รายงานการวิจัย

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว และคณะ

ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย

บทคัดย่อ

บทนำ: ในตำรายาแผนโบราณได้มีการนำเหง้าไพล *Zingiber cassumunar* Roxb. มาร่วมใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องการอักเสบรวมทั้งโรคหืด

วัตถุประสงค์: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตยาไพลในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับภูมิแพ้และโรคหืด พร้อมทั้งมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเป็นพิษต่อ DNAเซลล์ และในสัตว์ทดลอง การต้านการอักเสบนอกกายและในสัตว์ทดลอง ตลอดจนการออกฤทธิ์ในการรักษาโรคและข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์

วัสดุและวิธีการ: ทำการแยกสารสำคัญโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี (chromatographic method) และตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopic method) ทำการวัดการเกิดความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดไพลและสาร D ในเซลล์ตับ เซลล์บุผนังทางเดินหายใจ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และวัดผลของสารสกัดและสาร D ต่อการคัดหลั่ง β-hexosaminidase TNF-α และ cysteinyl leukotriens จากเซลล์มาสต์หนู นอกจากนั้นยังศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อการสร้างมิวซินทั้งหมดและระดับของ MUC-2 และ MUC5AC ในเซลล์บุทางเดินหายใจมนุษย์

ทำการเตรียมแกรนูลไพลซึ่งมีสารสกัดไพลมาตรฐาน 100 มิลลิกรัมในแกรนูลไพล 580 มิลลิกรัม แล้วศึกษาความเป็นพิษของแกรนูลไพลต่อ DNA และโครโมโซมของเซลล์มนุษย์โดยวิธี micronucleus test และ karyotyping รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรังในหนูขาว ทำการทดสอบผลของการทายาเตรียมไพลที่มีแกรนูลไพลเป็นส่วนประกอบต่อการอักเสบของหูหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย ethyl phenylpropiolate (EPP)-induced หรือ arachidonic acid (AA) รวมทั้งผลของการกินยาเตรียมไพลต่อการอักเสบด้วยการฉีด carrageenan ที่อุ้งเท้าหนูขาว และการก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในแบบจำลองการเกิด granuloma ด้วยการใส่ก้อนสำลีในช่องท้องหนู และศึกษาผลของยาเตรียมไพลในการต้านผลการหดเกร็งของหลอดลมอันเนื่องจากการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีนในหนูตะเภาทั้งในแบบนอกกายและในกาย

โครงการวิจัยนี้สามารถผลิตแคปซูลไพลที่มีสารสกัดไพลมาตรฐาน 100 มิลลิกรัมหรือเทียบเท่ากับสาร D 3.12 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ไพลดังกล่าวมีความคงตัวได้นาน 2 ปี ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาไพลได้ให้อาสาสมัคร 5 คนได้รับยาไพลแคปซูลขนาด 250 มก. (สาร D 8 มก.) ทีเดียวจำนวน 8 เม็ดแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะในช่วงเวลาต่างๆเป็นเวลารวม 24 ชั่วโมง และตรวจปริมาณสาร Dในตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนั้นยังทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในหนู ซึ่งกระทำโดยให้หนูขาวได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานทางหลอดเลือดในขนาด 25 มก./กก. ของน้ำหนักตัวหนูหรือทางปากในขนาด 1-10 มก. ต่อ กก.น้ำหนักตัว แล้วทำการตรวจวัดสารD ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะหลังได้รับสารสกัดไพล 48 ชั่วโมง รวมทั้งวัดปริมาณสาร D ในอวัยวะต่างๆเพื่อศึกษาการกระจายของสารนี้ในร่างกาย นอกจากนั้นยังทำการศึกษาแบบสลับการรักษา

(Prospective cross over study) ในผู้ป่วยโรคเยื่อบุจมูกอักเสบจากภูมิแพ้จำนวน 20 ราย โดยอาสาสมัครจะได้รับยาทั้ง 2 ชนิด คือ ยาไพลและยา Loratidine โดยเว้นช่วงระหว่างการได้รับยา 1 สัปดาห์ ศึกษาฤทธิ์ต้านฮิสตะมีนโดยการตรวจทดสอบทางผิวหนังด้วยน้ำยาสารฮิสตะมีนและสารก่อภูมิแพ้ระบบทางเดินหายใจ ที่พบบ่อย (ไรฝุ่น,แมลงสาบ, เกสรหญ้า, ขนแมว, รังแคสุนัข) ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการรับประทานยาแต่ละชนิด

ผลการวิจัย เราสามารถสกัดได้สารที่เคยมีรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดไพลมาตรฐานและตรวจยืนยันโครงสร้างทางเคมีจาก IR and ^{1}H NMR spectra ได้ 4 ชนิดคือ สารประเภทฟีนิลบิวทีนอยด์ (phenylbutenoids) 2 ชนิด คือ (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate (สาร B′)และ (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (สาร D) และ สารประเภทอนุพันธ์ของไซโคลเฮกซีน (cyclohexene derivatives) 2 ชนิด ได้แก่ *cis*-3-(3′,4′-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (สาร C′) และ *cis*-3-(2′,4′,5′-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (สาร C) สารสกัดไพลและสารD ไม่เป็นผลต่อเซลล์ตับ เยื่อบุทางเดินหายใจและไฟโบรบลาสต์ สารดังกล่าวสามารถลดการคัดหลั่ง β-hexosaminidase TNF-α และ cysteinyl leukotriens จากเซลล์มาสต์หนู และสามารถยับยั้งการสร้างมิวซินทั้งหมดและระดับของ MUC-2 และ MUC5AC ในเซลล์บุทางเดินหานใจ แกรนูลไพลขนาด 5-20μg/mlไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อโครโมโซมของเซลล์ตับมนุษย์ การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันไม่พบความผิดปกติใดๆจากป้อนแกรนูลไพลครั้งเดียวในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนูขาวและไม่พบความผิดปกติใดๆในการให้หนูได้รับแกรนูลไพลโดยการป้อน ขนาด 0.3- 1,125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากทุกวันเป็นเวลา 270 วันและ 28 วันภายหลังจากได้รับไพลไป 270 วัน (กลุ่มทดลองแบบติดตามผล, satellite)

