



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพริกไทยดำและอนุพันธ์ของฟิเพอรีน

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกวรรณ กิตตินิยม

เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2555

MRG5080111

สัญญาเลขที่ MRG5080111

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพริกไทยดำและอนุพันธ์ของฟิเพอริน

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกวรรณ กิตตินิยม

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

MRG5080111

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้จะเกิดขึ้นและสำเร็จไม่ได้ถ้าขาดการสนับสนุนหลักจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประเพณีทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี 2550 สัญญาเลขที่ MRG5080111 ขอขอบพระคุณที่ให้การสนับสนุนและให้โอกาสในการเริ่มต้นการทำวิจัยและแบ่งปันประสบการณ์ที่มีค่าในชุมชนนักวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. มัลลย์ วจิตร ในฐานะนักวิจัยพี่เลี้ยงที่กรุณาให้คำแนะนำและกระตุ้นการทำงานวิจัยขึ้นนี้ด้วยดี และขอขอบพระคุณสมาชิกเครือข่ายงานวิจัยทั้ง รศ. ดร. นันทกา โกรธนา ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้อนุเคราะห์สารทดสอบและให้คำแนะนำเรื่องสารสมุนไพร ดร. ปณิตดา เทพอัศกร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้อนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง ผศ. จงรักษ์ เพิ่มมงคล ผศ. ดร. วารุณี เงินงามเลิศ ผศ. ดร. รพีพร ไหญ่เจริญ และนักศึกษาจากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ร่วมพัฒนาการทดสอบ

สุดท้ายขอขอบพระคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน และคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ สารเคมีและให้การสนับสนุนเพื่อการวิจัยนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ขอน้อมรับและขออภัยมา ณ ที่นี้

ผศ. ดร. กนกวรรณ กิตตินิยม

Abstract

Project Code : MRG5080111

Project Title : Anti-microbial effects of black pepper extracts and piperine analogues

Investigator : Assistant Professor Kanokwan Kittiniyom

Department of Clinical Microbiology and Applied Technology,
Faculty of Medical Technology, Mahidol University

E-mail Address : kkittiniyom@yahoo.com

Project Period : 1 December 2007 - 31 August 2012

Based on folkloric use, black pepper (*Piper nigrum*) and its major compound, piperine, are attractive sources to be explored for new antimicrobial substances during drug resistance era. To study antimicrobial effects against bacteria (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. and *P. aeruginosa*), yeasts (*C. neoformans* and *C. albicans*), malaria (*P. falciparum* K1), intestinal protozoa (*B. hominis*) and HBs antigen expressed cell line (PLC/PRF/5), 16 compounds including black pepper extracts, piperine and piperine analogues by alter side chain and vary the number of double bond were determined. These compounds showed the tendency against malaria and HBs antigen expressed cell line. The methanol extract (AB-14) and piperine analogue (AB-8) showed the highest % inhibition of malaria growth (79.5% and 78.5%, respectively) at 50 µg/ml drug concentration and have IC₅₀ of 0.41 and 0.29 µg/ml, respectively. The effective compounds for malaria inhibition were medium in polar and contained amide group with double bond which were different from the effective compounds for β-haematin formation inhibition; the water extract (AB-13, high polar) and piperine analogue (AB-7, carboxylic acid group). In addition, AB-14 (water extract) and AB-17 (CH₂Cl₂ extract) also showed the potential inhibition of HBs antigen expression on PLC/PRF/5. Although no antibacterial, anti-yeast and anti-intestinal protozoa effects have been observed, but the combination of ciprofloxacin with piperine was effective in reducing two folds of MIC for only *S. aureus*. Further studies focused on active structure, mechanism of action and drug combination may increase the potential of black pepper and its compounds for infectious disease treatment and reducing of drug resistance.

Keywords : Piperine, black pepper, antimicrobial, antimalarial

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5080111

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากพริกไทยดำและอนุพันธ์ของฟิเพอริน

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์กนกวรรณ กิตตินิยม

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์

คณะเทคนิคการแพทย์

มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : kkittiniyom@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 ธันวาคม 2549 – 31 สิงหาคม 2555

พริกไทยดำ (*P. nigrum*) และองค์ประกอบหลักฟิเพอริน จัดเป็นสมุนไพรที่ใช้กันในครัวเรือนและมีสรรพคุณมากมายตามตำรายาโบราณ นับเป็นต้นแบบที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นยาต้านจุลชีพในยุคที่พบปัญหาการดื้อยามากขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ ฟิเพอริน และอนุพันธ์ของฟิเพอรินที่ได้จากการสังเคราะห์โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ side chain และความยาวของพันธะคู่จำนวน 16 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. และ *P. aeruginosa*) ยีสต์ (*C. albicans* และ *C. neoformans*) มาลาเรีย (*P. falciparum* K1) โปรโตซัวในลำไส้ (*B. hominis*) และไวรัสผ่านการหลั่งแอนติเจนบนผิวไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ติดเชื้อไวรัส PLC/PRF/5 จากการทดลองพบว่าสารสมุนไพรเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ได้ดีต่อมาลาเรียและเซลล์ติดเชื้อไวรัส ซึ่งสารสกัดพริกไทยดำด้วยเมทานอล (AB-14) และ อนุพันธ์ของฟิเพอริน AB-8 ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาเลเรียฟัลซิพารัมได้สูงสุดถึงร้อยละ 79.5 และ 78.5 ตามลำดับ ด้วยค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.41 และ 0.29 µg/ml ตามลำดับ สารที่ออกฤทธิ์นี้จัดเป็นสารที่มีขั้วปานกลางและเป็นหมู่เอไมด์ที่มีพันธะคู่ต่างจากสารที่ออกฤทธิ์ได้ดีในการยับยั้งการสร้าง β-haematin ของมาเลเรียซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสูงและมีหมู่คาร์บอกซิลิกแอซิด คือสารสกัดพริกไทยดำด้วยน้ำ (AB-13) และ อนุพันธ์ AB-7 นอกจากนี้สารสกัดพริกไทยดำด้วยเมทานอล (AB-14) และด้วย CH₂Cl₂ (AB-17) มีแนวโน้มที่จะให้ผลดีในการยับยั้งการหลั่งแอนติเจนบนผิวไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ติดเชื้อไวรัส แม้ว่าจะไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์และโปรโตซัวในลำไส้ แต่เมื่อทดสอบการใช้ยาร่วมกันกลับพบว่าฟิเพอรินสามารถเสริมฤทธิ์ยา ciprofloxacin โดยลดค่า MIC ของ *S. aureus* ลงสองเท่า ดังนั้นนอกจากการศึกษาในเชิงโครงสร้างและกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพแล้ว การพัฒนาสารสมุนไพรเพื่อใช้เสริมฤทธิ์กับยารักษาในปัจจุบันอาจช่วยลดปัญหาการดื้อยาอีกทางหนึ่ง

