รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2 : การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร

Subproject 2 : The Study of the Phytochemistry and Biological Activity of Herbal Medicines

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและยาพื้นบ้านบนพื้นที่สูง

แผนงานการวิจัยเพื่อต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นและพัฒนานวัตกรรมจากความหลากหลายทางชีวภาพบนพื้นที่สูง

โดย

สีวบูรณ์ สิรีรัฐวงศ์ และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2 : การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร

Subproject 2 : The Study of the Phytochemistry and Biological Activity of Herbal Medicines

โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและยาพื้นบ้านบนพื้นที่สูง

แผนงานการวิจัยเพื่อต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นและพัฒนานวัตกรรมจากความหลากหลายทางชีวภาพบนพื้นที่สูง

คณะผู้วิจัย	สังกัด
รองศาสตราจารย์ ดร.สีวบูรณ์ สิรีรัฐวงศ์	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
รองศาสตราจารย์ ภก.ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภญ.สุนีย์ จันทร์สกาว	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฏฐกานติ์ จิรัณธนัฐ	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริรัตน์ คนสูง	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อาจารย์ ดร.จักรพันธ์ จุลศรีไกวัล	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อาจารย์ ดร.แพรภคภร กุลนาจา	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อาจารย์ ดร.กาญจนา ใจจ้อย	คณะพยาบาลศาสตร์แมคคอร์มิค มหาวิทยาลัยพายัพ

ธันวาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัย (สัญญารับทุนอุดหนุนการวิจัย เลขที่ 7/2561) เพื่อวิจัยและพัฒนาต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นจากพืชสมุนไพรและยาพื้นบ้าน ซึ่งจะเกิดประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สร้างมูลค่าเพิ่มแก่ภูมิปัญญาท้องถิ่น และความหลากหลายทางชีวภาพ แก่ชุมชนต่างๆ บนพื้นที่สูง

คณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จักเป็นประโยชน์ต่องานด้านสมุนไพร งานด้านสาธารณสุข และพื้นที่สูง ตลอดจนประชาชนทั่วไป

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2561

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

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นายสีวบูรณ์ สิรีรัฐวงศ์
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Mr. Seewaboon Sireeratawong
คุณวุฒิ	วท.ด. (เภสัชวิทยา)
ตำแหน่ง (ทางวิชาการ/ราชการ)	รองศาสตราจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร	0-5393-5352/0-5393-5355
E-mail	seewaboon@gmail.com

คณะนักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นายปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Mr. Pramote Tipduangta
คุณวุฒิ	วท.ม. (เภสัชศาสตร์)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ)	รองศาสตราจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร	0-5394-4399 / 0-5322-2741
E-mail	phiptpdn@gmail.com
2. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นางสาวสุนีย์ จันทร์สกาว
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Miss Sunee Chansakaow
คุณวุฒิ	Ph.D. (Pharmaceutical Sciences)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ)	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร	0-5394-4399 / 0-5322-2741
E-mail	chsunee@gmail.com

3. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายจักรพันธ์ จุลศรีไกวัล
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Jakaphun Julsrigival
คุณวุฒิ วท.ด. (เภสัชศาสตร์)
ตำแหน่ง (ทางวิชาการ/ราชการ) อาจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์ 0-5394-4399
โทรสาร 0-5322-2741
e-mail jakaphun@gmail.com

4. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวณัฏฐกานต์ จิรัณธนัฐ
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Natthakarn Chiranthanut
คุณวุฒิ วท.ด. (เภสัชวิทยา)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ) ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์ 0-5393-5352
โทรสาร 0-5393-5355
E-mail cnatthak@gmail.com

5. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางปริรัตน์ คนสูง
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Parirat Khonsung
คุณวุฒิ วท.ด. (เภสัชวิทยา)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ) ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์ 0-5393-5352
โทรสาร 0-5393-5355
E-mail wparirat@hotmail.com

6. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวแพรภคภร กุลนาจา
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Phraepakaporn Kunnaja
คุณวุฒิ วท.ด. (เภสัชวิทยา)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ) อาจารย์
หน่วยงาน แขนงวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์ 0-5394-5082
โทรสาร 0-5394-6942
E-mail phraepakaporn.k@cmu.ac.th

7. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวกาญจนา ใจจ้อย
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Kanjana Jaijoy
คุณวุฒิ วท.ด. (เภสัชวิทยา)
ตำแหน่ง(ทางวิชาการ/ราชการ) อาจารย์
หน่วยงาน คณะพยาบาลศาสตร์แมคคอร์มิค มหาวิทยาลัยพายัพ
ที่อยู่ คณะพยาบาลศาสตร์แมคคอร์มิค มหาวิทยาลัยพายัพ
ต.วัดเกต อ.เมือง จ.เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร 0-5393-5072
E-mail joi.kanjana@gmail.com

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

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

การวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรขับสารพิษ “สังหยู” ที่ผ่านมาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2557-2559 พบว่า สารสกัดสังหยูให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีจากวิธี DPPH และ superoxide radical และยังลดการเกิด cell proliferation นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาทางเภสัชเวทหรือจัดทำข้อกำหนดเฉพาะของวัตถุดิบสมุนไพรในส่วนราก คือ ตรวจเอกลักษณ์ทางจุลภาคของผงยา และค่าคงที่ต่างๆ เช่น ตรวจสอบปริมาณความชื้น ตรวจสอบปริมาณเถ้า ตรวจสอบปริมาณสารสกัดด้วย 95 % Ethanol ตรวจสอบปริมาณสารสกัดด้วยน้ำที่อิ่มตัวคลอโรฟอร์ม และทำการศึกษาแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของเครื่องดื่มสมุนไพร การศึกษาฤทธิ์ต้านยาฆ่าแมลงในสัตว์ทดลองพบว่า มีผลต้านฤทธิ์ต้านยาฆ่าแมลงได้ดี โดยไม่เปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักตับและไต มีผลทำให้ค่าการทำงานของตับกลับสู่ระดับใกล้เคียงกับหนูปกติ อีกทั้งยังมีผลลดระดับสารอนุมูลอิสระ MDA เพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ GSH และทำให้ค่า AChE activity มีระดับใกล้เคียงกับหนูปกติ ผลทางพยาธิวิทยาพบว่ามีผลในการปกป้องตับโดยไม่ทำให้เกิด hepatic necrosis จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน การศึกษาความเป็นพิษระยะยาว 90 วัน (กึ่งเรื้อรัง) พบว่า ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษระยะยาว ทั้งนี้จากผลการศึกษาใน “สังหยู” ที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า มีศักยภาพสำหรับต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรเชิงพาณิชย์ต่อไป

ดังนั้นโครงการวิจัยปีนี้จึงเลือกทำวิจัยสมุนไพรสังหยู เพราะว่าสังหยูเป็นสมุนไพรเดี่ยว การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและการจัดทำมาตรฐานสารสกัดสามารถทำได้รวดเร็ว นอกจากนี้จากการที่คณะผู้วิจัยลงพื้นที่สอบถามหมอพื้นบ้าน พบว่าสังหยูสามารถรับประทานเพื่อต้านพิษจากยาฆ่าแมลงได้ทั้งปี จากการประเมินความเป็นไปได้ของผลิตภัณฑ์ พบว่าสมุนไพรขับสารพิษสังหยู และตำรับยาขับสารพิษ มีโอกาสทางการค้ามากกว่าสมุนไพรกลุ่มบำรุงกำลัง เนื่องจากสามารถใช้ได้ทั่วไป และมีประโยชน์กับประชาชนมากกว่า ดังนั้นโครงการวิจัยปีนี้มุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของสังหยูเพื่อหาสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัด (fraction) เพื่อใช้ประโยชน์ในการจดสิทธิบัตร ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ และหาส่วนของพืช (ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้) เพื่อใช้ทดแทนราก ซึ่งจะทำให้สังหยูสามารถเข้าสู่กระบวนการเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต ส่วนสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของสังหยูนำมาศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro) รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งการวิจัยดังกล่าวเป็นไปตามวิธีการและข้อกำหนดในการเตรียมผลิตภัณฑ์ขึ้นทะเบียนในอนาคต รายละเอียดคือ

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (ครั้งที่ 1)

ตัวอย่างสังหยูทั้งสองชนิด (ชนิดใบเขียวและชนิดใบแดง) ในส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก เปลือก เนื้อไม้หรือแก่น กิ่ง ใบ นำมาลดขนาด อบให้แห้ง บดเป็นผง นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (เฮกเซน เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ และน้ำตามวิธีการใช้ตามภูมิปัญญา) ด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องหรือวิธีการต้ม จากนั้นทำให้แห้ง สารสกัดที่ได้มี 15 ตัวอย่าง นำไปทดสอบการทดสอบฤทธิ์

