บทคัดย่อ

<u>สารสกัดสังหยู</u>

การสกัดและการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของสังหยู โดยตัวอย่างสังหยู (ใบเขียว) ในส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ใบ ลำต้นหรือกิ่งขนาดใหญ่ นำมาลดขนาด อบให้แห้ง บดเป็นผง จากนั้นนำมาสกัดด้วย แอลกอฮอล์ และน้ำ ด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องหรือวิธีการต้ม จากนั้นทำให้แห้ง สารสกัดที่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ โดยตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ที่ดี คือส่วนเปลือก นำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี โดยติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นตัวการสำคัญในการทำลายเซลล์ให้เกิดความเครียดออกซิเดชั่นและการอักเสบซึ่งเป็นผลให้เกิดความเสียหายของเซลล์ตามมา อนุมูลอิสระยังเกี่ยวข้องกับการทำให้เซลล์ตับอักเสบและเกิดพังผืดที่ตับ (liver fibrosis) ด้วย ทำให้ปัจจุบันจึงมีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของพืชสมุนไพรกันอย่างแพร่หลาย และเนื่องจากสารอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบของเซลล์ตับและ liver fibrosis ด้วย ดังนั้นสมุนไพรที่สามารถลดอนุมูลอิสระในเซลล์ ยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับ และเหนี่ยวนำให้เซลล์ตับเกิด apoptosis จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการรักษา liver fibrosis ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดสังหยูทำโดยวิธี DPPH และ superoxide radical ซึ่งพบว่าสารสกัดสังหยู LCBH_02_Ea, LCBE_01_E, LCLH_02 และ LCBH_02 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีกว่าสารสกัดสังหยูชนิดอื่น เมื่อศึกษาผลต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงโดยวิธี cell proliferation assay พบว่าสารสกัดเหล่านี้ทำให้เซลล์ตายเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น (concentration-dependent manner) และได้เลือกใช้ความเข้มข้นระหว่าง 200-800 µg/mL มาทำการทดสอบผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตาย โดยวิธี apoptosis assay ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารสกัดสังหยู LCBH_02 และสาร LCBE_01_E

การศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลองของสารสกัดสังหยู โดยวัดการของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione ในซีรั่ม พบว่าสารสกัดใบสังหยู LCLH ให้ผลดีในการเป็นสารต้านพิษยาฆ่าแมลง ซึ่งควรนำไปศึกษาต่อไป

<u>ตำรับขับสารพิษ</u>

การศึกษาสูตรตำรับของสมุนไพรขจัดสารพิษ วัตถุดิบสมุนไพร 4 ชนิดได้แก่ รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) หนามแน่แดงหรือรางจืดดอกแดง *(Thunbergia coccinea* Wall. ex D.Don) ยอดินหรือยอป่า (*Morinda angustifolia* Roxb. var. *angustifolia)* และส้มกุ้ง *(Embelia ribes* Burm.f.) ที่จะนำไปใช้ในการศึกษา นำมาประเมินคุณภาพ โดยอ้างอิงวิธีการจากเภสัชตำรับสมุนไพรไทย ได้แก่ การตรวจสอบด้วยจุลทรรศน์ลักษณะ ค่าคงที่ของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย ปริมาณเถ้ารวม เถ้าที่ไม่ละลายด้วยกรด ปริมาณความชื้น อ้างอิงผลของข้อกำหนดเฉพาะที่ได้จัดทำไว้ในการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าผลการประเมินสอดคล้องกับข้อกำหนดเฉพาะที่จัดทำไว้ในปี พ.ศ. 2559

สมุนไพรในตำรับยาขับสารพิษที่ผ่านการประเมินคุณภาพ แต่ละชนิดนำมาสกัดด้วยน้ำและตั้งสูตรตำรับใหม่ จำนวน 7 ตำรับ สกัดด้วยน้ำด้วยวิธีการต้ม และทำให้แห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย อัตรส่วนของสมุนไพรอ้างอิงจากข้อมูลทางภูมิปัญญาและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ สารสกัดที่ได้นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