การศึกษาผลต้านการอักเสบในหนูขาวพบว่าการทายาเตรียมไพลขนาด 4 มก./ใบหูสามารถลดการอักเสบที่เกิดจาก EPP หรือ AA ได้ และมีผลยับยังการอักเสบอุ้งเท้าจากการกระตุ้นด้วย carrageen เมื่อหนูกินยาเตรียมไพล 150 - 600 มก./กก.น้ำหนักตัวหนู อย่างไรก็ตามพบว่ายาเตรียมไพลที่ความเข้มข้น 300 มก./กก.น้ำหนักตัวหนูไม่มีผลต้านการอักเสบเรื้อรังในแบบจำลอง granuloma ยาเตรียมไพลขนาด 0.1-1 มก./มล.มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดลมหนูตะเภานอกกาย ในขณะที่สารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10-120 มก./กก.ให้ผลลดการหดเกร็งของหลอดลมในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน

การศึกษาในคนพบว่าไม่สามารถตรวจพบสาร D ในเลือดของอาสาสมัครที่ได้รับยาไพลแคปซูล 4-8 แคปซูลไป 24 ชั่วโมง แต่สามารถพบสารนี้ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครในความเข้มข้น 0.23-1.97 ng/ml โดยมี % recovery เท่ากับ 0.29-2.47% การศึกษาในหนูพบว่ามีการดูดซึมได้รวดเร็ว และสาร D มีการกระจายและสะสม

ในอวัยวะต่างๆ 1-1000 เท่า ภายในเวลา 1-4 ชม.ภายหลังได้รับยาทางปาก โดยพบสาร D สะสมมากในกระเพาะอาหาร หลอดลม สมอง ม้าม และปอด และพบว่าสาร D ถูกขับมาทางอุจจาระในเวลา 0-48 ชม.เมื่อได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานทางปากหรือหลอดเลือด ยาไพลสามารถยับยั้งปฏิกิริยา wheal ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน โดยมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ 6 ชม. และยับยั้งขนาดของ wheal ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไรฝุ่นสูงสุดที่ 4 ชม. แต่เมื่อเปรียบเทียบพบว่ายา Loratadine มีคุณสมบัติในการยับยั้งได้มากกว่ายาไพลแคปซูลทั้งจากการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน และ ไรฝุ่น

บทสรุป การวิจัยนี้พบว่าสารสกัดไพลและสารDไม่มีพิษต่อ chromosome และ เซลล์มนุษย์ สารสกัดไพลและสาร D มีผลยับยั้งการสร้างตัวกลางการอักเสบจากเซลล์มาสต์ที่ถูกกระตุ้น และสามารถลดการสร้างมิวซินจากเซลล์บุผนังทางเดินหายใจมนุษย์ สารสกัดไพลสามารถยับยั้งการอักเสบในหนูและทำให้หลอดลมคลายตัวได้ และสารสกัดไพลที่เตรียมจากโครงการนี้ไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรังในหนู การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในหนูพบว่าสารD มีการดูดซึมที่รวดเร็วและแพร่กระจายไปสะสมในอวัยวะต่างๆได้ 1-1000 เท่า ภายใน 1-4 ชม. การได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานเข้มข้น 200 มิลลิกรัมในรูปยาแคปซูลไพลมีผลยับยั้งการเกิดรอยนูนแดงบนผิวหนังของอาสาสมัครที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีนและไรฝุ่น

กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund

Abstract

Background: Rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. (Phlai in Thai) has been used in traditional medicine for controlling diverse inflammatory diseases including asthma.

Aims: The objective of this study was to prepare a drug containing Phlai constituents for treatments of allergic airway inflammation. Anti-inflammatory activities of the standardized Phlai extract were studied *in vitro* and *in vivo* in the present study. Toxicity and therapeutic properties of the drug were also evaluated.

Materials and Methods: The isolation of the marker compounds (such as compound D) was performed by chromatogarphic method. The effect of the Standardized Phlai Extract (SPE) on the cell viability was determined. Inhibitory effects of SPE on degranulation, TNF-α production and cysteinyl leukotriens release were carry out in rat mast cells. Effects of the SPE on mucin production in human airway epithelial cells were also investigated in this study. Phlai granules (PGs)were prepared and 580 mg of PGs contained 100 mg of SPE.Anti-inflammatory effect of Phlai granules was evaluated for its anti-inflammatory activity in rats using ethyl phenylpropiolate (EPP)-induced and arachidonic acid (AA)-induced ear edema, carrageenan-induced paw edema as well as cotton pellet-induced granuloma models. Effects of the extract on contractile responses in the histamine-stimulated isolated guinea pig trachea was also investigated. Genotoxicity of Phlai granules was determined using the micronucleus test and karyotyping. Acute and chronic toxicities of SPE were conducted in rats.

Phlai capsules were successfully prepared from the standardized Phlai extract. One capsule of the drug contained 100 mg of the Phlai extract which was equivalent to 3.12 mg of compound D. Pharmacological studies were performed in human and rats. Five healthy volunteers received orally of 8 Phlai capsules (8 mg compound D). Blood samples an d urine were collected. Clinical chemistry was measured from the blood samples. The concentration of compound D in blood and urine samples was determined using LC-MS. Phlai graules were administered either intravenously 1 mg/kg or by oral gavage 1- 10 mg/kg to rats. The concentration of compound D in blood, urine and tissue homogenates was determined.

To evaluate pharmacological properties of Phlai capsules, a randomized two-way cross-over study with a wash out of 1 week between periods was carried out in allergic rhinitis (AR) patients. 20 AR patients were enrolled per group. Skin prick test for 5 common aeroallergens (mite, cockroach, grass, dog, cat) were performed. One group of patients received Phlai capsules (8 mg), and the other group received 10 mg loratadine.

Inhibition of wheal and flare response to skin prick test to histamine and aeroallergen were measured at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after doses. After a washout period of 1 week, the treatments were reversed.

Results: Five known bioactive compounds were isolated however the structures of four bioactive compounds were comfirmed. IR and ^{1}H NMR spectra revealed two phenylbutenoids : (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate (compound B′) and (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (compound D) and two cyclohexene derivatives *cis*-3-(3′,4′-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (compound C′) and *cis*-3-(2′,4′,5′-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (compound C). There is no cytotoxicity of the crud Phlai extract and compound D on certain human cells. SPE and compound D decreases expression of mast cell-specific mediators *in vitro*. They also inhibit mucin gene expression and production of mucin protein, by directly acting on airway epithelial cells.

