นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1

ณัฐพร พลแสน*, เดชมนตรี วจีสุนทร, ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง, สุภัชฌา พูนศรัทธา
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง นนทบุรี 11000
* ***ผู้รับผิดชอบบทความ:*** *nattanatt3@gmail.com*

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: กระชาย (fingerroot) เป็นสมุนไพรไทยที่ใช้เป็นอาหารและยาในการแพทย์แผนไทย มีรายงานวิจัยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล หรือเหล้ากระชายมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่างที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสุขภาพ รวมทั้งฤทธิ์ต้าน SAR-CoV-2 อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์ของสารสกัดกระชายมาใช้ในผู้ป่วยที่กินยาแผนปัจจุบันร่วมด้วย อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาและสารสกัดสมุนไพร (herb-drug interactions) เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรอาจมีผลต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (cytochrome P450) ในการศึกษานี้เพื่อตรวจสอบผลต่อ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1 เนื่องจาก CYP3A4 เมทาบอไลซ์ยาในท้องตลาดกว่าร้อยละ 50, CYP2C9 เมทาบอไลซ์ยา warfarin ที่มีดัชนีการรักษา (therapeutic index) แคบ รวมถึง CYP2E1 เมทาบอไลซ์แอลกอฮอล์ที่มีการบริโภคกันอย่างกว้างขวาง คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดกระชายและสารสำคัญที่พบในสารสกัดต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1

วิธีการศึกษา: เตรียมสารสกัดเหง้ากระชายด้วยการหมักใน 95% เอทานอล ครั้งละ 72 ชั่วโมง 3 ครั้ง ตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญ คุณภาพทางเคมีของกระชายด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (UPLC) และทดสอบผลของสารสกัดกระชายต่อเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1 ด้วยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้นด้วยคุณสมบัติการเรืองแสง (fluorescence) คำนวณค่าการยับยั้งของสารสกัดกระชายและสารสำคัญเทียบกับสารควบคุมลบ (negative control) ได้แก่ ตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.25% DMSO และสารควบคุมบวก (positive CYP inhibitors) ได้แก่ ketoconazole, sulfaphenazole และ tranylcypromine ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1 ตามลำดับ โดยแสดงผลเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ค่า IC_{50} และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการศึกษา: พบสารสำคัญหลักในสารสกัดเอทานอลของกระชาย ได้แก่ pinocembrin และ pinostrobin โดยมีปริมาณสารเท่ากับ 6.0% และ 12.0% w/w ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง ตามลำดับ เมื่อคำนวณความเข้มข้นของ pinocembrin และในสารสกัดได้เท่ากับ 11.71 μM และปริมาณ pinostrobin ได้เท่ากับ 22.20 μM เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดและสารสำคัญ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์

Received date 24/03/25; Revised date 12/08/25; Accepted date 26/08/25

CYP2E1 จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสำคัญในสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายในปริมาณที่พบในสารสกัด พบว่า pinocembrin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.037$) แต่ pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว ขณะที่ทั้ง pinocembrin และ pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2E1

อภิปรายผล: สารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายมีผลยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 แปรผันตามความเข้มข้น โดยฤทธิ์ยับยั้งนี้ส่วนหนึ่งเนื่องจากฤทธิ์ของสาร pinocembrin แต่ไม่เกี่ยวข้องกับ pinostrobin ขณะที่ฤทธิ์ยับยั้ง CYP2C9 ของสารสกัด น่าจะเนื่องจากสารอื่นที่ไม่ใช่ทั้ง pinocembrin และ pinostrobin ขณะที่ทั้งสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชาย pinocembrin และ pinostrobin ไม่มีผลต่อ CYP2E1

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายมีผลยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 โดยส่วนหนึ่งเนื่องจากสาร pinocembrin ส่วนการยับยั้งการทำงานของ CYP2C9 ของสารสกัดกระชายไม่ผ่านทั้ง pinocembrin และ pinostrobin ขณะที่สารสกัดกระชายและสารสำคัญทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP2E1 ทั้งนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมด้านรูปแบบกลไกการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ และการวิจัยทางคลินิก

คำสำคัญ: กระชาย, สารสกัดเอทานอล, ไซโตโครมพี 450

Effect of *Boesenbergia Rotunda* Ethanolic Extract on CYP3A4, CYP2C9 and CYP2E1 Activities

Nattaporn Polsan*, Detmontree Wachisunthon, Sakwichai Ontong, Subhudhcha Poonsatha

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Talad Kwan Sub-District, Muang District, Nonthaburi 11000, Thailand

* ***Corresponding author:*** *nattanatt3@gmail.com*

Abstract

Introduction and Objectives: Fingerroot (*Boesenbergia rotunda*), a traditional Thai herb, has long been used in both culinary and medicinal applications within traditional Thai medicine. Recent studies have shown that ethanol extracts of *B. rotunda*, commonly referred to as *B. rotunda* liquor, exhibit various pharmacological activities with potential applications in drug development or as herbal health products, including antiviral activity against SARS-CoV-2. However, the use of *B. rotunda* extract products alongside conventional medications raises concerns regarding potential herb–drug interactions. These interactions may be due to the modulation of cytochrome P450 (CYP) enzymes by herbal constituents. This study aimed to investigate the effects of *B. rotunda* extract and its major constituents on the activities of CYP3A4, CYP2C9, and CYP2E1. These enzymes were selected based on their clinical significance: CYP3A4 metabolizes over 50% of marketed drugs; CYP2C9 metabolizes warfarin, a drug with a narrow therapeutic index; and CYP2E1 is involved in the metabolism of ethanol, which is widely consumed.