สารสกัดที่ได้ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี จากนั้นนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยคาดว่ารูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่เลือกใช้ คือ ยาแคปซูล เนื่องจากรูปแบบยาเตรียมชนิดนี้ เตรียมโดยการนำสารสกัดมาตั้งตำรับเพื่อบรรจุผงยาลงแคปซูล โดยไม่มีการเปลี่ยนสภาพของสารสกัด ซึ่งจะเหมือนกับการใช้สารสกัดที่ใช้ศึกษาทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยา ซึ่งในการทดลองทางคลินิกจะต้องเตรียมผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษาดังกล่าว เพื่อให้ผลการวิจัยทางคลินิกมีความเที่ยงตรงมากที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดสังหยุทำโดยวิธี DPPH และ superoxide radical พบว่าสารสกัดตำรับขับสารพิษที่ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นสูงคือ ES 01_V, TL 01_L, ES 01_L, สูตรตำรับ 01 และสูตรตำรับ 03 ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยงโดยวิธี cell proliferation assay และการทดสอบผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตาย โดยวิธี apoptosis assay พบว่า สารสกัดตำรับขับสารพิษ สูตรตำรับ 03, สารสกัด ES_01_V และสารสกัด ES_01_L สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ early apoptosis ที่มากกว่าสารสกัดชนิดอื่น จากการที่สารสกัดเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและมีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis ได้ ดังนั้นสารสกัดเหล่านี้จึงน่าจะมีศักยภาพที่จะใช้เป็นยา (antifibrotic agents) ในการรักษา liver fibrosis แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับตำรับขับสารพิษที่ได้ทดลองทั้ง 3 ตำรับยังไม่สามารถตัดสินได้ว่าดีกว่าตำรับเดิมหรือไม่ จึงได้พัฒนาตำรับยาขับสารพิษเพิ่มอีก 4 ตำรับ ได้แก่ สูตรตำรับ 04 สูตรตำรับ 05 สูตรตำรับ 06 และสูตรตำรับ 07 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับตำรับยาขับสารพิษสูตรเดิม (ตำรับปี พ.ศ. 2558) พบว่า สารสกัดสูตรตำรับ 04 และสูตรตำรับ 05 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันใกล้เคียงกันจึงได้เลือกทั้งสองสูตรตำรับมาศึกษาผลในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด apoptosis เทียบกับสารสูตรเดิม (ตำรับปี พ.ศ. 2558)_Ea รวมถึงได้นำสาร Es 01_V_Ea ซึ่งให้ผลต้านออกซิเดชันดีที่สุดในทั้งสองการทดลองมาศึกษาต่อ ซึ่งพบว่า สารสกัดสูตรตำรับ 04 น่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่าสารสูตรเดิม_Ea (ตำรับปี พ.ศ. 2558) เนื่องจากสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด early apoptosis ได้สูงกว่าสารสูตรเดิม_Ea (ตำรับปี พ.ศ. 2558) โดยสารสูตรเดิม_Ea (ตำรับปี พ.ศ. 2558) รวมถึงสาร Es 01_V_Ea ทำให้เซลล์ตายแบบ late apoptosis เท่านั้น โดยเฉพาะสาร Es 01_V_Ea มีเปอร์เซ็นต์การเกิด late apoptosis ที่สูงมากถึง 90% ซึ่งสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ late apoptosis เปอร์เซ็นต์สูงๆ อาจจะไม่เหมาะในการนำมาใช้เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะเป็นพิษต่อเซลล์สูง ดังนั้นจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (ในหลอดทดลอง) ทางผู้วิจัยคัดเลือกสารสกัดตำรับขับสารพิษ 04 มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลอง

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลองของสารสกัดตำรับขับสารพิษ 04 พบว่า สารสกัดตำรับขับสารพิษ 04 น่าจะมีศักยภาพในการต้านพิษยาฆ่าแมลงได้ โดยสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระซึ่ง

กลไกที่เกี่ยวข้องคือการเพิ่มระดับ antioxidant enzyme ได้แก่ SOD เพิ่มระดับ glutathione และลดการเกิด lipid peroxidation โดยการลด MDA ได้

การศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลองของตำรับยาขับสารพิษ ซึ่งจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (ในหลอดทดลอง) ทางผู้วิจัยคัดเลือกสารสกัดตำรับขับสารพิษ 04 มาทำการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลอง และจากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดตำรับขับสารพิษในแบบที่ 3 (ขนาด 800, 400 และ 120 mg/kg) น่าจะเป็นขนาดสารที่เหมาะสำหรับการนำไปทดสอบความเป็นพิษระยะยาวต่อไป ทั้งนี้สัตว์ทดลองที่เตรียมไว้สำหรับทดสอบความเป็นพิษระยะยาวทุกตัวได้รับการตรวจร่างกายและประเมินสุขภาพ ซึ่งพบว่าหนูแรททุกตัวมีสุขภาพแข็งแรง ไม่พบความผิดปกติใดที่บ่งบอกถึงอาการป่วยหรือมีอาการผิดปกติ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
Highland Research and Development Institute (Public Organization)

Abstract

Sang-Yu extract

Extraction and separation of Sang-Yu samples. The samples of San-Yu (green leaves) was separately dried, reduces their size, pulverized and then extracted with continuous extraction by Soxhlet's apparatus using 95 % ethanol as solvents or reflux with water. The extract was concentrated by a rotary evaporator or spray dryer. The crude extract from the different parts of the plant were obtained and test for their activities. The bark ethanolic extract gave the high potency. Then this sample was selected to determined their bioactive component(s) or chemical fraction by bioassay-guided isolation.

