3.2 การนำเสนอผลงานวิชาการระดับชาติ จำนวน 1 เรื่องดังนี้

เชียรคนย์ เสริมบุญไพศาล และพัชตรา สวัสดิ์. สารยับยั้งบิวทิลรีล โคลีนเอสเทอร์ที่มีศักยภาพสูงจากสติลบิน. การประชุมวิชาการ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 3 วันที่ 14-15 มีนาคม 2554 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานการเงิน (ดังเอกสารแนบ)

ลงชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรินทร์ ชาศิริ)