โดยส่วนรากขนาดใหญ่ (No.3) ของสังหยูใบเขียว นำไปสกัดแยกสารสำคัญหรือแยกด้วย partition technique ซึ่งเป็นข้อมูลการแยกส่วนเบื้องต้น

2. การศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro) (ครั้งที่ 1)

การทดสอบฤทธิ์จากสารสกัดหยาบและสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยูรวม 15 ตัวอย่าง นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น เพื่อคัดกรองเอาสารสกัดที่มีฤทธิ์ดี โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน พบว่า การทดลอง DPPH radical scavenging assay สารสกัดสังหยูใบเขียวที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction สารสกัดส่วนที่ 10 สังหยูใบเขียว (แก่น) สารสกัดส่วนที่ 7 สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่) และสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction ตามลำดับ สารสกัดสังหยูใบแดงที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ สารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) สารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) สารสกัดที่ 16 สังหยูใบแดง (แก่น) และสารสกัดที่ 12 สังหยูใบแดง (รากใหญ่) ตามลำดับ การทดลอง superoxide radical scavenging assay ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยู พบว่าสารสกัดสังหยูใบเขียวที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction สารสกัดส่วนที่ 11 สังหยูใบเขียว (ใบ) สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction และสารสกัดส่วนที่ 7 สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่) ตามลำดับ ส่วนในสารสกัด สังหยูใบแดงที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) สารสกัดที่ 15สังหยูใบแดง (เปลือก) สารสกัดที่ 16 สังหยูใบแดง (แก่น) สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) และสารสกัดที่ 17 สังหยูใบแดง (ใบ) ตามลำดับ

นำมาทำการทดลองต่อใน cell proliferation assay และ apoptosis assay ใน LX-2 cell line ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ให้ผลการเกิดทั้ง early apoptosis และ late apoptosis ใน LX-2 cells โดดเด่นกว่าสารสกัดอื่น ส่วนสารสกัดที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction และสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ที่ความเข้มข้นขนาดสูง 800 µg/mL เป็นส่วนที่น่าสนใจ เนื่องจากทำให้เซลล์เกิดการตายทั้งแบบ early apoptosis และ late apoptosis ได้เช่นเดียวกับสารสกัดส่วนที่ 9 และ 15

ดังนั้น สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) สารสกัดที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction และสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ควรจะนำมาแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและนำส่วนสกัด (fraction) ที่ได้ไปศึกษาต่อเพื่อหาส่วนสกัดสังหยูที่มีฤทธิ์ apoptosis สูงที่สุดสำหรับการทดลองในสัตว์ทดลองระยะต่อไป

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (ครั้งที่ 2)

จากผลการศึกษาเบื้องต้น ส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดีคือ สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) แต่จากการใช้ในชุมชน ส่วนรากปมและใบ เป็นส่วนที่มีการนำไปใช้ จึงนำมาศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการสกัดแยกด้วย partition technique โดยใช้ความแตกต่างของขั้วของตัวทำละลาย สารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ จึงนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Thin layer

chromatography เป็นการศึกษาข้อมูลทางเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดี ซึ่งการศึกษาเพื่อหาสารองค์ประกอบสำคัญจะทำการแยกสารด้วยการติดตามฤทธิ์ในการศึกษาต่อ

ซึ่งขณะนี้ยังไม่ทราบชนิดสาร จึงเป็นเพียงการจัดทำ TLC chromatogram เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีของแต่ละส่วนเท่านั้น ในการตรวจสอบใช้ UV 254, 366 nm และฉีดพ่นด้วยน้ำยาฉีดพ่น ซึ่งพบว่า ส่วนสกัดมีรูปแบบองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

4. การศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro) (ครั้งที่ 2)

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น โดยการทดลอง DPPH assay พบว่า พบว่าสารสกัดทุกส่วนมีค่า IC_{50} ที่ต่างจากสาร gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามสารสกัดส่วน 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารส่วน 5.2 สังหยูเขียว (รากปม) Butanol fraction สารส่วน 11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction สารส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีในการทดลองนี้ สารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีรองลงมาจากสารสกัดส่วน 5.1, 5.2, 11.1 และ 11.2 โดยสารสกัดส่วน 11.3 นี้มีค่า IC_{50} 68.8± 10.9 µg/mL ส่วนสารสกัด 5.3 สังหยูเขียว (รากปม) Water fraction ให้ผลไม่ดีเท่าส่วนอื่น โดยมีค่า IC_{50} 398 µg/mL การทดลอง Superoxide radical assay พบว่า สารส่วน 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารส่วน 5.2 สังหยูเขียว (รากปม) Butanol fraction สารส่วน 11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction สารส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีในการทดลองนี้ โดยให้ค่า IC_{50} ไม่แตกต่างจาก gallic acid ส่วนสารสกัด 5.3 สังหยูเขียว (รากปม) Water fraction และสารสกัด 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction ให้ค่า IC_{50} 806.4 และ 80.6 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ต่างจาก gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองที่ได้สารสกัดส่วนที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อคือ fraction 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารสกัด 5.2 สังหยูเขียว(รากปม) Butanol fraction สารสกัด 11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction สารสกัด 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction แต่เนื่องจากใน traditional use ของพืชนี้มีการใช้ใบจึงได้เลือกสารสกัดสังหยูส่วน 11 สังหยูเขียว(ใบ) มาทดลองต่อ โดยสารที่ได้นำมาทดลองต่อได้แก่ สารสกัด No. 11.1 Ethyl acetate fraction สารสกัด 11.2 Butanol fraction และ สารสกัด 11.3 water fraction

ทำการทดลองต่อใน cell proliferation assay และ apoptosis assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า fraction ที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อได้แก่สารสกัดส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction และสารสกัดส่วน11.3 สังหยูเขียว(ใบ) water fraction เนื่องจากมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด early apoptosis และ late apoptosis แต่มีส่วน early apoptosis โดดเด่นและมีฤทธิ์ต้านอ๊อกซิเดชั่นที่ดี

5. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (ครั้งที่ 3)

จากการศึกษาข้างต้น พบว่าส่วนเปลือกของสังหยูใบเขียวให้ผลการทดสอบที่ดี จึงทำการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งยังอยู่ระหว่างการดำเนินการ เนื่องจากดำเนินการต่อเนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น

สำหรับส่วนสกัดจากรากปมและใบ ได้นำไปศึกษารูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีด้วย IR เพื่อเป็นข้อมูลในด้านเอกลักษณ์ทางเคมี ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบ

องค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันของแต่ละส่วนสกัด ซึ่งข้อมูลของ IR fingerprint สามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบในการศึกษาความคงตัวต่อไป

แต่อย่างไรก็ตาม ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ควรคำนึงถึงวัตถุดิบที่เพียงพอ ดังนั้นจึงนำสารสกัดจากส่วนใบมาทดสอบฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro) พบว่าให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดี จึงนำใบมาศึกษาฤทธิ์ควบคู่กับรากและเปลือกต่อไป เพื่อให้สามารถใช้ทดแทนรากสำหรับเข้าสู่กระบวนการเชิงพาณิชย์อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคตได้

6. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษระยะยาว (เรื้อรัง)

การป้อนสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวทางปากขนาดต่างๆ 3 แบบคือ แบบที่ 1 ขนาด 150 และ 50 mg/kg แบบที่ 2 ขนาด 750 และ 250 mg/kg แบบที่ 3 ขนาด 3750 และ 1250 mg/kg เป็นเวลา 180 วัน ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษระยะยาว

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

Executive Summary

From the previous report; 2014-2016, Sang-Yu revealed potent antioxidant activities with DPPH assay, superoxide radical scavenging assay and gave anti-cell proliferation effect. Pharmacognostic study and physicochemical properties; microscopic character, loss on drying, total ash, extractive values, of the crude drugs (root) were studied. And then, herbal beverages of Sang-Yu were developed. Detoxicification of the pesticides in an animal model was determined. The general appearances of the internal organs of rats receiving Sang-Yu extract showed normal structure, size, texture, and color when compared with those of the control group. Moreover, Sang-Yu extract gave the decreasing of MDA and increasing of GSH. The oral administration of Sang-Yu extract caused neither sign of toxicity nor mortality of the rats in the test group. Therefore, Sang-Yu maybe one of the potential herb for development of commercial herbal product to detoxify the pesticides in human body.

Sang-Yu was selected for cumulative study in this fiscal year 2018. Quality control of raw material and finished product of a single herb was not complicated compare with herbal formula. Furthermore, one of the traditional uses of Sang-Yu was to detoxify the toxic substance especially from pesticides. Sang-Yu has safety information in traditional uses. Evaluation of commercial product development of this plant was performed and estimated to has a possibility in the health affairs. Because of the crisis health problem of pesticide contamination in foods and environment led to finding any detoxify herbal product. In this present year, the phytochemical study followed bioassay-guided isolation was proceeded. The information of phytochemicals, pharmacological activities and also toxicity are needed for product license application or patent application. Moreover, a substituted organ of Sang-Yu was also important because the roots of plants were quite difficult to produce in large volume for an industry in the future. The fractionations of Sang-Yu extract was evaluated their antioxidant activities and cell proliferation assay, and apoptosis assay. Chronic toxicity was also studied in this present year. The methodology of all studies was followed FDA guideline for product license application in the future. The detail of this year research as follows.

1. Study of phytochemicals in the first year (1st report)

Both Sang-Yu (green leaves and red leaves) in each part; i.e. root, bark, wood, leaves, was separately reduced their size, dried and pulverized into powder. The powder of each part was extracted by continuous extraction using *n*-hexane, ethyl

acetate and alcohol as solvents. Water extraction was followed indigenous knowledge. Fifteen samples of the solvent extract were obtained and tested their activities. Large size of the roots (No.3) of green Sang-Yu were also isolated by partition technique for preliminary isolation.

2. Studies of antioxidant and apoptosis properties of Sang-Yu extracts (1st phase)

The Sang-Yu crude extract and the various parts of Sang-Yu fractions, a total of 15 samples, were tested for antioxidant properties. The antioxidant activities of the extracts were determined using DPPH radical scavenging assay and superoxide radical scavenging assay. Gallic acid was used as the positive control in these experiments. The results of DPPH assay revealed that the top five of the Sang-Yu Green leaf extracts that provided good antioxidant activities were fraction 9 Sang-Yu Green leaf (bark), fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, fraction 10 Sang-Yu Green leaf (heartwood), fraction 7 Sang-Yu Green leaf (large branch), and fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction, respectively. The top five of Sang-Yu Red leaf extracts that exhibited good antioxidant activity were fraction 15 Sang-Yu Red leaf (bark), fraction 13 Sang-Yu Red leaf (large branch), fraction 14 Sang-Yu Red leaf (small branch), fraction 16 Sang-Yu Red leaf (heartwood), and fraction 12 Sang-Yu Red leaf (large root), respectively. The results of the superoxide radical scavenging assay showed that the top five of Sang-Yu Green leaf extract were fraction 9 Sang-Yu Green leaf (bark), fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction, fraction 11 Sang-Yu Green leaf (leave) fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, and fraction 7 Sang-Yu Green leaf (large branch), respectively. For Sang-Yu leaf extract, the top five of the extracts that exhibited high antioxidant activities were fraction 13 Sang-Yu Red leaf (large branch), fraction 15 Sang-Yu Green leaf (bark), fraction 16 Sang-Yu Red leaf (heartwood), fraction 14 Sang-Yu Red leaf (small branch), and fraction 17 Sang-Yu Red leaf (leave), respectively.

The extracts which showed high antioxidant properties were properly selected for the cell proliferation assay and apoptosis assay in LX-2 cell line. The results showed that fraction 9 Sang-Yu Green leaf (bark) and fraction 15 Sang-Yu Red leaf (bark) could induce apoptosis of LX-2 cells. These fractions exhibited outstanding results by inducing both of early apoptosis and late apoptosis in these cells. The other good samples were fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction and fraction 11.3 Sang-Yu Green leaf (leave) Water fraction at the concentration of 800 µg/mL, which could induce apoptosis similarly to fraction 9 and fraction 15.

Therefore, fraction 9 Sang-Yu Green leaf (bark), fraction 15 Sang-Yu Red leaf (bark), fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction should be further separated by the column chromatography. The fraction with the highest apoptosis activity was selected for further study in animal experiments.

3. Study of phytochemicals in the first year (2nd report)

For the preliminary study, the most active fraction was the extract of bark of green Sang-Yu (fraction 9) and red Sang-Yu (fraction 15) whereas the root and leaves are the part uses in the indigenous knowledge. Therefore, the roots and leaves were additional studied with isolation work by bioassay-guided isolation)

At present, the chemical constituents are continuing study. TLC Chromatograms were used as a tool for chemical comparison of each part of Sang-Yu. The detection of TLC were UV 254, 366 nm and chemical spraying reagents. The results found that each sample showed different chemical profiles.

4. Studies of antioxidant and apoptosis properties of Sang-Yu extracts (2nd phase)

The results from DPPH assay revealed that the IC_{50} of all fractions significantly differ from that of gallic acid. However, fraction 5.1 Sang-Yu Green leaf (root knot) Ethyl acetate fraction, fraction 5.2 Sang-Yu Green leaf (root knot) Butanol fraction, fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, and fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction, exhibited the high antioxidant properties in DPPH assay. The lower antioxidant activities were observed in fraction 11.3 Sang-Yu Green leaf (leave) Water fraction with the IC_{50} of 68.8± 10.9 µg/mL. Fraction 5.3 Sang-Yu Green leaf (root knot) Water fraction displayed the lowest antioxidant activity in DPPH assay with the IC_{50} of 398 µg/mL. In the superoxide radical assay, the high antioxidant activities were seen in the fraction 5.1 Sang-Yu Green leaf (root knot) Ethyl acetate fraction, fraction 5.2 Sang-Yu Green leaf (root knot) Butanol fraction, fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, and fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction, respectively. The IC_{50} of these fractions were not different from that of gallic acid. However, the IC_{50} of fraction 5.3 Sang-Yu Green leaf (root knot) Water fraction and fraction 11.3 Sang-Yu Green leaf (leave) were 806.4 and 80.6 µg/mL, respectively, which were significantly different from that of gallic acid.

Based on the obtained results of the antioxidant properties, the attractive fractions for further studied were fraction 5.1 Sang-Yu Green leaf (root knot) Ethyl acetate fraction, fraction 5.2 Sangyu Green leaf (root knot) Butanol fraction, fraction 11.1 Sang-Yu Green leaf (leave) Ethyl acetate fraction, and fraction 11.2 Sang-Yu

Green leaf (leave) Butanol fraction. However, this plant is traditionally used by using its leaves. Therefore, fraction 11.1 Ethyl acetate fraction, the fraction 11.2 Butanol fraction, and the fraction 11.3 water fraction were also selected for the further study.

The next experiments were conducted by using the cell proliferation assay and apoptosis assay. The results revealed that fraction 11.2 Sang-Yu Green leaf (leave) Butanol fraction and fraction 11.3 Sang-Yu Green leaf (leave) Water fraction induced both early and late apoptosis in LX-2 cells. These two fractions showed outstanding properties of early apoptosis-inducing and antioxidant effects.

5. Study of phytochemicals in the first year (3rd report)

From the previous study, the bark of green Sang-Yu found the potent activity. The isolation is continuing study with bioassay-guided isolation. The extract of its roots and leaves was determined IR spectrum to used as one of a tool for chemical stability study.

However, the development of commercial products should consider adequate raw materials. Therefore, the leaf extract was tested for oxidative activity and the effect on the liver cell culture (in vitro). It was found that it has anti-oxidation effect. Thus, the leaves brought to study the effect along with the roots and the bark. In order to be able to replace the roots for effective commercialization in the future.

6. Chronic toxicity study of *Pseuduvaria rugosa* (Blume) Merr extract

Three series dose of *Pseuduvaria rugosa* (Blume) Merr (150 mg/kg and 50 mg/kg; 750 mg/kg and 250 mg/kg; and 3750 mg/kg and 1250 mg/kg) had no toxicity in the long-term.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	จ
Executive Summary	ฌ
สารบัญ	ฐ
สารบัญตาราง	ฒ
สารบัญภาพ	ณ
บทคัดย่อ	ต
Abstract	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	9
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	9
3.2 วิธีการวิจัย	10
3.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลงานวิจัย	16
4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1	16
4.2 ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro)	29
4.3 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (รอบที่ 2)	43
4.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (รอบ 2)	52
4.5 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (รอบที่ 3)	57
4.5 ศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลองของสารสกัดสังหยูใบเขียว	62
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย	75
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	79

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	80
ภาคผนวก	83
ตารางสรุปเปรียบเทียบแผนงานวิจัยกับผลงานวิจัย	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรสังหยู	17
2	กระบวนการเตรียมตัวอย่าง-สารสกัดสมุนไพรสังหยู	18
3	ผลการเตรียมสารสกัดน้ำของสังหยู	24
4	ผลการสกัดสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ด้วยวิธี Soxhlet's extraction	25
5	ผลการสกัดสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ด้วยวิธี Reflux	25
6	ผลการสารสกัดหยาบสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ	27
7	ตัวอย่างของสารสกัดสังหยูที่ส่งทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	29
8	ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant activity ของสังหยู รอบ 1	30
9.	ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant activity ของสังหยู รอบ 2	53
10	น้ำหนักตัวของหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบขียว	64
10	น้ำหนักอวัยวะ (g) ของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	65
11	น้ำหนักอวัยวะ (g) ของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	66
12	ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	67
13	ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	68
14	ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	69
15	ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	70
16	ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	71
17	ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากสังหยูใบเขียว	72

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะต้นและส่วนต่างๆ ของสังหยู	4
2 แผนภูมิแสดงการแยกสารโดยอาศัย Bioassay guided isolation	6
3 การเตรียมสารสกัดน้ำของตัวอย่างสังหยู	22
4 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการต้ม	23
5 การสารสกัดหยาบสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ	28
6 ผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 24 h	32
7 ผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 48 h	33
8 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	34
9 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	35
10 แสดงผลของสารสกัดสังหยู Crude extract ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	36
11 แสดงผลของสารสกัดสังหยู Ethanol extract ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	37
12 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูเขียว (เปลือก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	37
13 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	38
14 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	38
15 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	39
16 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	39
17 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	40
18 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis	40
19 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ early apoptosis	41
20 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ late apoptosis	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบแดงส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ early apoptosis	42
22 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบแดงส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ late apoptosis	42
23 แสดงผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 24h (รอบ 2)	54
24 แสดงผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 48h (รอบ 2)	54
25 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)	55
26 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)	55
27 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)	56
28 แสดงผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)	56
29 Histopathology ของ portal triad ของตับในหนูกลุ่มควบคุม และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว	73
30 Histopathology ของ renal corpuscles (glomerulus and Bowman's capsule) ของหนูกลุ่มควบคุม และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว	74

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยปีนี้เลือกทำวิจัยสมุนไพรสังหยู เพราะว่าสังหยูเป็นสมุนไพรเดี่ยว การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและการจัดทำมาตรฐานสารสกัดสามารถทำได้รวดเร็ว นอกจากนี้จากการที่คณะผู้วิจัยลงพื้นที่สอบถามหมอพื้นบ้าน พบว่าสังหยูสามารถรับประทานเพื่อต้านพิษจากยาฆ่าแมลงได้ทั้งปี จากการประเมินความเป็นไปได้ของผลิตภัณฑ์ พบว่าสมุนไพรขับสารพิษสังหยู และตำรับยาขับสารพิษ มีโอกาสทางการค้ามากกว่าสมุนไพรกลุ่มบำรุงกำลัง เนื่องจากสามารถใช้ได้ทั่วไป และมีประโยชน์กับประชาชนมากกว่า ดังนั้นโครงการวิจัยปีนี้มุ่งเน้นศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของสังหยู เพื่อหาสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัด (fraction) เพื่อใช้ประโยชน์ในการจดสิทธิบัตร ควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ และหาส่วนของพืช (ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็กเปลือก แก่นหรือเนื้อไม้) เพื่อใช้ทดแทนราก ซึ่งจะทำให้สังหยูสามารถเข้าสู่กระบวนการเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต ส่วนสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของสังหยูนำมาศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro) รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลอง ซึ่งการวิจัยดังกล่าวเป็นไปตามวิธีการและข้อกำหนดในการเตรียมผลิตภัณฑ์ขึ้นทะเบียนในอนาคต

