กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนในการทำวิจัย โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้รับทุนประจำปี 2553-2554

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่ให้ความสะดวกในการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็น

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยทดลองฤทธิ์ทางชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ผู้วิจัย

2555

บทคัดย่อภาษาไทย

การแยกสกัดรากของส่องฟ้าดงพบว่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งสิ้นจำนวน 20 สาร มีสารประเภทคาร์บาโซล 15 สาร คูมาริน 4 สาร มี 1 สารที่เป็นซินนามิลเอสเทอร์ เมื่อนำสาร heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ไปทำการดัดแปลงโครงสร้างได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 19 อนุพันธ์ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และต้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ที่ดีนัก ยกเว้นสาร IIa แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (IC_{50}= 3.27 mg/ml) เมื่อทดสอบกับเซลล์ม NCI-H187 (มะเร็งปอด), MCF-7 (มะเร็งเต้านม), KB (มะเร็งช่องปาก) และเซลล์ปรกติ (Vero cell lines). พบว่าสาร Ih และ IIi แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์ NCI-H187 ที่ดี (IC_{50} = 0.02 และ 0.66 μM ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่า ellipticine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประมาณ 138 และ 4 เท่า นอกจากนี้ออกซีม Ih แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์ KB (IC_{50} = 0.17 μM) ซึ่งสูงกว่า ellipticine เท่ากับ 10 เท่า และแสดงความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปรกติ (IC_{50} = 66.01 μM) จะเห็นได้ว่าสารนี้น่าจะสามารถพัฒนาให้เป็นยาต่อไปได้

ในส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญด้วยวิธี HPLC จากตัวอย่างที่เก็บจากหลายแหล่ง พบว่า nordentatin และ dentatin ในตัวอย่างพบ สาร nordentatin อยู่ในช่วง 0.464 ถึง 0.056 กรัมต่อ 100 กรัมของรากบดแห้ง และสาร dentatin อยู่ในช่วง 0.367 ถึง 0.050 กรัมต่อ 100 กรัมของรากบดแห้ง จากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่สุ่มมาจาก 4 จังหวัดนั้นมีสารสำคัญคือ nordentatin และ dentatin แตกต่างกัน 7-8 เท่า วิธีการวิเคราะห์โดย gradient elution นั้นมีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีกว่า วิธี isocratic elution ควรสามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณสาร biomarkers ได้ 8-9 ตัว แต่เนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องที่ใช้ในการวิจัยนี้มีสภาพเก่า คาดว่าส่วน autoinjector มีปัญหา จึงไม่ผ่านเกณฑ์ของ method validation ส่องฟ้าดงและสารสกัดรากสันโสกมีรูปแบบการแยกของสารในคอลัมน์คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าต้นไม้สองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เนื่องจากมีสารประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่แตกต่างจากต้นมะไฟจีน และเฟื้ยฟานอย่างชัดเจน นอกจากนั้นยังพบว่าสารประกอบในใบของส่องฟ้าดงที่เก็บมาจาก 4 จังหวัดนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก และแตกต่างจากใบของสันโสก มะไฟจีน และเฟื้ยฟาน

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Twenty compounds were isolated from the root of *Clausena harmandiana* including carbazoles, coumarins and cinnamate ester. Heptaphylline (I) and 7-methoxyheptaphylline (II) were used as the starting material for structural modification and nineteen carbazole alkaloids were synthesized. All isolated compounds were evaluated for their biological activities such as an antifungal against *Candida albicans*, an antiplasmodial against *Plasmodium falciparum*, an antimycobacterial against *Mycobacterium tuberculosis* It was found that all compounds showed moderate to weak activities against all tests except compound IIa exhibited strong activity against *Plasmodium falciparum.* Cytotoxicity against NCI-H187 (human lung cancer), MCF-7 (breast cancer), KB (oral human epidermal carcinoma) and Vero cell lines (African green monkey kidney, normal cell) were also evaluated. Among these derivatives, Ih and IIi showed cytotoxicity against the NCI-H187 cell line with IC_{50} values of 0.02 and 0.66 μM, respectively, which are about 138 and 4 fold stronger than the ellipticine standard. In addition, oxime Ih displayed cytotoxicity against KB cells with an IC_{50} value of 0.17 μM which is about 10 times stronger than the ellipticine. This compound demonstrated weak cytotoxicity against Vero cells (IC_{50} = 66.01 μM). The results show convincingly that Ih may be a promising lead for the development of cytotoxic agents.