PGs at 5-20 μg/ml could not induce genotoxic effects on human hepatic cells. PGs had no acute and chronic toxic effects on rats after oral administration of SPE for 14 days and 270 days, respectively. PGs at 4 mg/ear exhibited anti-inflammatory effect on EPP or AA-induced ear edema. Oral administration of PGs at the doses of 150 - 600 mg/kg caused dose-dependent inhibition of carrageenan-induced rat paw edema. PGs at 0.1-1 mg/ml inhibited histamine-induced tracheal contraction *in vitro*. PGs at 10-120 mg/kg of body weight also suppressed the bronchoconstriction action of histamine in pentobarbital anesthetized guinea pigs.

Phlai capsules were successfully prepared from SPE. One capsule of the drug contained 100 mg of SPE which was equivalent to 3.12 mg of compound D. There was no abnormality values in blood chemistry in all volunteers after taking Phlai capsules. A negligible amount of compound D was found in human blood samples after receiving 8 Phlai capsules for 1-24 h. This implies that compound D was rapidly absorbed and eliminated from plasma. However, compound D at the concentrations of 0.23-1.97 ng/ml were found in urine samples. The recovery of this compound in urine was in the range of 0.29-2.47%. A similar rapid absorption was also found in rats. Compound D exerted excellent tissue distribution with ranging from 1 to 1,000 folds in several organs after oral dosing for 1-4 h. Compound D distributed to all examined tissues with the highest concentrations found in the stomach followed by the trachea, brain, spleen and lung after oral administration this compound for 4 h. The unchanged Compound D was also detected in feces from 0-48 h after dosing, but the level was very low in both oral and intravenous route. Phlai capsules inhibited the wheal induced by histamine with peak effect

at 6 h in AR patients. However, Loratadine obviously i inhibited the mite-induced wheal compared to that of Phlai capsules. Both drugs were well-tolerated with no adverse events.

Conclusions: Phlai capsules were successly prepared from standardized Phlai extract. They rapidly absorbed into tissues and excreted via urine. Human and animal studies revealed anti-histamine properties of the drug. Phlai contains certain active substances including compound D. Phlai had no cytoxic and genotoxic effects on human cell lines. There was no acute and chronic toxicity of Phlai in rats.

กองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย
Thai Traditional Medical Knowledge Fund

โครงการวิจัยที่ 1

การเตรียมสารสำคัญจากไพลและการทดสอบคุณสมบัติต้านการอักเสบนอกกาย

Preparation of marker compounds and anti-inflammatory effects of *Zingiber cassumunar* Roxb. (Phlai)

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว* ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา*

นภาพร พัฒนาเจริญชัย * ลัดดา มีสุข*

เพาพงา มณฑพิศุทธิ์* วิสาขา อุปพงค์ *

ธนากร อินทชาติ* บุญเอก ยิ่งยงณรงค์ กุล**

อานิตย์ ไทนลักษณ์ * บดินทร์ ชิตกุล**

* คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์ ในตำรายาแผนโบราณได้มีการนำเหง้าไพล *Zingiber cassumunar* Roxb. มาใช้รักษาโรคที่เกี่ยวข้องการอักเสบรวมทั้งโรคหืด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ประการแรกคือ เพื่อแยกสารสำคัญบางชนิดที่เคยพบว่าเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเหง้าไพล เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและยาเตรียมจากไพล รวมทั้งเพื่อใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้วย นอกจากนั้นได้มีการทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ และ ทดสอบคุณสมบัติของสารที่แยกได้บางชนิดในการต้านการอักเสบนอกกาย

วิธีการ ทำการแยกสารสำคัญโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี (chromatographic method) และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopic method) ทำการวัดการเกิดความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดไพลและสาร D ในเซลล์ตับ เซลล์บุผนังทางเดินหายใจ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์มนุษย์ และวัดผลของสารสกัดและสาร D ต่อการคัดหลั่ง β-hexosaminidase TNF-α และ cysteinyl leukotriens จากเซลล์มาสต์หนู (RBL-2H3) ที่กระตุ้นด้วย Ca ionophore (A23187) นอกจากนั้นยังศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อการสร้างมิวซินทั้งหมดและระดับของ MUC-2 และ MUC5AC ในเซลล์บุทางเดินหายใจมนุษย์ (NCI-H292) ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ทั้งในระดับgene และการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี RT-PCR และ ELISA ตามลำดับ

ผลการวิจัยได้สารที่เคยมีรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดด้วยเอทานอล (ethanol extract) 5 ชนิด แต่สามารถตรวจยืนยันโครงสร้างทางเคมีจาก IR and ^{1}H NMR spectra ได้ 4 ชนิดคือ สารประเภทฟีนิลบิวทีนอยด์ (phenylbutenoids) 2 ชนิด คือ (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate (สาร B′)และ (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (สาร D) และ สารประเภทอนุพันธ์ของไซโคลเฮกซีน (cyclohexene derivatives) 2ชนิด ได้แก่ *cis*-3-(3′,4′-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (สาร C′)และ *cis*-3-(2′,4′,5′-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (สาร C) สารสกัดไพลและสารD ไม่มีผลต่อเซลล์ตับ เยื่อบุทางเดินหายใจและไฟโบรบลาสต์อย่างเด่นชัด สารดังกล่าวสามารถลดการคัดหลั่ง β-hexosaminidase TNF-α และ cysteinyl leukotriens จากเซลล์RBL-2H3 ที่ถูกกระตุ้นด้วย A23187 และพบว่าสารสกัดไพลสามารถยับยั้งการสร้างมิวซินทั้งหมดและระดับของ MUC-2 และ MUC5AC ในเซลล์ NCI-H292 ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA ทั้งในระดับgene และโปรตีน

บทสรุป การวิจัยนี้พบว่าสารสกัดไพลและสารDไม่มีพิษต่อเซลล์มนุษย์อย่างเด่นชัด สารสกัดไพลและสาร D มีผลยับยั้งการสร้างตัวกลางการอักเสบจากเซลล์มาสต์ที่ถูกกระตุ้น และสามารถลดการสร้างมิวซินจากเซลล์บุผนังทางเดินหายใจมนุษย์ทั้งในระดับ gene และโปรตีน

Abstract

Background and aim: Rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. (Phlai in Thai) has been used in traditional medicine for controlling diverse inflammatory diseases including asthma. The objective of this study was to isolate known bioactive constituents from the rhizomes of *Z. cassumunar*. The isolated compounds were used as the markers for the quality control of raw materials and drug preparation from Phlai. Cytotoxicity and anti-inflammatory activities of the crude extract and certain isolates were also studied *in vitro* in the present study.