Methods: *B. rotunda* rhizomes were extracted by maceration in 95% ethanol for 72 hours, repeated three times. The chemical composition and content of active compounds in the extract were analyzed using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). The inhibitory effects of the extract on CYP3A4, CYP2C9, and CYP2E1 enzymes were evaluated by measuring the fluorescence of metabolites formed during enzyme-substrate reactions. Inhibitory activities of both the crude extract and its major constituents were compared to a negative control (0.25% DMSO) and known positive CYP inhibitors: ketoconazole (CYP3A4), sulfaphenazole (CYP2C9),

and tranylcypromine (CYP2E1). The results were presented as percentage inhibition (% inhibition) and IC_{50} values. Statistical analyses were performed to assess the significance of differences observed.

Results: The major active compounds identified in the ethanol extract of *B. rotunda* were pinocembrin and pinostrobin, with contents of 6.0% and 12.0% w/w of the dried extract, respectively. The concentrations of pinocembrin and pinostrobin in the tested extract were 11.71 μM and 22.20 μM, respectively. The ethanol extract demonstrated inhibitory activity against CYP3A4 and CYP2C9 but not against CYP2E1. Among the individual constituents, pinocembrin significantly inhibited CYP3A4 ($p = 0.037$) at the concentration found in the extract, whereas pinostrobin showed no such effect. Neither compound inhibited CYP2C9 or CYP2E1 activity.

Discussion: The inhibitory effect of the ethanol extract on CYP3A4 activity was concentration-dependent and attributed, at least in part, to the presence of pinocembrin. Pinostrobin did not contribute to this inhibition. The observed inhibition of CYP2C9 by the extract is likely due to other constituents besides pinocembrin and pinostrobin. No significant inhibition of CYP2E1 activity was observed for either the extract or its major constituents.

Conclusion and Recommendations: The ethanol extract of *B. rotunda* inhibits CYP3A4 activity, with pinocembrin being a contributing factor. The inhibition of CYP2C9 activity by the extract does not appear to involve either pinocembrin or pinostrobin. No inhibitory effects on CYP2E1 were observed for the extract or its major compounds. Further research is recommended to elucidate the specific mechanisms of enzyme inhibition and to conduct clinical studies to evaluate potential herb–drug interactions.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, ethanolic extract, Cytochrome P450

บทนำและวัตถุประสงค์

กระชาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. วงศ์ Zingiberaceae ชื่อพ้อง ได้แก่ *B. pandurata* (Roxb.) Schltr., *B. longiflora* (Wall.), *Gastrochillus panduratus* (Ridl.) Schltr. ชื่อสามัญคือ fingerroot, ขิงทราย, หัวกะแอน, หัวชาย, หัวละแอนส้ม, ว่านเปรี้ยว[1] เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าสั้น รากอวบ รูปทรงกระบอกหรือรูปไข่ค่อนข้างยาวเรียว กว้าง 1-2 เซนติเมตร ยาว 4-10 เซนติเมตร ออกเป็นกระจุก ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีเหลือง[2] องค์ประกอบทางเคมีของเหง้ากระชาย ส่วนใหญ่เป็นสารทุติยภูมิกลุ่มเฟลโวนอยด์ (flavonoids) เช่น pinocembrin (5,7-dihydroxy flavanone), pinostrobin (5-hydroxy 7-methoxy flavanone), boesenbergin A, boesenbergin B, panduratin A, 4-hydroxypanduratin A, panduratin B-1, panduratin B-2, rubranine, rotundaflovone, silybin, alpinetin, cardamonin นอกจากนี้ เหง้ากระชายยังมีน้ำมันระเหยง่าย ซึ่งมีองค์ประกอบ ได้แก่ nerol, camphor, cineole, fenchene, limonene, hemanthidine และสารกลุ่มโพลิฟีนอล (polyphenol) เช่น caffeic acid, coumaric acid, chlorogenic acid คนไทยนิยมใช้เหง้ากระชายสดเป็นเครื่องเทศ หรือผักแนมในอาหารไทย ช่วยดับกลิ่นคาว ตำราสรรพคุณยาไทยว่าเหง้ากระชายมีรสเผ็ดร้อนขม แก้ปวดมวนในท้อง จุกเสียด แก้บิด แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนัด เป็นต้น[3] มีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาว่าสารสกัดกระชายสามารถต้านมะเร็ง[4-6]

ต้านการอักเสบ[7] ต้านเบาหวาน[8] ต้านภูมิแพ้[8] ปกป้องระบบประสาท[9-10] ปกป้องไต[11] ทำให้หลอดเลือดคลายตัว[12] ลดการบีบตัวของลำไส้[13] เพิ่มปริมาณอสุจิ[14] ต้านเชื้อแบคทีเรีย[15] รวมทั้งต้านไวรัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัส SARS-CoV-2 ที่สารสกัดกระชายยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส[16] ซึ่งในสถานการณ์โควิด-19 มีการส่งเสริมการบริโภคสารสกัดกระชายเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว และเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย รวมทั้งกระชายอยู่ภายใต้แผนปฏิบัติการด้านสมุนไพรแห่งชาติ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2566-2570 ที่กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ประกาศ “สมุนไพร Herbal Champions 15 รายการ” โดยกระชายจัดเป็นหนึ่งในสมุนไพร Herbal Champions 12 รายการในกลุ่มที่ 2 เป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพและต้องการความต่อเนื่องในการพัฒนา ได้แก่ บัวบก มะขามป้อม ไพล ขิง กระชาย ว่านหางจระเข้ กวาวเครือขาว มะระขี้นก เพชรสังฆาต กระท่อม กัญชง และกัญชา[17]

