ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247239

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุจากสารสกัดสมุนไพรมาตรฐาน:เพชรสังฆาต

โดย

ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์
พรรณี หนูซื่อตรง
ธรัชต์ ทรัพย์ศรีทอง

มิถุนายน 2555

6002517439

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247239

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุจากสารสกัดสมุนไพรมาตรฐาน: เพชรสังฆาต

โดย

ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์

พรรณี หนูซื่อตรง

ธรัชต์ ทรัพย์ศรีทอง

มิถุนายน พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2553 และคณะผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำทางวิชาการและข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ทำให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินการไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสมุนไพรให้กับระบบสาธารณสุขของประเทศ และขอขอบคุณในความช่วยเหลือเรื่องต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ครุภัณฑ์ และสาธารณูปโภค สำหรับการวิจัยตลอดโครงการ
2. รองศาสตราจารย์ นพ. พลภัทร โรจน์นครินทร์ และอาจารย์เบญจพร อัคควัฒน์ สาขาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับการวิจัยเกล็ดเลือด และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมทั้งอาสาสมัครที่ให้ความอนุเคราะห์เลือด
3. รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร. รุทธ์ สุทธิศรี ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำการเก็บและพิสูจน์เอกลักษณ์ตัวอย่างพืชสมุนไพร
4. นางสาววีรยา แก้วเปรม นางสาวศรัณยา ทองอำไพ นายนนท์ธเนศ นลินรัตน์ นายวิโรจน์ จันทอง นิสิตบัณฑิตศึกษาสาขาวิชาชีวเวชเคมี นางสาวกนกวรรณ หงษ์ทอง นางสาวมาริสา นวลกุล นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ตลอดจนนิสิตและบุคลากรทุกท่านในภาควิชาที่ทำให้การดำเนินการวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยที่ได้จะได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อวงวิชาการ และระบบสาธารณสุขด้านการแพทย์ทางเลือกของประเทศต่อไป

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2555

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพสำหรับผู้สูงอายุจากสารสกัดสมุนไพรมาตรฐาน: เพชรสังฆาต

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน เมฆสุริเยนทร์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรรณี หนูซื่อตรง
นายธรัชต์ ทรัพย์ศรีทอง

เดือนและปีวิจัยที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน 2555

247239

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระของสารสกัดเพชรสังฆาต ทั้งในหลอดทดลองและในเซลล์บุผิวหลอดเลือดมนุษย์ ECV304 ผลการทดลองพบว่าน้ำคั้นจากเพชรสังฆาตสดและนำมาพ่นแห้ง (CQWS1) สามารถต้านอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และไฮดรอกซิล รวมทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ดีกว่าเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยเอทานอลโดยวิธี soxhlet เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (CQES48) และสอดคล้องกับฤทธิ์ของ quercetin และ resveratrol จึงนำสารสกัดทั้งสองชนิดมาศึกษาฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ชักนำให้อยู่ภายใต้ภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2 ด้วยวิธี DCFH-DA พบว่า CQES48 (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไปทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 (100 ไมโครโมลาร์) กลับเข้าสู่ระดับปกติและได้ดีกว่า CQWS1 (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสอดคล้องกับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ quercetin และ resveratrol (5 ไมโครโมลาร์) จึงคัดเลือกเฉพาะ CQES48 มาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้วยวิธี Western blot พบว่าสามารถเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ copper/zinc superoxide dismutase, manganese superoxide dismutase และ glutathione peroxidase รวมทั้ง endothelial nitric oxide synthase ทั้งนี้ ความเข้มข้นของ CQWS48 ที่ไปลดอนุมูลอิสระภายได้นั้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์และต่อยีน และไม่มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP และเมื่อนำสารสกัด CQES48 มาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่ามี quercetin และ resveratrol เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดเพชรสังฆาตที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Project Title Development of health product for the elderly from standardized herbal extract: *Cissus quadrangularis* L.