An elevation of intracellular reactive oxygen species (ROS) concentrations induces oxidative stress and inflammation, resulting in cell damage. ROS is also a key factor in hepatic inflammation and fibrosis. Nowadays, many research studies focus on the antioxidant activity of medicinal plants. Since ROS is involved in liver fibrosis, herbs which can reduce intracellular ROS, inhibit cell proliferation, and induce cell apoptosis, might exert some beneficial effects in the treatment of liver fibrosis. In the present study, antioxidant activity of *Litsea martabanica* extract was done by using DPPH assay and superoxide radical assay. The result reveals that antioxidant activities of *L. martabanica* extract include LCBH_02_Ea, LCBE_01_E, LCLH_02, and LCBH_02 were higher than those of the other extracts of *L. martabanica*. From the proliferation assay in live cell lines, these extract induced cell death in a concentration-dependent manner, and the concentrations between 200-800 µg/mL were then chosen for apoptosis assay. The results from the apoptosis assay showed that *L. martabanica* extract LCBH_02 and LCBE_01_E could induce early apoptosis of the liver cells, and their effects were higher than those of the other extracts..

Anti-pesticide effect of *Litsea martabanica* extract include LCBH (bark extract) and LCLH (leave extract) was evaluated the acetylcholinesterase (AChE) activity, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione in serum. It was found that LCLH (leave extract) showed better anti-pesticide effect than LCBH (bark extract), which should be used for further studies.

Detoxifying formula

Detoxifying formulation containing 4 species; *Thunbergia laurifolia* Lindl., *T. coccinea* Wall. ex D.Don, *Morinda angustifolia* Roxb. var. *angustifolia* and *Embelia ribes* Burm.f., were evaluated their quality of raw materials; i.e. microscopic character,

extractive value, ash content, acid-insoluble ash content, loss on drying, followed the Thai Herbal Pharmacopoeia. According to the previous specification data in 2016, the results of this year were consistent with the described criteria. Each of the herbal medicines was extracted with water by decoction and also four kinds of the herbs were mixed as formulation and then extracted by decoction. The water extract was separately concentrated and dried by a spray dryer. As a result, the dried powder of water extract was obtained. The extract was evaluated its biological activities especially antioxidant activities.

The part of the water extract was developed to be a pharmaceutical product that provided consistency of dose, convenience to use, and confidence for consumers. The selected dosage form is the capsule. The water extract was formulated and directly filled in the capsules without transformation of the extract similar to the previous studies on pharmacological activity and toxicology. Therefore, clinical study should use the pharmaceutical product which is representative to the *in vivo*-study for an accuracy of the results.

Antioxidant activity study of detoxification formula extract was done by using DPPH assay and superoxide radical assay. the high antioxidant activities were found in ES 01_V, TL 01_L, ES 01_L, formula 01, and formula 03, respectively. When studying the effect on cultured liver cells by cell proliferation assay and testing for induced cell death by apoptosis assay, the detoxification formula extract include formula 03, ES_01_V and ES_01_L could induce early apoptosis of the liver cells, and their effects were higher than those of the other extracts. As these extracts showed high antioxidant and apoptosis-inducing effects, these extracts might have a potential for using as antifibrotic agents in the treatment of liver fibrosis. However, the detoxifying formula, all 3 formulas were unable to determine whether it was better than the original formula. Therefore, 4 detoxifying formulas including formula 04, formula 05, formula 06, and formula 07, were developed and studied in the comparison with the old detoxifying formula (formula in year 2015), the old detoxifying formula_Ea (formula in year 2015) and and sample Es 01_V_Ea. It was found that formula 04 and formula 05 have similar antioxidant effect, so these two formulas were chosen for studying the effect on apoptosis of cells and compared their effects with the formula (formula in year 2015)_Ea. Moreover, sample Es 01_V_Ea, which has the best antioxidant effect in both experiments, were also studied. It was found that extract formulas 04 might be more effective than the formula (formula in year 2015)_Ea as it could induce early apoptosis of cells greater than the old detoxifying formula_Ea (formula in year 2015) and sample Es 01_V_Ea caused only late apoptosis in cells

with the very high percentage (90%). Compounds which induce the high percentage of late apoptosis are not be suitable to use because they may have high cytotoxicity. Therefore, from the study results of antioxidant effect and apoptotic activity in cultured liver cells (*In vitro*), we chose the formula 04 extract for studying its effect against insecticides in experimental animals.

Anti-pesticide effect of detoxification formula 04 extract, it was found that extracts from detoxifying formula 04 should have the potential to be resistant to insecticides, which can increase the activity of enzymes acetylcholinesterase. It also has an inhibitory effect on free radicals, which the mechanism involved is to increase antioxidant enzyme levels, including SOD, increase glutathione levels and reduce lipid peroxidation by reducing MDA.

Chronic toxicity study (180 days) of detoxifying formulation in experimental animals. The results from the studies of antioxidant activities and the effects on liver cell lines (*In vitro*), we chose the formula 04 extract for studying its effect against insecticides in experimental animals. The result from the effect against insecticide in animals, the detoxifying formula 04 extract Type 3 (800, 400 and 120 mg/kg) seems to be the ideal substance size for the chronic toxicity test. All animals prepared for long-term toxicity tests have been examined and assessed for their health, which found that all rats are healthy No abnormality was found to indicate illness or abnormal symptoms.

Highland Research and Development Institute (Public Organization)