ทั้งนี้ การใช้สารสกัดสมุนไพรในผู้ป่วยที่ได้รับยาแผนปัจจุบันร่วมด้วย อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรและยา ซึ่งเกิดจากสารสกัดสมุนไพรอาจมีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 (Cytochrome P450, CYP450) ในร่างกาย ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีหน้าที่เปลี่ยนแปลงยาหรือสิ่งแปลกปลอม (metabolize) ที่เข้าสู่ร่างกายในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics)[18] กลไกหลักในการเปลี่ยนแปลงยาคือการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้ยามีความเป็นขั้วมากขึ้นและสามารถถูกขับออกทางไต CYP450 มีหลายไอโซไซม์ (isozymes) แต่ละไอโซไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยาที่มีโครงสร้างทางเคมีต่างกัน เช่น CYP3A4 เปลี่ยนแปลงยามากกว่าร้อยละ 50 ของยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จึงมีผลต่อการใช้ยาในการรักษาหลายกลุ่มโรค[19-20] CYP2C9 เปลี่ยนแปลงยารักษาเบาหวานกลุ่มยาซัลโฟนิลยูเรีย (sulfonylurea) และ NSAIDs[21-22] ซึ่งมีการใช้มากในปัจจุบัน รวมทั้งยา warfarin ที่มีดัชนีการรักษาแคบ (narrow therapeutic index) และอาจเกิดอันตรายต่อผู้ใช้ยาได้หากเกิดอันตรกิริยากับยาจากสมุนไพร ส่วน CYP2E1 เปลี่ยนแปลงเอทานอล (ethanol) ซึ่งมีการบริโภคอย่างกว้างขวาง และยาพาราเซตามอล (paracetamol)[23] ดังนั้นสารที่มีผลต่อกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวไม่ว่าจะในทางกระตุ้นหรือยับยั้งย่อมส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์โดยอาจไปเพิ่มหรือลดการขับยาออกจากร่างกาย (excretion) ทำให้ระดับยาที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ในเลือดต่ำลงจนใช้ยาไม่ได้ผลหรือสูงขึ้นจนอาจทำให้เกิดพิษได้[24]

การใช้สารสกัดกระชายเป็นยา เช่นเพื่อเสริมภูมิคุ้มกันและป้องกันโควิด-19 ยังไม่มีข้อมูลอันตรกิริยาระหว่างยาแผนปัจจุบันและสารสกัดกระชาย จึงอาจเกิดผลข้างเคียงได้ในผู้ป่วยที่ได้รับยาอื่นร่วมด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดเหง้ากระชาย และสารสำคัญ 2 ชนิดในกระชายต่อเอนไซม์ CYP3A4, CYP2E1 และ CYP2C9 เพื่อพัฒนาสมุนไพรกระชายตามแผนปฏิบัติการด้านสมุนไพรแห่งชาติ และเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ซึ่งเป็นข้อมูลที่จำเป็นต่อการคุ้มครองผู้บริโภค และพัฒนาสมุนไพรกระชายในอนาคต

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างสมุนไพร

จัดหาวัตถุดิบสมุนไพรกระชายสด จำนวน 10 กิโลกรัม โดยซื้อจาก จ. นนทบุรี นำมาตรวจระบุชนิดตามหลักอนุกรมวิธานพืช เพื่อยืนยันชนิดของสมุนไพร พร้อมทั้งจัดทำตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิงในงานวิจัย เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (หมายเลขพรรณไม้อ้างอิง DMSC 5205) จากนั้นนำส่วนเหง้ามาเพื่อเตรียมสมุนไพรสกัดต่อไป

1.2 สารเคมีและตัวทำละลาย

Vivid® CYP450 screening kits (Life technologies, USA), pinocembrin (Sigma Chemical, USA), pinostrobin (Sigma Chemical, USA), methanol (Fisher, USA), acetonitrile (Fisher, USA), DMSO (Sigma Chemical, USA)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมสมุนไพรและการสกัด

เตรียมสารสกัดจากกระชายโดยนำส่วนเหง้าของกระชาย ล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และอบให้แห้งด้วยเตาอบร้อนไฟฟ้าที่มีพัดลมระบายอากาศที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปแช่ในเอทานอลเข้มข้น 95% (v/v) (maceration) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง กรอง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดกระชาย และเก็บสารสกัดดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดกระชายด้วยวิธี ultra-performance liquid chromatography (UPLC)

สารสกัดกระชายความเข้มข้น 0.5 mg/mL ใช้เมทานอล 100% เป็นตัวทำละลาย ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (pinocembrin และ pinostrobin) ที่ใช้ในการเตรียม standard curve คือ 10, 50, 100, 500 และ 1000 μM ตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UPLC (Waters Acquity™ , USA) ปริมาณสารสำคัญวัดด้วยเครื่อง Photodiode array detector (Tabel 1)