คำหลัก : ฟิเพอริน พริกไทยดำ สารต้านจุลชีพ สารต้านมาลาเรีย

เนื้อหาทางวิจัย

บทนำ

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย ซึ่งส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ การท่องเที่ยว และชีวิตความเป็นอยู่ของคนในชาติ ด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยในการติดต่อและการคมนาคมแบบไร้พรมแดนในปัจจุบัน จึงทำให้การกระจายของเชื้อและโรคเป็นไปอย่างไม่จำกัดเช่นกัน ปัญหาโรคติดเชื้อเริ่มมีความหลากหลายและทวีความรุนแรงขึ้นในยุคของการระบาดของโรคเอดส์ เกิดเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสและโรคอุบัติใหม่ขึ้นมากมาย รวมทั้งการดื้อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistance) พบสูงมากขึ้น ทั้งในแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส มาลาเรีย และโปรโตซัว การคิดค้นยาใหม่หรือสารทดแทนเพื่อใช้ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็น ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาสมุนไพรไทยซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีอยู่แล้วเพื่อการนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาสมุนไพรหลากหลายชนิด ซึ่งพริกไทยดำจัดเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณมากมาย

พริกไทยดำเป็นเครื่องเทศที่ใช้กันแพร่หลายมาเป็นเวลานาน มีแหล่งกำเนิดอยู่บริเวณเทือกเขาทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย ปัจจุบันเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศที่มีอากาศร้อน เช่น บราซิล อินเดีย อินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย พริกไทยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* Linn ชื่อภาษาอังกฤษ black pepper อยู่ในวงศ์ piperaceae ลักษณะลำต้นเป็นเถาเลื้อย เมื่อนำพริกไทยมาสกัดด้วยตัวทำละลาย จะพบสารจำพวกอัลคาลอยด์ที่สำคัญคือ พิเพอริน (piperine) ซึ่งสารนี้จะพบได้ในต้นปี่ (Piper longum) ได้ด้วย พิเพอรินเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้กลิ่นฉุนและรสเผ็ด พริกไทยดำมีสรรพคุณตามตำรายาไทยคือ ใช้เป็นยาขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อ บำรุงธาตุเจริญอาหาร ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะและกระตุ้นประสาท ชาวจีนใช้พริกไทยระงับอาการปวดท้อง แก้ไข้มาลาเรีย แก้อหิวาตกโรค (1)

ในปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติและฤทธิ์ของพริกไทยดำและอนุพันธ์พิเพอรินที่พบมากในพริกไทยดำ และสนับสนุนสรรพคุณเบื้องต้นเช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านมะเร็งและการแพร่กระจาย (2) ฤทธิ์ antioxidant แก้วลมบ้าหมู (Antiepileptic) ช่วยควบคุมอุณหภูมิ และช่วยเพิ่มการดูดซึมสารของลำไส้ (3) ยับยั้งการทำงานของ drug metabolizing enzymes ในยา/สารบางชนิด เช่น rifampicin (anti-tuberculosis), propranolol, theophylline, coenzyme Q₁₀ และ beta-carotene ทำให้มียาในซีรัมสูงและอยู่นาน (4,5) นอกจากคุณสมบัติในการรักษาโรคแล้ว พริกไทยดำและอนุพันธ์พิเพอรินยังมีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุงและแมลงด้วย (6) ส่วนฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพแม้ว่าจะมีรายงานไม่มากนัก แต่ก็พบว่าเมื่อให้พิเพอรินร่วมกับยาต้านจุลชีพในหนู rat จะเห็นผลการเสริมฤทธิ์กับยาในกลุ่ม beta lactam, amoxycillin trihydrate และ cefotaxime sodium โดยกลไกการเสริมฤทธิ์นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (7) นอกจากนี้ Khan และคณะยังพบว่าค่า MIC ของ Ciprofloxacin ลดลง เมื่อผสมยากับพิเพอรินในการทดลองกับ *S. aureus* ทั้งชนิด MSSA และ MRSA ซึ่งเชื่อว่าพิเพอรินอาจยับยั้ง efflux pump ของเชื้อ (8) ในกลุ่มเชื้อราพบว่า MRG5080111

