รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง
การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน
ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ
โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์
Isolation of anti-diabetic substances of medicinal plants
in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal
Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn
by measuring the inhibitory activity of advanced glycation end
product formation

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

(ภาษาไทย)....การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์

(ภาษาอังกฤษ).... Isolation of anti-diabetic substances of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory activity of advanced glycation end product formation

ผู้ดำเนินงาน
รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล

ชื่อหน่วยงาน *ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

เลขหมู่
เลขทะเบียน 016466
วัน, เดือน, ปี 23 มี.ค. 58

บทคัดย่อ

จากการนำสารสกัดพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราช ดำริฯ ที่มีฤทธิ์ดีในการยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ ได้คัดเลือกเปลือกต้นลำป้าง นำมาสกัดแยกสารด้วยวิธี Bioassay guided fractionation สามารถแยกสารได้ 1 สาร คือ สาร PD-1 จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารทั้งสอง พบว่า คือ (-)-epicatechin โดยเทียบกับข้อมูล ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR spectra ของสารที่ได้รายงานมาแล้ว จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ พบว่า(-)-epicatechin มีร้อยละของการยับยั้งการสร้าง AGE เป็น 71.93 และมีค่า IC_{50} เป็น 34.6 µg/ml

คำสำคัญ การสกัดแยกสาร, ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์, Bioassay guided fractionation, พื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ

Abstract

Pterospermum littorale Craib was selected for extraction and isolation by using bioassay guided fractionation, PD-1, was isolated. Structure elucidation of these compounds (using ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectral data compare to the previous reports) show that PD-1 is (-)-epicatechin. The percent inhibition of advanced glycation end product formation of (-)-epicatechin is 71.93 and the IC_{50} value is 34.6 µg/ml.

Keyword: screening, extraction, isolation, advanced glycation end product formation, Bioassay guided fractionation, the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn

สารบัญเรื่อง

ชื่อเรื่อง **การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์**

กิตติกรรมประกาศ..... i
บทคัดย่อภาษาไทย..... ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iii
สารบัญเรื่อง..... iv
สารบัญตาราง..... v
สารบัญภาพ และสารบัญแผนภาพ..... vi
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ vii

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 1
วัตถุประสงค์ 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา..... 3
ผลการศึกษา 4
สรุปและวิจารณ์ผล..... 13
เอกสารอ้างอิง..... 18

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	การแยกสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากเปลือกต้นลำป้าง โดยวิธี quick column chromatography	6
ตารางที่ 2	Fraction ที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบ EtOAc ด้วย quick column chromatography	6
ตารางที่ 3	Fraction และ spot ในแต่ละ fraction พร้อมค่า Rf	8
ตารางที่ 4	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก **Fraction** A2	8
ตารางที่ 5	การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก **Fraction** A3	9
ตารางที่ 6	Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4	10
ตารางที่ 7	Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4-3 และ% inhibitionการสร้างAGE	10
ตารางที่ 8	Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4-6 และ% inhibitionการสร้างAGE	10
ตารางที่ 9	ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของสารที่แยกได้ PD-1 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ (-)-epicatechin ในliterature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว	12
ตารางที่ 10	ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของสารที่แยกได้ PD-1 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ (-)-epicatechin ในliterature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว	13
ตารางที่ 11	ตารางสรุปชื่อพืช วงศ์ สารสำคัญ และค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยethanol	15
ตารางที่ 12	ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ของสารที่แยกได้จากสารสกัดพืช	17

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 TLC แสดงการแยกสารจาก สารสกัดหยาบ ethyl acetate จาก เปลือกต้นลำป้าง ด้วยวิธี quick column chromatography 7

ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ สาร (-)-epicatechin 12

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 แสดงการเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นลำป้าง 5

แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ PD-1 จาก fraction A4 11

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 TLC แสดงการแยกสารจาก สารสกัดหยาบ ethyl acetate จาก
เปลือกต้นลำป้าง ด้วยวิธี quick column chromatography 7

ภาพที่ 2 **สูตรโครงสร้างของ สาร (-)-epicatechin** 12

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1 แสดงการเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นลำป้าง 5
แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ PD-1 จาก fraction A4 11

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

^{13}C-NMR = carbon-13 nuclear magnetic resonance
DMSO = dimethylsulphoxide
EtOAc = ethyl acetate
EtOH = ethyl alcohol, ethanol
^{1}H-NMR = proton nuclear magnetic resonance
IC_{50} = 50% inhibitory concentration
MeOH = methyl alocohol, methanol
µg/ml = microgram per milliliter
mg/ml = milligram per milliliter

การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์

Isolation of anti-diabetic substances of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by measuring the inhibitory Activity of advanced glycation end product formation

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรัตนา อำนวยผล
Associate Professor Dr. Surattana Amnuoypol

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่จัดว่าเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลก ในปัจจุบันโรคเบาหวาน มีอุบัติการณ์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากข้อมูลรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) พบว่า ในปี พ.ศ. 2549 มีผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกสูงถึง 171 ล้านคน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2573 จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ส่วนในประเทศไทย จากรายงานของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี พ.ศ. 2547 พบว่ามีประชากรไทยป่วยด้วยโรคเบาหวานถึง 1,500,000 คน หรือประมาณร้อยละ 6 ของประชากรไทย นอกจากนี้ พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวานทั่วโลก ประมาณ 3.2 ล้านคนต่อปี หรือมีผู้เสียชีวิต 6 คนต่อนาที[1]

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากร่างกายขาดฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin) หรือมีระดับอินซูลินในเลือดต่ำ หรือเนื้อเยื่อต่างๆมีการตอบสนองต่ออินซูลินน้อยลง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการใช้คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน ซึ่งอินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ผลิตโดยตับอ่อน ทำหน้าที่ควบคุมให้เซลล์ต่างๆในร่างกายใช้น้ำตาลในกระแสเลือดเป็นพลังงาน[2] เมื่อร่างกายขาดฮอร์โมนอินซูลินจะส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ในผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำตาลสูงนานๆทำให้อวัยวะต่างๆเกิดการเปลี่ยนแปลงผิดปกติ และนำมาซึ่งโรคแทรกซ้อนมากมายได้ โรคเบาหวานสามารถแบ่งได้ 2 ประเภทหลักๆ คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type I Diabetes Mellitus : Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนผลิตอินซูลินไม่ได้เลย หรือผลิตได้น้อยมาก โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type II Diabetes Mellitus: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) เกิดจากตับอ่อนสามารถผลิตอินซูลินได้ แต่ไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย หรือผลิตได้พอ แต่เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน[3]

ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงนั้นมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานโดยทำให้เกิดปฏิกิริยาการเติมน้ำตาลให้กับโมเลกุลของโปรตีน (Protein Glycation Reaction) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากปฏิกิริยาไกลเคชัน (Advanced Glycation End Products : AGEs) ที่เพิ่ม