Table 1 Optimal chromatography conditions for the separation of pinocembrin and pinostrobin by UPLC system

	Optimal conditions
Stationary phase	UPLC column Acquity™ BEH C18; 2.1 × 100 mm, 1.7 μm
Column Temperature	35°C
Mobile phase	Gradient: (a) water (b) methanol : acetonitrile (1:1)
Flow rate	0.5 mL/min
Detection	PDA 290 nm
Injection volume	5 μL

2.3 การศึกษาผลของสารสกัดกระชายและสารสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1

เตรียมสารละลายสารสกัดกระชายให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5, 1, 5, 10, 50 μg/mL ปริมาตร 40 μL ใน DMSO 0.25% ใน 96 well black plate ใช้สารจาก Vivid® CYP450 screening kits โดยใส่ master pre-mix ปริมาตร 50 μL ที่ประกอบด้วย (a) Vivid® Regeneration system 1 μL : 333 mM glucose-6-phosphate และ 30 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase ใน 100 mM potassium phosphate, pH 8.0 (b) เอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ไอโซฟอร์มเฉพาะ (CYP3A4, CYP2C9 หรือ CYP2E1 Baculosome®) ปริมาตร 0.5 μL (c) Vivid® reaction buffer 48.5 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 20 นาที ใส่ substrate cocktail ปริมาตร 10 μL ที่ประกอบด้วย (a) สารตั้งต้น (substrate) ที่จำเพาะต่อชนิดไอโซฟอร์มของเอนไซม์ ดังนี้คือ CYP3A4 ใช้ BOMCC® substrate CYP2C9 ใช้ BOMF® substrate และ CYP2E1 ใช้ EOMCC® substrate ปริมาตร 0.5 μL (b) 10 mM NADP+ in 100 mM potassium phosphate, pH 8.0 ปริมาตร 0.3 μL (c) Vivid® reaction buffer 9.2 μL ทั้งนี้การทดสอบผลของสารสำคัญในสารสกัดกระชาย คือ 10 μM pinocembrin และ 20 μM pinostrobin ใช้วิธีการเดียวกันกับสารสกัด ตรวจวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยคุณสมบัติการเรืองแสง (fluorescence) แบบ kinetics โดยในการทดสอบ CYP3A4 และ CYP2E1 อ่านผลปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ค่า excitation/emission wavelengths เท่ากับ 415/460 ทุก 10 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบ CYP2C9 อ่านผลปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ค่า excitation/emission wavelengths เท่ากับ 490/520 ทุก 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที นำผลปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้มาคำนวณค่าการยับยั้งของสารสกัดกระชายเทียบกับสารควบคุม (0.25% DMSO) และสารควบคุมบวก (Ketoconazole-CYP3A4, Sulfaphenazole-CYP2C9 และ Tranylcypromine-CYP2E1) หาค่าร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) ค่า IC_{50} และวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม ANOVA (Dunnett) เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตของกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มทดลอง (p-value < 0.05, N = 3-6)

ผลการศึกษา

1. องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดกระชายด้วยวิธี UPLC

จากการเตรียมสารสกัดเหง้ากระชายแห้งด้วย 95% เอทานอลด้วยวิธีการหมัก และโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชาย (Figure 1) พบว่าสารสำคัญหลักในสารสกัดประกอบไปด้วยสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ pinocembrin และ pinostrobin โดยมีปริมาณสารเท่ากับ 6.0% และ 12.0% w/w ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง ตามลำดับ เมื่อคำนวณความเข้ม

ข้นของ pinocembrin และ pinostrobin ในสารสกัดได้เท่ากับ 11.71 μM และ 22.20 μM ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ pinocembrin และ pinostrobin จึงใช้ความเข้มข้นเทียบเท่าที่อยู่ในสารสกัดคือ 10 μM และ 20 μM ตามลำดับ

