ฉ.114831

สัญญาเลขที่ 22 / 2551
รหัสโครงการวิจัย 51108030022

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การยับยั้ง COX-2 และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยสารซาโปนิน จากหนุมานประสานกาย

The COX-2 inhibition and antioxidant activity by saponin of *Schefflera Leucantha*

โดย

นาย พหล แสนสมชัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
ดร. ไชยยง รุจจนเวท สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ประจำปี พ.ศ.2551

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยความกรุณาจากทุนมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ผู้ให้การสนับทุนแหล่งทุนทรัพย์ ในการวิจัยเพื่อความก้าวหน้าในสาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางในงาสุขภาพ ผู้เขียนขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ วันชัย ศิริชนะ อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง รองศาสตราจารย์ นสพ. เทอด เทศประทีป รองอธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ศาสตราจารย์ สุจินต์ จินายนต์ ที่ปรึกษาอธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง และรองศาสตราจารย์ พรรณวิภา กฤษฎาพงษ์ คณบดี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ที่ได้ให้การสนับสนุน และส่งเสริมการศึกษาวิจัยครั้งนี้ตลอดมา ขอขอบคุณผู้ร่วมงานวิจัย เจ้าหน้ามหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ อาจารย์ มยุรมาศ แสงเงิน ดร. ไชยยง รุจจนเวท และนางสาว อัญชลี เขื่อนเพชร ที่ได้ให้กำลังใจ การแนะแนวประกอบการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์เพื่อพัฒนาสถาบันการศึกษา และต่อผู้บริหารสถานศึกษา ตลอดจนหน่วยงานต่างๆ ที่มีบทบาทและหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง หากมีสิ่งใดผิดพลาด หรือข้อบกพร่องประการใด ผู้เขียนขอน้อมรับ และขออภัยไว้ ณ ที่นี่ด้วย

พหล แสนสมชัย หัวหน้าโครงการวิจัย
ไชยยง รุจจนเวท ผู้ร่วมโครงการวิจัย
1 กรกฎาคม 2552

บทสรุปผู้บริหาร

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พืชมีความสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์มากมายเช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง สีย้อม และยารักษาโรค พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญนานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ช่วยขจัดความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป

ประเทศไทยมีความหลายหลายทางด้านชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะทางด้านพฤษศาสตร์ ซึ่งเราสามารถใช้จุดแด่นในด้านนี้เพื่อพัฒนา และยกระดับพืชในประเทศไทยให้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสำคัญที่ได้จากพืชหลายชนิดสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถลดการอักเสบของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากของสิ่งที่ไม่คิดว่าเกิดประโยชน์นั้น เป็นการเพิ่มมูลค่าเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดให้กับสิ่งเหล่านั้น

พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็นเครื่องดื่มในรูปชาก็ได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1 เพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย

2 เพื่อหาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2

3 เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหนุมานประสานกาย

3.1 คำถามหลักของงานวิจัย

สารสกัดจากหนุมานประสานกายสามารถลดระดับการเกิดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการอักเสบโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Cox-2 ได้หรือไม่

3.2 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

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 ผลเป็นผลสด รูปกลม

จากการสกัดใบของหนุมานประสานกายพบว่าสาร betulinic acid, lup-20(29)-en-28-oic acid,3-O-[∝-L-rhamnopyranosyl (1-2) β- D-glucopyranosyl (1-2)-β-D-glucuaronpy-ranosyl], lup-20(29)-en-28oic acid,3-O-[∝-L-rhamnopyranosyl (1-2)- β-D-xylopy-ranosyl (1-2)- β- D-glucopyranosyl], oleanolic acid, olean- 12- en –28-oic acid,3-O-[∝-L-amnopyranosyl (1-2) -β- D- glucopyranosyl (1-2)-β-D-glucuaronpy-ranosyl], Schefflera leucantha trierpenoid saponin

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

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ต้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล่แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

3.3 ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารจากพืชหนุมานประสานกาย
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย
3. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายในการยับยั้งการอักเสบ
4. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายในการต้านอนุมูลอิสระ