มากขึ้นในเนื้อเยื่อต่างๆ ทั่วร่างกาย สาร AGEs ที่เกิดขึ้นนี้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลกับโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นในร่างกายก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชันและทำให้เกิดสาร AGEs มากขึ้น ซึ่งล้วนแล้วแต่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลและเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย จากการศึกษาวิจัยพบว่า มีตัวรับของ AGEs (receptor of AGEs : RAGE) ในเซลล์ร่างกายหลายชนิด โดยเฉพาะเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน เมื่อ AGEs เกิดปฏิกิริยากับ RAGE แล้วจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการสื่อสารภายในเซลล์ การแสดงออกของยีน (gene expression) การหลั่งของสาร proinflammatory และอนุมูลอิสระ นำไปสู่พยาธิสภาพของภาวะแทรกซ้อน[4] อาจก่อให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดเล็กๆ ที่ไปเลี้ยงยังอวัยวะต่างๆ เช่นไต ตา ปลายมือ ปลายเท้า ทำให้มีอาการแทรกซ้อนของระบบหัวใจและหลอดเลือด ความดันเลือดสูง หลอดเลือดหัวใจตีบตัน ตามัวถึงตาบอด หลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงตามปลายมือปลายเท้าอุดตัน ทำให้เกิดแผลเน่า ไตเสื่อมสภาพจนเกิดไตวาย และยังมีผลลดสมรรถภาพทางเพศในผู้ชายอีกด้วย [5,6]

จากความสำคัญของการเกิด AGEs ในผู้ป่วยเบาหวาน ทำให้สนใจค้นหาแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดสาร AGEs ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนอันเนื่องมาจากความเป็นพิษของน้ำตาลในปัจจุบัน นอกจากมีรายงานถึงพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการต้านเบาหวานและลดระดับน้ำตาลในเลือดแล้ว ยังพบว่ามีพืชสมุนไพรที่มีกลไกยับยั้งการสร้างสาร AGEs ด้วย ตัวอย่างเช่น พืชสกุลเบญจมาศ (*Chrysanthemum sp.*)[7], บัวหลวง (*Nelumbo nucifera*)[8], หอมหัวใหญ่ (*Allium cepa*), โป๊ยกั๊กญี่ปุ่น (*Illicium religiosum*), Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), ออรีกาโน (*Origanum officinalis*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), สาลี่ (*Pyrus pyrifolia*), โสมไซบีเรีย (*Acanthopanax senticosus*), กานพลู (*Eugenia caryophllata*), Daisy (*Erigeron annuus*)[9]

ดังนั้นการคัดกรองหาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ จึงเป็นเรื่องที่น่าศึกษาวิจัยเพื่อเก็บเป็นข้อมูล เนื่องจากมีศักยภาพในการศึกษาและเพื่อนำไปพัฒนาใช้เป็นยาต้านเบาหวานต่อไปได้ นอกจากนี้ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯนั้นมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสมุนไพร จึงมีโอกาสสูงในการได้พืชใหม่ๆที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน

จากการวิจัยการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ เมื่อปีที่ผ่านมา (พ.ศ. 2555) พบว่าใบก้างปลา (สามพันตา) *Cleistanthus gracilis* Hook.f., ใบช้างน้าว *Ochna integerrima* Merr., เปลือกลำป้าง *Pterospermum littorale* Craib, กิ่งกระพี้จั่น *Millettia brandisiana Kurz.* และ ผลโพทะเล *Thespesia populnea* (L.)Soland.ex Corr. เป็นพืชที่มีฤทธิ์ดี และได้คัดเลือกเปลือกลำป้าง *Pterospermum littorale* Craib มาทำการสกัดแยกสารสำคัญโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี ควบคู่กับทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์

ลำป้าง มีชื่อพื้นเมืองดังนี้คือ กะหนาย ยวนปลา (ภาคใต้), ขนาน, ลำป้าง (ชลบุรี), จำปีแขก จำปาเทศ (ภาคกลาง, กรุงเทพมหานคร), สนาน (นนทบุรี), หำอาว (หนองคาย) **และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า** *Pterospermum littorale* Craib **วงศ์** : STERCULIACEAE

เป็นพืชถิ่นเดียวและ หายาก (endemic and rare plant) พบกระจายอยู่ตามป่าชายหาด และป่าละเมาะใกล้ชายหาดทางภาคตะวันออกของประเทศไทย สำรวจพบครั้งแรกโดยหมอคาร์ ที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี บริเวณใกล้ชายหาด พรรณไม้ชนิดนี้มีใบ ลักษณะพิเศษกว่าพรรณไม้ชนิดอื่นตรงที่ใบของต้นอ่อนหรือใบของกิ่งที่

แตกมาจากต้นที่ถูกตัดยอดจะมีลักษณะคล้ายฝ่ามือ แต่เมื่อเจริญเติบโตมากขึ้นจนถึงช่วงที่เริ่มออกดอกได้ ใบจะเปลี่ยนรูปร่างไปเรื่อยๆ มีลักษณะจักเว้าน้อยลงจนมีลักษณะเหมือนกับใบไม้ทั่วๆไป

ในช่วงเดือนกันยายนถึงธันวาคม จะทยอยออกดอกสีขาวขนาดใหญ่ ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ กลีบดอกบางบิดเวียน และมีกลีบเลี้ยงหนายาวโค้งเรียวส่งกลิ่นหอมอ่อนๆ แต่กลีบดอกบอบบางและช้ำง่าย ดอกบานได้เพียงวันเดียวแล้วร่วงโรยในวันรุ่งขึ้น ดอกที่ร่วงเมื่อแห้งจะมีกลิ่นคล้ายจำปา เป็นพรรณไม้ที่ปลูกเลี้ยงได้ง่าย ทนแล้ง

ลักษณะพรรณไม้

ต้น เป็นไม้ต้นขนาดเล็ก สูง 5-16 ม. แตกกิ่งยาวโค้งอ่อนช้อย กิ่งอ่อนมีขนสีขาวหรือเหลืองอ่อนประปราย กิ่งแก่เกลี้ยง ทรงพุ่มค่อนข้างโปร่งสูงเรียว

ใบ เดี่ยวเรียงสลับ มี 2 แบบ คือใบของต้นอ่อนรูปไข่กว้างหรือเกือบเป็นแผ่นกลม กว้าง 14-18 ซม. ยาว 14-16 ซม. แผ่นใบเว้าเป็นแฉกลึก 5-7 แฉก ใบของต้นแก่มีรูปขอบขนานและมีขนาดเล็กลง

ดอก เดี่ยวออกตามง่ามใบ ดอกมีสีขาว กลิ่นหอมอ่อนๆ กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียวอมน้ำตาล รูปขอบขนาน กว้าง 7-8 มม. ยาว 7-8 ซม. กลีบดอก 5 กลีบ กว้าง 4-5 ซม. ยาว 5-6 ซม. โคนกลีบเรียว กลีบด้านนอกมีขนเป็นแฉกรูปดาวประปราย ด้านในเกลี้ยง

ผล แบบผลแห้งแตก คล้ายผลทุเรียน รูปกระบอกสั้น กว้าง 3-4 ซม. ยาว 5-8 ซม. มีสันคม 5 สัน ผนังผลมีขนสีเหลืองอมน้ำตาล ผลแก่แตกตามรอยสันออกเป็น 5 เสี่ยง มีเมล็ดจำนวนมาก

เมล็ด ด้านบนมีปีกบางใสสีน้ำตาล[10]

วัตถุประสงค์

เพื่อแยกสารสำคัญจากเปลือกต้นลำป้าง ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) มีความรู้ความเข้าใจในวิธีการนำสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay) โดยเฉพาะการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์
2) นำผลที่ได้จากการทดลองไปต่อยอดองค์ความรู้ เกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ แยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรเพื่อหาแนวทางในการพัฒนาเป็นยาสำหรับโรคเบาหวาน
3) ตระหนักในความสำคัญของการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชสมุนไพรไทย และมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานในกลไกด้านอื่นๆเพิ่มเติม เพื่อการค้นพบยาใหม่จากทรัพยากรในประเทศ