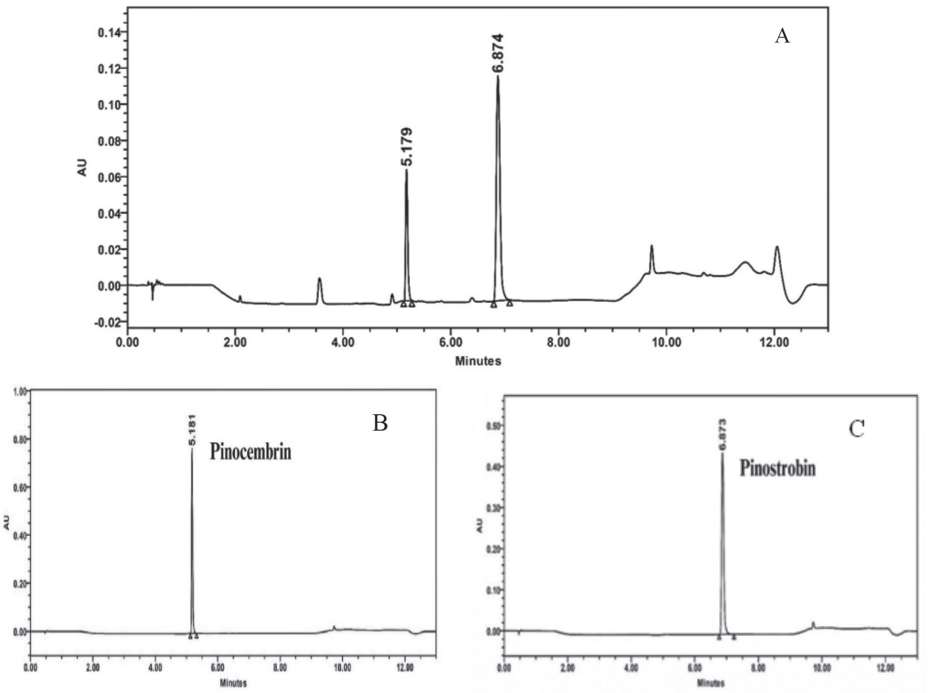

Figure 1 Chromatogram of sample solution of *Boesenbergia rotunda* (A), standard pinocembin (B) and pinostrobin (C)

2. ผลของสารสกัดกระชายต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1

2.1 ผลของสารสกัดกระชายต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4

พบว่าสารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 5, 10, 50 μg/mL ลด CYP3A4 activity โดยมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น (dose dependent) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวทำละลาย 0.25% DMSO (p-value = 0.035, 0.008 และ 0.013 ตามลำดับ) โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 26.79, 61.82 และ 99.43 ตามลำดับ ขณะที่สารยับยั้ง CYP3A4 5 μM ketoconazole มีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 97.51 โดยมีความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 7.84 μg/mL (Figure 2A)

2.2 ผลของสารสกัดกระชายต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2C9

พบว่าสารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 10, 50 μg/mL ลด CYP2C9 activity โดยมีความสัมพันธ์

กับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับตัวทำละลาย 0.25% DMSO (p-value = 0.021 และ 0.008 ตามลำดับ) โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 55.38 และ 94.79 ตามลำดับ ขณะที่สารยับยั้ง CYP2C9 30 μM sulfaphenazole มีร้อยละของการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 85.10 โดยมีความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 10.08 μg/mL (Figure 2B)

2.3 ผลของสารสกัดกระชายต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1

พบว่าสารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 50 μg/mL ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ CYP2E1 activity ขณะที่ 1 mM tranylcypromine ยับยั้ง CYP2E1 activity อย่างมีนัยสำคัญ เทียบกับตัวทำละลาย 0.25% DMSO คิดเป็นร้อยละ 90.09 ดังนั้นสารสกัดกระชายจึงไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 (Figure 2C)

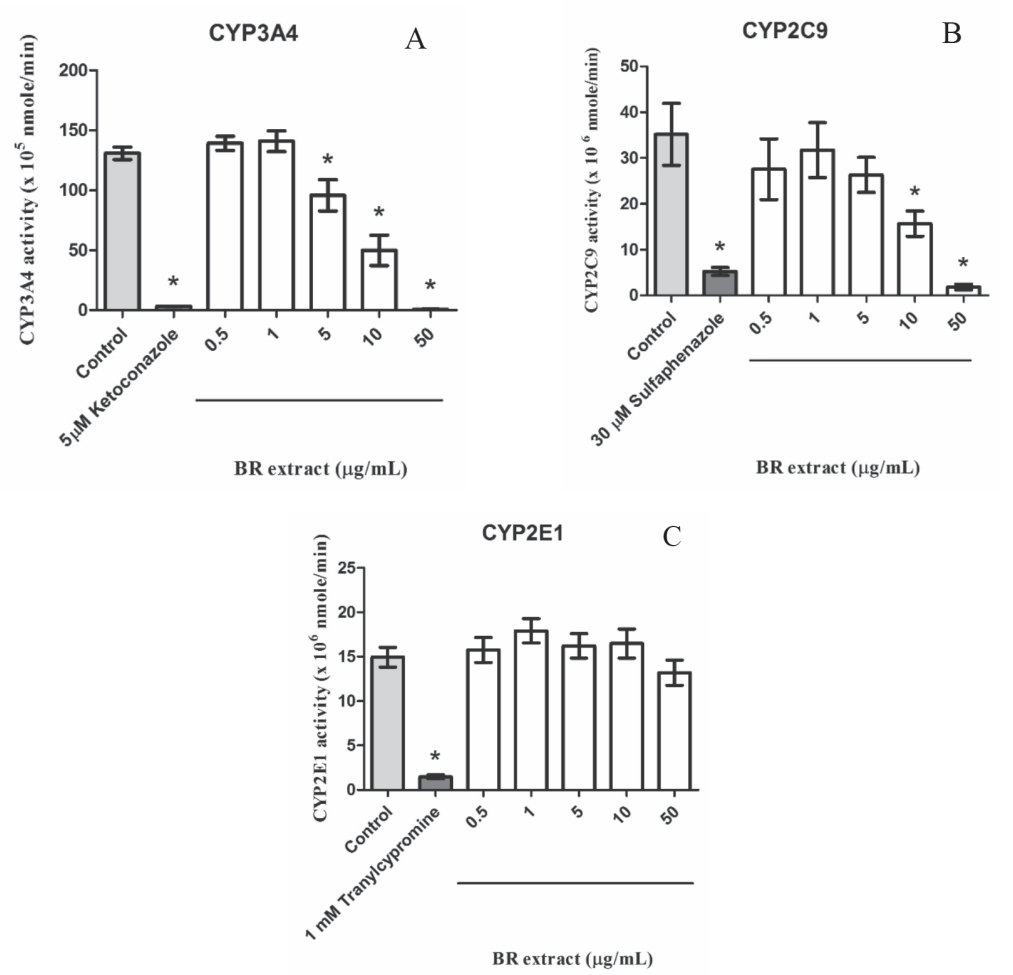

Figure 2 Effects of *Boesenbergia rotunda* ethanolic extract on activities of CYP3A (A), CYP2C9 (B) and CYP2E1 (C)