อนุพันธ์อัลคาลอยด์จาก *Piper longum* มีฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่ม Phytopathogenic fungi (9) ส่วนโปรโตซัว มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดอัลคาลอยด์ฟิเพอริน จากพืชตระกูล *Piper* spp. พบว่ามีฤทธิ์ต่อโปรโตซัว โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของระยะ promastigote และ amastigote ของ *Leishmania donovani* ซึ่งเป็น intracellular protozoa ที่ก่อให้เกิดโรค visceral leishmaniasis ได้ (10,11). Ribeiro และคณะพบว่าอัลคาลอยด์ฟิเพอรินที่สกัดจาก *Piper nigrum* มีฤทธิ์เป็นพิษต่อระยะ epimastigote และ amastigote ของ *Trypanosoma cruzi* ซึ่งเป็นโปรโตซัวก่อโรค Chagas's disease ที่ค่า $IC_{50} = 7.36 \mu\text{M}$ เมื่อเทียบกับ benznidazole ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาโรค ($IC_{50} = 2.20 \mu\text{M}$) (12) Tripathi และคณะ ได้ทำการศึกษาศักยภาพของอัลคาลอยด์ฟิเพอริน ต่อโปรโตซัวในลำไส้พบว่าสารสกัด ethanol จาก *P. longum* (ดิบสไล) ที่ $125 \mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Giardia lamblia* ในหนูได้ 100% (13) ในประเทศไทย Sawangaroen และคณะ รายงานว่าสารสกัดด้วย methanol จาก *P. longum* มีฤทธิ์ในการกำจัด *Entamoeba histolytica* ในหนู โดยมี cure rate เท่ากับ 100% เมื่อให้สารสกัดในขนาด $1,000 \mu\text{g/kg/day}$ ติดต่อกัน 5 วัน ซึ่งเทียบเท่ากับ metronidazole $125 \mu\text{g/kg/day}$ และเมื่อลดขนาดลงเหลือ $500 \mu\text{g/kg/day}$ cure rate ยังคงสูงถึง 93% (14) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดด้วยเฮกเซนจาก *P. longum* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Blastocystis hominis* ในหลอดทดลองอีกด้วย (15) อย่างไรก็ตามกลไกในการออกฤทธิ์ของอัลคาลอยด์ฟิเพอรินต่อโปรโตซัวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดในปัจจุบัน *B. hominis* และ *Trichomonas hominis* เป็นโปรโตซัวในลำไส้ แม้โดยปกติไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ในปัจจุบันมีรายงานการพบ *B. hominis* ในปริมาณมาก หรือการพบร่วมกับโปรโตซัวชนิดอื่นซึ่งมีความสัมพันธ์กับอาการผิดปกติทางลำไส้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (16,17) เนื่องจาก *B. hominis* และ *T. hominis* เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีแบคทีเรียเป็นอาหาร การแยกเชื้อเพื่อการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถทำได้ง่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์และซีรัม ในปัจจุบันโปรโตซัวทั้งสองชนิดยังไม่มีรายงานการต่อการรักษาด้วยยา metronidazole ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นโปรโตซัวต้นแบบในการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารอัลคาลอยด์ฟิเพอรินต่อโปรโตซัวในลำไส้ต่อไปได้ ส่วนโปรโตซัวในเลือดอย่างมาเลเรียฟัลซิพารัมที่พบเป็นปัญหามากในประเทศไทย ที่มีทั้งความชุกโดยเฉพาะบริเวณชายแดนไทย-กัมพูชาและชายแดนไทย-พม่า ความรุนแรงของโรคและการดื้อยาที่เพิ่มขึ้น (18) จากรายงานพบว่าฟิเพอรินมีผลต่อ choline and Rb^+ transport ในเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาเลเรียฟัลซิพารัม (19)

จากการออกฤทธิ์ที่มีความหลากหลายของสมุนไพรไทยดำ ฟิเพอริน และอนุพันธ์ฟิเพอริน ทำให้มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาหาส่วนประกอบหรือโครงสร้างสารที่มีฤทธิ์สำคัญและจำเพาะในการใช้งาน หรือสังเคราะห์ปรับปรุงโครงสร้างของยา เพื่อปรับใช้ในการรักษาให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ให้ยามีคุณภาพคงที่และลดผลข้างเคียงของสมุนไพร ที่อาจมีผลมาจากความแตกต่างของการสกัดและแหล่งที่มาของสมุนไพร และสามารถต่อยอดเพื่อนำไปพัฒนาและผลิต

เป็นยาในอุตสาหกรรม อาจใช้เป็นทางเลือกในการรักษาร่วมกับยาแผนปัจจุบัน หรือใช้เป็นยาเสริมในการรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อต่อไป

วัตถุประสงค์

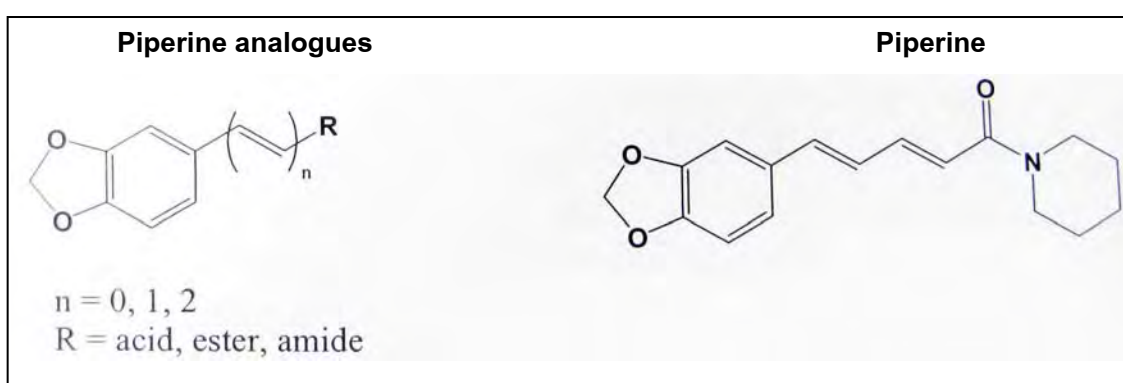
1. ศึกษาการออกฤทธิ์ในการทำลายและ/หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ไวรัส ยีสต์ มาลาเรีย และโปรโตซัวในลำไส้ ของสารสกัดพริกไทยดำ (*P. nigrum*) พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอรินที่ได้จากการสังเคราะห์โดยมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้าง
2. เปรียบเทียบโครงสร้างของสารสกัดจากพริกไทยดำและอนุพันธ์ของพิเพอรินกับฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ

วิธีทดลอง

1. สารสมุนไพรและสารเคมีทดสอบ

สารสกัดของพริกไทยดำและอนุพันธ์ของพิเพอรินจำนวน 16 ชนิด (ตารางที่ 1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. นันทกา โกธนา ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งประกอบ ด้วยสารสกัดจากพริกไทยดำ ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ (น้ำ เมทานอล เฮกเซน และ CH_2Cl_2) และอนุพันธ์พิเพอรินชนิดต่างๆ ที่ได้จากการสังเคราะห์และบางตัวสามารถสั่งซื้อได้จากบริษัท โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ side chain ทั้งที่เป็นคาร์บอกซิลิกแอซิด เอสเทอร์และเอไมด์ และปรับความยาวของพันธะคู่ให้แตกต่างกัน ดังรูปที่ 1