Methods: The isolation of the marker compounds was performed by chromatogarphic method and the structure determination of all isolates was accomplished by the spectroscopic method. The effect of crude Phlai extracts and compound D on the cell viability of human liver cells, human airway epithelial cells and human fibroblasts was determined using the MTT assay. Effects of the test substances on β-hexosaminidase release and inflammatory mediators in Ca ionophore (A23187) -stimulated rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3 were investigated. The level of TNF-α and cysteinyl leukotriens was determined using ELISA. In addition, effects of the crude Phlai on mucin production in human airway epithelial cells (NCI-H292) were also investigated in this study. Total mucin, MUC2 and MUC5A were measured using ELLA. The levels of *MUC2* and *MUC5AC* mRNA were determined using RT-PCR.

Results: Five known bioactive compounds were isolated however the structures of four bioactive compounds were comfirmed. IR and ^{1}H NMR spectra revealed two phenylbutenoids : (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-yl acetate (compound B′) and (*E*)-4-(3′,4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (compound D) and two cyclohexene derivatives *cis*-3-(3′,4′-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (compound C′) and *cis*-3-(2′,4′,5′-trimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-2′′′,4′′′,5′′′-trimethoxystyryl] cyclohex-1-ene (compound C). The crude Phlai and compound D had no obvious effect on human liver cells, human airway epithelial cells and human fibroblasts. The crude Phlai extract and compound D inhibited the release of, hexosaminidase, TNF-α and cysteinyl leukotrienes in A23187-stimulated RBL-2H3 cells. The crude Phlai extract also suppressed total mucin production, including MUC2 and MUC5AC mRNA and proteins induced by PMA in NCI H292 cells.

Conclusion: There is no cytotoxicity of the crud Phlai extract and compound D on certain human cells. The crude Phlai extract and compound D decreases expression of mast cell-specific mediators *in vitro*. They also inhibit mucin gene expression and production of mucin protein, by directly acting on airway epithelial cells.

โครงการวิจัยที่ 2

การเตรียมยาไพลจากสารสกัดไพลมาตรฐาน

Drug preparation from standardized Phlai extract (SPE)

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

วีณา จิรัจฉริยากูล *

ฤดี เสาวคนธ์ **

ประคองศิริ บุญคง ***

* คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

*** ศูนย์พัฒนายาไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ไพลเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับการอักเสบรวมทั้งโรคหืดในตำรายาไทยโบราณ การวิจัยมีความประสงค์ในการผลิตแกรนูลและยาจากสารสกัดไพลรวมทั้งศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

วัสดุและวิธีการ: ในการสกัดสารสกัดไพลมาตรฐานนั้นใช้ (*E*)-4-(3′, 4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol) (สาร D) เป็นสารที่แสดงฤทธิ์เฉพาะหรือสารเทียบเฉพาะ วัตถุดิบเหง้าไพลได้รับการยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ผ่านการตรวจการปนเปื้อนสารพิษตกค้าง ได้แก่ยาฆ่าแมลงและโลหะหนัก รวมทั้งแบคทีเรียที่เป็นอันตรายบางชนิด วัตถุดิบไพลได้ผ่านการกำจัดสารที่ระเหยก่อนนำมาสกัด ทำการเตรียมสารสกัดไพลมาตรฐานโดยวิธีหมักผงเหง้าไพลด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ทำการวัดปริมาณสาร Dโดยวิธี HPLC การควบคุมคุณภาพสารสกัดไพลกระทำโดยพิจารณาจาก drug-extract ratio chromatogram finger print และปริมาณสาร D ทำการพัฒนาสูตรแกรนูลไพลจากสารสกัดไพลมาตรฐานเพื่อทำการศึกษาความเป็นพิษ และผลิตยาไพลในรูปแคปซูลเพื่อการวิจัยทางคลินิกภายใต้สภาวะ GMP นอกจากนั้นได้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดไพลและแคปซูลไพลที่อุณหภูมิห้องนาน 12 เดือนและที่สภาวะเร่ง (45°C, ความชื้นสัมพัทธ์ 75%) นาน 3-6 เดือน

ผลการทดลอง: การทดลองนี้ไม่พบสารในกลุ่ม carbonate, organochroline, organophosphate และpyrethroid ในเหง้าไพล และไม่พบโลหะหนักและแบคทีเรียชนิด *Eschorichia coli, Samonella spp., Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* and *Clostridium spp* ในเหง้าไพลตัวอย่าง โดยมีค่า drug-extract ratio เท่ากับ 11:1 ซึ่งหมายความว่าสามารถเตรียมสารสกัดไพล 1 กรัมจากเหง้าไพลหนัก 11 กรัม และสามารถตรวจพบสาร D จากสารสกัดไพลมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4.93% การศึกษาความคงตัวของแกรนูลไพลที่อุณหภูมิห้องและสภาวะเร่งพบมีการเปลี่ยนแปลงความชื้น 1.8% และแคปซูลไพลมีสารสกัดไพลมาตรฐาน 100 มิลลิกรัม ซึ่งเทียบเท่ากับสาร D 3.12 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ไพลดังกล่าวมีความคงตัวได้นาน 2 ปี

บทสรุป: การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถผลิตแกรนูลและยาไพลแคปซูลจากสารสกัดไพลมาตรฐานที่มีคุณภาพและมีความคงตัว และพบว่ายานี้มีความเสถียร 2 ปี

Abstract

Background and aim: The folklore of Thailand widely use *Zingiber cassumunar* Roxb (Phlai) for inflammatory and asthma treatments. The aims of this research work was to formulate herbal granules and the drug by incorporating the standardized Phlai extract. The stability of Phlai granules and drug was also determined for 2 years.

Materials and methods: In this study, we used (*E*)-4-(3′, 4′-dimethoxyphenyl) but-3-en-1-ol (compound D) as a specific active compound or a specific marker compound. The raw material, Phlai rhizome, was identified and examined for the residual toxic substances (pesticides and heavy metals) as well as microbial contamination. First the volatile substances were removed from Phlai rhizomes. The standardized Phlai extract was prepared by maceration method with 95% ethanol. Compound D in the extracts was determined using HPLC analysis. The quality of the extracts was assessed using drug-extract ratio (DER), the chromatogram fingerprint and the quantity of compound D. Phlai granules were prepared for toxicity assessment. To study therapeutic effects of Phlai extracts, drug capsules of phlai were performed in GPM manners. Quality control (QC) of Phlai granules and drug capsules was performed at room temperature and an accelerated condition (45˚C).