3. ผลของ pinocembrin และ pinostrobin ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP3A4, CYP2C9 และ CYP2E1

3.1 ผลของ pinocembrin และ pinostrobin ต่อเอนไซม์ CYP3A4

10 μM pinocembrin มีผลลด CYP3A4 activity อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO (p-value = 0.037) โดยลดลงร้อยละ 35.66 ขณะที่ 20 μM pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO ในขณะที่ 5 μM ketoconazole ลด CYP3A4 activity อย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 96.41 เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO (Figure 3A)

3.2 ผลของ pinocembrin และ pinostrobin ต่อเอนไซม์ CYP2C9

10 μM pinocembrin และ 20 μM pinostrobin ไม่มีผลต่อ CYP2C9 activity เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO ในขณะที่ 30 μM sulfaphenazole ลด CYP2C9 activity อย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 87.71 เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO (Figure 3B)

3.3 ผลของ pinocembrin และ pinostrobin ต่อเอนไซม์ CYP2E1

10 μM pinocembrin และ 20 μM pinostrobin ไม่มีผลต่อ CYP2E1 activity เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO ในขณะที่ 1 mM tranylcypromine ลด CYP2E1 activity อย่างมีนัยสำคัญที่ร้อยละ 90.14 เมื่อเทียบกับ 0.25% DMSO (Figure 3C)

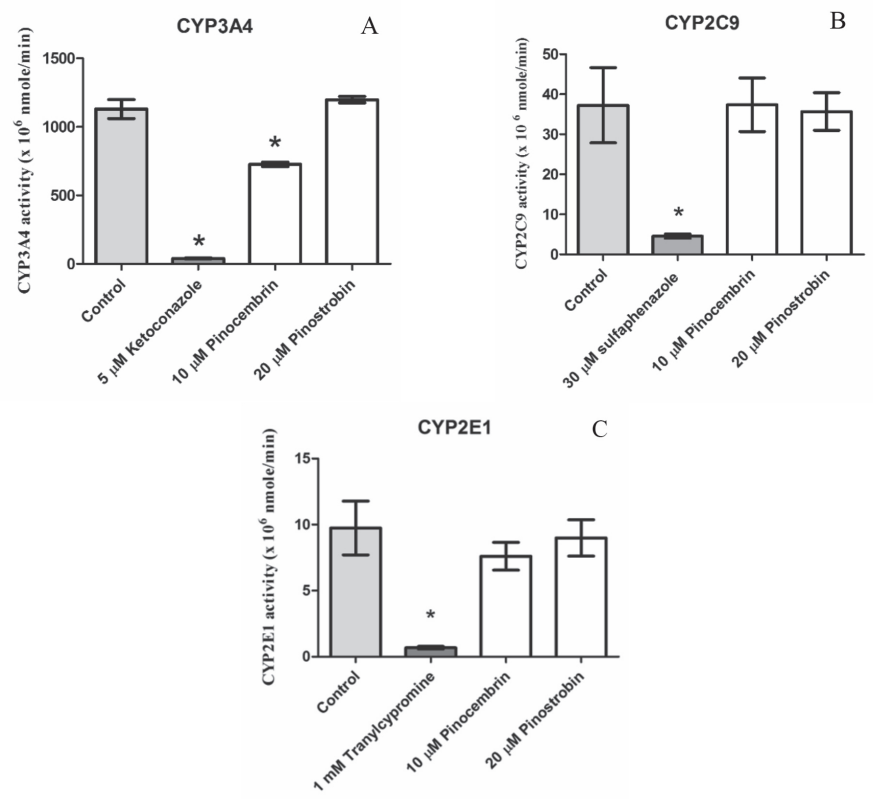

Figure 3 Effects of 10 μM pinocembrin and 20 μM pinostrobin on the activities of CYP3A (A), CYP2C9 (B) and CYP2E1 (C)