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย

Rotary Evaporator	Water bath
Spectrophotometer	TLC tank
Microcentrifuge	Fluorometer
Microplate reader	Incubator 37 ^{o}C
Column chromatography	

วิธีดำเนินการศึกษา

1) คัดเลือกพืชสมุนไพรที่ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งการสร้างสาร AGEs แล้ว พบว่ามีฤทธิ์ดี ได้แก่ ต้นลำป้าง *Pterospermum littorale* Craib วงศ์ Sterculiaceae (ส่วนเปลือกต้น) และทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ บริเวณเกาะแสมสาร จ.ชลบุรี ในปริมาณที่มากเพียงพอที่จะนำมาสกัดแยกสารสำคัญ
2) นำส่วนเปลือกต้นมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดหยาบ
3) นำสมุนไพรแห้งไปแช่หมักในเอทานอลนาน 5 วัน กรอง นำไประเหยแห้งและนำมา partition ด้วยตัวทำละลายต่างๆ แล้วนำไปทำให้แห้งได้สารสกัดหยาบ
4) นำสารสกัดหยาบมาแยก โดยใช้เทคนิคทาง chromatography
5) นำสารสกัดหยาบ และ fraction ที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างสาร AGEs เลือกเฉพาะ fraction ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง มาทำการแยกต่อจนได้สารบริสุทธิ์ ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า Bioassay guided fractionation
6) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาข้อมูลทาง spectrophotometry เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสาร AGEs
7) อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

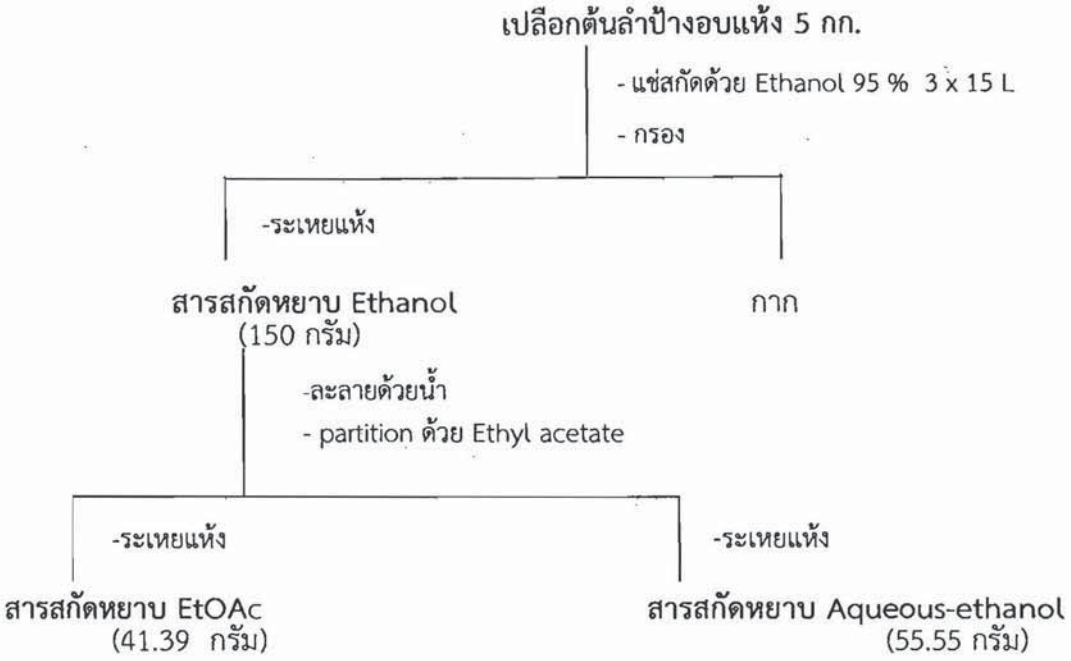
สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

คัดเลือกเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

การสกัดสารจากสมุนไพร

เก็บเปลือกต้นลำป้าง จากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี นำมาทำให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 55 - 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดด้วยเครื่องบดหยาบได้น้ำหนักสมุนไพรแห้ง 5 กิโลกรัม นำสมุนไพรแห้งไปแช่หมักในเอทานอล 95% ครั้งละ 15 ลิตร กรอง และระเหย ทำการสกัด 3 ครั้ง นานครั้งละ 5 วัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยภายใต้ความดันต่ำ ด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้เป็นสารสกัดหยาบ Ethanol น้ำหนัก 150 กรัม และนำสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์มา partition ด้วย ethyl acetate นำทั้งสองส่วนไประเหยให้แห้ง ได้สารสกัดหยาบ ethyl acetate น้ำหนัก 41.39 กรัม และสารสกัดหยาบ Aqueous-ethanol น้ำหนัก 55.55 กรัม



แผนภาพที่1 แสดงการเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นลำป่าง

AGE inhibitor test

	Ethanol ext. 150 g	EtOAc ext. 41.39 g	Aq.- EtOH. ext. 55.55 g
% inhibition :	85.50 %	72.46 %	64.50 %

การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate โดยวิธี Quick column chromatography

นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate น้ำหนัก 30 กรัม มาแยกด้วยวิธี Quick column chromatography โดยใช้ Silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ ใช้ตัวทำละลาย เริ่มต้นด้วย Dichloromethane และ MeOH โดยค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของตัวทำละลาย MeOH เพื่อเพิ่มระดับความมีขั้วของตัวทำละลาย ปริมาตรที่รับ fraction ละ 500มิลลิลิตร แยก fraction ได้จำนวนทั้งสิ้น 25 fraction ดังแสดงในตารางที่ 1

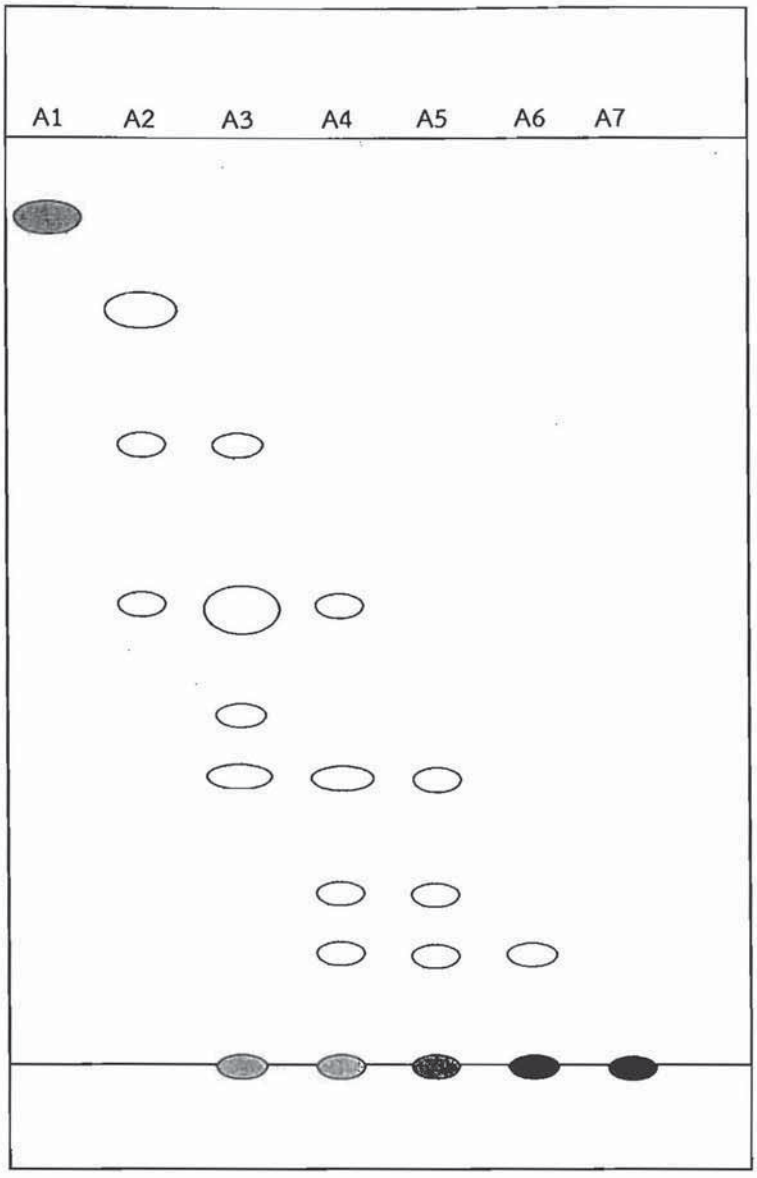
จาก fraction ย่อยทั้ง 55 fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ EtOAc นำมาทำ thin layer chromatography เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบที่มีอยู่ในแต่ละ fraction แล้วรวม fraction ที่มีองค์ประกอบใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 7 fraction (A1-A7) โดยแสดงการรวม fraction และน้ำหนัก ในตารางที่ 2 , แสดง TLC ของfractions ในรูปที่ 1 และspot ในแต่ละ fraction พร้อมค่า Rf ในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 การแยกสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากเปลือกต้นลำป้าง โดยวิธี quick column chromatography

