

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase ของหัวข้าวเย็นเหนือ
ผู้เขียน	นางสาว รอปิยะ กิจจิ
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

เอดส์ เป็นโรคที่เป็นสาเหตุการตายของคนไทยและคนทั่วโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อ HIV และยังไม่มียาใดรักษาโรคนี้ให้หายขาดได้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นเอทานอลของสมุนไพรไทยที่ชื่อว่าหัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่หอมพื้นบ้านของไทยเคยใช้ในการรักษาโรคเอดส์ พร้อมทั้งแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี bioassay-guided fractionation และนำมาทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase โดยวิธี multiplate integration assay (MIA) และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging และ lipid peroxidation โดยการใช้ liposome assay

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดชั้นเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase ถึง 99.4 % เมื่อนำสารสกัดชั้นเอทานอลมาแยกด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography พบว่าสารสกัดด้วย CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate, CHCl_3 : MeOH (1:1) precipitate และ MeOH fractions ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 integrase ได้ 99.8 %, 99.4 % และ 91.9 % ตามลำดับ

เมื่อนำ fractions CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate ซึ่งมีฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase ดีที่สุดมาแยกสารบริสุทธิ์และวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้ Spectroscopy ต่าง ๆ เช่น UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ และ Mass spectroscopy พบว่าได้สาร 5 ชนิดคือ β -sitosterol (SC1), β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside (SC2), quercetin (SC3), astilbin (SC4) และ engeletin (SC5) ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase พบว่า quercetin มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.9 μM ส่วน astilbin, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside, β -sitosterol และ engeletin มีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.3, 80.5, 80.8 และ 174.3 μM ตามลำดับ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า fractions ของสารสกัดชั้นนี้ได้แก่ CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate, CHCl_3 : MeOH (1:1) precipitate และ MeOH fractions มีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.1, 11.1 และ 8.9 $\mu\text{g/ml}$, ตามลำดับ ส่วนสารที่แยกได้ พบว่า quercetin, astilbin และ engeletin มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.6, 2.5 และ 3.9 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ส่วน β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside และ β -sitosterol มีค่า EC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี lipid peroxidation in liposome ของ 3 fractions ที่แยกได้ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.1, 6.4 และ 5.5 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน quercetin, astilbin และ engeletin มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.3, 0.8 และ 1.2 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับโดย β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside และ β -sitosterol มีค่า EC_{50} >100 $\mu\text{g/ml}$

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารสกัดหัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) ชั้น ethanol ที่มีฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase และสารสำคัญที่แยกได้และมีฤทธิ์ต้าน HIV-1 integrase คือ Quercetin ส่วนสารสกัดชั้น ethanol ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีโดยสารที่ออกฤทธิ์ และเป็น marker ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือ quercetin, astilbin และ engeletin ดังนั้นหัวข้าวเย็นเหนือน่าจะเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้รักษาโรคเอดส์ตามภูมิปัญญาของหมอพื้นบ้านได้

Thesis Title Study on Antioxidant Activity and HIV-1 Integrase Inhibitory
Effect of *Smilax corbularia* Kunth

Author Miss Rapih Kejik

Major Program Pharmaceutical Sciences

Academic Year 2007

ABSTRACT

The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is one among the top causes of death in Thailand and the world. It is caused by human immunodeficiency virus (HIV) and nowadays, there is not any appropriate treatment for AIDS.

The objectives of this study were to investigate the anti-HIV-1 integrase and anti-oxidant activities of Thai medicinal plant called “Hua-Khao-Yen-Neua” (*Smilax corbularia* Kunth) which was used by traditional doctors for treatment AIDS patients. The ethanolic extract and the compounds which were isolated by bioassay-guided fractionation were tested for anti-HIV-1 integrase activity by a multiplate integration assay (MIA) and for antioxidant activity by DPPH radical scavenging and lipid peroxidation (LPO) on liposome assay.

It was found that the ethanolic extract showed high anti-HIV-1 integrase activity with the inhibition of 99.4 % at 100 $\mu\text{g/ml}$. The ethanolic extract was fractionated by vacuum liquid chromatography. Three fractions of this extract which were CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate, CHCl_3 : MeOH (1:1) precipitate and MeOH fractions possessed potent anti-HIV-1 integrase activity by the inhibition HIV-1 integrase as 99.8 %, 99.4 % and 91.9 % at 100 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

The fraction CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate that possessed high anti HIV-1 integrase activity was isolated the pure compounds. The compounds were elucidated with spectroscopic methods such as UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and Mass spectroscopy. Five compounds were obtained including β -sitosterol (SC1), β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside (SC2), quercetin (SC3), astilbin (SC4) and engeletin (SC5). The results indicated that quercetin possessed the most potent inhibitory activity against HIV-1 integrase with an IC_{50} value of 8.9

μM , followed by astilbin, β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, β -sitosterol and engeletin. Their IC_{50} values for HIV-1 integrase activity were 50.3, 80.5, 80.8 and 174.3 μM , respectively.

The antioxidant activity was determined by the DPPH radical scavenging assay. Three fractions of this extract which are CHCl_3 : MeOH (1:1) supernate, CHCl_3 : MeOH (1:1) precipitate and MeOH fractions possessed the EC_{50} values of 2.1, 11.1 and 8.9 $\mu\text{g/ml}$ respectively, while those of quercetin, astilbin and engeletin were 0.6, 2.5 and 3.9 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The EC_{50} of β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside and β -sitosterol were >100 $\mu\text{g/ml}$. Moreover, their antioxidant activities were also determined by the lipid peroxidation of liposome assay. These three fractions exhibited the EC_{50} values of 1.1, 6.4 and 5.5 $\mu\text{g/ml}$, while those of quercetin, astilbin and engeletin were found to be 0.3, 0.8 and 1.2 $\mu\text{g/ml}$ respectively, and those of β -sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside and β -sitosterol were >100 $\mu\text{g/ml}$.

In conclusion, the extract of *Smilax corbularia* Kunth possessed high anti-HIV-1 integrase activity, in which quercetin is responsible for its activity. In addition, the ethanolic extract showed high antioxidant activity in both tests. The active components or markers for antioxidant activity are quercetin, astilbin and engeletin. This study supports the traditional use of *Smilax corbularia* for AIDS treatment.