2. ทฤษฎี และแนวคิด

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย

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 ผลเป็นผลสด รูปกลม

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

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ต้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล่แมลง 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 เพื่อรอทดสอบทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2

2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารสกัดซาโปนินในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ

   การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2 โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดซาโปนินที่สกัดจากพืชหนุมานประสานกาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive oxygen species ของสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี DPPH assay

ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive nitrogen species ของสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี Griess reaction

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย

4. ผลการศึกษาวิจัย

สารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายสามารถการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของ Reactive Oxygen Specie (ROS) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยพบว่าไวตามิน ซี (ascorbic acid) ณ ความเข้มข้น 1.26 μg/ml สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Butylated hydroxytoluene (BHT) ณ ความเข้มข้น 4.20 μg/ml สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Beta hydroxy acid (BHA) ณ ความเข้มข้น 4.23 μg/ml สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 และ สารสกัดซาโปนินจาก *S. leucantha* ณ ความเข้มข้น 67.52 μg/ml สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid, BHT, และ BHA

สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* 0-20 mg/ml พบว่าสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 5-20 mg/ml สามารถลดการเกิด Reactive Nitrogen Specie (NOS) แต่สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 mg/ml สามารถลดการเกิด NOS ได้ดีที่สุด

จากการทำ Western blot analysis พบว่าสารสกัดที่ศึกษาจนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย LPS ได้ และที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

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* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้างก๊าซไนตริคออกไซด์ 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/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษา จึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

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.* Chemicai constitufnts of Scheffiera SP. J. Sci Soc Thailand 1982; 8:115-7.
4. Pancharoen O. *et al.* Triterpenoid glycosides from Schefflera lucantha. 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. อารีรัตน์ ลออปักษา สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (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 11 th 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. Brondiodilator 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 lucantha* viguier. JSPS-NRCT Seminar: Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, 54.

11. Sinchaisri N., Roongsook D., and Areekul S. Botanical repellent against the diamonback moth, plutellasxylostella 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.

ชื่อเรื่อง **การยับยั้ง COX-2 และ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยสารซาโปนินจากหนุมานประสานกาย**

คณะผู้ทำวิจัย **1. พหล แสนสมชัย หัวหน้าโครงการวิจัย**

2. ดร. ไชยยง รุจจนเวท ผู้ร่วมโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญนานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ช่วยขจัดความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็นเครื่องดื่มในรูปชาก็ได้ โดยการศึกษาในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์การลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย หาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการลดการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2 และเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสมานแผลจากสารสกัดหนุมานประสานกาย จากการทดลองโดยทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย พบว่าสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย ณ ความเข้มข้น 67.52 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เมื่อเปรียบเทียบกับไวตามิน ซี BHT และ BHA ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Griess โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานพบว่าสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย ณ ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร สามารถลดปริมาณไนตริคออกไซด์สูงที่สุด ส่วนการทดลองเพื่อลดการอักเสบอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกเหนี่ยวนำการอักเสบโดย LPS พบว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์ RAW 264.7 ดังนั้นสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ทั้ง ROS และ NOS แต่ไม่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของ COX-2 ในเซลล์แมคโครฟาจได้

Project Title **The COX-2 inhibition and antioxidant activity by saponin of *Schefflera Leucantha***

Members **1. Pahol Sansomchai Head of the project**

2. Chaiyong 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 form 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 μg/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 oxideproduction. For the antiinflamation 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 μg/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		**ฌ**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		**ญ**
บทที่ 1 บทนำ		**1**
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2	วัตถุประสงค์ของโครงการ	1
1.3	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4	คำถามหลักของงานวิจัย	2
1.5	ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดขอโครงงานวิจัย	2
1.6	ขอบเขตการวิจัย	3
1.7	ระยะเวลาในการดำเนินงาน	4
1.8	นิยามศัพท์	4
1.9	คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย	5
บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		**6**
2.1	แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย	6
2.2	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย		**8**
3.1	ระเบียบวิธีการวิจัย	8
3.2	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	8
3.3	กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินงาน การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล	9
3.4	สถิติที่ใช้ในการวิจัย	9
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย		**10**
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ		**14**