Fraction	ระบบตัวทำละลาย	ปริมาตร (ml)
1-15	100% dichlomethane	7,500
16-24	5% MeOH /dichlomethane	4,500
25-40	10% MeOH / dichlomethane	8,000
41-46	15% MeOH / dichlomethane	3,000
47-52	20% MeOH / dichlomethane	3,000
53-55	100% MeOH	1,500

ตารางที่ 2 Fraction ที่ได้จากการแยกสารสกัดหยาบ EtOAc ด้วย quick column chromatography

Fraction	รวม fraction	น้ำหนัก (กรัม)	% Inhibition
A1	1-18	2.9641	70.47
A2	19-26	2.8781	-
A3	27-34	5.0864	61.83
A4	35-41	6.6850	80.00
A5	42-45	8.8911	79.43
A6	46-49	8.0715	72.50
A7	50-55	1.2698	70.56



ภาพที่ 1 TLC แสดงการแยกสารจาก สารสกัดหยาบ ethyl acetate จากเปลือกต้นลำป้าง ด้วยวิธี quick column chromatography

Solvent system Dichloromethane : MeOH = 8:2

ตารางที่ 3 Fraction และ spot ในแต่ละ fraction พร้อมค่า Rf

Fraction	spot	Rf
A1	A1	0.87
A2	A2-1	0.48
	A2-2	0.62
	A2-3	0.77
A3	A3-1	0.29
	A3-2	0.38
	A3-3	0.48
	A3-4	0.62
A4	A4-1	0.10
	A4-2	0.19
	A4-3	0.29
	A4-4	0.48
A5	A5-1	0.10
	A5-2	0.19
	A5-3	0.27
A6	A6	0.10
A7	A7	0.00

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก Fraction A2

นำ Fraction A2 มาแยกสารต่อโดยการใช้เทคนิค column chromatography ใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย EtOAc ได้ Fraction ย่อย A2-1 ถึง A2-6 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก Fraction A2

Fraction	รวม fraction ย่อย	น้ำหนัก (ก.)
A2-1	1-3	3.193
A2-2	4-6	0.5189
A2-3	7-10	0.4077
A2-4	11-14	0.3087
A2-5	15-17	0.082
A2-6	18-20	0.0622

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก Fraction A3

นำ Fraction A3 มาแยกโดยการผ่าน column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย EtOAc / MeOH ได้ Fraction ย่อย 15 ส่วนคือ A3-1 ถึง A3-15 และร้อยละของฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก Fraction A3 และ% inhibitionการสร้างAGE

Fraction	รวม fraction ย่อย	น้ำหนัก (ก.)	% Inhibition
A3-1	1	0.0439	-
A3-2	2-3	0.0307	-
A3-3	4	0.0513	-
A3-4	5-7	0.1944	-
A3-5	8-11	0.3977	85.43- 90.84
A3-6	12-16	1.3845	83.32
A3-7	17-20	0.4133	-
A3-8	21-24	0.2367	-
A3-9	25-29	0.2520	79.69
A3-10	30-32	0.0962	-
A3-11	33-36	0.1156	-
A3-12	37	0.0618	-
A3-13	38	0.0422	-
A3-14	39-40	0.2522	14.90
A3-15	41-45	0.6139	18.19

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จาก Fraction A4

นำส่วนสกัด A4 (fraction A4) มาแยกเป็นส่วนย่อยๆ ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane/methanol ในอัตราส่วน 4:1 ได้ fraction ย่อยทั้งสิ้น 60 ส่วน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) แล้วสามารถรวม fraction ย่อยที่มีองค์ประกอบแบบเดียวกันเข้าด้วยกันได้เป็น 11 ส่วน ให้รหัสเป็น fraction A4-1 ถึง A4-11 แต่ละ fraction มีน้ำหนักและร้อยละของฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4 และ% inhibitionการสร้างAGE

Fraction	รวมจาก fraction ย่อยที่	น้ำหนัก (กรัม)	% Inhibition
A4-1	2-4	0.4211	54.59
A4-2	5	0.8803	56.00
A4-3	6-7	0.3161	
A4-4	8-10	0.4012	32.44
A4-5	11-14	0.5980	53.10
A4-6	15-17	0.1886	
A4-7	18-22	0.2059	
A4-8	23-25	0.1926	
A4-9	26-29	0.2418	71.28
A4-10	30-51	0.5027	
A4-11	52-60	0.9945	71.06

เมื่อนำส่วนสกัด A4-3 มาแยกต่อโดยการผ่าน gel filtration column ที่มี Sephadex LH-20 เป็น gel filter และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane/methanol ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากตรวจสอบด้วย TLC แล้วสามารถรวมส่วนสกัดย่อยได้เป็น 4 ส่วนคือ ส่วนสกัดย่อย A43-1 ถึง A43-4 โดยจากส่วนสกัดย่อย A43-3 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ PD-1 ปริมาณ 4.1 มิลลิกรัม ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 และร้อยละของฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ดังแสดงในตารางที่ 7

