

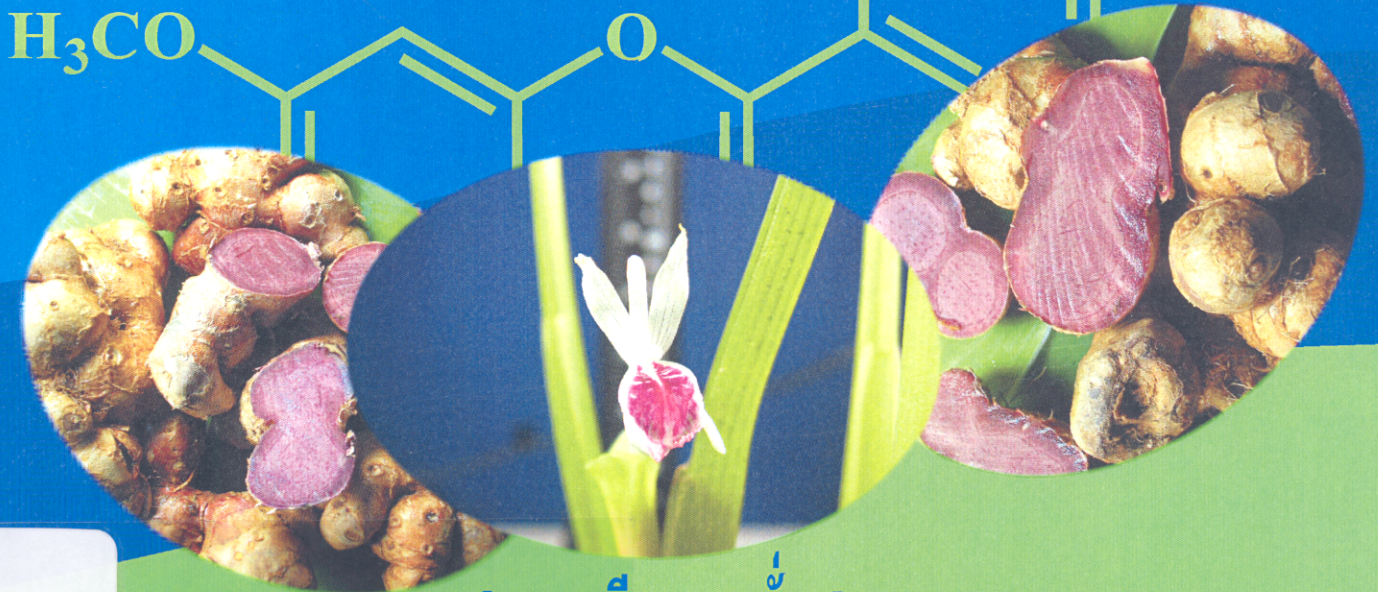


รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การแยกสารคล้ายตัวต่อเนื้อเยื่อ cavernosum จากเหง้ากระชายดำและ
กลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารนั้นต่อเนื้อเยื่อ human cavernosum
ที่ตัดออกมาศึกษาออกตัว

Isolation of cavernosal dilator substance(s) from rhizomes of
Kaempferia parviflora and its mechanism of action on human cavernosal tissue *in vitro*



รศ.ดร.ฉวีวรรณ จันสกุณ
นพ.กุลเดช เตชะนภารักษ์
ศ.พวงเพ็ญ ศิริรักษ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2550 - 2551
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
8 มิถุนายน 2552