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1-1 ระยะเวลาในการดำเนินงาน 4

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 4-1	The western blot analysis of COX-2 protein.	10
ภาพที่ 4-2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ	11
ภาพที่ 4-3	กราฟมาตรฐานไนตริคออกไซด์	12
ภาพที่ 4-4	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริคออกไซด์	13

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.* Chemicai constitufnts of Scheffiera SP. J. Sci Soc Thailand 1982; 8:115-7.
4. Pancharoen O. *et al.* Triterpenoid glycosides from Schefflera lucantha. 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. อารีรัตน์ ลออปักษา สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (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 11 th 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. Brondiodilator 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 lucantha* viguier. JSPS-NRCT Seminar: Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, 54.
11. Sinchaisri N., Roongsook D., and Areekul S. Botanical repellent against the diamonback moth, plutellasxylostella 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 กฤษฎาพงษ์
Assoc. Prof.	Panvipa Krisdaphong, Ph.D.
ตำแหน่งปัจจุบัน	รองศาสตราจารย์ คุณวุฒิ Ph.D.
สถานที่ติดต่อ	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6833
โทรสาร	0-5391-6831
E-mail:	panvipa@mfu.ac.th

2. นายพหล แสนสมชัย	หัวหน้าโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย	ร้อยละ 80
ที่อยู่	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6833

3. นายไชยยง รุจจนเวท	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย	ร้อยละ 20
ที่อยู่	สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์	0-5391-6824

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พืชมีความสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์มากมายเช่น ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งในอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง สีย้อม และยารักษาโรค พืชมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์เรา เนื่องจากพืชเป็นแหล่งรวมสารสำคัญนานาชนิดที่มีฤทธิ์ในการบำบัดรักษาโรคได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารธรรมชาติที่ได้จากพืชสมุนไพรที่ช่วยขจัดความเจ็บป่วยในมนุษย์มีฤทธิ์ทางชีวภาพและกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันไป

ประเทศไทยมีความหลายหลายทางด้านชีวภาพเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะทางด้านพฤษศาสตร์ ซึ่งเราสามารถใช้จุดแด่นในด้านนี้เพื่อพัฒนา และยกระดับพืชในประเทศไทยให้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น ที่น่าสนใจประการหนึ่ง สารสำคัญที่ได้จากพืชหลายชนิดสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสามารถลดการอักเสบของร่างกาย เมื่อร่างกายเกิดการติดเชื้อจากเชื้อโรคต่างๆ อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากของสิ่งที่ไม่คิดว่าเกิดประโยชน์นั้น เป็นการเพิ่มมูลค่าเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดให้กับสิ่งเหล่านั้น

พืชหนุมานประสานกายเป็นพืชที่พบได้โดยทั่วไปในประเทศไทย ซึ่งสารสกัดจากหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็น โรคภูมิแพ้ หรืออาการหอบหืด มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด บางครั้งเรายังสามารถนำพืชชนิดนี้มาทำเป็นเครื่องดื่มในรูปชาก็ได้

จากการรายงานทางวิชาการยังไม่พบรายงานการศึกษาทางด้านการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการลดการอักเสบและดูการสมานแผลจากสารสกัดจากหนุมานประสานกาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อทำการทดลองเกี่ยวกับการสัดส่วนที่เหมาะสมในการลดการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบของสารสกัดหนุมานประสานกาย
2. เพื่อหาสัดส่วนองค์ประกอบที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2
3. เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหนุมานประสานกาย

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. สามารถเผยแผ่ความรู้สู่ชุมชน
9. งานวิจัยสามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1.4 คำถามหลักของงานวิจัย

สารสกัดจากหนุมานประสานกายสามารถลดระดับการเกิดอนุมูลอิสระ และยับยั้งการอักเสบโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ Cox-2 ได้หรือไม่

1.5 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

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 ผลเป็นผลสด รูปกลม

จากการสกัดใบของหนุมานประสานกายพบว่าสาร betulinic acid, lup-20(29)-en-28-oic acid,3-O-[∝-L-rhamnopyranosyl (1-2) β- D-glucopyranosyl (1-2)-β-D-glucuaronpy-ranosyl], lup-20(29)-en-28oic acid,3-O-[∝-L-rhamnopyranosyl (1-2)- β-D-xylopy-ranosyl (1-2)- β- D-glucopyranosyl], oleanolic acid, olean- 12- en –28-oic acid,3-