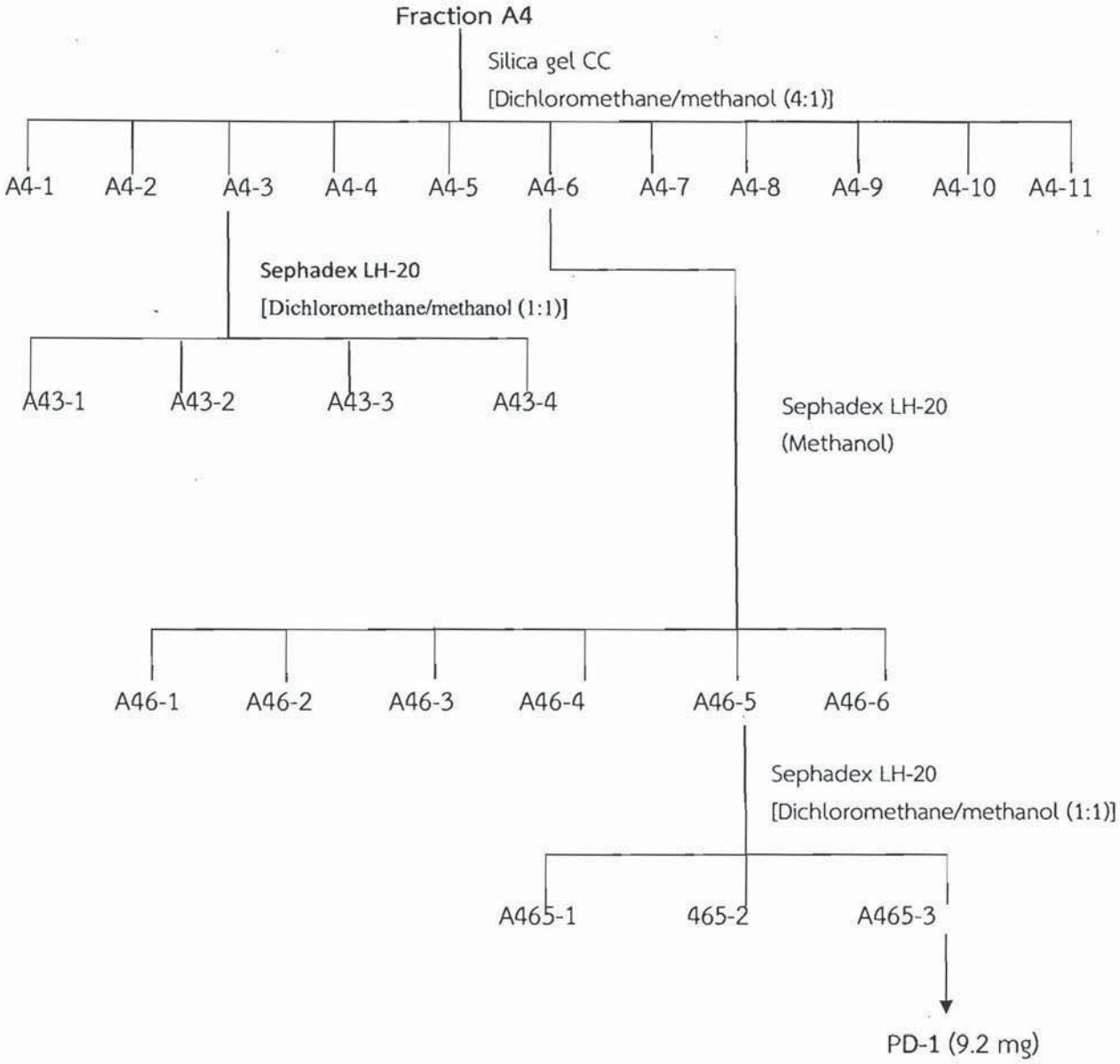
ส่วนสกัด A4-6 ถูกนำมาแยกองค์ประกอบต่อไป โดยการผ่าน Sephadex LH-20 column และชะด้วย methanol ตรวจสอบองค์ประกอบด้วย TLC ได้เป็นส่วนสกัดย่อย 6 ส่วนคือ fraction A461-1 ถึง A46-6 จากนั้นนำ fraction A461-5 มาแยกต่อโดยผ่าน Sephadex LH-20 column ซึ่งชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane/methanol ในอัตราส่วน 1:1 สามารถแยกส่วนสกัดนี้ย่อยออกได้อีก 3 ส่วนคือ fraction A465-1 ถึง A465-3 โดยจาก fraction A465-3 สามารถตกผลึกได้สารบริสุทธิ์ PD-2 ปริมาณ 9.2 มิลลิกรัม ดังแสดงในแผนภาพที่1และร้อยละของฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ดังแสดงในตารางที่8

ตารางที่ 7 Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4-3 และ% inhibitionการสร้างAGE

fraction	A43-1	A43-2	A43-3	A43-4
% Inhibition	25.82	63.19	**56.15**	**37.84**

ตารางที่ 8 Fraction ต่างๆ ที่แยกได้จาก fraction A4-6 และ% inhibitionการสร้างAGE

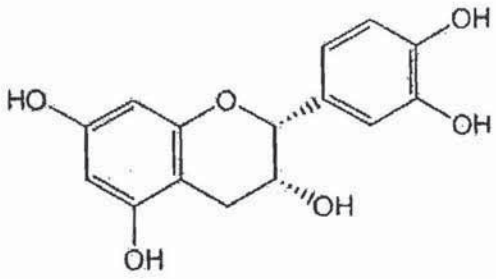
fraction	A46-1	A46-2	A46-3	A46-4	A465-3	A46-6
% Inhibition	**34.70**	**42.93**	**53.29**	**72.33**	71.93	104.07



แผนภาพที่ 2 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์ PD-1 จาก fraction A4

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้

นำสารที่แยกได้ คือสาร PD-1 และ PD-2 นำไปหาข้อมูลทางspectrophotometry ได้แก่ข้อมูล proton และcarbon NMR (nuclear magnetic resonance) พบว่า สาร PD-1 คือสาร (-)-epicatechin มีสูตรโครงสร้างดังนี้



ภาพที่ 2 สูตรโครงสร้างของ สาร (-)-epicatechin

ตารางที่ 9 ข้อมูล ^{1}H-NMR spectra ของสารที่แยกได้ PD-2 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{1}H -NMR spectra ของ (-)-epicatechin ใน literature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

ข้อมูลสารที่แยกได้ PD-1		ข้อมูล (-)-epicatechin ที่ตีพิมพ์
carbon	^{1}H Chemical shift	^{1}H Chemical shift
2	4.80, br s	4.88, br s
3	4.17, br s	4.21, br s
4	2.86, dd, (16.8,4.5) 2.73, dd, (16.8,2.8)	2.87, dd, (16.8,4.6) 2.74, dd, (16.8,3.2)
5	-	-
6	5.93, d, (1.9)	6.02, d, (2.3)
7	-	-
8	5.91, d, (1.9)	5.92, d, (2.3)
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	6.97, br s	7.05, br s
3'	-	-
4'	-	-
5'	6.75, d, (8.6)	6.79, d, (8.1)
6'	6.80, d, (8.6)	6.84, d, (8.1)

Davis และคณะ., 1996[11]

ตารางที่ 10 ข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของสารที่แยกได้ PD-2 เปรียบเทียบกับข้อมูล ^{13}C-NMR spectra ของ (-)-epicatechin ในliterature ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

ข้อมูลสารที่แยกได้ (PD-2)		ข้อมูล (-)-epicatechin ที่ตีพิมพ์
carbon	^{13}C Chemical shift	^{13}C Chemical shift
2	79.9	79.46
3	67.5	66.97
4	29.3	29.01
5	157.4	157.61
6	96.4	96.22
7	158.0	157.60
8	95.9	95.75
9	157.7	157.19
10	100.1	99.85
1'	132.3	132.32
2'	115.3	115.31
3'	146.0	145.42
4'	145.8	145.31
5'	115.9	115.51
6'	119.4	119.41

Davis และคณะ., 1996[11]

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์

จากการนำสารที่แยกได้ PD-1 ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ พบว่าสาร PD-1 มีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของการสร้าง AGE เป็น 71.93 มีค่า IC_{50} เป็น 34.6 µg/ml

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการทบทวนงานวิจัยการสกัดแยกสารสำคัญและการหาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชลำป้าง (*Ptero-spermum littorale* Craib) ยังไม่พบรายงานการวิจัย จึงได้ทบทวนรายงานการวิจัยของพืชในสกุล *Pterospermum* โดยพืชต้นแรกเป็นพืชที่เก็บจากดอยตุง จังหวัดเชียงราย เป็นวิทยานิพนธ์ระดับดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554 ของนางสาวพัชรวรรณ ตันอมาตยรัตน์ เรื่องสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสามเต้าและลำดวนดอย (Bioactive compounds from *Pterospermum grande* Craib and *Mitrephora wangii* Hu.) โดยงานที่เกี่ยวข้องได้แก่งานในส่วนของต้นสามเต้า จากการนำใบสามเต้า (*Pterospermum grande* Craib) มาแยกสารสำคัญ พบว่าได้สาร 7 ชนิด คือ สารกลุ่ม triterpene ได้แก่ taraxerol, taraxerol acetate, simiarenol, สารกลุ่มsteroid ได้แก่ β-sitosterol, สารกลุ่ม flavonoid ได้แก่ kaempferol-3-*o*-β-D-galactopyranoside, kaempferol-3-*o*-β-D-6"(4-hydroxy-*E*-cinnamoyl-)-β-galactopyranoside, และ (-)-epicatechin [12]

ส่วนการวิจัยพืชสกุลนี้ในประเทศอื่น พบว่ามีรายงานการวิจัยของ *Pterospermum acerifolium* Willd. **สารสำคัญที่มีรายงานการแยกจาก<u>ดอก</u>** สารที่แยกได้เป็นสารกลุ่ม flavones ได้แก่ 4'-(2-methoxy-4-(1,2,3-trihydroxypropyl) phenoxy luteolin , 5,7,3'-trihydroxy-6-O-β-D-glucopyranosyl flavones สารกลุ่ม lactone ได้แก่ 3,5-dihydroxyfuran-2(5H)-one [13]

ฤทธิ์ทางชีวภาพของดอก *Pterospermum acerifolium* **Willd. ออกฤทธิ์สร้างกระดูก(osteogenic** activity **โดยใช้** primary cultures osteoblast **ของหนู** rat **พบว่าสารที่แยกได้สามารถกระตุ้น** osteoblast differentiation [12] นอกจากนี้เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ immunomodulatory ใน BALB/c mice พบว่าสารสกัดของพืชนี้มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในการทดลองในหลอดทดลอง *(in vitro)* หลายชนิด เช่น T and B cell proliferation, CD4+ helper (T_H) cells, CD8+ cytotoxic (Tc) cells and CD19+ B cell เป็นต้น จากการทดลองต่างๆนี้ สรุปได้ว่าพืชต้นนี้มีฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกันที่มีฤทธิ์ดี สามารถพัฒนาเป็นวัคซีนหรือสารที่ใช้ในโรคติดเชื้อ และโรคของระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติได้ แต่จะต้องแยกสารสำคัญที่เป็นโมเลกุลเดียว (single molecule) และศึกษาฤทธิ์ของระบบภูมิคุ้มกันก่อน[14]

จากการทบทวนการใช้<u>ใบ</u> *Pterospermum acerifolium* Willd. พบว่ามีการใช้พืชนี้เป็นยาพื้นบ้านของอินเดีย เช่นใช้รักษาโรคเบาหวาน รักษาแผล ต้านอักเสบ แก้ปวด แก้ปวดท้อง แก้ท้องผูก ใช้รักษาโรคเรื้อน ส่วนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น สารสกัดจากใบของพืชนี้ ใช้ในโรคเบาหวาน ลดระดับน้ำตาลในเลือด ในสัตว์ทดลอง(หนู)ที่ทำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 2, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ[15] ยาพื้นบ้านของอินเดียใช้ใบในการบำบัดอาการปวดอักเสบ ผู้วิจัยได้นำสารสกัด petroleum ether ของใบพืชต้นนี้ และสารที่แยกได้ β-sitosterol มาทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบใน carrageenan-induced paw edema model และฤทธิ์ต้านปวด พบว่ามีฤทธิ์ดี [16] นอกจากนี้ยังมีการนำสารสกัดด้วย acetone, ethanol และน้ำ มาศึกษาคุณสมบัติการแย่งจับอนุมูลอิสระ(Free radical scavenging property)หลายวิธี พบว่า สารสกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ดีที่สุด[17]

รายงานการวิจัยของ *Pterospermum heterophyllum* **สารสำคัญที่มีรายงานการแยกจาก<u>ราก</u>**

สารที่แยกได้ คือ taraxerol, betulin, betulinic acid, sumaresinolic acid, 2-methoxy-5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone, 5, 7-dihydroxy-6, 8-dimethylchromone, alpha-monpalmitin, palmitic acid, β-sitosterol, 5-hydroxy-2-methoxy-1,4-naphthoquinone, asperglaucide, 2-methoxy-4-hydroxy phenol-1-O-β-D-apiofuranosyl-(1⟶6)-O-β-D-glucopyranoside, nudiposide, (-)-epicatechin, eriodictyol, taxifolin, quercetin, 3β-hydroxy-urs-12-en-28-olicacid, 2β,3β-dihydroxyolean-12-en-28-olic acid, vanillic acid, cholest-4-en-3-one, และ β-daucosterol [18]

ส่วนสารสำคัญที่มีรายงานการแยกจาก<u>ใบ</u> *Pterospermum lanceaefolium* Roxb คือ (-)-epicatechin, quercertin-3-alpha-L-arabinopyranoside และ lup-20(29)-en-3beta-ol[19] จะเห็นได้ว่าสารสำคัญที่พบในพืชสกุลนี้มีหลายกลุ่ม ได้แก่กลุ่ม triterpene, steroid, flavonoid, fatty acid และ naphthaquinone

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยจากหลายแหล่งพบว่าพืชที่มีสารยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์เป็นพืชที่กระจายอยู่ในวงศ์ต่างๆ และสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์นี้เกี่ยวโยงกับสารกลุ่มที่มี phenolic หรือสาร ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

ตารางที่ 11 ตารางสรุปชื่อพืช วงศ์ สารสำคัญ และค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยethanol

Botanical Name	Family	Plant part	Identified compounds	IC_{50}
Abies balsamea (L.) Mill.	Pinaceae	Bark	Gallocatechin derivatives	34.2 ± 12.5
Alnus incana subsp. Rugosa (Du Roi) R. T.Clausen	Betulaceae	Bark	Oregonins, rubranoside A & B, hirsutanone	N/A
Gaultheria hispidula (L.) Muhl	Ericaceae	Leaf	Chlorogenic acid, (−)-catechin, (+)-epicatechin, taxifolin glycoside, myricitrin, quercetin glycosides	1.5 ± 0.2
Juniperus communis L.	Cupressaceae	Cone	(−)-Catechin, 2 kaempferol glycosides, quercetin glycosides	5.4 ± 1.6
Kalmia angustifolia L.	Ericaceae	Leaf	(+)-Catechin, (−)-epicatechin, myricetin, quercetin glycosides	1.5 ± 0.5
Larix laricina Du Roi (K. Koch)	Pinaceae	Bark	(+)-Catechin, (−)-epicatechin, 2 diterpenes, resin acids, piceatannol Hydroxystilbenes	N/A
Lycopodium clavatum L.	Lycopodiaeae	Whole plant	Ferulic acid derivatives, apigenin derivatives	Inactive
Picea glauca(Moench.) Voss	Pinaceae	Needle	(+)-Catechin, taxifolin, kaempferol, quercetin and isorhamnetin glycosides, hydroxystilbenes, lycopodine	6.2 ± 0.6
Picea mariana (P.Mill) BSP	Pinaceae	Cone	Pungenin, hydroxy- and Hydroxymethoxystilbenes	2.1 ± 0.2
Pinus banksiana Lamb.	Pinaceae	Cone	(+)-Catechin, procyanidin B, taxifolin 1	1.5 ± 0.2
Populus balsamifera L.	Salicaceae	Bark	Salicin, salicortin, salireposide, populoside, rubranoside	21.9 ± 9.7
Rhododendron groenlandicum (Oeder) Kron & Judd	Ericaceae	Leaf	Chlorogenic acid, (+)-catechin, (−)-epicatechin, procyanidins B1, B2, B3, quercetin glycosides, p-coumaric acid	7.0 ± 1.7