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) แยกสารออกฤทธิ์คล้ายตัวต่อเนื้อเยื่อ cavernosum ของคน จากเหง้ากระชายดำให้บริสุทธิ์ (2) ศึกษากลไกในการแสดงฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาได้ต่อการ คลายตัวเนื้อเยื่อ cavernosum ของคน ทำการทดลองโดยสกัดเหง้ากระชายดำสดด้วย ethanol และตามด้วย dichloromethane ได้เป็น ethanol และ dichloromethane extract แล้วนำมาแยกสารออกฤทธิ์โดยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 100 เป็นตัวยึดอยู่กับที่ และชะออกด้วยส่วนผสมของ CH_2Cl_2 : MeOH ในสัดส่วนต่าง ๆ กัน แล้วเลือก fraction ที่มีผลคลายตัวต่อเนื้อเยื่อ cavernosum มาแยกต่ออีกครั้ง ด้วยวิธีการเดิมโดยใช้ silica gel 60 เป็นตัวยึดอยู่กับที่ แล้วเลือก fraction ที่มีผลคลายตัวต่อเนื้อเยื่อ cavernosum มาแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ silica gel RP 18 เป็นตัวยึดอยู่กับที่และชะออกด้วยส่วนผสมของ MeOH: H_2O ในสัดส่วนต่าง ๆ กัน สามารถแยกสารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ 3 ชนิดคือ 5,7-dimethoxyflavone (DM), 5,7,4'-trimethylflavone (TM) และ 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM) และ นำสารทั้ง 3 ชนิดนี้มาศึกษากลไกในการแสดงฤทธิ์แบบ *in vitro* โดยใช้เนื้อเยื่อ cavernosum ของคนที่ได้ จากการผ่าตัดแปลงเพศ ผลการทดลองพบว่าทั้ง DM, TM และ PM มีผลทำให้เนื้อเยื่อ cavernosum ของ คนที่ให้หดตัวอยู่ก่อนแล้วด้วย phenylephrine คลายตัว โดยความแรงในการคลายตัวเพิ่มขึ้นตามความ เข้มข้นของสาร สารทั้ง 3 ชนิดนี้ออกฤทธิ์ทั้งทางตรงโดยกระตุ้นให้เนื้อเยื่อ cavernosum คลายตัวและ ออกฤทธิ์ทางอ้อมโดยที่ DM มีผลกระตุ้นให้มีการหลั่ง nitric oxide จาก endothelium cell ของเนื้อเยื่อ cavernosum และกระตุ้นการทำงานของ soluble guanylate cyclase, TM มีผลกระตุ้น Ca^{2+} sensitive K^+ channel และ ATP-sensitive K^+ channel ส่วน PM มีผลกระตุ้นเฉพาะ ATP-sensitive K^+ channel ไปเสริม ผลทางตรงที่ทำให้เกิดการคลายตัวของเนื้อเยื่อ cavernosum ทั้ง DM, TM และ PM อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการ หลั่งของ Ca^{2+} จาก sarcoplasmic reticulum แต่ไม่มีฤทธิ์เป็น phosphodiesterase inhibitor, dihydropyridine Ca^{2+} -channel blocker, store-operated Ca^{2+} -channel blocker, Rho-kinase inhibitor หรือ ยับยั้งการหลั่ง Ca^{2+} จากแหล่งอื่นภายในเซลล์ที่ไม่ใช่จาก sarcoplasmic reticulum ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ในครั้งนี้สามารถยืนยันข้อมูลทางยาของเหง้ากระชายดำในการเสริมสมรรถนะทางเพศของชายได้

Abstract

This study was designed to (1) isolate cavernosal –relaxive substances from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*, and (2) investigate the mechanisms involved in their relaxant activity on the human cavernosum. Fresh rhizomes of the *Kaempferia parviflora* were extracted with ethanol followed by dichloromethane to obtain an ethanol and dichloromethane extract. Cavernosal –relaxive substances were isolated from these two extracts by using a column of silica gel 100 as a stationary phase, and elution with different concentrations of a mixture of CH_2Cl_2 : MeOH. The active fractions were re-chromatographed using a similar procedure with silica gel 60. Finally, the active sub-fractions obtained were subjected to column chromatography using silica gel RP18 as a stationary phase and elution with different concentrations of a mixture of MeOH: H_2O . Three pure active substances were isolated: 5,7-dimethoxyflavone (DM), 5,7,4'-trimethylflavone (TM) and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone (PM). The mechanisms responsible for the relaxant activity of these compounds were studied in *in vitro* preparations of the human cavernosum obtained from patients that had undergone a sex-change operation. DM, TM and PM each caused a dose-dependent relaxation of the human cavernosum previously contracted with phenylephrine. These three compounds acted both directly to relax the cavernosal tissue and indirectly via different pathways. DM indirectly stimulated the release of nitric oxide from the cavernosal endothelial cell, as well as by stimulating the soluble guanylate cyclase, TM stimulated by opening a Ca^{2+} sensitive K^+ channel and an ATP-sensitive K^+ channel, whereas PM caused an opening of the ATP-sensitive K^+ channel. These indirect activities potentiated a direct relaxant effect on the cavernosum. DM, TM and PM may also acts as Ca^{2+} mobilizing inhibitors of the sarcoplasmic reticulum, but do not act as a phosphodiesterase inhibitor, a dihydropyridine Ca^{2+} channel blocker, a store-operated Ca^{2+} -channel blocker, a Rho-kinase inhibitor, or a mobilizing inhibitor of the Ca^{2+} from other intracellular Ca^{2+} stores beside that of the sarcoplasmic reticulum. Knowledge obtains from these studies support the therapeutic claims made for the aphrodisiac activity of the *Kaempferia parviflora* rhizomes.