O-[∝-L-amnopyranosyl (1-2) -β- D- glucopyranosyl (1-2)-β-D-glucuaronpy-ranosyl], Schefflera leucantha trierpenoid saponin

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

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ต้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล่แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

1.6 ขอบเขตการวิจัย

1. สกัดสารจากพืชหนุมานประสานกาย
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย
3. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายในการยับยั้งการอักเสบ
4. ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของส่วนสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายในการต้านอนุมูลอิสระ

1.7 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ตารางที่ 1-1 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ขั้นตอน	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. เก็บตัวอย่าง อบแห้ง สกัดด้วยตัวทำละลาย	←	→										
2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งการอักเสบจาก Cox-2		←	—	—	→							
3.หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการต้านอนุมูลอิสระ						←	—	—	—	→		
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 ผลเป็นผลสด รูปกลม

สารซาโปนินที่ได้จากการสกัดพืชหนุมานประสานกายไม่สามารถก่อให้เกิดพิษในหนู อีกทั้งสารซาโปนินนี้ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ไม่ว่าจะเป็น ผิวหนัง ขน สายตา และระบบเนื้อเยื่อในหนูทดลองเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำหรือก่อให้เกิดความเสียหายแก่อวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม ต่อมหมวกไต อวัยวะเพศ และสมอง ในสัตว์ทดลองได้ในการทดลองให้หนูทดลองรับประทานเป็นระยะเวลานาน เพื่อทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากการสะสมของสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่พบเหตุการณ์ใดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็น น้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ลดลง การตายระหว่างการทดลอง ปริมาณของเม็ดเลือดขาว ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าความเข้มข้นของเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด ปริมาณโปรตีนในเลือด ในการนี้เมื่อศึกษาผลของพิษระยะยาวต่ออวัยวะภายใน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ หรือเนื้อในอวัยวะภายในในสัตว์ทดลอง ไม่ว่าจะเป็น ตา สมอง ต่อมหมวกไต ระบบปัสสาวะ ระบบประสาทส่วนกลาง

มากไปกว่านั้นสารสกัดเอธานอลของพืชหนุมานประสานกายมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับวิตามิน อี อีทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Clostridium spp. Bacteroides spp. Enterococcus faecalis Lactobacillasspp. Peptococcus spp. Propionibacterium acnes และ *Candida albicans* ได้เป็นอย่างดี

1.9 คณะนักวิจัยและที่ปรึกษางานวิจัย

1. ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

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

2. นายพหล แสนสมชัย — หัวหน้าโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย — ร้อยละ 80
ที่อยู่ — สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์ — 0-5391-6833

3. นายไชยยง รุจจนเวท — ผู้ร่วมโครงการวิจัย
สัดส่วนงานที่ทำวิจัย — ร้อยละ 20
ที่อยู่ — สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง อำเภอเมือง เชียงราย 57100
โทรศัพท์ — 0-5391-6824

บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎี และเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้องและครอบคลุมงานวิจัย

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 ผลเป็นผลสด รูปกลม

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

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชชนิดนี้พบว่าสามารถ ต้านเชื้อแบคทีเรีย กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อรา ขยายหลอดลม ไล่แมลง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มแรงบีบของหัวใจ เป็นพิษต่อหัวใจ

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สารซาโปนินที่ได้จากการสกัดพืชหนุมานประสานกายไม่สามารถก่อให้เกิดพิษในหนู อีกทั้งสารซาโปนินนี้ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ไม่ว่าจะเป็น ผิวหนัง ขน สายตา และระบบเนื้อเยื่อในหนูทดลองเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่สามารถเหนี่ยวนำหรือก่อให้เกิดความเสียหายแก่อวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม ต่อมหมวกไต อวัยวะเพศ และสมอง ในสัตว์ทดลองได้ในการทดลองให้หนูทดลองรับประทานเป็นระยะเวลานาน เพื่อทดสอบความเป็นพิษเนื่องมาจากการสะสมของสารสกัดหนุมานประสานกายพบว่า ไม่พบเหตุการณ์ใดที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดอาการผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองที่ลดลง การตายระหว่างการทดลอง ปริมาณของเม็ดเลือดขาว ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าความเข้มข้นของเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด ปริมาณโปรตีนในเลือด ในการนี้เมื่อศึกษาผลของพิษระยะยาวต่ออวัยวะภายใน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ หรือเนื้อในอวัยวะภายในในสัตว์ทดลอง ไม่ว่าจะเป็น ตา สมอง ต่อมหมวกไต ระบบปัสสาวะ ระบบประสาทส่วนกลาง