Name of Investigators Associate Professor Dr. Duangdeun Meksuriyen

Assistant Professor Dr. Punnee Nuesutrong

Mr. Tarat Sapsrithong

Year June 2012

Abstract

247239

The aims of the present study are to determine free radical scavenging activities of *Cissus quadrangularis* L. (CQ) in cell-free system compared with protective effect against hydrogen peroxide (H_2O_2)-injured human umbilical vein endothelial ECV304 cells. The result demonstrated that the spray drying of compressed fresh CQ (CQWS1) possessed stronger free radical scavenging activities against superoxide anion, hydroxyl radical and H_2O_2 than the ethanol extract using soxhlet apparatus for 48 h (CQES48). The free radical scavenging activities of CQWS1 and CQES48 were well correlated with those of quercetin and resveratrol. Using DCFH-DA assay, pretreatment of CQES48 (0.1 mg/mL) significantly restored intracellular reactive oxygen species (ROS) in H_2O_2-treated cells more effective than of CQWS1 (1 mg/mL). The attenuation of intracellular ROS of both extracts was also correlated with those of quercetin and resveratrol (5 μM). Western blot analysis revealed that pretreatment of CQES48 significantly up-regulated the protein expression of antioxidant enzymes such as copper/zinc superoxide dismutase, manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase including endothelial nitric oxide synthase. Additionally, cytotoxic, genotoxic and antiplatelet effects of CQES48 at the antoxidative concentrations were not observed. HPLC analysis revealed the presence of quercetin and resveratrol in CQES48, which could be used as biomarkers for the quality control of the extract.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการตารางประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	vi
รายการสัญลักษณ์	viii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	13
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	25
บทที่ 5 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	70
เอกสารอ้างอิง	73
ส่วนผนวก	86

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดเพชรสังฆาตที่สกัดด้วยวิธีต่าง ๆ	26
2	การวิเคราะห์หาปริมาณ quercetinในสารสกัดเพชรสังฆาตด้วยวิธี TLC densitometry	28
3	การเปรียบเทียบระหว่างความเป็นพิษต่อเซลล์ ECV304 และความสามารถในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ของ CQES48, CQWS1, quercetin, resveratrol, hesperidin และ diosmin	55

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดเพชรสังฆาต และ quercetin, ascorbic acid และ resveratrol	31
2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของสารสกัดเพชรสังฆาต	33
3	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{\cdot-}$ ของ quercetin และ resveratrol	34
4	ฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ของสารสกัดเพชรสังฆาต	35
5	ฤทธิ์ต้าน H_2O_2 ของ quercetin และ resveratrol	36
6	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $OH^{\bullet}$ ของสารสกัดเพชรสังฆาต	39
7	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $NO^{\bullet}$ ของสารสกัดเพชรสังฆาต	40
8	ความเป็นพิษของสารสกัดเพชรสังฆาตต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT	42
9	ความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT	43
10	ความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี MTT	45
11	การทดสอบความเป็นพิษต่อยีนด้วยวิธี comet ในเซลล์ที่ได้รับ CQES48 และ CQWS1	47
12	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษต่อยีนของ CQES48 และ CQWS1 ด้วยวิธี comet	48
13	การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ด้วยวิธี DCFH-DA	50
14	การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ H_2O_2	51
15	การวัดปริมาณอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับสารทดสอบนาน 24 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 100 ไมโครโมลาร์	53
16	การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	56
17	การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	58
18	การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	59
19	การแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	60

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
20	การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	62
21	การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และ iNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ CQES48 ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	63
22	การแสดงออกของเอนไซม์ eNOS และ iNOS ในเซลล์ ECV304 ที่ได้รับ quercetin หรือ resveratrol ก่อนบ่มด้วย H_2O_2 วิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot	64
23	Aggregation trace ของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นให้เกาะกลุ่มกันด้วย ADP	67
24	ผลของ CQES48 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP	68
25	โครมาโทแกรมของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	69
26	กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเพชรสังฆาต CQES48 ในการลดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ECV304 ภายใต้ภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย H_2O_2	72