In this research study, high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint analysis was developed to investigate and demonstrate the variance of chemical constituents among *Clausena spp.* collected from different parts of Thailand. The amount of nordentatin and dentatin found in 100 grams of dried ground root of the samples of *Clausena harmandiana* were ranged from 0.464 to 0.056 and 0.367 to 0.050 grams, respectively. Therefore, the results showed biodiversity of the contents among the samples, which was approximately up to 7-8 folds different in the content of bioactive compounds. The method using gradient elution technique showed higher separation efficiency than the isocratic elution method. The resolution of 9 biomarkers showed adequately for quantitation purpose, however, the results failed to meet the validation criteria. This may be explained by the error of the instrument at the part of auto-injector. Both of the analytical methods revealed that *Clausena harmandiana* and *Clausena excavata* showed the similar patterns in chromatographic separation. This suggested that these two species might have a very close relationship in terms of chemotaxonomy, whereas they are obviously different from *Clausena lansium* and *Clausena wallichii.* It is also noted that the HPLC fingerprints of the leaves of *Clausena harmandiana* were different among the samples collected from different sites and were also different from the leaves of *Clausena excavate, Clausena lansium and Clausena wallichii*.

บทนำรวม

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

คณะผู้วิจัยได้ทุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น งบประมาณทุนอุดหนุนประจำปี 2552 (เพิ่มเติม) ชื่อแผนงานวิจัย**เรื่องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษเฉียบพลันของสารสกัด และสารกึ่งสังเคราะห์จากราก และใบของส่องฟ้าดง** ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดจากรากต้นส่องฟ้าดงมีฤทธิ์แก้ปวด และฤทธิ์ลดไข้ (พบพร 2552) ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหูอักเสบของสุนัข (Chatchawanchonteera et al., 2009) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น (Prasertcharoensuk et al., 2007) ฤทธิ์ในการป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท (Boonyarat et al., 2009) และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Tongthoom et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากรากและใบของต้นส่องฟ้าดงมีความเป็นพิษต่ำมาก (พบพร 2552) จึงเหมาะสำหรับนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยา

ส่องฟ้าดงเป็นสมุนไพรที่พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ชาวบ้านใช้ในการเป็นยาบำรุงเลือด บำรุงหัวใจใช้กับหญิงในวัยใกล้หมดประจำเดือน รักษาโรคกระเพาะ ลดอาการบวม ลดไข้รักษาอาการวัยทองของหญิงวัยใกล้หมดประจำเดือน จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าส่องฟ้าดงมีองค์ประกอบทางเคมีประเภทคาร์บาโซลและคูมารินจำนวนมาก ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้น พบว่าคูมารินแสดงฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับภาวะผิดปรกติในร่างกาย เช่น มีผลต่อการเกิดภาวะความจำเสื่อม มะเร็ง เบาหวาน จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งหากได้มีการศึกษาค้นคว้าถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของส่องฟ้าดงอย่างเป็นระบบในเชิงวิทยาศาสตร์ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีเบื้องต้น พบว่าสารสกัดหยาบส่องฟ้าดงแสดงศักยภาพที่ดี ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ คณะนักวิจัยจึงเล็งเห็นว่าควรมีการวิจัยต่อเนื่องถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่มีต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาท หาความเชื่อมโยงระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและผลในการต้านเบาหวาน และขยายการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อันจะสอดคล้องกับ**ข้อกำหนดกรอบหัวข้อการวิจัย พศ. 2553 กลุ่ม 2 เรื่องการป้องกันโรคและรักษาสุขภาพ หัวข้อย่อย 2.13 การศึกษาสมุนไพรเฉพาะถิ่นที่มีการใช้ประโยชน์กันมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ยังขาดงานวิจัย คือ 1. การใช้สมุนไพรในการรักษาโรค 2. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพร** นอกจากนั้นเพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการควบคุมคุณภาพและการพิสูจน์ชนิดของต้นส่องฟ้าดง จึงจะให้มีการวิจัยด้านการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญโดยใช้ HPLC finger print ร่วมด้วย และเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพของสารบริสุทธิ์จากส่องฟ้าดง การเตรียมอนุพันธ์ของสารเหล่านั้นจึงเป็นอีกโครงการหนึ่งที่จะขยายขอบเขตของงานวิจัยให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

