

๖.114381

สัญญาเลขที่ 22 / 2551

รหัสโครงการวิจัย 51108030022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การลดการอักเสบของ COX-2 และฤทธิ์การสมานแผลโดยสารสกัดจาก
หนุ่แมนประสานกาย

REDUCTION OF COX-2-MEDIATED INFLAMMATION AND
WOUND HEALING ACTIVITY BY *Schefflera leucantha*
EXTRACT

โดย

นาย พหล แสนสมชัย
ดร. ไชยยง รุจจนเวท

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปี พ.ศ.2551

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยความกรุณาจากทุนมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้ให้การสนับสนุนแหล่งทุนทรัพย์ ในการวิจัยเพื่อความก้าวหน้าในสาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางใน งามสุภาพ ผู้เขียนขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ วันชัย ศิริชนะ อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง รองศาสตราจารย์ นสพ. เทิด เทศประทีป รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ศาสตราจารย์ สุจินต์ จินายนต์ ที่ปรึกษาอธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และรองศาสตราจารย์ พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์ คณบดี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ที่ได้ให้การสนับสนุน และส่งเสริมการ ศึกษาวิจัยครั้งนี้ตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย เจ้าหน้าที่มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้ให้ความ ช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ มยุรมาศ แสงเงิน ดร. ไชยขยง รุจจนเวท และนางสาว อัญชลี เชื้อนเพชร ที่ได้ให้กำลังใจ การแนะนำประกอบการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์เพื่อพัฒนา สถาบันการศึกษา และต่อผู้บริหารสถานศึกษา ตลอดจนหน่วยงานต่างๆ ที่มีบทบาทและหน้าที่ที่ เกี่ยวข้อง หากมีสิ่งใดผิดพลาด หรือข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับ และขอภัยไว้ ณ ที่นี้ ด้วย

พหล แสนสมชัย หัวหน้าโครงการวิจัย

ไชยขยง รุจจนเวท ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1 กรกฎาคม 2552

บทสรุปผู้บริหาร

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พืชมีความสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์มากมายเช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่ง ในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง สีย้อม และยารักษาโรค พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญนานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ช่วยขจัดความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะทางด้านพฤษศาสตร์ ซึ่งเราสามารถนำจุดเด่นในด้านนี้เพื่อพัฒนา และยกระดับพืชในประเทศไทยให้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสำคัญที่ได้จากพืชหลายชนิดสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถลดการอักเสบของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากของสิ่งที่ไม่คิดว่าเกิดประโยชน์นั้น เป็นการเพิ่มมูลค่าเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดให้กับสิ่งเหล่านั้น

พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็น โรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็นเครื่องดื่มในรูปแบบชาก็ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1 เพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย
- 2 เพื่อหาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2
- 3 เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสมานแผลจากสารสกัดหนุมานประสานกาย

3.1 คำถามหลักของงานวิจัย

สารสกัดจากหนุมานประสานกายสามารถลดระดับการเกิดอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Cox-2 และยังสามารถลดการอักเสบได้หรือไม่

3.2 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

หนุমানประสานกาย (*Schefflera leucantha* Viguer) อยู่ในวงศ์ Araliaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พุ่มแกมเถา สูง 1-7 เมตร ใบประกอบแบบมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 5-8 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีนวล ผลเป็นผลสด รูปกลม

จากการสกัดใบของหนุমানประสานกายพบว่าสาร betulinic acid, lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-O-[[α -L-rhamnopyranosyl (1-2) β -D-glucopyranosyl (1-2)- β -D-glucuronopyranosyl], lup-20(29)-en-28oic acid, 3-O-[[α -L-rhamnopyranosyl (1-2)- β -D-xylopyranosyl (1-2)- β -D-glucopyranosyl], oleanolic acid, olean-12-en-28-oic acid, 3-O-[[α -L-amnopyranosyl (1-2)- β -D-glucopyranosyl (1-2)- β -D-glucuronopyranosyl], *Schefflera leucantha* trierpenoid saponin

ใบมีสรรพคุณ แก้เส้นเลือดในสมองแตก แก้โรคต่อมทอนซิลอักเสบ แก้คออักเสบ แก้ลักปิดลักเปิด แก้ไข้หวัด แก้วัณโรคปอด แก้พิษต่างๆ แก้ไอ แก้อาเจียนเป็นเลือด ปวดแผลห้ามเลือดและสมานแผล แก้อาเจียนเป็นเลือด

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ด้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล่แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

3.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารจากพืชหนุমানประสานกาย
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัดซาโปนินจากหนุমানประสานกาย
3. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุমানประสานกายในการลดการอักเสบ
4. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุমানประสานกายในการสมานแผล
5. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุমানประสานกายในการต้านอนุมูลอิสระ

2. ทฤษฎี และแนวคิด

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและกรอบคณงานวิจัย

หนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha* Viguer) อยู่ในวงศ์ Araliaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พุ่มแกมเถา สูง 1-7 เมตร ใบประกอบแบบมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 5-8 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีนวล ผลเป็นผลสด รูปกลม

ใบมีสรรพคุณ แก้เส้นเลือดในสมองแตก แก้โรคต่อมทอนซิลอักเสบ แก้คออักเสบ แก้ลักปิดลักเปิด แก้ไข้หวัด แก้วัณโรคปอด แก้พิษต่างๆ แก้ไอ แก้อาเจียนเป็นเลือด ปิดแผลห้ามเลือด และสมานแผล แก้อาเจียนเป็นเลือด