อภิปรายผล

กระชายเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องอืดเฟ้อ ซึ่งเป็นอาการที่พบได้ในทุกเพศทุกวัย และมีการใช้ในรูปแบบยาดองกระชายเพื่อบำรุงร่างกาย รวมถึงในสถานการณ์โควิด-19 มีการส่งเสริมการใช้สารสกัดกระชายเพื่อป้องกันโควิด-19 และเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังรายงานการศึกษาสารสกัดกระชายต่อการต้านไวรัส SARS-CoV-2 ที่สารสกัดกระชายยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส โดย Kanjanasirirat P และคณะ[16] รายงานว่า panduratin A ซึ่งพบในสารสกัดกระชาย มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส SARS-CoV-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ในการศึกษานี้พบว่า pinocembrin และ pinostrobin เป็นสารสำคัญหลัก และมี panduratin A อยู่น้อย เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว สารสกัดกระชายในการศึกษานี้อาจมีฤทธิ์ต้านไวรัส SARS-CoV-2 ได้น้อยกว่างานวิจัยก่อนหน้า อย่างไรก็ตาม งานศึกษาทางคอมพิวเตอร์ (in silico) ระบุว่า pinocembrin และ pinostrobin สามารถจับกับตำแหน่งของ SARS-CoV-2 main protease ได้อย่างมีเสถียรภาพ ผ่านพันธะไฮโดรเจนและแรงยึดเหนี่ยวอื่น ๆ[25] ซึ่งใกล้เคียงกับกลไกของ panduratin A[26] ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารทั้งสองอาจมีศักยภาพในการต้านไวรัส SARS-CoV-2 ได้เช่นกัน รวมทั้งกระชายมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ อีกมาก อาทิ ต้านการอักเสบ ต้านเบาหวาน ต้านภูมิแพ้ ปกป้องระบบประสาท ปกป้องไต ทำให้หลอดเลือดคลายตัว ลดการบีบตัวของลำไส้ เพิ่มปริมาณอสุจิ เป็นต้น จึงมีโอกาสพัฒนาสารสกัดกระชายเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น จึงมีโอกาสที่ผู้ป่วยจะใช้สารสกัดกระชายร่วมกับยาแผนปัจจุบัน และเกิดอันตรกิริยาระหว่างกระชายและยาแผนปัจจุบันได้ จากผลการทดสอบสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9 แต่ไม่มีผลต่อเอนไซม์ CYP2E1 ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์จึงเลือกใช้สารสำคัญที่พบในปริมาณสูงในสารสกัดกระชาย ได้แก่ pinocembrin และ pinostrobin ที่ความเข้มข้นที่พบในสารสกัด ซึ่งพบว่า pinocembrin พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ทั้งสาร pinocembrin และ pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 และ CYP2E1 ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP3A4 ของสารสกัดกระชาย ส่วนหนึ่งจึงเนื่องมาจากสาร pinocembrin ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 ไม่เกี่ยวข้องกับ pinocembrin และ pinostrobin และน่าจะเกิดจากสารอื่นในสารสกัด

ในการศึกษาก่อนหน้า Punvittayagul C และคณะ[27] ได้ทำการศึกษาผลของสาร pinocembrin ที่แยกจากสารสกัดกระชายต่อเอนไซม์เมทาบอลิซึมในหนูแรต พบว่า pinocembrin ไม่มีผลต่อเอนไซม์ cytochrome P450 reductase, quinone reductase, UDP glucuronosyltransferase และ glutathione-S-transferase รวมทั้งการแสดงออกของยีนในเอนไซม์ CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A2 และ cytochrome P450 reductase สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่สารสำคัญ pinocembrin ไม่มีผลต่อเอนไซม์ CYP2E1 เช่นเดียวกัน ในการศึกษาพบว่า pinocembrin ที่ความเข้มข้นที่พบในสารสกัด ยับยั้ง CYP3A4 activity ได้ร้อยละ 35 ดังนั้น การใช้ยาดองเหล้ากระชายหรือการพัฒนาสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายเป็นยาอาจมีข้อควรระวังในการใช้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันที่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ CYP3A4 และ CYP2C9

และควรต้องหลีกเลี่ยงการรับประทานสารสกัดกระชายในปริมาณสูงร่วมกับยาที่มีการเปลี่ยนแปลงยาผ่านเอนไซม์ CYP3A4 ซึ่งเป็นยาส่วนใหญ่ในท้องตลาด เช่น ยาลดไขมัน atorvastatin, ยาคุมกำเนิดที่มี progesterone เป็นส่วนประกอบ ยาแก้ไอ codeine เพื่อลดความเสี่ยงจากอันตรกิริยาระหว่างยาและสมุนไพรที่อาจเกิดขึ้นได้ในผู้บริโภค อย่างไรก็ตาม ควรต้องมีการศึกษาทางคลินิกเพิ่มเติม เพื่อยืนยันการเกิดอันตรกิริยากับยาที่มีการเปลี่ยนแปลงด้วย CYP3A4 และ CYP2C9 ที่พบในการศึกษานี้

ข้อสรุป

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ CYP3A4 และ CYP2C9 โดยส่วนหนึ่งเนื่องจากสาร pinocembrin ขณะที่ pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ CYP2C9 ของสารสกัดไม่เกี่ยวข้องกับ pinocembrin และ pinostrobin และน่าจะเกิดจากสารอื่นในสารสกัด ส่วนสารสกัดกระชาย, pinocembrin และ pinostrobin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP2E1

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาสำหรับความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยาทุกท่าน รวมทั้ง ดร.ภก.จำรัส กาญจนไพบูลย์ และ ว่าที่ร้อยตรี ธนวัฒน์ ทองจีน สำหรับคำแนะนำ ที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และครอบครัวพลแสนสำหรับกำลังใจตลอดมา