2.1 ศึกษาฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์กระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของสารสกัด และสารประกอบหลัก และศึกษากลไกการควบคุมผ่านการทำงานของ insulin signaling pathway

2.2 เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และจากการเหนี่ยวนำด้วย beta amyloid และใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ในการศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารสกัดกับ เอนไซม์ β-secretase

2.3 เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธิ์ต่อเซลล์ประสาท neuroblastoma

2.4 เพื่อต้องการตรวจกรองฤทธิ์และศึกษากลไกต้านมะเร็งท่อน้ำดีในเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดและอนุพันธ์ใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น

2.5 เพื่อแยกสกัดสารบริสุทธิ์และเตรียมอนุพันธ์ของคาร์บาโซลและคูมารินเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวาน ป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท และฤทธิ์ต้านมะเร็งท่อน้ำดี

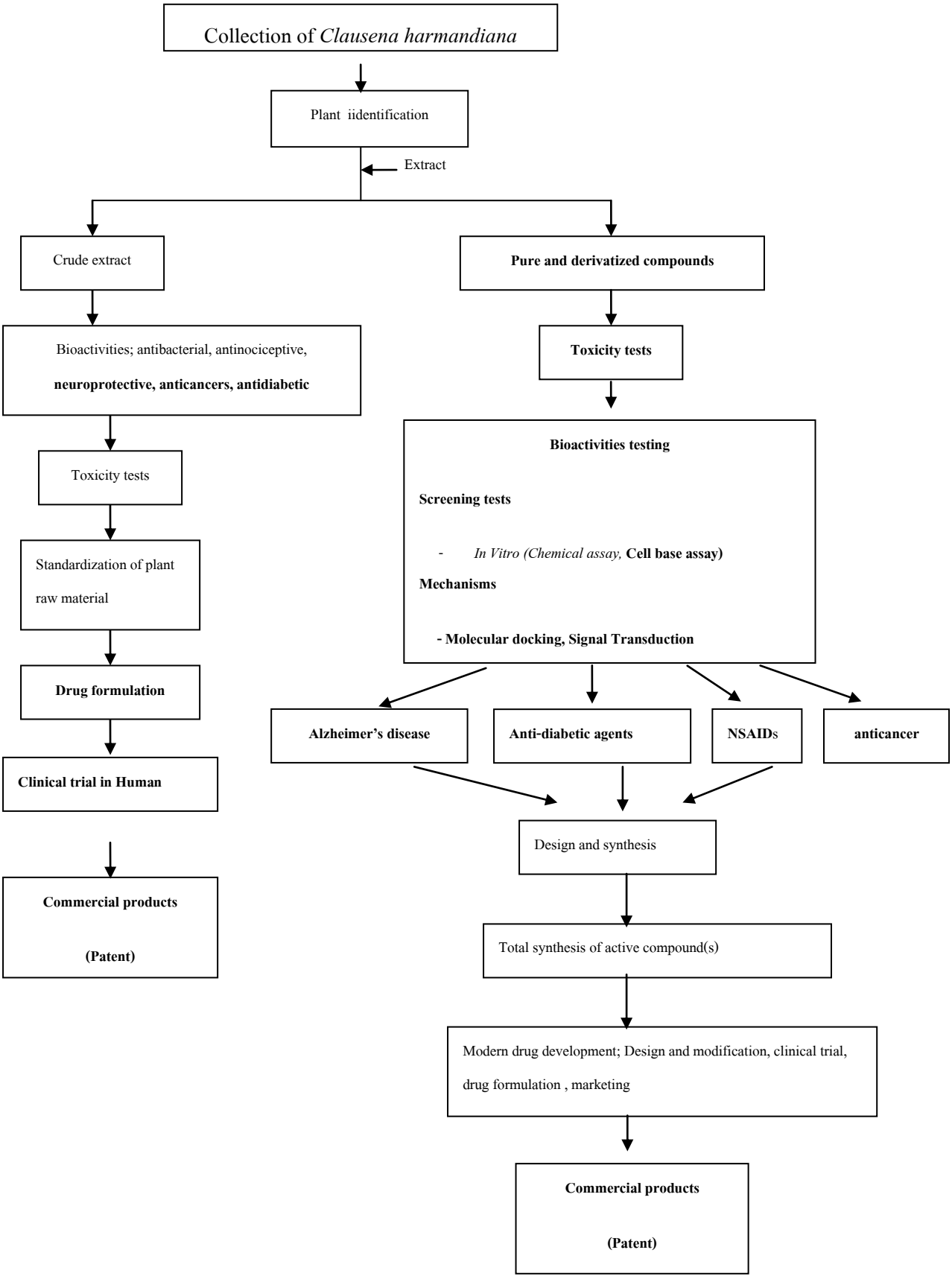
2.6 เปรียบเทียบระดับสารออกฤทธิ์ของตัวอย่าง *Clausena harmandiana* Pierr. ที่เก็บจากต่างสถานที่เพื่อศึกษาคุณภาพของต้นส่องฟ้าดงที่มีตามธรรมชาติ