Results: We could not found insecticides including carbonate, organochroline, organophosphate and pyrethroid compounds in Phlai rhizomes. There was no contamination of heavy metals and certain bacterial species (*Eschorichia coli, Samonella spp., Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* and *Clostridium spp*). DER of the extract was 11:1. This means that one g of the extract was prepared from 11 g of Phlai rhizomes. Chromatographic analyses of Phlai granules showed active components including compound D which was used as the potential QC marker. The yield of compound D was 4.93 % of the standardized Phlai extracts. Appearances and moisture analyses of Phlai granules indicated the stability of the preparation. Stability test revealed that moisture of Phlai granules kept a stored at 45˚C was loss at 1.8%. Phlai capsules were successfully prepared from the standardized Phlai extract. One capsule of the drug contained 100 mg of the Phlai extract which was equivalent to 3.12 mg of compound D.

Conclusions: Our findings suggested that standardized Phlai extract can be employed in the formulation of Phlai granules and drug capsules with good uniformity and stability. The products were stable for 2 years.

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 3

ผลของสารสกัดไพลมาตรฐานต่อการต้านการอักเสบและยับยั้งการหดตัวของหลอดลมหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน

(Anti-inflammatory and inhibitory effects of Standardizes Phlai Extract on histamine-induced contraction in the rat trachea

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

สาวบูรณ์ สีรีรัฐวงศ์ *

ปริรัตน์ คนสูง *

กาญจนา ใจอ้อย *

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์การวิจัย: ไพลเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในตำรายาโบราณ อย่างไรก**วัสดุและวิธีการวิจัย:** ทำการทดสอบผลของการทายาเตรียมไพลต่อการอักเสบของหูหนูขาวที่ถูกกระตุ้นด้วย ethyl phenylpropiolate (EPP)-induced หรือ arachidonic acid (AA) รวมทั้งผลของการกินยาเตรียมไพลต่อการอักเสบด้วยการฉีด carrageenan ที่อุ้งเท้าหนูขาว และการก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในแบบจำลองการเกิด granuloma ด้วยการใส่ก้อนสำลีในช่องท้องหนู นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาผลของยาเตรียมไพลในการต้านผลการหดเกร็งของหลอดลมอันเนื่องจากการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีนในหนูตะเภาทั้งในแบบนอกกายและในกาย

ผลการวิจัย: ยาเตรียมไพลขนาด 4 มก/.ใบหูสามารถลดการอักเสบที่เกิดจาก EPP หรือ AA ได้ และมีผลยับยังการอักเสบอุ้งเท้าจากการกระตุ้นด้วย carrageen เมื่อหนูกินยาเตรียมไพล 150 300 600 มก./กก.น้ำหนักตัวหนู อย่างไรก็ตามพบว่ายาเตรียมไพลที่ความเข้มข้น 300 มก./กก.น้ำหนักตัวหนูไม่มีผลต้านการอักเสบเรื้อรังในแบบจำลอง granuloma ยาเตรียมไพลขนาด 0.1-1 มก./มล.มีผลยับยั้งการหดตัวของหลอดลมหนูตะเภานอกกาย ในขณะที่สารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10-120 มก./กก.ให้ผลลดการหดเกร็งของหลอดลมในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน

บทสรุป: การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ายาเตรียมไพลมีคุณสมบัติยับยั้งการอักเสบและต้านการหดเกร็งของหลอดลมหนูที่กระตุ้นด้วยฮิสตะมีน แต่ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบชนิดเฉียบพลันจะมีมากกว่าการอักเสบเรื้อรัง

Thai Traditional Medical Knowledge Fund

Abstract

Background and aim: *Zingiber cassumunar* (Phlai) has been used for anti-inflammatory relief in traditional medicine. However little is known about its underlined mechanism of anti-inflammation. In the present study, we investigated the anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activity of the Phlai Extract Granules (PEG).

Materials and methods: PEG was evaluated for its anti-inflammatory activity in rats using ethyl phenylpropiolate (EPP)-induced and arachidonic acid (AA)-induced ear edema, carrageenan-induced paw edema as well as cotton pellet-induced granuloma models. Effects of the extract on contractile responses in the histamine-stimulated isolated guinea pig trachea was also investigated. Bronchodilating action of PEG was also investigated by intravenous administration to anesthetized animals and bronchoconstriction was induced by histamine.

Results: PEG at 4 mg/ear exhibited anti-inflammatory effect on EPP or AA-induced ear edema. Oral administration of PEG at the doses of 150, 300 and 600 mg/kg caused dose-dependent inhibition of carrageenan-induced rat paw edema. However, PEG at 300 mg/kg did not reduce transudative and proliferative phases; body weight gain and thymus weight in cotton pellet-induced granuloma formation. PEG at 0.1-1 mg/ml inhibited histamine-induced tracheal contraction *in vitro*. PEG at 10-120 mg/kg of body weight also suppressed the bronchoconstriction action of histamine in pentobarbital anesthetized guinea pigs.

Conclusions: Our results suggest that PGE has anti-inflammatory and brochodilating properties. However, its inhibitory effect on acute inflammation is relatively obvious compared to that of chronic inflammation.

Thai Traditional Medical Knowledge Fund

รายงานวิจัย

โครงการวิจัยที่ 4

ความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดไพลในหนู

Acute and Chronic Toxicities of Phlai (*Zingiber cassumunar*) Extract in Rats

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

อรพรรณ โพชนุกูล*

สีวบูรณ์ สิรีรัฐวงศ์**

ปริรัตน์ คนสูง**

กาญจนา ใจจ้อย**

*คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb.) เป็นสมุนไพรที่ใช้ในตำราแพทย์แผนไทย โดยใช้เหง้าไพลในการรักษาโรคหืด อย่างไรก็ตามความรู้ในเรื่องความเป็นพิษของพืชชนิดนี้ยังมีน้อย การวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดไพลในหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย

วัสดุและวิธีการ: ทำการสกัดเหง้าไพลด้วยethyl alcohol 95% โดยใช้ Soxhlet apparatus เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำสารสกัดให้แห้งโดย rotary evaporation แล้วนำสารสกัดไพลมาตรฐาน (Specific Phlai Extract, SPE) ไปตรวจสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและรื้อรังในหนู ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันหนูขาวเพศผู้และเพศเมียถูกป้อนด้วยSPEในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในครั้งเดียว (single dose) และทำการประเมินอาการเป็นพิษแบบเฉียบพลันและชั่งน้ำหนักตัวทุกวันติดต่อกัน 14 วัน เมื่อสิ้นสุดการทำลองวันที่ 14 ทำการชั่งน้ำหนักอวัยวะ ตรวจสอบลักษณะทางกายวิภาคและพยาธิวิทยา ส่วนการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียกระทำโดยการป้อน SPE ขนาด 0.3, 3, 30, 11.25, 112.5 และ 1,125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากทุกวันเป็นเวลา 270 วันและ 28 วันภายหลังจากได้รับ SPE ไป 270 วัน (กลุ่มทดลองแบบติดตามผล ,satellite) แล้วทำการชั่งน้ำหนักอวัยวะ ตรวจลักษณะทางกายวิภาคและพยาธิวิทยา

ผลการวิจัย: การศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันไม่พบความผิดปกติใดๆจากป้อนSPEครั้งเดียวในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวในหนูขาว เมื่อทำการประเมินพฤติกรรมน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะ ลักษณะทางจุลกายวิภาคไม่พบความผิดปกติใดๆเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการได้รับ SPE ขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวครั้งเดียวทางปากไม่ก่อพิษเฉียบพลันในหนูขาว การศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังพบว่าจากการสังเกตอาการ พฤติกรรมและตรวจสุขภาพสัตว์ทดลองภายหลังจากการป้อนสารทดสอบไม่พบว่ามีความผิดปกติใดๆ ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ในวันที่ 270 ของกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบและกลุ่มควบคุมและวันที่ 298 ของกลุ่มทดลองแบบติดตามผล ได้มีการชั่งน้ำหนักตัวสุดท้าย น้ำหนักอวัยวะ การผ่าพิสูจน์ซากสัตว์ทดลอง การตรวจค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิกของเลือดและการตรวจจุลกายวิภาคไม่พบว่ามีความผิดปกติใดที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อนำข้อมูลเหล่านี้มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลของอาการ พฤติกรรมและการตรวจสุขภาพสัตว์ทดลองสามารถสรุปได้ว่าการได้รับSPEในขนาด 0 .3, 3, 30, 11.25, 112.5 และ 1,125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากเป็นเวลา 270 วันไม่ก่อพิษเรื้อรัง

บทสรุป: ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าสารสกัดไพลมีสารสำคัญในไพลไม่มีสารที่ก่อให้เกิดความเป็นผิดปกติแบบเฉียบพลันและเรื้อรังในหนู

Abstract

Background and aim: *Zingiber cassumunar* Roxb (Phlai) is used as folk medicine in Thailand. The rhizome of this plant is traditionally used for the treatment of asthma. However, little is known about the toxicity of this plant. In this study the acute and chronic toxicities of this plant were evaluated.

Materials and methods: The rhizomes of *Z. cassumunar* were extracted with 95% ethyl ethanol for 6 h using a Soxhlet apparatus. The standardized Phlai extract (SPE) was obtained after rotary evaporation. Acute and chronic toxicities of SPE were conducted in male and female rats. After 14 days of a single oral administration of SPE 5,000 mg/kg body weight, measurement of the body and organs weights, necropsy and health monitoring were performed. The chronic toxicity was determined by oral feeding both male and female rats daily with SPE 0.3, 3, 30, 11.25, 112.5 and 1,125 mg/kg body weight for 270 days. Both test and control groups (day 270th) and satellite group (day 298th) were analyzed by measuring their final body and organ weights, taking necropsy, and examining hematology, blood clinical chemistry, and histopathology.

Results: No signs and differences in the weights and behavior were observed relative to the control rats in the acute toxicity assessment. The results indicated the single oral administration of SPE in the amount of 5,000 mg/kg body weight does not produce acute toxicity. In chronic toxicity evaluation, the examinations of signs, animal behavior and health monitoring showed no defects in the test groups as compared to the controls. Histological evaluation did not show any differences between the experimental and the control rats. Analyses of these results with the information of signs, behavior and health monitoring can lead to a conclusion that an oral administration of SPE 0.3, 3, 30, 11.25, 112.5 and 1,125 mg/kg body weight for 270 days does not cause chronic toxicity.

Conclusion: SPE has no acute and chronic toxic effects on rats after oral administration of SPE for 14 days and 270 days, respectively.

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 5

ผลของการได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานต่อเภสัชจลนศาสตร์ของ compound D ในมนุษย์และการกระจายตัวของสาร D ในหนูทดลอง

(Effect of standardized phlai extract ingestion on the pharmacokinetics of compound D in humans and rats)

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

อรพรรณ โพชนุกูล*

ประภาศรี กุลาเลิศ*

ภัทรา ตันติเจริญวิวัฒน์*

ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา**

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาการอักเสบรวมทั้งโรคหืดและมีรายงานว่าสาร D เป็นสารสำคัญที่มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องเภสัชจลนศาสตร์และการกระจายของสารนี้ในอวัยวะต่างๆน้อยมาก การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารD ในมนุษย์และในสัตว์ทดลองและศึกษาการกระจายของสาร D ในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดไพลมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ:ขั้นตอนแรกได้มีการพัฒนาวิธีการหาสาร D จากเลือดโดยใช้ liquid chromatography (LC-MS) จากนั้นให้อาสาสมัคร 5 คนได้รับยาไพลแคปซูลขนาด 250 มก. (สาร D 8 มก.) ทีเดียวจำนวน 8 เม็ด แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะในช่วงเวลาต่างๆเป็นเวลารวม 24 ชั่วโมงและตรวจปริมาณสาร D ในตัวอย่างดังกล่าว การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในหนูกระทำโดยให้หนูขาวสายพันธ์ Wistar ได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานทางหลอดเลือดในขนาด 25 มก./กก. ของน้ำหนักตัวหนูหรือทางปากในขนาด 1, 3 และ 10 มก. ต่อ กก.น้ำหนักตัวแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะหลังได้รับสารสกัดไพล 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการวัดปริมาณสาร D ในอวัยวะต่างๆเพื่อศึกษาการกระจายของสารนี้ในร่างกาย