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ด้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดเลือด ไส้แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

3. วิธีการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทางด้านเคมี

สกัดสารที่ได้จากพืชหนุมานประสานกาย

วิธีการดำเนินงาน

1. เตรียมตัวอย่างหนุมานประสานกาย
2. แยกสกัดเอาสารซาโปนินด้วยตัวทำละลาย
3. ระเหยเอาตัวทำละลายออก
4. แบ่งสารสกัดที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ได้

การเตรียมสารละลายเพื่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. นำส่วนสกัดซาโปนินที่ได้ในแต่ละส่วนเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทดสอบทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2
2. เตรียมสารสกัดซาโปนินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารสกัดทั้ง 2 ชนิด เพื่อทดสอบทดสอบฤทธิ์การสมานแผล

2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารสกัดชาโปนินในการทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบ การทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบอื่นเนื่องมาจาก Cox-2 โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดชาโปนินที่สกัดจากพืชหนุมานประสานกาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล
การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดชาโปนินจากพืชหนุมานประสานกาย
4. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ
ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive oxygen species ของสารสกัดชาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี DPPH assay
ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive nitrogen species ของสารสกัดชาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี Griess reaction

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สารสกัดชาโปนินจากหนุมานประสานกาย

4. ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดชาโปนินจากหนุมานประสานกายสามารถการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของ Reactive Oxygen Specie (ROS) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยพบว่าวิตามิน ซี (ascorbic acid) ณ ความเข้มข้น 1.26 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Butylated hydroxytoluene (BHT) ณ ความเข้มข้น 4.20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Beta hydroxy acid (BHA) ณ ความเข้มข้น 4.23 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 และ สารสกัดชาโปนินจาก *S. leucantha* ณ ความเข้มข้น 67.52 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid, BHT, และ BHA

สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* 0-20 mg/ml พบว่าสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 5-20 mg/ml สามารถลดการเกิด Reactive Nitrogen Specie (NOS) แต่สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 mg/ml สามารถลดการเกิด NOS ได้ดีที่สุด

จากการทำ Western blot analysis พบว่าสารสกัดที่ศึกษาจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการ

อักเสบโดย LPS ได้ และที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบได้

5. สรุปและข้อเสนอแนะ

สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Specie และ Reactive Nitrogen Specie โดยพบว่า สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 67.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Specie จากการทดลองพบว่าสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง Reactive Nitrogen Specie

จากการทดลองสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้าง Reactive Oxygen Specie โดยวิธี DPPH สามารถกล่าวได้ว่าฤทธิ์การต้านการเกิดอนุมูลอิสระแบบ Reactive Oxygen Specie ได้

จากการทดลองสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ โดยวิธี Griess reaction จึงสามารถกล่าวได้ว่าฤทธิ์การต้านการสร้างอนุมูลอิสระแบบ Reactive Nitrogen Specie ได้

ยิ่งไปกว่านั้นในการทดลองยังได้ทำการทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ Cyclooxygenase แบบที่ 2 (COX-2) โดยพบว่าสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ณ ความเข้มข้นสูงที่สุด คือ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย Lipopolysaccharide (LPS) ขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย LPS ได้ อีกทั้งที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบได้

6. เอกสารอ้างอิง

1. Witthamaskul P. *et al.* Acute and Subacute Toxicities of the Saponin mixture Isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. *J. of Ethno.* 2003; 89, 115-121.
2. Potduang B. *et al.* Biological Activities of *Schefflera leucantha*. *Afr. J. Trad. CAM* 2007; 4(2):157-164.

3. Tunhwachwuttikul P. *et al.* Chemical constituents of *Schefflera* SP. J. Sci Soc Thailand 1982; 8:115-7.
4. Pancharoen O. *et al.* Triterpenoid glycosides from *Schefflera leucantha*. Phytochem. 1994; 35(4):987-92.
5. Tantivitayapan S., Teerakulpisan S., and Bunyapraphatsara N. The chemical constituents of the leaves of *Schefflera leucantha* Harms (Araliaceae). Undergraduate Special Project Report, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1978; 30 p.
6. อาริรัตน์ ลออปกษา สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. การศึกษาสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (ตอนที่1). ไทยเภสัชสาร 1988; 13(1):23.
7. To-a-nun C., Sommart T., and Rakvidhyasastra V. Effect of some medicinal plants and spices on growth of *Aspergillus*. Abstr 11th Conference of Science and Technology Bangkok, Thailand, October 24-26, 1985:364-5.
8. Taylor WC. Constituents of some Asian medicinal plants. Pure Appl. Chem. 1994; 66(10/11):2375-8.
9. Taesotikul T., Panthong A., and Kanjanapothi D. Bronchodilator activity of *Schefflera venulosa* : preliminary investigation. The 4th Asian symposium on medicinal plants and spices, Bangkok, Thailand, 1980; 46.
10. Tipsuwan S. *et al.* Bronchodilator activity of saponin mixture from the leaves of *Schefflera leucantha* viguier. JSPS-NRCT Seminar: Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, 54.
11. Sinchaisri N., Roongsook D., and Areekul S. Botanical repellent against the diamondback moth, *plutellaxylostella* L. The Kasetsart Journal (Withayasan Kasetsart) 1988; 22(5): 71-4.
12. Satayavivad J. *et al.* Hypoglycemic activity of the aqueous extract of *Schefflera leucantha* viguier in rats. Thai J. of Phyto. 1996; 3 (1):1-5.
13. Achamaas G., Thawornset R., and Bunyapraphatsara N. Phytochemical and anticancer screening of *Schefflera leucantha* and *Saccharum officinarum*. Undergraduate Special Project Report, Fac. Pharm, Mahidol Univ. 1980:69 pp.

14. Satayavivad J. *et al.* Pharmacological and toxicological studies of the constituents of *Schefflera venulosa*. The 4th Asian Symposium on medicinal plants and spices, Bangkok, Thailand, 1980; 47.



ชื่อเรื่อง การลดการอักเสบของ Cox-2 และฤทธิ์การสมานแผลโดยสารสกัดจาก
หนุมานประสานกาย

คณะผู้ทำวิจัย 1. พพล - แสนสมชัย หัวหน้าโครงการวิจัย
2. ดร. ไชยยง รุจจนเวท ผู้ร่วมโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญ
นานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืช
สมุนไพรที่ช่วยจัดการความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่าง
กันไป พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมาน
ประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้าน
เชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็น
เครื่องดื่มในรูปชาก็ได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบของ
สารสกัดหนุมานประสานกาย หาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการลดการอักเสบอัน
เนื่องมาจาก Cox-2 และเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสมานแผลจากสารสกัดหนุมาน
ประสานกาย จากการทดลองโดยทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารสกัดชาไปนินจากหนุมาน
ประสานกาย พบว่าสารสกัดชาไปนินจากหนุมานประสานกาย ๗ ความเข้มข้น 67.52 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อเปรียบเทียบกับวิตามิน ซี
BHT และ BHA ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Griess โดยเปรียบเทียบจาก
กราฟมาตรฐานพบว่าสารสกัดชาไปนินจากหนุมานประสานกาย ๗ ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิ
ลลิลิตร สามารถลดปริมาณไนตริกออกไซด์สูงที่สุด ส่วนการทดลองเพื่อลดการอักเสบอัน
เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย
LPS พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ใน
เซลล์ RAW 264.7 ดังนั้นสารสกัดชาไปนินจากหนุมานประสานกาย สามารถลดการเกิดอนุมูล
อิสระได้ทั้ง ROS และ NOS แต่ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์
แมคโครฟาจได้

Project Title **Reduction of Cox-2-mediated Inflammation and Wound Healing Activity by *Schefflera leucantha* Extract**

Members	1. Pahol Sansomchai	Head of the project
	2. Chaoyong Rujjanawate, Ph.D.	Member

Abstract

Plants have played a significant role in maintaining human health and improving the quality of human life, as several medicinal plants have been exploited for centuries by various communities for their activities against a wide spectrum of diseases in man and animals. Among these, *Schefflera leucantha* Viguier is easily found in Thailand. The extract of *S. leucantha* Viguier may evoke the human immune system. Moreover, the extracts derived from three kinds of these plants are essential oil. These essential oils are evoking the human immune system, prevent asthma, antibacterial, reduce blood sugar, and used as a tea drinking. This study aimed to study the bioactivities *S. leucantha* Viguier extract that may reduce the inflammation by COX-2, to find out suitable concentration of *S. leucantha* Viguier extract for reduction the inflame, and to study the suitable concentration for reduction the inflame. By the antioxidation experiment with the saponin extract from *S. leucantha* Viguier found that the saponin extract from *S. leucantha* Viguier at the concentration 67.52 $\mu\text{g/ml}$ have a antioxidant activity that is generate by DPPH when compare to ascorbic acid, BHT, and BHA ($p < 0.05$). The inhibition of oxidation by Griess reaction when compare to standard nitric oxide found the saponin extract from *S. leucantha* Viguier at the concentration 15 mg/mL gave the highest inhibition of nitric oxide production. For the antiinflammation that measurement the change of COX-2 level in RAW 264.7 cell that enhance the inflammation by LPS, the Change of COX-2 level was not found when co-incubate with saponin extract from *S. leucantha* Viguier at the highest concentration 1,000 $\mu\text{g/mL}$. The saponin extract from *S. leucantha* Viguier can reduce the reactive species even if ROS and NOS but can not change the COX-2 level in macrophage cell.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทสรุปผู้บริหาร	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ญ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ -	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 คำถามหลักของงานวิจัย	2
1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดขอโครงการงานวิจัย	2
1.6 ขอบเขตการวิจัย	3
1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน	4
1.8 นิยามศัพท์	4
1.9 คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย	5
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย	7
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	9
3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย	9
3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	10
3.3 กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงาน การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล	10
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย	11
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	15

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1-1 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

หน้า

4



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	The western blot analysis of COX-2 protein.	11
ภาพที่ 4-2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ	12
ภาพที่ 4-3	กราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์	13
ภาพที่ 4-4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริกออกไซด์	14



บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พืชมีความสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์มากมายเช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง สีย้อม และยารักษาโรค พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญนานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ช่วยขจัดความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะทางด้านพฤษศาสตร์ ซึ่งเราสามารถนำจุดเด่นในด้านนี้เพื่อพัฒนา และยกระดับพืชในประเทศไทยให้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสำคัญที่ได้จากพืชหลายชนิดสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถลดการอักเสบของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากของสิ่งที่ไม่คิดว่าเกิดประโยชน์นั้น เป็นการเพิ่มมูลค่าเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดให้กับสิ่งเหล่านั้น

พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็นเครื่องดื่มในรูปชาก็ได้

จากการรายงานทางวิชาการยังไม่พบรายงานการศึกษาทางด้านการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการลดการอักเสบและดูการสมานแผลจากสารสกัดจากหนุมานประสานกาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อทำการทดลองเกี่ยวกับการสกัดส่วนที่เหมาะสมในการลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย
2. เพื่อหาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2
3. เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสมานแผลจากสารสกัดหนุมานประสานกาย