Rhododendron tomentosum ssp. subarcticum (Harjama) G.Wallace	Ericaceae	Leaf	Chlorogenic acid, p-coumaric acid, caffeic acid derivatives, (+)-catechin, (−)-epicatechin, taxifolin glycoside, quercetin glycosides, procyanidins B1, B2, B3, Myricetin	1.2 ± 0.4
Salix planifolia Pursh	Salicaceae	Bark	Salicin, isosalireposide derivatives, Tremulacin	0.4 ± 0.2
Sarracenia purpurea L.	Sarraceniaceae	Leaf	Kaempferol, quercetin and cyaniding glycosides, goodyeroside, morronoside	38.6 ± 1.9
Sorbus decora (Sarg.) C. K.Schneid.	Rosaceae	Bark	(+)-Catechin, (−)-epicatechin, uvaol, 24-hydroxyuvaol, beta-amyrin, betulin, 24-hydroxybetulin, betulinic acid	Inactive
Vaccinium vitis-idaea L.	Ericaceae	Fruit	Benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, p-coumaric acid, p-coumaroyl-D-glucose, (+)-catechin, quercetin and cyanidin glycosides	10.8 ± 2.1
Quercetin (positive control)				1.8 ± 0.7

N/A = not applicable;

IC50 concentrations ± SEM were calculated as the amount of extract in μg/mL required to reduce AGE formation by 50% relative to the negative control (maximum glycation) as determined by regression analysis

ตัวอย่างของงานวิจัย ได้แก่ การนำสารสกัดด้วย ethanol ของพืช 17 ต้นจากประเทศCanada มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ พบว่าส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ดี โดยมีค่า IC_{50} จาก 0.4 – 38.6 µg/ โดยมีตารางสรุปชื่อพืช วงศ์ สารสำคัญ และค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยethanol ดังตารางที่ 11[20] ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ เกี่ยวโยงกับปริมาณ phenol ทั้งหมด ฤทธิ์การแย่งจับอนุมูลอิสระ(free radical scavenging activity) จะเห็นได้ว่าสารส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่ม phenol, polyphenol เช่น สารกลุ่ม flavonoids, procyanidins, tannins และglycoside ของสารที่กล่าวข้างต้น

ส่วนสารที่แยกได้จากเปลือกลำป้าง ได้แก่ (-)-epicatechin จัดเป็นสารกลุ่มflavonoid นอกจากนี้สารนี้ยังมีรายงานการพบจากพืชสกุล *Pterospermum* เกือบทุกต้น รวมทั้งมีรายงานการใช้เป็นยาพื้นบ้านในโรคเบาหวาน แต่งานวิจัยนี้เป็นรายงานการมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์เป็นครั้งแรก โดยคาดว่าน่าจะมีความเกี่ยวโยงกับฤทธิ์การแย่งจับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้าน oxidation

ตารางที่ 12 ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ของสารที่แยกได้จากสารสกัดพืช

Metabolite	Fluorescent AGE (IC50)[a]	
	µg/mL	µM
Phenolic acid derivatives		
" gallic acid	0.56 ± 0.08	3.29 ± 0.61
" caffeic acid	1.28 ± 0.37	7.12 ± 2.50
" chlorogenic acid	1.31 ± 0.16	3.69 ± 0.57
Flavonoids		
" taxifolin	0.51 ± 0.06	1.68 ± 0.26
" quercetin	1.69 ± 0.33	5.58 ± 1.08
" quercetirin	3.51 ± 1.37	7.82 ± 3.75
" rutin	4.14 ± 0.37	6.77 ± 0.74
" myricetin	0.86 ± 0.03	2.70 ± 0.12
" catechin	3.15 ± 0.32	10.84 ± 1.11
Procyanidins		
" procyanidin B1	2.18 ± 0.23	3.77 ± 0.48
" procyanidin B2	1.41 ± 0.17	2.43 ± 0.37
Nonphenolic compounds		
" 24-hydroxybetulin	Inactive	–
" morronoside	Inactive	–

[a] IC50 concentrations ± SEM were calculated as the metabolite concentration required to reduce AGE formation by 50% as determined by regression analysis (n = 3)

เอกสารอ้างอิง

1. ธีระ ฤทธิรอด, จินตวี ไชยชุน, สุภาพร น้อยเมล์, ญาณิน ขมะณะรงค์. Sitagliptin ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2. [Homepage on the internet]. กรุงเทพ: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; [updates 2008 Aug; cited 2008 Aug 1] Available from: http://www.doctor.or.th/node/7131
2. วันดี กฤษณพันธุ์, พีรนุช มั่งมีศรี. สมุนไพรลดน้ำตาลในเลือด. วารสารเภสัชกรรมชุมชน 2552, 16–24.
3. นายแพทย์สุรเกียรติ อาชานุภาพ. ตำราการตรวจรักษาโรคทั่วไป 2. กรุงเทพฯ: บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด, พิมพ์ครั้งที่ 4; 2551: 777-91.
4. Ahmed, N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. Diabetes Research and Clinical Practice 2005, 67, 3–21.
5. Hardman J.G., Limbird L.E., et al. (2002). Diabetes Mellitus and Pharmacological effects of Insulin. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10th Edition: 1686 – 1692.
6. Huang H.W., Peng G., Bhavani P.K., Li G.Q., Yamahara J., Roufogalis B.D., Li Y. (2005). Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: Activation of PPAR-γ and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 207:160 – 169.
7. Tsuji-Naito, K., Saeki, H., Hamano, M. Inhibitory effects of Chrysanthemum species extracts on formation of advanced glycation end products. Food Chemistry 2009, 116, 854–9.
8. Jung, H.A., Jung, Y.J., Yoon, N.Y., Jeong, D.M., Bae, H.J., Kim, D.W., Na, D.H., Choi, J.S. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase, advanced glycation end products formation, and oxidative stress. Food and Chemical Toxicology 2008, 46, 3818–26.
9. Kim, H.Y., Kim, K. Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts in vitro. J. Agric. Food Chem. 2003, 51(6), 1586–91.
10. บริษัท กสท โทรคมนาคม จำกัด (มหาชน). 84 พรรณไม้ ถวายในหลวง กรุงเทพฯ: บริษัท เปรียว จำกัด (พริ้นติ้ง) , พิมพ์ครั้งที่ 1; 2554.
11. Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P., and Lewis, J.R. ^{1}H and ^{13}C NMR assignments of some green tea polyphenols. Magn. Reson.Chem., 1996, 34, 887-890.
12. พัชรวรรณ ตันอมาตยรัตน์ สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสามเต้าและลำดวนดอย วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2554
13. Dixit, P., Khan, M.P., Swarnkar, G., Chattopadhyay, N. and Maurya, R. Osteogenic constituents from *Pterospermum acerifolium* Willd. Flowers. Bioorg.Med.Chem.Lett. 2011, 21(15), 4617-4621.
14. Soni, V.K., Dixit, P., Bano, N., Kumar, P. et al. Relative immune modifier activities of *Pterospermum acerifolium*, *Murraya koenigii* and Withania coagulans in BALB/C mouse. Int.J.of Pharm.&Pharm.Sci. 2011, 3(5), ISSN-0975-1491.