ผลวิจัย การศึกษาในคนพบว่าไม่สามารถตรวจพบสาร D ในเลือดของอาสาสมัครที่ได้รับยาไพลไป 24 ชั่วโมง แต่สามารถพบสารนี้ในตัวอย่างปัสสาวะของอาสาสมัครในความเข้มข้น 0.23-1.97 ng/ml โดยมี % recovery เท่ากับ 0.29-2.47% การศึกษาในหนูพบว่ามีการดูดซึมได้รวดเร็ว และสาร D มีการกระจายและสะสมในอวัยวะต่างๆ 1-1000 เท่า ภายในเวลา 1-4 ชม.ภายหลังได้รับยาทางปาก โดยพบสาร D สะสมมากในกระเพาะอาหาร หลอดลม สมอง ม้าม และปอด และพบว่าสาร D ถูกขับมาทางอุจจาระในเวลา 0-48 ชม. เมื่อได้รับสารสกัดไพลมาตรฐานทางปากหรือหลอดเลือด

บทสรุป: การวิจัยนี้พบว่าสาร D ถูกขับออกจากเลือดได้รวดเร็ว และสามารถกระจายไปอวัยวะต่างๆได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่หลอดลม สมอง ม้าม และ ปอด

Abstract

Background and aim: *Zingiber cassumunar* Roxb (Phlai) rhizome is regularly used to manage inflammatory diseases including asthma. The pharmacological effects of this plant were mainly attributed to its constituents including compound D. This study aimed to determine the pharmacokinetic properties of compound D in humans. Tissue distribution profile of the compound in using human equivalent dose was determined in rats.

Materials and methods: Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method was used to measure compound D in plasma. Then 5 healthy volunteers received orally of 8 Phlai capsules (8 mg compound D). Blood samples were collected at 6 different time point over a 24 h period. Urine was also collected over 24 h in five sequential timed intervals. Clinical chemistry was measured from the blood samples. The concentration of compound D in blood and urine samples was determined using LC-MS and pharmacokinetic parameters of compound D were calculated. The pharmacokinetic profiles of compound D was also determined in male Wistar rats. Using a standardized extract of *Z. cassumunar* 25 mg/kg contains compound D 1 mg/kg, the compound was administered either intravenously 1 mg/kg or by oral gavage 1, 3, 10 mg/kg to the Wistar rats. Blood, tissues, urine, and feces were collected from time 0 to 48 hours after dosing to determine the level of Compound D by LC-MS spectrometry. The concentration of compound D in tissue homogenates was also determined.

Results: There was no abnormality values in blood chemistry in all volunteers after taking Phlai capsules. A negligible amount of compound D was found in human blood samples after receiving 8 Phlai capsules for 1-24 h. This implies that compound D was rapidly absorbed and eliminated from plasma. However, compound D at the concentrations of 0.23-1.97 ng/ml were found in urine samples. The recovery of this compound in urine was in the range of 0.29-2.47%. A similar rapid absorption was also found in rats. Compound D exerted excellent tissue distribution with ranging from 1 to 1,000 folds in several organs after oral dosing for 1-4 h. Compound D distributed to all examined tissues with the highest concentrations found in the stomach followed by the trachea, brain, spleen and lung after oral administration this compound for 4 h. The unchanged Compound D was also detected in feces from 0-48 h after dosing, but the level was very low in both oral and intravenous route.

Conclusions: Our findings demonstrated that compound D is eliminated from plasma rapidly. This compound can obviously distributed well to the trachea, brain, spleen and lung.

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยที่ 6

ผลของยาไพล ในการยับยั้งปฏิกิริยารอยนูนแดงของสารฮิสตะมีนและสารก่อภูมิแพ้ที่ผิวหนังของผู้ป่วยโพรงจมูกอักเสบภูมิแพ้

(Inhibitory Effect of Phlai Capsule on the Histamine and Allergen-induced Wheal and Flare Response on Skin Test Response among Allergic Rhinitis Patients)

ในโครงการ

การพัฒนายาจากไพลเพื่อการรักษาโรคหืด

Drug development from Phlai (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

ผู้วิจัย

อรพรรณ โพชนุกูล*

ประภาศรี กุลาเลิศ*

ภัทรา ตันติเจริญวิวัฒน์*

ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา**

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: ไพลเป็นพืชในวงศ์ *Zingiberaceae* มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ ว่า *Zingiber cassumnunar* Roxbมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเพื่อการรักษาโรคหืด สาร D ซึ่งเป็นสารสำคัญที่แยกได้จากไพลมีคุณสมบัติสามารถต้านฤทธิ์ของฮิสตะมีนที่มีต่อหลอดลมของหนูตะเภาทั้งขณะที่อยู่ในร่างกายและขณะที่อยู่ภายในหลอดทดลอง

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านฮิสตะมีน (Antihistamine effect) ของไพลโดยดูขนาดที่ลดลงของรอยนูนแดงที่ผิวหนังเมื่อตรวจด้วยวิธีการสะกิดฮีสตะมีน และสารก่อภูมิทางผิวหนังในผู้ป่วยภูมิแพ้

วัสดุและวิธีการวิจัย : เป็นการศึกษาแบบสลับการรักษา (Prospective cross over study) ในผู้ป่วยโรคเยื่อบุจมูกอักเสบจากภูมิแพ้จำนวน 20 ราย โดยอาสาสมัครจะได้รับยาทั้ง 2 ชนิด คือ ยาไพลและยา loratidine โดยเว้นช่วงระหว่างการได้รับยา 1 สัปดาห์ ศึกษาฤทธิ์ต้านฮิสตะมีนโดยการตรวจทดสอบทางผิวหนังน้ำยาสารฮิสตะมีน (Histamine 1 mg/ml) และสารก่อภูมิแพ้ระบบทางเดินหายใจ ที่พบบ่อย (ไรฝุ่น,แมลงสาบ, เกสรหญ้า, ขนแมว, รังแคสุนัข) ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการรับประทานยาแต่ละชนิด

ผลการศึกษา : ยาไพลสามารถยับยั้งปฏิกิริยา wheal ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีนโดยมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ 6 ชม.ขนาดลดลงจาก 4.58 เป็น 3.68 มม. ($P < 0.01$) ในขณะที่ขนาดของ wheal ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไรฝุ่นมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ 4 ชม.ขนาดลดลงจาก 5.98 เป็น 4.98 มม. ($P < 0.01$). ยา loratadine สามารถยับยั้งปฏิกิริยา wheal ที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วย histamine โดยออกฤทธิ์สูงสุดที่ 3 ชั่วโมง ขนาดลดลงจาก 4.83 เป็น 3.23 มม.($P < 0.01$) ในขณะที่ขนาดของ wheal ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยไรฝุ่นลดลงจาก 5.73 เป็น 3.80 ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบพบว่ายา loratadine มีคุณสมบัติในการยับยั้งได้มากกว่าทั้งจากการกระตุ้นด้วยฮิสตะมีน และ ไรฝุ่น