References

1. Smitinand T. Thai plant names. Bangkok: The forest herbarium Royal Forest Department; 2001.
2. Bunyapraphat N, Chokchaicharoenphon O, Editors. Local herbs (1). Bangkok: Faculty of Pharmacy, Mahidol University; 1996.
3. Pattamadilok D, Sakpetch A. Isolation of Pinostrobin, a chemical marker from fingerroots for quality control purposes. J Thai Trad Alt Med. 2021;19(2):424-34.
4. Isa NM, Abdelwahab SI, Mohan S, Abdul AB, Sukari MA et al. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). Braz. J. Med. Biol. Res.2012;45(6):524-30.
5. Mohammed, IA, Akhtar MN, Biau FJ, Tor YS, Zareen S, Binti SS et al. Isolation of cardamonin and pinostrobin chalcone from the rhizomes of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and their cytotoxic effects on H-29 and MDA-MB-231 cancer cell lines. Nat Prod J. 2019.9(4):341-348.
6. Break MKB, Chiang M, Wiart, Chin CF, Khoo ASB, Khoo TJ. Cytotoxic activity of *Boesenbergia rotunda* extracts against nasopharyngeal carcinoma cells (HK1). Cardamonin, A *Boesenbergia rotunda* constituent, inhibits growth and migration of HK1 cells by inducing caspase-dependent apoptosis and G2/M-phase arrest. Nutr. Cancer, 2021;73(3):473-83.
7. Rosdianto A, Puspitasari I, Lesmana R, Sumiwi S, Megantara S et al. Inhibitory effects of Indonesian temu kunci (*Boesenbergia rotunda*) rhizome extract on nitric oxide synthase production and on the kidneys of Wistar rats. World Acad Sci.2022;4(5):38.
8. Wang P, Wen C, Olatunji OJ. Anti-Inflammatory and antinociceptive effects of *Boesenbergia rotunda* polyphenol extract in diabetic peripheral neuropathic rats. J Pain Res.2022;15:779-88.
9. Youn K, Jun M. Biological evaluation and docking analysis of potent BACE1 inhibitors from *Boesenbergia rotunda*. Nutrients. 2019;11(3):662.
10. Ping C, Tengku MT, Akhtar M, Perimal,E, Akira A, Israf AD, Sulaiman M. Antinociceptive effects of cardamonin in mice: Possible involvement of TRPV1, glutamate, and opioid receptors. Molecules. 2018;23(9):2237.
11. Thongnuanjan P, Soodvilai S, Fongsupa S, Chabang N, Vivithanaporn P, Tuchinda P. Protective effect of Panduratin A on cisplatininduced apoptosis of human

renal proximal tubular cells and acute kidney injury in mice. Biol Pharm Bull. 2021;44(6):830-7.

12. Deepak A, Dal-Seong G, Se HO, Eun HS, Seung OL, Dong-Wook K et al. Vasorelaxant effect of *Boesenbergia rotunda* and its active ingredients on an isolated coronary artery. Plants. 2020;9(12):1688.
13. Haginiwa J, Harada M, Morishita I. Properties of essential oil components of aromatics and their pharmacological effect on mouse intestine. Pharmacological studies on crude drugs. VII. Yakugaku Zasshi. 1963;83:624.
14. Yotarlai S, Chaisuksunt V, Saenphet K, Sudwan P. Effects of *Boesenbergia rotunda* juice on sperm qualities in male rats. J Med Plants Res. 2011;5(16):3861-7.
15. Kanchanapiboon J, Kongsa U, Pattamadilok D, Kampon C S, Wachisunthon D, Poonsatha S, Tuntoaw S. Boesenbergia rotunda extract inhibits *Candida albicans* biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin. J Ethnopharmacol. 2020;261:113193.
16. Kanjanasirirat P, Suksatu A, Manopwisedjaroen S, Munyoo1 B, Patoomratana T et al. High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component as anti-SARS-CoV-2 agents. Plos One. 2020;5(11),e0241793.
17. National Herbal Policy Committee. National herbal action plan No. 2 (2023 - 2027). Peppery Company Limited, Bangkok. 2023.
18. Ung YT, Chin EO and Yan P. Current High-Throughput approaches of screening modulatory effects of xenobiotics on cytochrome P450 (CYP) enzymes. High-Throughput. 2018;7:29.
19. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet. 2002;360:1155-62.
20. Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter RD. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cytochrome P450-mediated drug metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006;2(6):875-94.
21. Charlize W. Inhibitory effect of selected herbal supplements on CYP450-mediated metabolism- An in vitro approach, Thesis of master degree of science (pharmacology). Department of Medicine and Health Sciences. University of Stellenbosch. 2016.
22. James A R. Time in the therapeutic range for patients taking warfarin in clinical trials: useful, but also misleading, misused, and overinterpreted. Circulation. 2017; 135(16):1475-77.
23. Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter RD. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cytochrome P450-mediated drug metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006;2(6):875-94.
24. Bill J G. Pharmacokinetic herb-drug interactions (part 2): drug interactions involving popular botanical dietary supplements and their clinical relevance. Planta Med. 2012;78(13):1490-514.
25. Arun BG, Mohammad AA, Fahad A, Mohamed E, Joongku Lee. In silico analyses of major active constituents of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) unveils inhibitory activities against SARS-CoV-2 main protease enzyme. Saudi J Biol Sci. 2021;29(1):65-74.
26. Patamalai B, Pongsak K, Thana S. A computational study on the molecular mechanisms of panduratin A as a potential inhibitor on SARS-CoV-2 protein targets. Heliyon.2023;9(1):e12780.
27. Punvittayagul C, Wongpoomchai R, Taya S, Pompimon W. Effect of Pinocembrin isolated from *Boesenbergia pandurata* on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. Drug Metab Lett. 2011;5(1):1-5.