สารเคมีสังเคราะห์หรือยา (ตารางที่ 1) ที่ใช้ในการทดสอบควบคุมในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบและเป็นตัวควบคุมคือพิเพอริน (Piperine) เป็นสารหลักของสมุนไพรกลุ่มพริกไทยดำ Ciprofloxacin เป็นยาด้านแบคทีเรีย Amphotericin B เป็นยาด้านเชื้อรา Choloquine diphosphate และ Artesunate เป็นยาด้านมาลาเรียและ Metronidazole เป็นยาด้านโปรโตซัวในลำไส้

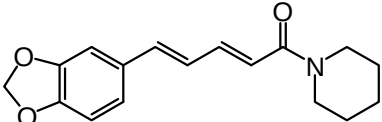


รูปที่ 1 รูปโครงสร้างของอนุพันธ์ของพิเพอริน (piperine analogues) และพิเพอริน (piperine): โดยอนุพันธ์ของพิเพอรินได้จากการสังเคราะห์โดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างที่ side chain ทั้งที่เป็นคาร์บอกซิลิกแอซิด เอสเทอร์และเอไมด์ และปรับความยาวของพันธะคู่ให้แตกต่างกัน

ตารางที่ 1 List of black pepper extracts, piperine analogues and chemical reagents

Type	Code	Compound	MW	Solvent
Piperine analogues	AB-1		168	DMSO
	AB-2		166	DMSO
	AB-3		192	DMSO
	AB-5		217	DMSO
	AB-6		239	DMSO
	AB-7		218	DMSO
	AB-8		231	DMSO
	AB-9		232	DMSO
	AB-10		246	DMSO
	AB-20		259	DMSO
	AB-53		194	DMSO

ตารางที่ 1 List of black pepper extracts, piperine analogues and chemical reagents (ต่อ)

Type	Code	Compound	MW	Solvent
Black pepper extracts	AB-13	สารสกัดพริกไทยจากน้ำ		DMSO
	AB-14	สารสกัดพริกไทยจาก Methanol		DMSO
	AB-15	สารสกัดพริกไทยจาก Hexane		DMSO
	AB-17	สารสกัดพริกไทยจาก CH ₂ Cl ₂		DMSO
Chemical agents	Piperine	From Fluka 	285.34	DMSO
	Ciprofloxacin	from US Biological	285	Water
	Amphotericin B			Water
	Choloquine diphosphate	from Sigma	515.87	DMSO
	Artesunate	from Guilin No. 2 pharmaceutical factory, China		DMSO
	Metronidazole	From Fluka		Acetic acid

DMSO = Dimethyl sulfoxide

2. เชื้อทดสอบและการเตรียมเชื้อ

2.1 แบคทีเรีย

Gram positive bacteria ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Enterococcus faecalis*

Gram negative bacteria ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., และ *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยทำการทดสอบยืนยันเชื้อด้วย biochemical tests ในจำนวนนี้มีเชื้อดื้อยาชนิด MRSA และ fluoroquinolone resistance รวมด้วย โดยเชื้อที่ทำการทดสอบมีจำนวน 10 isolates ต่อชนิดของเชื้อ ยกเว้น *Bacillus cereus* มีจำนวน 2 isolates เมื่อทดสอบการปรับค่าความขุ่นเชื้อแบคทีเรียที่ 0.5 McFarland standard ($1-2 \times 10^8$ CFU/ml) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ OD_{625 nm} พบว่าเชื้อแต่ละ genus ให้ค่า OD_{625 nm} ที่แตกต่างกันโดยอยู่ในช่วง 0.07-0.10 ในการปรับปริมาณเชื้อทั้งแบคทีเรียและยีสต์จะทำการนับโคโลนี (colony count) ด้วยวิธี 6×6 drop plate (20) เพื่อยืนยันทุกครั้ง

เชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุม ได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853

2.2 ยีสต์

Candida albicans และ *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยเชื้อที่ทำการทดสอบมีจำนวน 10 isolates ต่อชนิดของเชื้อ เชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นเชื้อควบคุมคือ *Candida albicans* ATCC 90028 ทำการทดสอบยืนยันเชื้อโดยวิธี germ tube สำหรับ *C. albicans* และย้อมด้วย Indian ink สำหรับ *C. neoformans* เพาะเลี้ยงยีสต์บน Sabouraud Dextrose Agar (SDA) และบ่มเพาะที่ 35-37°C

2.3 มาลาเรีย

เชื้อมาเลเรียฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) สายพันธุ์ K1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Chloroquine เพาะเลี้ยงด้วยวิธี Trager and Jensen (21) ที่อุณหภูมิ 37°C $\pm 0.5^\circ\text{C}$ ในสภาวะ 5% CO₂, 5% O₂ และ 90% N₂ โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุก 24 ชั่วโมง

2.4 โปรโตซัวในลำไส้

ทำการเลี้ยง *Blastocystis hominis* ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระ ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีแบคทีเรีย (xenic culture) ในหลอดทดลอง โดยนำอุจจาระที่ตรวจพบโปรโตซัว *B. hominis* ด้วยวิธี simple smear ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Jones' medium (22) ที่มีส่วนผสมของ 20% human serum ในหลอดแก้วสะอาด ปิด และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำ sediment มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ในการทดลองต่อไปจะใช้เชื้อในระยะ G0 คือการเพาะเชื้อโดยใช้เชื้อเริ่มต้นจากอุจจาระสด

2.5 ไวรัส (Hepatitis B virus)

ทำการทดสอบโดยใช้เซลล์ PLC/PRF/5 (Alexander cell) ซึ่งเป็น cell line ที่สร้างจากเซลล์ตับที่ได้จากผู้ป่วย chronic hepatitis ที่พบว่าชิ้นส่วนของ Hepatitis B virus ได้ integrate เข้าไปใน chromosome ของเซลล์ และสามารถผลิต HBs antigen ออกมาได้ ทำการเพาะเลี้ยงใน Minimal Essential Medium (MEM, GIBCO BRL) และบ่มเพาะที่ 37°C, 5% CO₂