15. Chatterjee, P., Chakraborty, B., Nandy, S., Dwivedi, A. and Datta, R. *Pterospermum acerifolium* Linn. : A comprehensive review with significant pharmacological activities. Int.J.of Pharm.&Life Sci. 2012, 3(2), ISSN-0976-7126.
16. Bhalke, R.D. and Pal, S.C. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Pterospermum acerifolium* leaves. Asian J. Pharm. Clin. Res. 2012, 5(2),ISSN-0974-2441
17. Saboo, S., Tapadiya, R., Khadabadi, S.S. and Deokate, U.A. In vitro antioxidant activity and total phenolic, flavonoid contents of the crude extracts of *Pterospermum acerifolium* wild leaves (Sterculiaceae). J.Chem.Pharm.Res., 2010, 2(3), 417-423.
18. Shi, Y., Li, H.Y., Cui, B.S. and Yuan, Y. Studies on chemical constituents from roots of *Pterospermum* heterophyllum. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2008, 33(16), 1994-1996.
19. Yongli, Z., Sujun, Y., Jingyu, S. and Longmei, Z. Studies on the chemical constituents from the leaves of *Pterospermum lanceaefolium* Roxb. Nat.Prod.Res.Dev. 1998, 10(2), 15-18.
20. Haris, C.S., Beaulieu, L.-P., Fraser, M.-H., Mcintyre, K.L., Owen, P.L., Martineau, L.C., Cuerrier, A., Johns, T., Haddad, P.S., Bennett, S.A.L., and Amason, J.T. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. Planta Med., 2011, 77, 196-204.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง สุรัตนา อำนวยผล
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Surattana Amnuoypol
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 00319 79 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   ภาควิชา เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทรศัพท์ 02-2188358
   โทรสาร 02-2188357
   e-mail : asuratta@chula.ac.th
1. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ภบ.	เภสัชศาสตร์	2521
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ภม.	เภสัชเวท	2524
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วท.ด.	เคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ พฤกษเคมี
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α – Glucosidase งบแผ่นดินปี 2553
2. การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α – Glucosidase งบแผ่นดินปี 2554
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ งบแผ่นดินปี 2555
4. การแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งการสร้างแอดวานซ์ไกลเคชันเอ็นด์โปรดักส์ งบแผ่นดินปี 2556
5. โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คลัสเตอร์ สุขภาพ สับคลัสเตอร์ เรื่อง ฐานงานประเมินที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อมุ่งเป้าหาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพืชสมุนไพร งบแผ่นดินปี 2554 - 2556

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

การคัดกรองและการแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเบาหวาน ในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่อง จากพระราชดำริฯ โดยการวัดฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ α – Glucosidase เผยแพร่ในการประชุมวิชาการชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการอพ.สธ. ครั้งที่ 5 "ทรัพยากรไทย: ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่นใจ" 3 พย. พ.ศ. 2554 จ.นครราชสีมา ทุนโครงการอพ.สธ.จฬ. ปี2552-2554

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.4.1 ฐานงานประเมินที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อมุ่งเป้าหาสารที่มีฤทธิ์ทางยาจากพืชสมุนไพร ทุนโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2554 – 2556

8. **ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่**

Publications:

1. Suwanchaikasem, P., Chaichantipyuth, C., **Amnuoypol, S.** and Sukrong, S. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Thunbergia laurifolia* Lindl. And its related species. *J.Med.Plants Res.*, 6(15), 2955-2964, 2012.

2. Daikuhara, N., Tada, Y., Yamaki, S.,Charupant, K., **Amnuoypol, S.**, Suwanborirux, K., and Saito, N. Chemistry of renieramycins. Part 7: Renieramycin T and U, novel renieramycin-ecteinascidin hybrid marine natural products from Thai sponge Xestospongia sp. *Tetrahedron Letters*, 50, 4276-4278, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

3. Charupant, K., Daikuhara, N., Saito, E., **Amnuoypol, S.,** Suwanborirux, K., Owa, T. and Saito, N. Chemistry of renieramycins. Part 8: Synthsis and cytotoxicity evaluation of renieramycin M-jorunnamycin A analogues. *Bioorg. & Med. Chem.*, 17, 4548-4558, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

4. Wirotesangthong, M., Nagai, T., Yamada, H., **Amnuoypol, S.,** Mungmee, C. Effect of Clinacanthus siamensis Leaf Extract on Influenza Virus Infection. *Microbiol. Immuno.*, 53(2), 66-74, 2009. ผู้ร่วมวิจัย

5. Charupant K., Suwanborirux K., **Amnuoypol S,** Saito, E., Kubo A., and Saito N., Jorunnamycins A-C, New Stabilized Renieramycin-Type Bistetrahydroisoquinolines Isolated from the Thai Nudibranch *Jorunna funebris*. *Chem. Pharm. Bull.*, 55(1), 81-86, 2007 ผู้ร่วมวิจัย

6. Puthongking P., Patarapanich C., **Amnuoypol, S.**, Suwanborirux K., Kubo A., and Saito N. Chemistry of Ecteinascidins. Part 2. Preparation of 6'-O-Acyl Derivatives of the stable Ecteinascidins and Evaluation of Antitumor Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 54(7), 1010-1016, 2006. ผู้ร่วมวิจัย

7. Saito, N., Tanaka, C., Koizumi, Y., Suwanborirux, K., **Amnuoypol, S.**, Pummangura, S., and Kubo, A. Chemistry of Renieramycins. Part 6. Transformation of Renieramycin M into

Jorumycin and Renieramycin J Including Oxidative Degradation Products, Mimosamycin, Renierone, and Renierol Acetate. *Tetrahedron*, 60, 3873-3881, 2004. ผู้ร่วมวิจัย

8. **Amnuoypol, S.**, Suwanborirux, K., Pummangura, S., Kubo, A, Tanaka, C., and Saito N. Chemistry of Renieramycins. Part 5. Structure Elucidation of Renieramycin-Type Derivatives O, Q, R, and S, from Thai Marine Sponge Xestospongia Species Pretreated with Potassium Cyanide. J. Nat. Prod, 67, 1023-1027., 2004. ผู้ร่วมวิจัย

9. Suwanborirux K., **Amnuoypol S.**, Plubrukarn A., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C. and Saito N. Chemistry of Renieramycins. Part 3. Isolation and Structure of Stabilized Renieramycin Type Derivatives Possessing Antitumor Activity from Thai Sponge, Xestospongia Species, Pretreated with Potassium Cyanide. J. Nat. Prod., 66, 1441-1446, 2003. ผู้ร่วมวิจัย

10. Saito N., Koizumi Y., Tanaka C., Suwanborirux K., **Amnuoypol S.** and Kubo A. Chemistry of Antitumor Isoquinolinequinone Alkaloids: Unexpected Oxidative Degradation of Saframycin S to Generate Simple Isoquinoline Alkaloids, Mimosamycin and Mimocin. Heterocycles, 61, 79-86, 2003. ผู้ร่วมวิจัย

11. Suwanborirux K., Charupant K, **Amnuoypol S**, Pummangura S, Kubo A, and Saito N. Ecteinascidins 770 and 786 from the Thai Tunicate Ecteinascidia thurstoni. J. Nat. Prod., 65, 935-937, 2002. ผู้ร่วมวิจัย