ในกระบวนการเกิดการอักเสบนั้นมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของกีดไขมันที่ชื่อว่า arachidonic acid ซึ่งในกระบวนการเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลให้เกิดสาร prostaglandins และสาร tromboxane โดยเอนไซม์ cyclooxygenase ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดง

และเป็นหนองในที่สุด ดังนั้นให้การหาสาระสำคัญที่สามารถยับยั้งกลไกการเปลี่ยนแปลงนี้ได้จะทำให้ไม่เกิดการอักเสบ โดยกลไกสำคัญคือกลไกที่สามารถยับยั้ง หรือป้องกันการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase โดยเอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ คือ cyclooxygenase1 และ2 โดยรูปแบบที่ 1 นี้มักพบโดยทั่วไปที่บริเวณเมือกของผนังลำไส้ เป็นสารชีวโมเลกุลแบบ glycoprotein ที่มีมวลโมเลกุล 71 kDa ส่วนเอนไซม์รูปแบบที่ 2 นี้พบได้โดยทั่วมักและมักเกิดขึ้นพร้อมกับการอักเสบโดยตรง ถ้ามีการสร้างเอนไซม์ cyclooxygenase นี้จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกันของเม็ดเลือดขาวให้มาที่บริเวณที่เกิดการติดเชื้อ การเกิดบาดแผล หรือแม้กระทั่งการเกิดการอักเสบ ส่งผมให้บริเวณนั้นมีการ บวม แดง หรืออักเสบได้ในที่สุด

นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ cyclooxygenase จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสาร cytokine คือ IL-1, VEGF, TNF ฯลฯ สาร cytokine เหล่านี้จะส่งผลโดยตรงต่อการเกิดการอักเสบ และเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ cyclooxygenase อีกด้วย

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 เพื่อรอทดสอบทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2

2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมจากสารสกัดซาโปนินในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการอักเสบอันเนื่องมาจาก Cox-2 โดยหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดซาโปนินที่สกัดจากพืชหนุมานประสานกาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3. การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive oxygen species ของสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี DPPH assay

ทดสอบฤทธิ์การต้าน reactive nitrogen species ของสารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกายด้วยวิธี Griess reaction

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สารสกัดซาโปนินจากหนุมานประสานกาย

3.3 กิจกรรมวิจัย ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย การวิเคราะห์ทดสอบ การติดตามผล

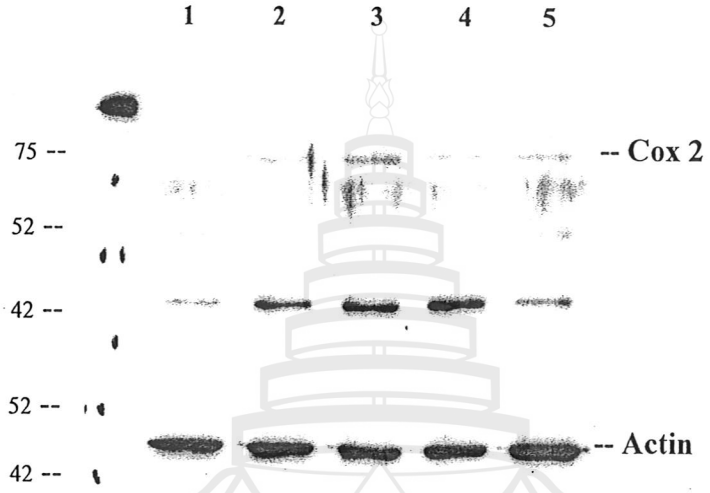
1. เก็บตัวอย่าง อบแห้ง สกัดหนุมานประสานกายด้วยตัวทำละลาย 1 เดือน
2. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับยับยั้งการอักเสบจาก Cox-2 5 เดือน
3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการต้านอนุมูลอิสระ 4 เดือน
4. สรุปผลการทดลองเขียนรายงาน และ Manuscript เพื่อตีพิมพ์ 3 เดือน

3.4 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

one-way ANOVA ค่า $p < 0.05$

บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัย

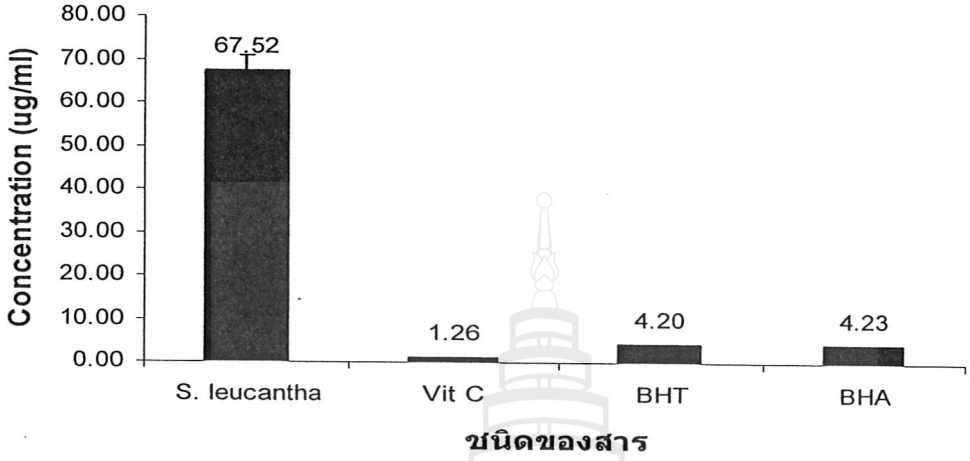
4.1 การลดการแสดงออกของเอนไซม์ COX-2



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/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษาจึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

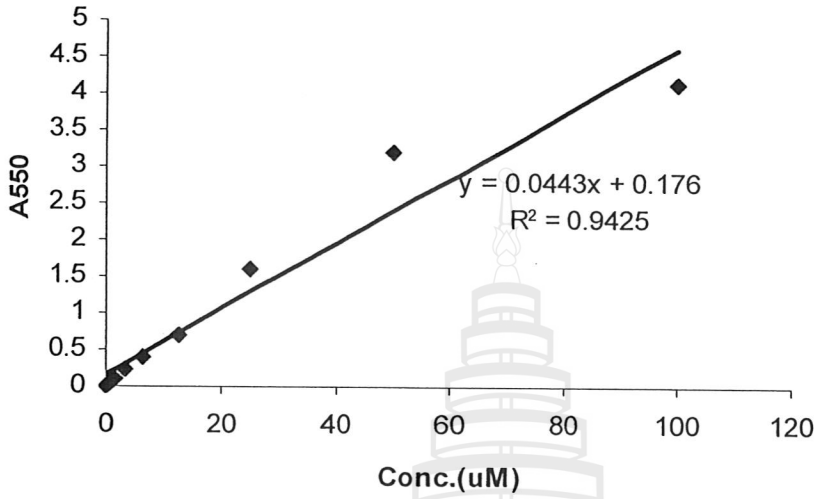
4.2 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH



ภาพที่ 4-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารสกัดต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ

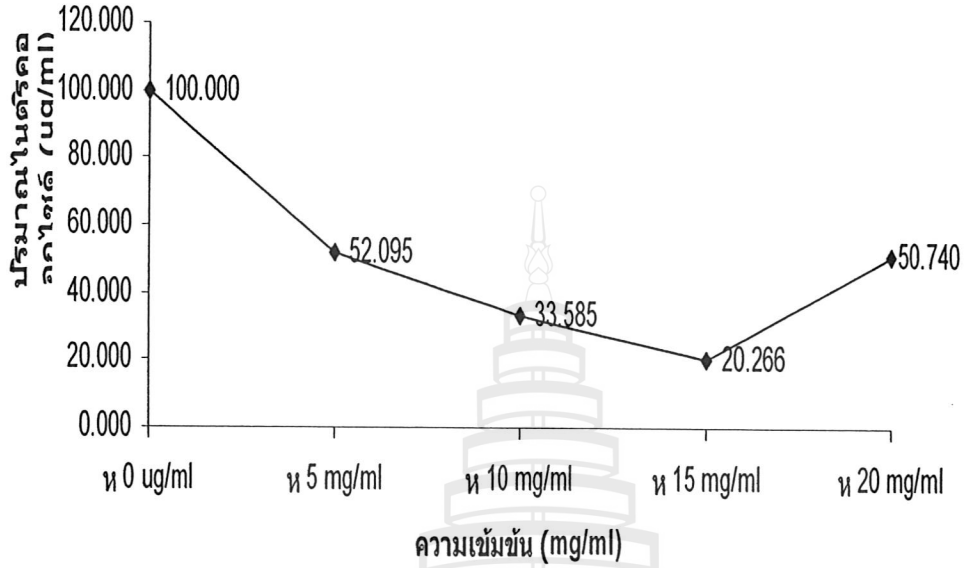
จากภาพที่ 4-2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของสารต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากกราฟแสดงถึงการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ของ Reactive Oxygen Specie (ROS) โดยพบว่าไวตามิน ซี (ascorbic acid) ณ ความเข้มข้น 1.26 μg/ml สามารถยับยั้ง ROS ได้ร้อยละ 50 Butylated hydroxytoluene (BHT) ณ ความเข้มข้น 4.20 μg/ml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

4.3 การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยวิธี Griess



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานไนตริคออกไซด์ โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไนตริคออกไซด์ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริคออกไซด์



ภาพที่ 4-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อปริมาณไนตริคออกไซด์

จากภาพที่ 4-4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดต่อการปริมาณไนตริคออกไซด์ จากกราฟได้ใช้สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* 0-20 mg/ml พบว่าสารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 5-20 mg/ml สามารถลดการเกิด Reactive Nitrogen Specie (NOS) แต่สารสกัดซาโปนินที่ได้จาก *S. leucantha* ความเข้มข้น 15 mg/ml สามารถลดการเกิด NOS ได้ดีที่สุด

บทที่ 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* ต่อการยับยั้งให้เกิดการสร้างก๊าซไนตริคออกไซด์ 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/มิลลิลิตรจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ศึกษา จึงไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

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.* Chemicai constitufnts of Scheffiera SP. J. Sci Soc Thailand 1982; 8:115-7.
4. Pancharoen O. *et al.* Triterpenoid glycosides from Schefflera lucantha. 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. อารีรัตน์ ลออปักษา สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ. การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ (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 11 th 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. Brondiodilator 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 lucantha* viguier. JSPS-NRCT Seminar: Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, 54.
11. Sinchaisri N., Roongsook D., and Areekul S. Botanical repellent against the diamonback moth, plutellasxylostella 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 กฤษฎาพงษ์

Assoc. Prof. Panvipa Krisdaphong, Ph.D.

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ คุณวุฒิ Ph.D.

สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100

โทรศัพท์ 0-5391-6833

โทรสาร 0-5391-6831

E-mail: panvipa@mfu.ac.th

2 หัวหน้าโครงการวิจัย

นาย พหล แสนสมชัย

ตำแหน่ง อาจารย์ **คุณวุฒิ** M.Sc. (Biochemistry)

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Natural Products, Antioxidant, Phagocytosis, Immunity, Toxicology

สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100

โทรศัพท์ 0-5391-6836

โทรสาร 0-5391-6831

E-mail: lyw11@hotmail.com

3 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

นาย ไชยยง รุจจนเวท

ตำแหน่ง อาจารย์ **คุณวุฒิ** Ph.D. (Pharmacology)

ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Natural Products, Antioxidant, Pharmacology, Toxicology

สถานที่ติดต่อ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุด อำเภอเมืองเชียงราย จังหวัดเชียงราย 57100

โทรศัพท์ 0 5391 6821

โทรสาร 0 5391 6821

E-mail: chaiyong@mfu.ac.th