3. การทดสอบความสามารถในการละลายของสารสมุนไพรในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ทำการทดสอบการละลายของสารสมุนไพร ด้วยตัวทำละลายต่างๆ คือ DMSO (Dimethyl sulfoxide, Fluka), Methanol และ 95% alcohol นอกจากนี้ยังทำการทดสอบการละลายเมื่อทำการเจือจางใน broth ที่มีและไม่มี Tween-80

4. ทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลาย

4.1 ต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

ทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลาย (DMSO, Methanol และ Tween-80) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1-50%) ต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ โดยใช้วิธี broth microdilution ดัง condition ในตารางที่ 2 อ้างอิงตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute อ่านค่าความเข้มข้นโดยที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นเป็นค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) จากนั้นนำทุก dilution ที่ไม่พบเชื้อมาลงบน Mueller Hinton Agar (MHA) เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าแบคทีเรียได้เป็น ค่า MBC (Minimal Bactericidal Concentration) แต่ละตัวอย่างจะทำการทดลองอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate)

ตารางที่ 2 Conditions for broth microdilution method

เชื้อทดสอบ	ปริมาณเชื้อ (CFU/ml/well)	อาหารทดสอบ (media)	เวลาบ่มเพาะที่ 35°C (ชั่วโมง)	ยาทดสอบอ้างอิง
Bacteria	$5-8 \times 10^5$	CAMHB	16-20	Ciprofloxacin
<i>C. albicans</i>	$0.5-2.5 \times 10^3$	RPMI with MOPS	46-50	Amphotericin B
<i>C. neoformans</i>	$0.5-2.5 \times 10^3$	YNB	70-74	Amphotericin B

CAMHB = Cation adjusted Mueller Hinton Broth MOPS = 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium YNB = Yeast nitrogen broth

4.2 ต่อมาลาเรีย

นำเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ด้วยวิธี Trager and Jensen (21) ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากกว่า 2% Parasitemia และเป็นระยะ ring form มากกว่าร้อยละ 90 มาเจือจางด้วยเม็ดเลือดแดงหมูโอที่ปราศจากเชื้อให้มีปริมาณร้อยละ 0.5 ถึง 1 ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 190 μ l จากนั้นเติม complete media RPMI 1640, complete media RPMI 1640 ที่มี 40% DMSO (final concentration 2%) และ complete media RPMI 1640 ที่มี methanol หลุมละ 10 μ l นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มอุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียจากกันหลุมมาทำฟิล์มชนิดบาง fix ด้วย methanol ย้อมด้วยสี Giemsa ตรวจนับปริมาณเชื้อของแต่ละหลุมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า คำนวณเป็นร้อยละ parasitemia และนับซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละหลุม

4.3 ต่อโปรโตซัวในลำไส้

การทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายจะทำการคู่ไปกับการทดลองในฐานะ reagent control ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. hominis* ในหลอดทดลอง โดยใช้ตัวทำละลายของ

piperine คือ DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5%, 7.5% และ 12.5% ทำควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสมุนไพรที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mg/ml ตามลำดับ และใช้ตัวทำละลายของยา metronidazole คือ acetic acid ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.25% และ 0.5% ทำควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของยาที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mg/ml ตามลำดับ และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดซึ่งจะไม่ติดสี eosin-brilliant cresyl blue ด้วย haemocytometer

4.4 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 (ไวรัส)

ตัวทำละลายของสารสมุนไพรที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งการหลั่ง HBs Antigen ของไวรัสในหลอดทดลองคือ 1% DMSO ใน maintenance media (M-MEM) ซึ่งได้ทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายที่ความเข้มข้นนี้ควบคู่ไปกับทุกการทดลองในฐานะ reagent control

5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรีย

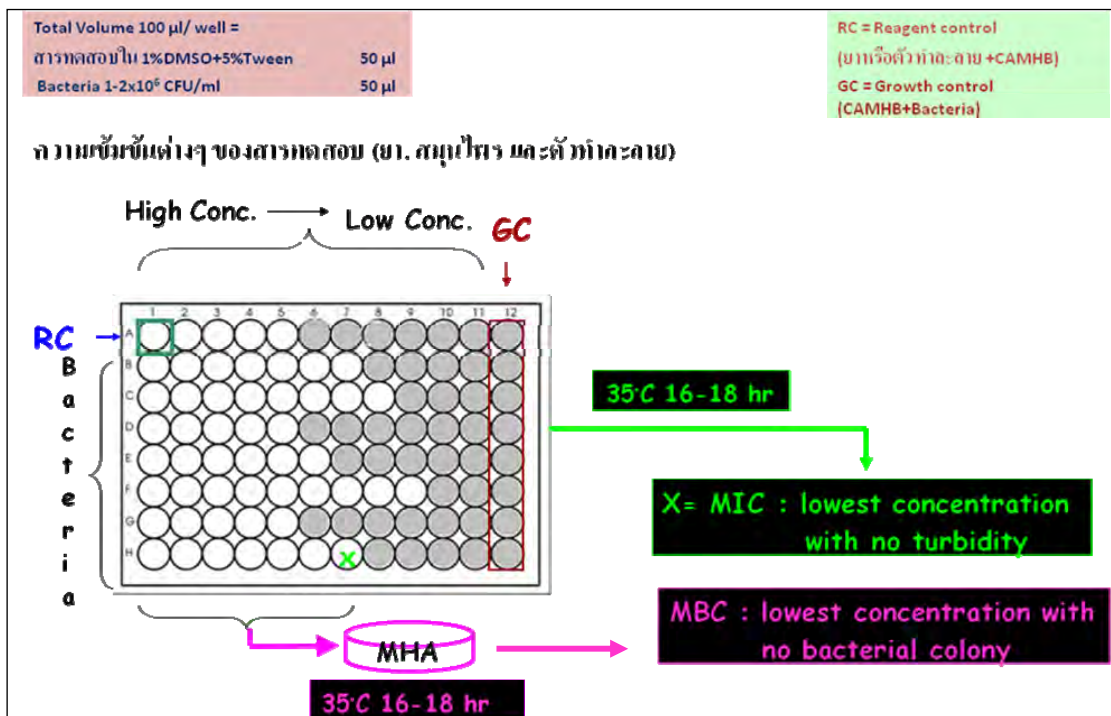
ทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอรีน (AB-2, AB-5, AB-6, AB-8, AB-20 และ AB-53) และ piperine (ตารางที่ 1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ สูงสุดถึง 500 µg/ml โดยกำหนดให้มีตัวทำละลายไม่เกิน 1% DMSO และ 5% Tween-80 ทดสอบด้วยวิธี broth microdilution (รูปที่ 2) โดยใช้อาหาร Cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ในตารางที่ 2 อ่านค่าความขุ่น โดยที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นเป็นค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) จากนั้นนำทุก dilution ที่ไม่พบเชื้อขึ้นมาลงบน Mueller Hinton agar (MHA) เพื่อหาค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ฆ่าแบคทีเรียได้เป็นค่า MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ทำการทดสอบเทียบกับยา Ciprofloxacin แต่ละตัวอย่างจะทำการทดลองอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) โดยแต่ละครั้งที่ทดลองจะทดสอบไปพร้อมกับเชื้อควบคุม (quality control strains) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชื่อเชื้อแบคทีเรียควบคุมสำหรับทำ Control และค่าความเข้มข้นที่เป็น acceptable range รวมถึงค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง

Organism	ATCC	Acceptable range of CIP (µg/ml)	Range of CIP concentration (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	29213	0.12-0.5	0.009-2
<i>E. faecalis</i>	29212	0.25-2	0.0625-8
<i>E. coli</i>	25922	0.004-0.015	0.009-1
<i>P. aeruginosa</i>	27853	0.25-1	0.125-16

ATCC = American Type Culture Collection

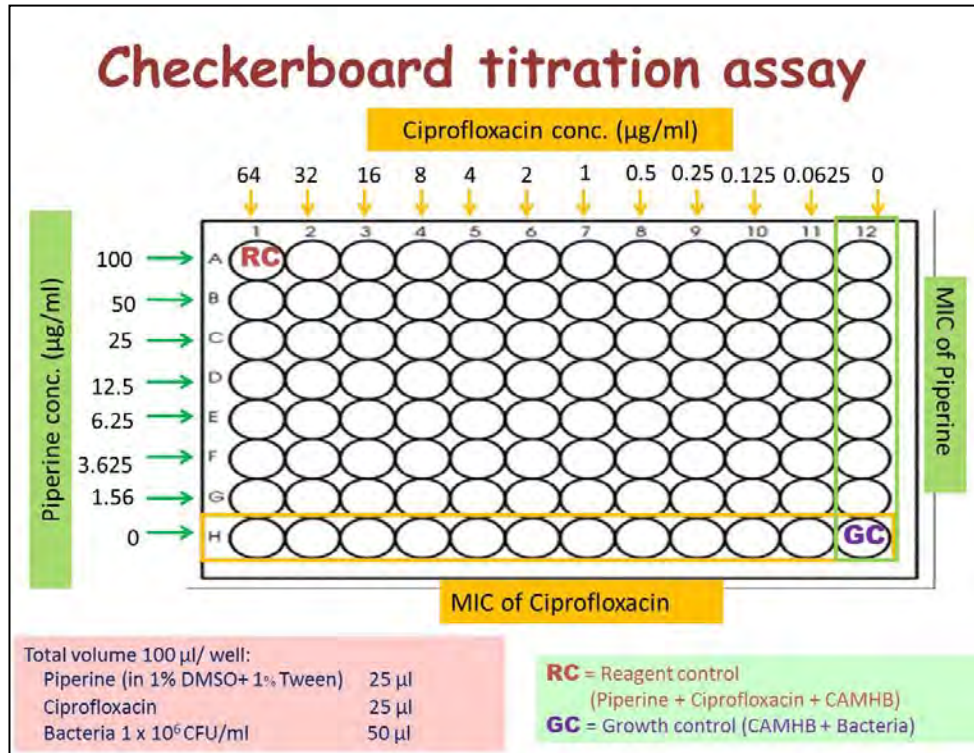
CIP = Ciprofloxacin



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี **Broth microdilution** รวมถึงการอ่านผล **Minimum inhibitory concentration (MIC)** และ **Minimum bactericidal concentration (MBC)**

6. ทดสอบการใช้สารสมุนไพรร่วมกับ ciprofloxacin เพื่อเสริม/ต้านฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

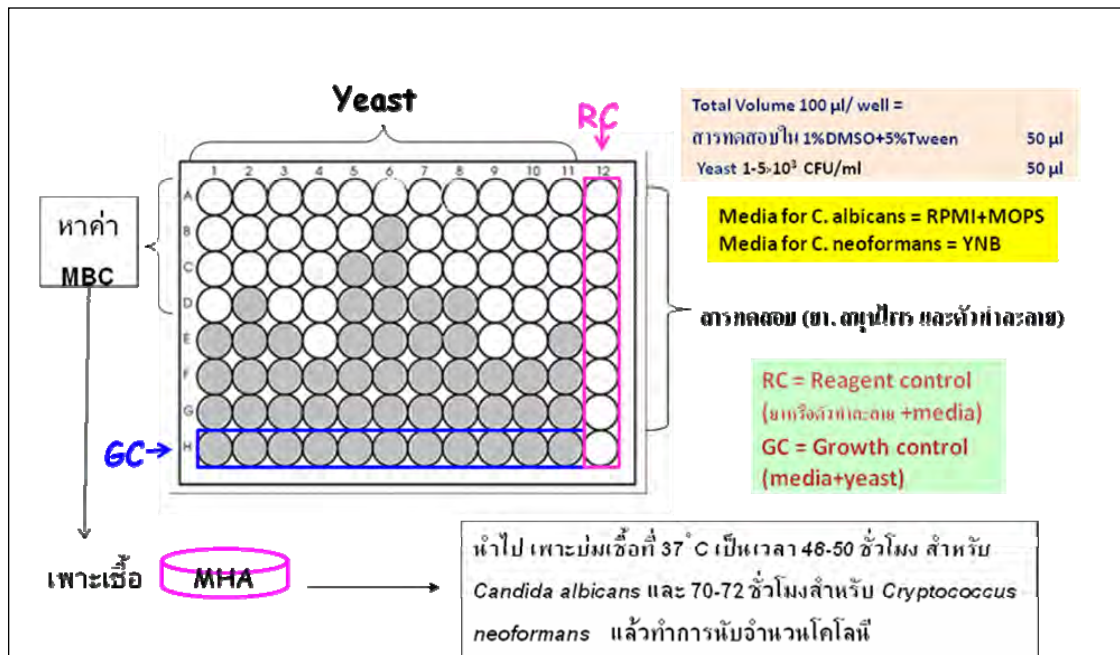
ทำการทดสอบคุณสมบัติของ piperine, สารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-14) และอนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-8) ในการเสริม/ต้านฤทธิ์ของ ciprofloxacin ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp. และ *Vibrio* spp. ด้วยวิธี checkerboard titration assay (รูปที่ 3) ปริมาณรวมทั้งหมดในแต่ละหลุมเท่ากับ 100 μ l โดยแต่ละหลุมมีส่วนผสมของพิเพอรินใน 1% DMSO กับ 5% Tween-80 จำนวน 25 μ l, ciprofloxacin 25 μ l และเชื้อ (1×10^6 CFU/ml) จำนวน 50 μ l (final concentration 5×10^5 CFU/ml) ในการทดสอบจะมี reagent control (หลุม A1) ซึ่งประกอบด้วยสารที่นำมาทดสอบผสมกับ CAMHB และสำหรับ growth control (หลุม H12) จะประกอบด้วย CAMHB กับเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนของความเข้มข้นของสารที่ใช้ ในแต่ละหลุมมีสัดส่วนผสมของ ciprofloxacin และพิเพอรินต่างๆโดยใส่ ciprofloxacin ความเข้มข้น 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0 μ g/ml ใน column ที่ 1 ถึง 12 ตามลำดับ และใส่ piperine ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.125, 3.625, 1.56 และ 0 μ g/ml ในแถวที่ A ถึง H ตามลำดับ ดังรูปที่ 4 หลังจากใส่เชื้อเรียบร้อยแล้วจึงนำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเพาะบ่มจะทำการอ่านค่า MIC



รูปที่ 3 แสดงผังการทดสอบการเสริม/ต้านฤทธิ์ของ piperine ต่อ ciprofloxacin ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Checkerboard titration assay

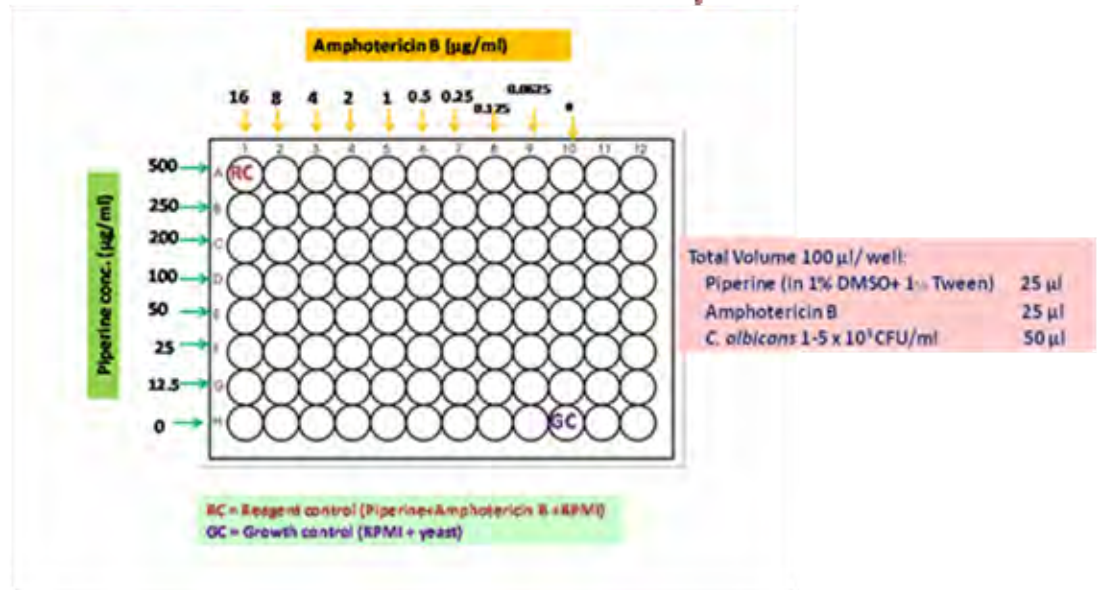
7. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งยีสต์

ทดสอบความไวต่อสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) และอนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-2, AB-8, AB-20 และ AB-53) ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml และ piperine ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml โดยใช้วิธี broth microdilution (รูปที่ 4) โดยใช้อาหาร RPMI-1640 ผสม MOPS สำหรับ *C. albicans* และ Yeast nitrogen broth (YNB) สำหรับ *C. neoformans* และเพาะบ่มที่ 35-37°C นาน 48-50 ชั่วโมง และ 70-72 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* และสำหรับ *C. neoformans* ตามลำดับ ตามคำแนะนำของ CLSI ในตารางที่ 2 อ่านค่าความขุ่น โดยที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นเป็นค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) จากหลุมที่ไม่ขุ่น จะนำมาหาค่าลด MHA อย่างละ 10 µl แล้วนำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 35-37°C เป็นเวลา 48-50 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาก็จะนำมาอ่านค่า MBC ทำการทดสอบเทียบกับยา Amphotericin B แต่ละตัวอย่างจะทำการทดลองอย่างละ 3 ครั้ง (triplicate) โดยมีการทำซ้ำควบคุม *C. albicans* ATCC 90028 ไปด้วยทุกครั้ง ซึ่งให้ค่าที่ยอมรับได้ตาม CLSI สำหรับ Amphotericin B คือ 0.5-2.0 µg/ml