บทสรุป : ยาไพลในขนาด 200 มิลลิกรัมของสารสกัดไพลฤทธิ์ต้านฮิสตะมีน โดยรอยนูนและรอยแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบด้วยน้ำยาฮิสตามีนและสารก่อภูมิแพ้ แต่น้อยกว่าฤทธิ์ต้านฮิสตะมีนของยา loratidine ขนาด 10 มิลลิกรัม

Abstract

Background and aim: *Zingiber cassumunar* Roxb. (Phlai in Thai) has been used for treatment of chronic airway diseases including mucin production. The purpose of this study was to assess the antihistamine effect of Phlai.

Material and methods: This was a randomized two-way cross-over study with a wash out of 1 week between periods. 20 AR patients were enrolled per group. Skin prick test for 5 common aeroallergens (mite, cockroach, grass, dog, cat) were performed. One group of patients received Phlai capsules (8 mg), and the other group received 10 mg loratadine. Inhibition of wheal and flare response to skin prick test to histamine and aeroallergen were measured at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after doses. After a washout period of 1 week, the treatments were reversed. The effect of Phlai and loratadine on wheal size was analyzed by the Friedman test for non-parametric analysis of repeated measures.

Results: Phlai inhibited the wheal induced by histamine with peak effect at 6 hours from 4.58+/-.89 to 3.68+/-.69 (p<.0001). Loratadine showed stronger histamine inhibition with peak effect at 3 hours from 4.83+/-1.08 to 3.23+/-.87 (p<.0001). Phlai inhibited the mite-induced wheal with peak effect at 4 hours from 5.98+/-2.9 to 4.98+/-2.97 (p=.0024), whereas loratadine more strongly inhibited the mite-induced wheal from 5.73+/-3.52 to 3.80+/-2.12 (p<.0001). Both medicines were well-tolerated with no adverse events.

Conclusions: Phlai capsule inhibits histamine and allergen-induced skin test wheal responses in AR patients, although these inhibitory effects are less potent than those of loratadine.

Thai Traditional Medical Knowledge Fund

โครงการวิจัย

การประเมินความเป็นพิษและพันธุศาสตร์ระดับเซลล์ของแกรนูลไพลด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส

(Cytotoxic and genotoxic effects of Phlai granules by the micronucleus test)

ผู้วิจัย

สิทธิชัย ขุนทองแก้ว[1]

ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา[1]

อรพรรณ โพชนุกูล[2]

วีณา จิรัจฉริยากูล [3]

ฤดี เสาวคนธ์ [4]

[1] คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

[2] คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

[3]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

[4] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

(ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย)

บทคัดย่อ

บทนำ: การวิจัยที่ผ่านมาในเรื่องไพลยังมีข้อถกเถียงกับในประเด็นว่าไพลก่อให้เกิดความเป็นพิษหรือไม่ โดยเฉพาะกับเซลล์ตับ ซึ่งในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการผลิตแกรนูลไพลเพื่อใช้ในการพัฒนาเป็นยา จึงควรที่ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และ DNA

วัตถุประสงค์: เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษระดับเซลล์และDNA ของแกรนูลไพล

วัสดุและวิธีการทดลอง: ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) ของแกรนูลไพลในเซลล์ 3 ชนิดคือเซลล์ TK6 (human lymphoblastoid cells , ATCC CRL-8015) เซลล์ L929 (mouse fibroblast, ATCC CCL-1™) และเซลล์ตับ (HepG2, Human hepatocellular carcinoma, ATCC HB-8065™) ด้วยวิธี WST assay เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษต่อ DNA ด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส [Cytokinesis Block Micronucleus (CBMN) assay] ในเซลล์ทั้ง 3 ชนิด

ผลการวิจัย: แกรนูลไพลมีผลก่อให้เกิด cytotoxicity ต่อเซลล์ TK6, L929 และHepG2 โดยมีค่า IC_{50}=175.98 ± 9.65 μg/ml, 53.08 ± 1.19 μg/ml และ 58.59 ± 11.52 μg/ml ตามลำดับ ผลการทดสอบ genotoxic ต่อ DNAโดยวิธี micronucleus assay พบว่าแกรนูลไพลที่ความเข้มข้น 25-100 μg/ml ร่วมกับการเติมสาร cytochalasin B (3μg/ml) เพื่อหยุดการแบ่งเซลล์ให้อยู่ในระยะ binucleated cells (BNC) ซึ่งเป็นระยะที่ใช้ในการประเมินการเกิดไมโครนิวเคลียส พบว่าทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ TK6 น้อยกว่า 20% ซึ่งบ่งชี้ว่าเกิดฤทธิ์ cytotoxicity แทน genotoxicity จึงทำไม่สามารถประเมินผลของการเกิดไมโครนิวเคลียส สำหรับเซลล์ L929 พบว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับแกรนูลไพลที่ความเข้มข้น 5-20 μg/ml มีอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ใส่สารทดสอบ (negative control)และเซลล์ที่ได้รับ mitomycin C (MMC) 1 μg/ml (positive control) ($P > 0.05$) แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับแกรนูลไพลที่ความเข้มข้นสูงที่สุดในการทดสอบ (30 μg/ml) สำหรับเซลล์ HepG2 แกรนูลไพลที่ความเข้มข้น 5-30 μg/ml ก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ไม่มีการใส่สารทดลอง (P >0.05) โดยเซลล์ HepG2ที่ได้รับ MMC ที่ความเข้มข้น 1 μg/ml ทำให้เกิดไมโครนิวเคลียสได้มากกว่าเซลล์ในกลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

บทสรุป: แกรนูลไพลมีค่า IC_{50}สำหรับการเกิดความเป็นพิษระดับเซลล์อยู่ระหว่าง 53.08-175.98 μg/ml และพบว่าแกรนูลไพลที่ความเข้มข้น 5-20 μg/mlไม่มีผลก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อ DNA ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนูและเซลล์ตับมนุษย์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารทดลอง