แบบสรุปย่อการวิจัย

1.รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านการอักเสบจากงิ้ว

Chemical Constituents and Anti-inflammatory Activities from *Bombax anceps.* Pierre

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

1. นางสาว ประภาพร ภูริปัญญาคุณ (หัวหน้าโครงการวิจัย)

39/1 สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม แขวงจันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร โทร. 02-9426900-99 ต่อ 5167 – 5168 มือถือ 086-0935969 โทรสาร 025417877

2. นางอุษณีย์ ใบบัว (ผู้ร่วมวิจัย)

39/1 สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม แขวงจันทรเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร โทร. 02-9426900-99 ต่อ 5167 – 5168 โทรสาร 025417877

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณพ.ศ.2551 งบประมาณที่ได้รับ500,000บาท

ระยะเวลาทำวิจัยตั้งแต่ 17 กันยายน 2551 ถึง 17 กันยายน 2552

2.ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

งานวิจัยนี้เกิดจากการได้เห็นผู้คนจำนวนมากไปเก็บงิ้วป่าดอกขาวในจังหวัดกาญจนบุรีมาต้มกิน เพราะมีคนเล่าว่าเมื่อนำไปต้มกินจะช่วยรักษาอาการอักเสบจากการบวมได้ดี ความเชื่อในเรื่องสรรพคุณของดอกงิ้วได้แพร่กระจายไปทั่วเพราะมีผู้ปฏิบัติแล้วได้ผล ปัจจุบันมีการนำดอกงิ้วไปชงเป็นน้ำดื่มทุกวันเป็นยาอายุวัฒนะ แต่สรรพคุณที่พิเศษของดอกงิ้วในเรื่องฤทธิ์ต้านการอักเสบนี้ ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลวิจัยทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของดอกงิ้วและฤทธิ์ต้านการอักเสบของดอกงิ้วจากต้นงิ้วนี้ ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ว่าดอกงิ้วนี้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้จริงหรือไม่ และมากน้อยเพียงใด มีความเป็นไปได้เพียงใดที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไปในอนาคต และสามารถนำไปบริโภคต่อเป็นระยะเวลายาวนาน เพื่อเสริมสุขภาพตนเองได้หรือไม่ หากพบว่าดอกงิ้วนี้สามารถลดการอักเสบได้จริงก็จะเป็นทางเลือกหนึ่ง ซึ่งนอกจากจะช่วยให้ประชาชนคนไทยมี

สุขภาพดีแล้ว ยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาตนเอง รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายของประเทศในการนำเข้ายาจากต่างประเทศอีกด้วย

3. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาคุณค่าทางโภชนาการของดอกงิ้วและใบงิ้ว
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกงิ้วและใบงิ้ว
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกงิ้วและใบงิ้ว
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบจากดอกงิ้วและใบงิ้ว

4. ระเบียบวิธีการวิจัย(โดยย่อ)

1. ใช้ในส่วนที่เป็นดอกและใบของต้นงิ้วป่าดอกขาวในจังหวัดกาญจนบุรี โดยเก็บดอกในเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ ใบเก็บในเดือนเมษายน-พฤษภาคม

2. หาคุณค่าทางโภชนาการของดอกงิ้วและใบงิ้วตากแห้งด้วยวิธีดัดแปลงจาก A.O.A.C.1999(และทดสอบความปั่นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดดอกงิ้วและใบงิ้ว)

3.หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วและใบงิ้วด้วยเทคนิคDPPH assay ใช้สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเป็นBHA

4.หาองค์ประกอบทางเคมีของดอกงิ้วด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และGC-MS

5.หาฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยดูความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ COX-2 ,iNOS (inducible nitric oxide synthase) และในหนูขาว ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

(1) ใช้ชุดเครื่องมือ Eliza kit สำหรับทดสอบ COX – 2 (cyclooxygenase- 2)

โดยนำสารสกัดมาทำการชั่งน้ำหนักและละลายใน DMSO ให้ได้ stock ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วใช้ stock เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบต่อไป โดยปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ จะทำที่ความเข้มข้น 1, 10 ,50 และ 100 μg/ml สารละลายที่ใช้ปรับความเข้มข้นคือ reaction ของชุดทดสอบ

ในการทดสอบส่วนแรก COX enzyme จะเปลี่ยน substrate arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ prostaglandin ที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดย protocol ระบุว่าต้องทำให้อยู่ในระดับช่วง C2 หรือ 1:2000 (dilution of the original sample) สำหรับค่า OD (optical density) ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 412 nm