2.7 เพื่อหา HPLC finger print ที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกสมุนไพรสกุล *Clausena*

3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทดสอบสารสกัดจากใบและรากส่องฟ้าดง พบว่า มีฤทธิ์แก้ปวดและลดไข้ในสัตว์ทดลอง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันนั้นมีความเกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆอีกมาก เช่น ฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธ์ต้านการอักเสบฤทธิ์ในการปกป้องสมองจากอนุมูลอิสระและสารพิษ รวมถึงเรื่องฟื้นฟูความทรงจำและเพิ่มประสิทธิภาพในการเรียนรู้ในสัตว์ทดลอง จึงมีกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัยที่จะทำต่อเนื่องให้ลึกซึ้งให้ได้ผลงานน่าเชื่อถือสามารถประเมินเชิงวิทยาศาสตร์ โดยได้ตั้งสมมุติฐานว่าสารสกัดจากส่องฟ้าดงน่าจะมีประสิทธิภาพในการลดไข้แก้ปวด ลดระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยฟื้นฟูความจำและมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยกลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญนอกจากผ่านกลไกต้านออกซิเดชันแล้ว น่าจะผ่านกลไกอื่นๆในระดับโมเลกุลด้วย จึงทำการศึกษาในเชิงลึกเพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่างๆ และมุ่งพัฒนาเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์กับประชากรของประเทศได้อย่างจริงจังและยั่งยืน ดังแสดงไว้ในรูป **กรอบแนวคิดและความเชื่อมโยงในการพัฒนาส่องฟ้าดงเพื่อเป็นยา** (หน้าถัดไป)

กรอบแนวคิดและความเชื่อมโยงในการพัฒนาส่องฟ้าดงเพื่อเป็นยา



4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ได้สารต้นแบบผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์รักษาโรคอัลไซเมอร์ เบาหวานและต้านมะเร็งท่อน้ำดี

4.2 เพื่อเป็นประโยชน์ต่อสาธารณะ โดยการถ่ายทอดองค์ความรู้ใหม่ที่ได้จากงานวิจัยให้กับประชาชนทุกภาคส่วน สำหรับประชาชนที่มีภูมิลำเนาซึ่งมีต้นส่องฟ้าดงอยู่ สามารถนำมาใช้รักษาโรคเบื้องต้นอันเป็นการพึ่งพาตนเอง และสนับสนุนทฤษฎีเศรษฐกิจพอเพียงได้ทางหนึ่ง

4.3 ได้นำเสนอผลงานในการประชุม และตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

5. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

หากงานวิจัยชิ้นนี้ประสบความสำเร็จ ก็สามารถถ่ายทอดองค์ความรู้ทั้งหมดสู่ชุมชน หน่วยงานทางด้านสาธารณสุข ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการดูแลรักษาสุขภาพของประชาชน นอกจากนี้หากพัฒนาต่อไปให้เป็นยารักษาโรคแบบทางเลือกก็จะประหยัดงบประมาณไปได้มาก