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการใช้ประโยชน์จากพืชที่มีอยู่แล้ว เพื่อเพิ่มมูลค่า
2. น่าจะพบสารมีฤทธิ์ที่ดีในการลดการอักเสบ เพื่อลดการนำเข้าสารสำคัญจากต่างประเทศ
3. น่าจะพบสารมีฤทธิ์ที่ดีในการสมานแผล เพื่อลดการนำเข้าสารสำคัญจากต่างประเทศ
4. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ในการพัฒนาตำรับเครื่องสำอาง เพื่อการผลิตเชิงปริมาณ
5. ในการผลิตและการแปรรูป จะทราบถึงการปรับปรุงขั้นตอนการผลิตเพื่อให้ได้องค์ประกอบของสารสกัดที่มีคุณภาพดี เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางต่อไป
6. ผู้บริโภค มีทางเลือกในการเลือกใช้ตำรับเครื่องสำอาง
7. นักศึกษาสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันได้
8. สามารถเผยแพร่ความรู้สู่ชุมชน
9. งานวิจัยสามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1.4 คำถามหลักของงานวิจัย

สารสกัดจากหนุমানประสานกายสามารถลดระดับการเกิดอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Cox-2 และยังสามารถลดการอักเสบได้หรือไม่

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

หนุমানประสานกาย (*Schefflera leucantha* Viguier) อยู่ในวงศ์ Araliaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พุ่มแกมเถา สูง 1-7 เมตร ใบประกอบแบบมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 5-8 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีนวล ผลเป็นผลสดรูปกลม

จากการสกัดใบของหนุমানประสานกายพบว่าสาร betulinic acid, lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1-2) β -D-glucopyranosyl (1-2)- β -D-glucuronopyranosyl], lup-20(29)-en-28oic acid, 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl (1-2)- β -D-xylopyranosyl (1-2)- β -D-glucopyranosyl], oleanolic acid, olean-12-en-28-oic acid, 3-

O-[α -L-aminopyranosyl (1-2) - β - D- glucopyranosyl (1-2)- β -D-glucuronopyranosyl],
Schefflera leucantha trierpēnoid saponin

ใบมีสรรพคุณ แก้เส้นเลือดในสมองแตก แก้โรคต่อมทอนซิลอักเสบ แก้คอ
อักเสบ แก้ลักปิดลักเปิด แก้ไข้หวัด แก้วัณโรคปอด แก้พิษต่างๆ แก้ไอ แก้อาเจียนเป็นเลือด
ปิดแผลห้ามเลือดและสมานแผล แก้อาเจียนเป็นเลือด

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ด้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้น
การเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล้แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อ
เซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

1.6 ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารจากพืชหนุมานประสานกาย
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัดชาโพนินจากหนุมานประสานกาย
3. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดชาโพนินจากหนุมานประสานกายในการลด
การอักเสบ
4. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดชาโพนินจากหนุมานประสานกายในการ
สมานแผล
5. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดชาโพนินจากหนุมานประสานกายในการ
ต้านอนุมูลอิสระ

1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ตารางที่ 1-1 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ขั้นตอน	เดือน												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. เก็บตัวอย่าง ออบแห้ง สกัดด้วยตัวทำละลาย	←→												
2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับลดการ ออกเสบจาก Cox-2		←→											
3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับฤทธิ์การ สมานแผล					←→								
5. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการค้น อนุมูลอิสระ								←→					
4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript										←→			

1.8 นิยามศัพท์

หนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha* Viguier) อยู่ในวงศ์ Araliaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พุ่มแกมเถา สูง 1-7 เมตร ใบประกอบแบบมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 5-8 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีนวล ผลเป็นผลสดรูปกลม

สารซาโปนินที่ได้จากการสกัดพืชหนุมานประสานกายไม่สามารถก่อให้เกิดพิษในหนู อีกทั้งสารซาโปนินนี้ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ไม่ว่าจะเป็น ผิวน้ำ ขนสาหร่าย และระบบเนื้อเยื่อในหนูทดลอง

เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำหรือก่อให้เกิดความเสียหายแก่อวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม ต่อมหมวกไต อวัยวะเพศ และสมอง ในสัตว์ทดลองได้

ในการทดลองให้หนูทดลองรับประทานเป็นระยะเวลานาน เพื่อทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากการสะสมของสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่พบเหตุการณ์ใดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็น น้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ลดลง การตายระหว่างการทดลอง ปริมาณของเม็ดเลือดขาว ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าความเข้มข้นของเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด ปริมาณโปรตีนในเลือด ในการนี้เมื่อศึกษาผลของพิษระยะยาวต่อ

อวัยวะภายใน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ หรือเนื้อในอวัยวะภายในในสัตว์ทดลอง ไม่ว่าจะเป็น ตา สมอ ต่อมหมวกไต ระบบปัสสาวะ ระบบประสาทส่วนกลาง

มากไปกว่านั้นสารสกัดเอธานอลของพืชหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับวิตามิน อี อีทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillusspp.*, *Peptococcus spp.*, *Propionibacterium acnes* และ *Candida albicans* ได้เป็นอย่างดี