(2)ใช้ชุดเครื่องมือ Eliza kit สำหรับทดสอบ iNOS

หลังจากที่เลี้ยงเซลล์แมโครฟาจน์ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยLPS จนทำให้เซลล์แมคโครฟาจน์มีการแสดงออกของเอนไซม์ iNOSในเซลล์เพิ่มขึ้น(เซลล์ควบคุม) เมื่อมีการเติมสารสกัดใดๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน(แมโครฟาจน์ + LPS+ extracts) สารสกัดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบโดยการกดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ก็จะทำให้เซลล์แมโครฟาจน์ไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์iNOS หรือแสดงน้อยกว่าปกตินั่นเอง จากนั้นจึงนำเซลล์ทั้งหมดซึ่งมีเซลล์ควบคุม

และเซลล์ที่มีสารสกัด มาสกัดแยก iNOS ออกมา แล้วนำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ iNOS ที่ได้ เพื่อนำมาตรวจต่อไปในEliza ตามวิธีการที่กำหนดไว้ในคู่มือของเครื่อง Eliza kit

(3)ใช้ Model Rat Paw Edema

โดยใช้สัตว์ทดลอง หนูขาวเพศผู้พันธุ์ wistar น้ำหนัก 180 – 200 กรัม จำนวน 30 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 $\pm$ 1 °ซ จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ เตรียมสารแขวนลอยพื้นฐาน จาก น้ำกลั่น, tragacanth และน้ำมันพืช ส่วนสารแขวนลอยตัวอย่างทดสอบและสารแขวนลอยยามาตรฐาน (standard drug) เตรียมแยกกัน ในสารแขวนลอยพื้นฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียม Carrageenan ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูในรูปสารละลาย โดยละลาย Carrageenan ใน 0.9% Normal saline ที่ขนาด 1% น้ำหนัก/ปริมาตร

5. ผลการวิจัย

1. คุณค่าทางโภชนาการของงิ้วดอกขาวแห้งประกอบด้วย ความชื้น 17.60% เถ้า 4.57 % โปรตีน 6.46 % ไขมัน 9.32 % เยื่อใย 22.60 % และคาร์โบไฮเดรต 39.45 % ในใบงิ้วแห้งประกอบด้วย ความชื้น 10.53% เถ้า 16.29 % โปรตีน 9.20 % ไขมัน 1.96 % เยื่อใย 28.60 % และคาร์โบไฮเดรต 33.42 % เมื่อเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการกับดอกงิ้วแดง(กองโภชนาการ 2535) ระบุว่ามีความชื้น 17.7% เถ้า 4.9% โปรตีน 6.6% ไขมัน 1.4% เยื่อใย 14.9% และคาร์โบไฮเดรต 69.4% จะเห็นว่างิ้วดอกขาวมีคุณค่าทางโภชนาการเช่นเดียวกับดอกงิ้วแดง แต่มีปริมาณเยื่อใยมากกว่า

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาวและใบงิ้วดอกขาว รายงานเป็นค่า IC_{50} โดยใช้DPPH assay เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานBHA พบว่าสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาว มีค่า IC_{50}เท่ากับ 0.046 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วดอกขาว มีค่าIC_{50} เท่ากับ0.111มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่สารละลายมาตรฐาน BHA มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.016 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จึงสรุปได้ว่าสารสกัดของดอกงิ้วและใบงิ้วมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาวกับงิ้วดอกขาวตากแห้ง ซึ่งมีค่าIC_{50}เท่ากับ 1.825 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเห็นว่าสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่างิ้วดอกขาวตากแห้ง

3. องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดหยาบเอทิลแอซีเตตของดอกงิ้ว ที่สกัดแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ และใช้เทคนิคทาง spectroscopy พบสาร 6 ชนิด คือ

2- butoxyethylacetate(991มิลลิกรัม ซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็กNCI-HI87) , 7 – hydroxy – 6 – methoxycoumarin(scopoletin 5มิลลิกรัม) ,4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid1.7 มิลลิกรัม), 4–hydroxybenzoic acid(2.9 มิลลิกรัม) , 4–hydroxy–3 ,5 – dimethoxybenzaldehyde (Syringaldehyde 59.7มิลลิกรัม)และ(3*E*)-2,6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol (16 มิลลิกรัม) ส่วนกากดอกงิ้วที่เหลือหลังจากสกัดด้วยเอทิลแอซีเตตแล้ว นำมาสกัดต่อด้วยเมทานอลได้สารสกัดเมทานอลของดอกงิ้ว แล้ววิเคราะห์ด้วยGC-MS พบสาร 19 ชนิด สารที่มีปริมาณสูงสุด 2อันดับแรกคือ cycacin และ quinic acid (32.16 และ 14.86 %) และเมื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านความเป็นพิษต่อเซลล์กับ Vero cells(African green monkey kidney)แล้วพบว่าสารสกัดเมทานอลของดอกงิ้วไม่แสดงความเป็นพิษ ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเมทานอลของใบงิ้ววิเคราะห์ด้วย GC–MS พบสาร 7 ชนิด โดยพบสารปริมาณสูงสุดเรียงตามลำดับคือ phytol 54.09 % palmitic acid 18.39% และquinic acid 13.14 % และเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วกับ Vero cells(African green monkey kidney)แล้วพบว่าสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วไม่แสดงความเป็นพิษ

4. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ได้ใช้วิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดดอกงิ้วและใบงิ้ว 3 เทคนิคคือ ทดสอบฤทธิ์สารสกัดของดอกงิ้วและสารสกัดของใบงิ้วในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Cyclooxygenease 2 (COX – 2) ยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมโครฟาจ (macrophage) ที่กระตุ้นจาก U 937 ด้วย PMA และ LPS และฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยทดสอบกับสัตว์ทดลองด้วย Model Rat Paw Edima ได้ข้อสรุปดังนี้คือ

ก. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX-2 ของสารสกัดเมทานอลของดอกงิ้วที่ความเข้มข้น 100μg/mL พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์COX – 2 ได้ โดยมีค่า % inhibition เท่ากับ 23 % และมีค่า IC_{50} > 100 μg/ml ส่วนสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วดอกขาวที่ความเข้มข้น 100 μg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ COX – 2 ได้โดยมีค่า % inhibition เท่ากับ 4 %

ข. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOSในการกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ ในเซลล์แมโครฟาจ โดยหน่วยของ iNOS แสดงเป็นปริมาณiNOSที่เหลืออยู่เป็นพิโคกรัมต่อ 50 ไมโครกรัมของโปรตีน พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วทั้ง 3 ความเข้มข้น คือ 1,10 และ 100μg/ml สามารถยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOSได้ทั้ง 3 ความเข้มข้นโดยลดระดับของปริมาณเอนไซม์ iNOS ลงได้เหลือ 2.29±0.14, 0.98±0.23 และ 0.53±0.12 pg/50 μgโปรตีนตามลำดับ ส่วนสารสกัดเมทานอลของใบงิ้วที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μg/ml สามารถลดระดับของปริมาณเอนไซม์ iNOS ลงได้เหลือ 2.19±0.43, 2.16±0.26 และ

1.88±0.11 pg/50 μgโปรตีน ตามลำดับ โดยเทียบกับเซลล์ควบคุมซึ่งมีระดับของปริมาณเอนไซม์ iNOS เหลืออยู่ 2.70 ± 0.23 pg/50 μgโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ของสารสกัดดอกงิ้วและและสารสกัดใบงิ้วที่ความเข้มข้น 100 μg/ml จะเห็นว่าสารสกัดดอกงิ้วจะลดปริมาณ iNOS ได้ดีกว่าสารสกัดใบงิ้ว และจากผลการทดสอบที่ได้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดเอทานอลของดอกงิ้วมีฤทธิ์ต้านการอักเสบจากเอนไซม์ iNOS ได้ดีมาก

ค. จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยใช้ Model Rat Paw Edema พบว่าสารมาตรฐานแขวนลอยของ Phenylbutazone ในขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีผลยับยั้งการอักเสบ (% inhibition) ในชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 36.48%, 67.47% และ 67.13% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาว ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีผลยับยั้งการอักเสบมากกว่า 40% ในชั่วโมงที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จึงสรุปว่าสารสกัดเอทานอลของงิ้วดอกขาว มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ที่ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

1. ความรู้เรื่องงิ้วดอกขาวสามารถต้านการอักเสบจากการบวมได้ ได้รับการพิสูจน์ยืนยันด้วยผลการทดลองทางวิทยาศาสตที่เชื่อถือได้แล้ว เป็นความรู้ใหม่ที่ยังไม่มีใครได้รายงานมาก่อนโดยเฉพาะฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์iNOS

2 . ควรจะมีการทำวิจัยต่อเพื่อหาว่าสารเคมีชนิดใดในดอกงิ้วที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบได้ เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคจากสมุนไพรและเตรียมเป็นอนุพันธ์ของสารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดียิ่งขึ้น

3. ควรจะมีการทำวิจัยต่อในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์โดยทดลองกับสัตว์ทดลอง เพื่อยืนยันถึงสมบัติความเป็นพิษของดอกงิ้วต่อเซลล์สัตว์ทดลอง รวมทั้งปริมาณการได้รับสารสกัดจากดอกงิ้วในตัวทำละลายที่เป็นน้ำเพื่อรักษาอาการอักเสบในระดับต่าง ๆของสัตว์ทดลอง

7.การนำไปใช้ประโยชน์

1.สามารถเผยแพร่ความรู้นี้ให้กับสาธารณชนและ ชุมชนในแหล่งที่เป็นต้นกำเนิดของงิ้วได้ทราบรวมทั้งการแพทย์ทางเลือก

2.หากได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารที่ออกฤทธิ์มากๆแล้วอาจทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างแพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคจากสมุนไพรและเตรียมเป็นอนุพันธ์ของสารเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบให้ดียิ่งขึ้น

3.เพื่อเป็นสมุนไพรทางเลือกแก่ประชาชนทั่วไปในการรักษาการอักเสบ