รายการสัญลักษณ์

AAI	antioxidant activity index
ADP	adenosine 5'-diphosphate
ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
ANOVA	analysis of variance
ASA	aspirin
AST	aspartate aminotransferase
BHA	butylated hydroxyanisole
BUN	blood urea nitrogen
CAT	catalase
CCl_4	carbon tetrachloride
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CO_2	carbon dioxide
CQ	*Cissus quadrangularis*
CQER7	ethanol extract of *Cissus quadrangularis* using reflux apparatus for 7 h
CQES7	ethanol extract of *Cissus quadrangularis* using soxhlet apparatus for 7 h
CQES48	ethanol extract of *Cissus quadrangularis* using soxhlet apparatus for 48 h
CQWF1	aqueous extract of *Cissus quadrangularis* and further freeze-dried
CQWS1	fresh *Cissus quadrangularis* juice and further spray-dried
Cu/Zn-SOD	copper/zinc superoxide dismutase
CYP	cytochrome P_{450}
DCF	dichlorofluorescein
DCFH	dichlorodihydrofluorescein
DCFH-DA	2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DPPH	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EA.hy 926	derived human umbilical vein endothelial cells

รายการสัญลักษณ์

EC_{50}	half maximal effective concentration
ECL	enhanced chemiluminescence
ECV304	transformed human umbilical vein endothelial cells
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
et al.	*et alii*, and others
FBS	fetal bovine serum
$FeCl_3$	iron (III) chloride
Fe^{2+}	ferrous ion
Fe^{3+}	ferric ion
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione disulfide
GST	glutathione-*S*-transferase
GTP	guanosine triphosphate
h	hour
HA22T/VGH	human-derived hepatoma cells
HDL	high density lipoprotein
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol
HepG2	human hepatoma cells
H_2O_2	hydrogen peroxide
HO-1	heme oxygenase-1
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HT29	human colon adenocarcinoma cells
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IC_{10}	10% inhibitory concentration
IC_{25}	25% inhibitory concentration

รายการสัญลักษณ์

IC_{50}	half maximal inhibitory concentration
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kDa	kilodalton
LD_{50}	median lethal dose
LDL	low density lipoprotein
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol
LPS	lipopolysaccharide
LSD	least significant difference
M	molar
M199	medium 199
RAW 264.7	mouse leukemic monocyte macrophage cells
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MC3T3-E1	mouse osteoblastic cells
MCV	mean corpuscular volume
MDA	malondialdehyde
mg	milligram (s)
min	minute (s)
mL	milliliter (s)
Mn-SOD	manganese superoxide dismutase
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	sodium chloride
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NBT	nitrotetrazolium blue chloride
NED	napthylethylenediamine dihydrochloride
NF-κB	nuclear factor kappa B
NO	nitric oxide

รายการสัญลักษณ์

$NO^{\bullet}$	nitric oxide radical
NOS	nitric oxide synthase
$O_2^{-\bullet}$	superoxide radical
$OH^{\bullet}$	hydroxyl radical
%	percentage
PBS	phosphate-buffered saline
PGE_2	prostaglandin E-2
pH	negative logarithm of hydrogen ion concentration
PMS	phenazine methosulfate
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
PVDF	polyvinylidene fluoride
R^2	coefficient of determination
R_f	retention factor
R_t	retention time
RBC	red blood cells
ROS	reactive oxygen species
SCr	serum creatinine
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
S.E.M.	standard error of the mean
SNP	sodium nitroprusside
SOD	superoxide dismutase
TBA	2-thiobarbituric acid
TBST	tris-buffered saline, 0.005% tween 20
TCA	trichloroacetic acid
TG	triglyceride
TGF-α	transforming growth factor-α
TLC	thin layer chromatography
VEGF	vascular endothelial growth factor

รายการสัญลักษณ์

v/v	volume by volume
µL	microliter (s)
µM	micromolar
WBC	white blood cells
w/w	weight by weight