1.9 คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย

1. ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.	พรณวิภา กฤษณาพงษ์
Assoc. Prof.	Panvipa Krisdaphong, Ph.D.
ตำแหน่งปัจจุบัน	รองศาสตราจารย์ คุณวุฒิ Ph.D.
สถานที่ติดต่อ	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ตำบลท่าสุค อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6833
โทรสาร	0-5391-6831
E-mail:	panvipa@mfu.ac.th

2. นายพหล แสนสมชัย

สัดส่วนงานที่ทำวิจัย

ที่อยู่

โทรศัพท์

หัวหน้าโครงการวิจัย

ร้อยละ 80

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง

เชียงราย 57100

0-5391-6833

3. นายไชยง รุจนเวท
สัปดาห์ที่ทำงานที่ทำวิจัย
ที่อยู่

โทรศัพท์

ผู้ร่วม โครงการวิจัย

ร้อยละ 20

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง

เชียงราย 57100

0-5391-6824



บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและกรอบคณงานวิจัย

หนุมานประสาณกาศ (*Schefflera leucantha* Viguier) อยู่ในวงศ์ Araliaceae ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้พุ่มแกมเถา สูง 1-7 เมตร ใบประกอบแบบมือ เรียงสลับ ใบย่อยรูปวงรีหรือรูปใบหอก กว้าง 1.5-3 ซม. ยาว 5-8 ซม. ดอกช่อออกที่ปลายกิ่ง กลีบดอกสีนวล ผลเป็นผลสด รูปกลม

ใบมีสรรพคุณ แก้เส้นเลือดในสมองแตก แก้โรคต่อมทอนซิลอักเสบ แก้คออักเสบ แก้ลักปิดลักเปิด แก้ไข้หวัด แก้วัณโรคปอด แก้พิษต่างๆ แก้ไอ แก้อาเจียนเป็นเลือด บิดแผลห้ามเลือด และสมานแผล แก้อาเจียนเป็นเลือด

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ด้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไ้แม่แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพืชต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพืชต่อหัวใจ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2005 จากผลการทดลองของ Mukherjee, R. และคณะ มีการใช้สารสกัดกะเพราในการบำบัดโรคที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ Punturee, K. ยังมีการใช้สารสกัดจากใบบัวบกและทองพันชั่งในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน โดยการเหนี่ยวนำจากพิษของเชื้อ Microbacteria MPCO และในปี 1997 See, D.M. และคณะ ได้มีการศึกษาในหลอดทดลองโดยดูผลจากพืช Echinacea และโสม ที่มีผลต่อเม็ดเลือดขาวและระบบภูมิคุ้มกันในคนปกติ และผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ในปีเดียวกัน Ernst E. และ Casileth B.R. ได้มีการศึกษาผลของความเสี่ยงและผลดีของผู้รับประทานมังสวิรัต และปีถัดมา ยังศึกษาผลของยาต่อโรคมะเร็งอีกด้วย

ในปี 1989 Phadke, S.A. และ KulKarni, S.D. ได้มีการคัดเลือกสารสกัดจากธรรมชาติพบว่า สมอไทย กะเม็ง และ กะเพรา มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ และในปี 2000 Babior, B.M. ได้มีการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเหนี่ยวนำให้เกิดการโอบล้อมจับกินและการเกิดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจ ในปี 1999 Craig W. J. ได้ทำการศึกษาการใช้สมุนไพรเหนี่ยวนำทำให้เกิดสุขภาพที่ดี นอกจากนี้ Singh S. และ Majumdar D.K. ได้ศึกษาฤทธิ์น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกะเพราสามารถลดรอยแผลในกระเพาะอาหารและภาวะการเจ็บปวดจากโรคกระเพาะอาหารได้

ในปี 1988 Mediratta, P.K. และคณะ ได้ศึกษาผลของกะเพราต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งพบว่าสารสกัดกะเพรมีฤทธิ์ในการส่งเสริมทำให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ดีขึ้น ในปีดังกล่าว Sukari, M.A. และ Takahashi, S. ได้ศึกษาสารสกัดจากประเทศมาเลเซียและไทย โดยศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดจาก 2 ประเทศนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น Antimicrobial Antivirus เป็นต้น ซึ่งหนึ่งในพืชเหล่านี้กะเพราก็มีฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนั้น Godhwani, S. และคณะ ได้มีการศึกษาเบื้องต้นการส่งเสริมให้เกิดภูมิคุ้มกันและระบบภูมิคุ้มกันในหนู โดยการเหนี่ยวนำจากพืชกะเพรา พบว่ากะเพรมีฤทธิ์ทำให้เกิดการส่งเสริมให้เกิดภูมิคุ้มกันและระบบภูมิคุ้มกันในหนู

ในปี 1978 Lal, R.N. และคณะ ได้ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากสารสกัดกะเพราโดยวิธี Gas chromatography พบว่ามีน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญคือ ยูจินอลและเมธิล-ยูจินอล และในปี 1991 Singh, S. และ Agrawal, S.S. ได้ศึกษาผลของสารสกัดกะเพราในการต้านภูมิแพ้และต้านการอักเสบ พบว่าสารสกัดจากพืชกะเพรมีฤทธิ์ลดภูมิแพ้และลดการอักเสบ ในปี 1996 Singh, S. และคณะ ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในปี 1981 Bhargava K.P. และ Singh N. ได้ศึกษาสารสกัดจากกะเพราในการต้านภาวะเครียด พบว่าสารสกัดกะเพรมีฤทธิ์ในการลดภาวะเครียด โดยการลดภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปและลดการแตกหักของ DNA นอกจากนั้นในปี 2004 Dharmani P. และคณะ ได้ใช้สารสกัดกะเพราในการสมานแผลและเป็นสาร Anti-ulcerogenic