ตัวอย่างสังหยูทั้งสองชนิดในส่วนต่าง ๆ (สังหยูใบเขียวและสังหยูใบแดง) ได้แก่ ราก ใบ ลำต้นหรือกิ่งขนาดใหญ่ นำมาลดขนาด อบให้แห้ง บดเป็นผง จากนั้นนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (เฮกเซน เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ และน้ำ) ด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องหรือวิธีการต้ม จากนั้นทำให้แห้ง สารสกัดที่ได้มี 15 ตัวอย่าง นำไปทดสอบการทดสอบฤทธิ์ สารสกัดหยาบและสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสังหยูรวม 15 ตัวอย่าง นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อคัดกรองเอาสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีมาทำการทดลองต่อใน cell proliferation assay และ apoptosis assay ใน LX-2 cell line ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดหมายเลข 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดหมายเลข 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ให้ผลการเกิดทั้ง early apoptosis และ late apoptosis ใน LX-2 cells ดังนั้นในการศึกษาต่อไป สารสกัดหมายเลข 9 และ 15 จะนำมาแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและนำส่วนสกัดแยก (fraction) ที่ได้ไปศึกษาต่อเพื่อหา fraction ที่มีฤทธิ์ apoptosis สูงที่สุดสำหรับการทดลองในสัตว์ทดลองต่อไป นอกจากนั้น fraction ที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อได้แก่ สารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) water fraction เนื่องจากมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด early apoptosis และ late apoptosis แต่มีส่วน early apoptosis โดดเด่นและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดี

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 ส่วนรากปมและใบของสังหยูใบเขียว ขณะนี้ยังไม่ทราบชนิดสาร เป็นเพียงการจัดทำ TLC chromatogram และศึกษารูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีด้วย IR เพื่อเป็นข้อมูลในด้านเอกลักษณ์ทางเคมี ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันของแต่ละส่วนสกัด และส่วนเปลือกของสังหยูใบเขียว จะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งยังอยู่ระหว่างการดำเนินการต่อเนื่องจากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น

ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง ทำการป้อนสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวทางปากขนาดต่างๆ 3 แบบคือ แบบที่ 1 ขนาด 150 และ 50 mg/kg แบบที่ 2 ขนาด 750 และ 250 mg/kg แบบที่ 3 ขนาด 3750 และ 1250 mg/kg เป็นเวลา 180 วัน ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษระยะยาว

Abstract

In this present year, the phytochemical study followed bioassay-guided isolation was proceeded. The information of phytochemicals, pharmacological activities and also toxicity are needed for product license application or patent application. Moreover, a substituted organ of Sang-Yu was also important because the roots of plants were quite difficult to produce in large volume for an industry in the future. The fractionations of Sang-Yu extract was evaluated their antioxidant activities and cell proliferation assay, and apoptosis assay. Chronic toxicity was also studied in this present year. The methodology of all studies was followed FDA guideline for product license application in the future.

Each sample of Sang-Yu was dried, reduces their size, pulverized and then extracted with continuous extraction by Soxhlet's apparatus using *n*-hexane, ethyl acetate, and 95 % ethanol as solvents or reflux with water. The extract was concentrated by a rotary evaporator or spray dryer. Fifteen samples of the crude extract from the different parts of the plant were obtained and test for their activities. Fifteen samples of the crude extract from the different parts of the plant were screened with oxidation assays and samples with good activities were used then tested with cell proliferation assay and apoptosis assay in LX-2 cell line. Finally, we found that the extracts No. 9 green Sang-Yu (bark) and No. 15 red Sang-Yu (bark) increased early and late apoptosis in LX-2 cells. Therefore, the extracts No. 9 and No. 15 will be isolated by chromatographic techniques. The extracts No. 9 and No. 15 will be tested for choosing the fraction with the highest apoptotic activity, which will be used in animal study. In addition, the interesting fraction of Sang-Yu to be further studied is the extract 11.3 Sang-Yu Green (leaf) water fraction due to the induction of early apoptosis and late apoptosis, especialy the early apoptosis and effective anti-oxidation effect.

From the previous study, the bark of green Sang-Yu found the potent activity. The isolation is continuing study with bioassay-guided isolation. The extract of its roots and leaves was determined IR spectrum and TLC chromatograms to used as one of a tool for chemical stability study. As results, the chromatograms and spectral data showed that each part of both Sang-Yu revealed different chemical profiles with the quantity of the chemical compositions.

The chronic toxicity was also evaluated. The oral administration of three series dose of *Pseuduvaria rugosa* (Blume) Merr (150 mg/kg and 50 mg/kg; 750 mg/kg and 250 mg/kg; and 3750 mg/kg and 1250 mg/kg) for 180 days had no toxicity in the long-term.