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีวิจัย

1. ทางด้านเคมี

สกัดสารที่ได้จากพืชหนุมานประสานกาย

วิธีการดำเนินงาน

1. เตรียมตัวอย่างหนุมานประสานกาย
2. แยกสกัดเอาสารซาโปนินด้วยตัวทำละลาย
3. ระเหยเอาตัวทำละลายออก
4. แบ่งสารสกัดที่ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ
5. วิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ได้

การเตรียมสารละลายเพื่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. นำส่วนสกัดซาโปนินที่ได้ในแต่ละส่วนเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทดสอบทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2
2. เตรียมสารสกัดซาโปนินที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารสกัดทั้ง 2 ชนิด เพื่อทดสอบทดสอบฤทธิ์การสมานแผล
2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารสกัดซาโปนินในการทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบ การทดสอบฤทธิ์การลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2 โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดซาโปนินที่สกัดจากพืชหนุมานประสานกาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล
การทดสอบฤทธิ์การสมานแผล โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดซาโปนินจากพืชหนุมานประสานกาย
4. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ
ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive oxygen species ของสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี DPPH assay

ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive nitrogen species ของสารสกัดชาโพนินจากหนุมาน
ประสานกายด้วยวิธี Griess reaction

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

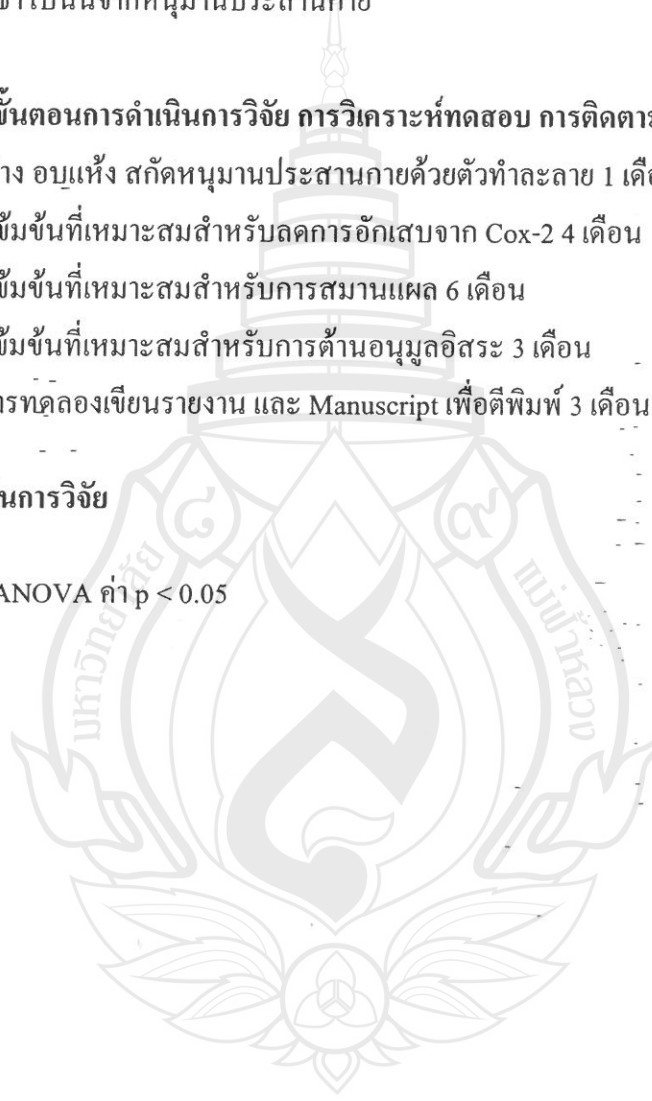
สารสกัดชาโพนินจากหนุมานประสานกาย

3.3 กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล

1. เก็บตัวอย่าง อบแห้ง สกัดหนุมานประสานกายด้วยตัวทำละลาย 1 เดือน
2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับลดการอักเสบจาก Cox-2 4 เดือน
3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการสมานแผล 6 เดือน
4. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการต้านอนุมูลอิสระ 3 เดือน
5. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript เพื่อตีพิมพ์ 3 เดือน

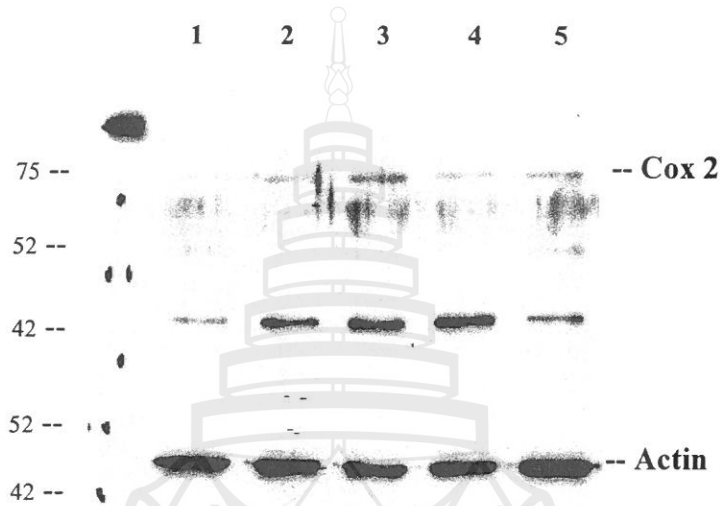
3.4 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

one-way ANOVA ค่า $p < 0.05$



บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย

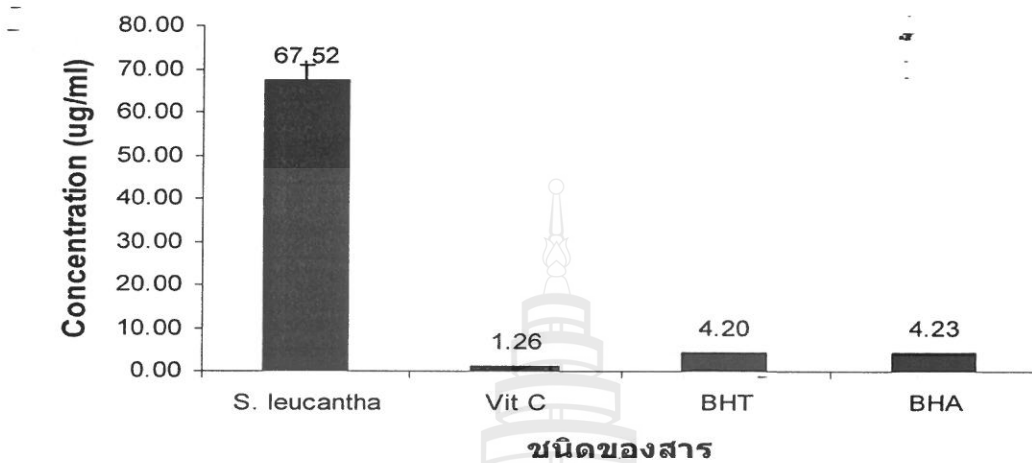
4.1 การลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2



ภาพที่ 4-1 The western blot analysis of COX-2 protein. Lane ที่ 1 Control, Lane 2 LPS 1 µg, Lane 3 LPS + 500 µg/ml, Lane 4 LPS + 1,000 µg/ml, and Lane 5 LPS + Asiatic acid 50 µg/ml.

จากภาพที่ 4-1 เป็นโปรตีน COX-2 ที่ได้จากการทำ western blot analysis พบว่าสารสกัดที่ศึกษาจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย LPS ได้ และที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบได้

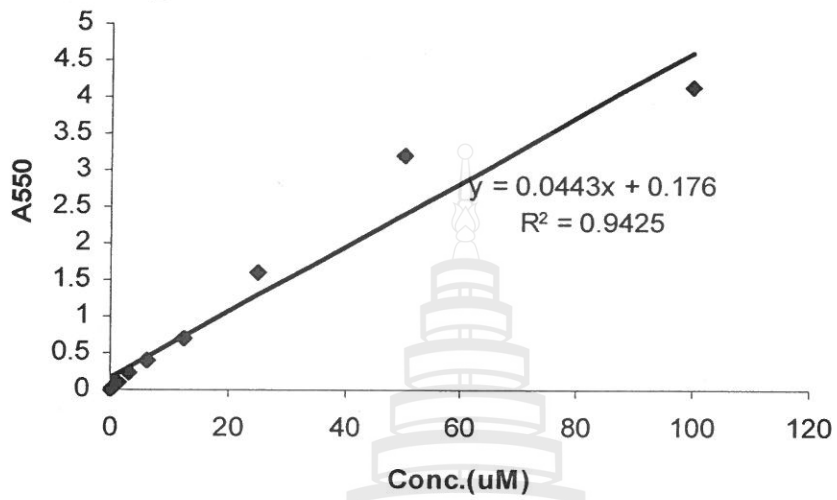
4.2 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH



ภาพที่ 4-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ

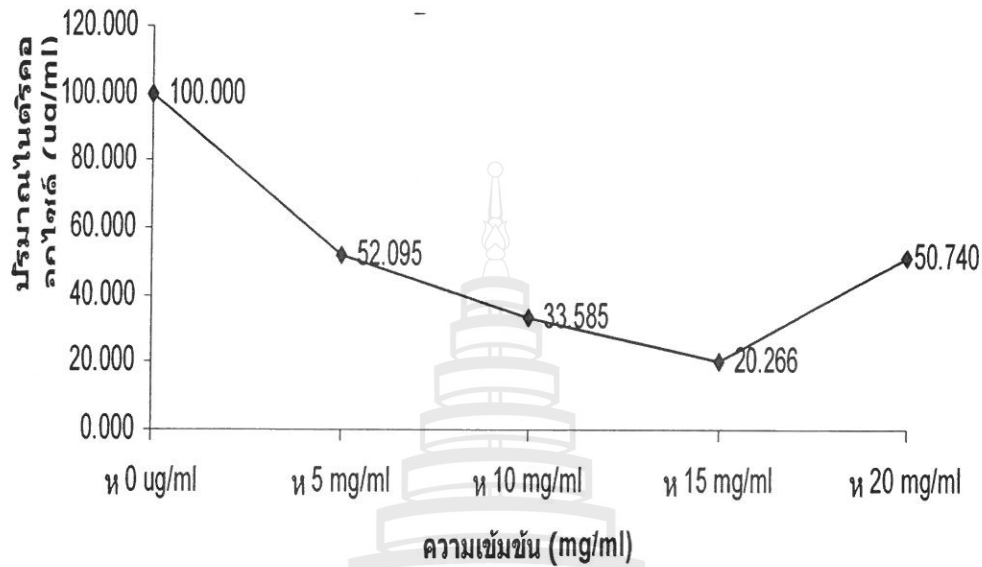
จากภาพที่ 4-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากกราฟแสดงถึงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของ Reactive Oxygen Specie (ROS) โดยพบว่าวิตามิน ซี (ascorbic acid) ณ ความเข้มข้น 1.26 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Butylated hydroxytoluene (BHT) ณ ความเข้มข้น 4.20 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Beta hydroxy acid (BHA) ณ ความเข้มข้น 4.23 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 และ สารสกัดซาโปนินจาก *S. leucantha* ณ ความเข้มข้น 67.52 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid, BHT, และ BHA

4.3 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี Griess



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริกออกไซด์



ภาพที่ 4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริกออกไซด์

จากภาพที่ 4-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อการปริมาณไนตริกออกไซด์ จากกราฟได้ใช้สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* 0-20 mg/ml พบว่าสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 5-20 mg/ml สามารถลดการเกิด Reactive Nitrogen Specie (NOS) แต่สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 mg/ml สามารถลดการเกิด NOS ได้ดีที่สุด

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ

สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Specie และ Reactive Nitrogen Specie โดยพบว่า สารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 67.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Specie จากการทดลองพบว่าสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง Reactive Nitrogen Specie

จากการทดลองสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้าง Reactive Oxygen Specie โดยวิธี DPPH สามารถกล่าวได้ว่าฤทธิ์การต้านการเกิดอนุมูลอิสระแบบ Reactive Oxygen Specie ได้

จากการทดลองสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ โดยวิธี Griess reaction จึงสามารถกล่าวได้ว่าฤทธิ์การต้านการสร้างอนุมูลอิสระแบบ Reactive Nitrogen Specie ได้

ยิ่งไปกว่านั้นในการทดลองยังได้ทำการทดสอบการแสดงออกของเอนไซม์ Cyclooxygenase แบบที่ 2 (COX-2) โดยพบว่าสารสกัดชาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ณ ความเข้มข้นสูงที่สุด คือ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย Lipopolysaccharide (LPS) ขณะที่ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย LPS ได้ อีกทั้งที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์การต้านการอักเสบได้

บรรณานุกรม

1. Witthamaskul P. *et al.* Acute and Subacute Toxicities of the Saponin mixture Isolated from *Schefflera leucantha* Viguier. *J. of Ethno.* 2003; 89, 115-121.
2. Potduang B. *et al.* Biological Activities of *Schefflera leucantha*. *Afr. J. Trad. CAM* 2007; 4(2):157-164.
3. Tunhwachwuttikul P. *et al.* Chemical constituents of *Schefflera* SP. *J. Sci Soc Thailand* 1982; 8:115-7.
4. Pancharoen O. *et al.* Triterpenoid glycosides from *Schefflera leucantha*. *Phytochem.* 1994; 35(4):987-92.
5. Tantivitayapan S., Teerakulpisan S., and Bunyapra-phatsara N. The chemical constituents of the leaves of *Schefflera leucantha* Harms (Araliaceae). Undergraduate Special Project Report, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 1978; 30 p.
6. อาริรัตน์ ลออปักษา สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. การศึกษาสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (ตอนที่1). *ไทยเภสัชสาร* 1988; 13(1):23.
7. Wo-a-nun C., Sommart T., and Rakvidhyasastra V. Effect of some medicinal plants and spices on growth of *Aspergillus*. Abstr 11th Conference of Science and Technology Bangkok, Thailand, October 24-26, 1985:364-5.
8. Taylor WC. Constituents of some Asian medicinal plants. *Pure Appl. Chem.* 1994; 66(10/11):2375-8.
9. Taesotikul T., Panthong A., and Kanjanapothi D. Bronchodilator activity of *Schefflera venulosa* : preliminary investigation. The 4th Asian symposium on medicinal plants and spices, Bangkok, Thailand, 1980; 46.
10. Tipsuwan S. *et al.* Bronchodilator activity of saponin mixture from the leaves of *Schefflera leucantha* viguier. JSPS-NRCT Seminar: Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, 54.
11. Sinchaisri N., Roongsook D., and Areekul S. Botanical repellent against the diamondback moth, *plutellasylostella* L. *The Kasetsart Journal (Witthayasan Kasetsart)* 1988; 22(5): 71-4.
12. Satayavivad J. *et al.* Hypoglycemic activity of the aqueous extract of *Schefflera leucantha* viguier in rats. *Thai J. of Phyto.* 1996; 3 (1):1-5.

13. Achamaas G., Thawornset R., and Bunyapraphatsara N. Phytochemical and anticancer screening of *Schefflera leucantha* and *Saccharum officinarum*. Undergraduate Special Project Report, Fac. Pharm, Mahidol Univ. 1980:69 pp.
14. Satayavivad J. *et al.* Pharmacological and toxicological studies of the constituents of *Schefflera venulosa*. The 4th Asian Symposium on medicinal plants and spices, Bangkok, Thailand, 1980; 47.



ประวัตินักวิจัย และคณะ

1. ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณวิภา กฤษณาพงษ์
Assoc. Prof. Panvipa Krisdaphong, Ph.D.
ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ คุณวุฒิ Ph.D.
สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ตำบลท่าสูด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 0-5391-6833
โทรสาร 0-5391-6831
E-mail: panvipa@mfu.ac.th

2. นายพหล แสนสมชัย

สัดส่วนงานที่ทำวิจัย
ที่อยู่

หัวหน้าโครงการวิจัย

ร้อยละ 80

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง
เชียงราย 57100

โทรศัพท์

0-5391-6833

3. นายไชยยง รุจจนเวท

สัดส่วนงานที่ทำวิจัย
ที่อยู่

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ร้อยละ 20

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง
เชียงราย 57100

โทรศัพท์

0-5391-6824