8. ทดสอบการใช้ฟิเพอริร่วมกับ Amphotericin B เพื่อเสริมต้านฤทธิ์การยับยั้งยีสต์ *C. albicans*

Checkerboard titration assay for *C. albicans*



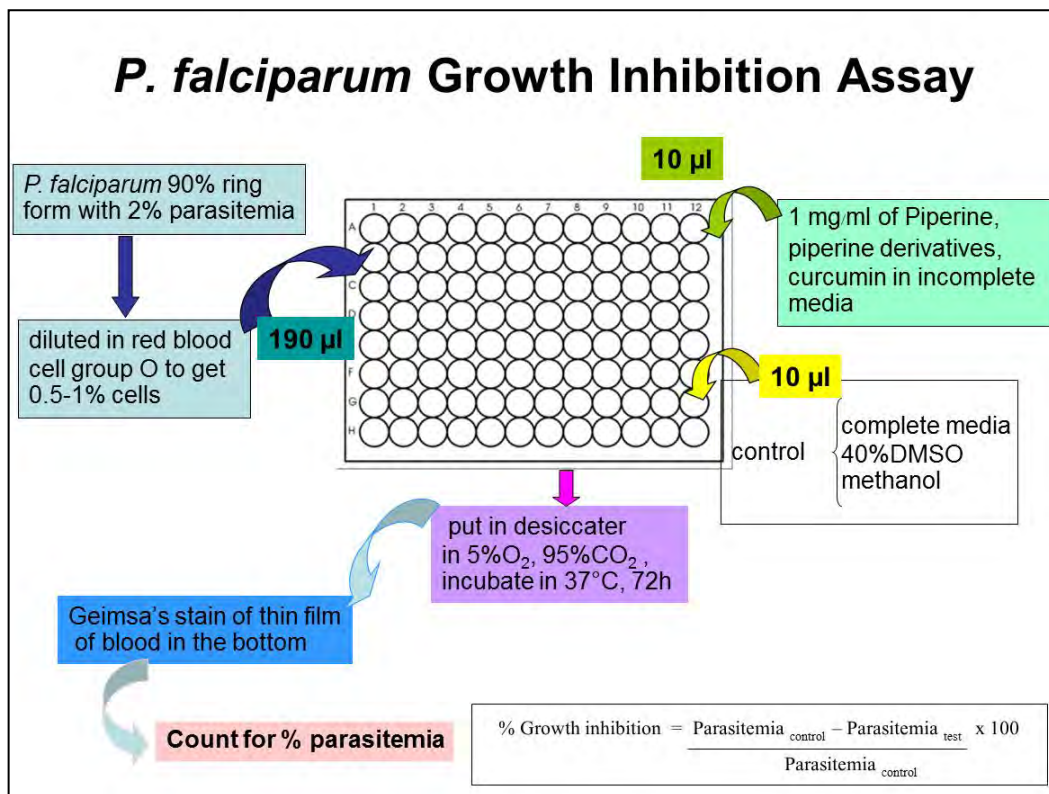
รูปที่ 5 แสดงผังการทดสอบการเสริม/ต้านฤทธิ์ของ piperine ต่อ Amphotericin B ในการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* โดยวิธี Checkerboard titration assay

9. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งมาลาเรีย *P. falciparum*

นำเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum* สายพันธุ์ K1 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640 ด้วยวิธี Trager and Jensen (21) ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากกว่า 2% Parasitemia และเป็นระยะ ring form มากกว่าร้อยละ 90 มาเจือจางด้วยเม็ดเลือดแดงหมู่อีที่ปราศจากเชื้อให้มีปริมาณร้อยละ 0.5 ถึง 1 ใส่ใน 96-well plate หลุมละ 190 µl จากนั้นเติมสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอรีน (AB-1, AB-2, AB-3, AB-6, AB-7, AB-8 และ AB-9) และ piperine ในระดับความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 10 µl (final concentration 50 µg/ml) สำหรับหลุมควบคุมจะใช้ 40% DMSO (final concentration 2%) แทนสารทดสอบ นำไปเพาะเลี้ยงในตู้บอดูอุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง (รูปที่ 6) จากนั้นนำเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียจากกันหลุมมาทำฟิล์มชนิดบาง fix ด้วย methanol ย้อมด้วยสี Geimsa ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียของแต่ละหลุม ต่อการนับเม็ดเลือดแดง 5,000 เซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 7 A) คำนวณเป็นร้อยละ parasitemia และนับซ้ำ 2 ครั้งในแต่ละหลุม นำค่า parasitemia ที่ได้มาคิดเฉลี่ยเป็น Geometric mean และคำนวณค่า % growth inhibition ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Growth inhibition} = \frac{\text{Parasitemia}_{\text{control}} - \text{Parasitemia}_{\text{test}}}{\text{Parasitemia}_{\text{control}}} \times 100$$

ถ้าสารสกัดจากพริกไทยดำหรืออนุพันธ์ของพิเพอรินชนิดใดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ได้มากกว่า piperine จะนำมาทดสอบต่อเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมาลาเรียได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยนำเชื้อมาลาเรียมาทดสอบกับสารสกัดจากพริกไทยดำที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 2000, 10000 และ 20000 mg/ml อนุพันธ์ของพิเพอรินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 2000, 5000, 20000 mg/ml และ piperine ที่ความเข้มข้น 0.2, 2, 20, 200, 2000 และ 20000 mg/ml โดยเปรียบเทียบกับ reference drugs คือ Chloroquine ที่ความเข้มข้น 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000 mM และ Artemisinin ที่ความเข้มข้น 19.6, 78, 312.5, 1250, 5000 และ 20000 ng/ml ตามวิธีที่กล่าวข้างต้น และวิเคราะห์ค่า IC_{50} ด้วยวิธี Log probit analysis โดยโปรแกรม Graph Pad Prism 4 ซึ่งกำหนดให้แกน X เป็น log ของความเข้มข้น แกน Y เป็น probit

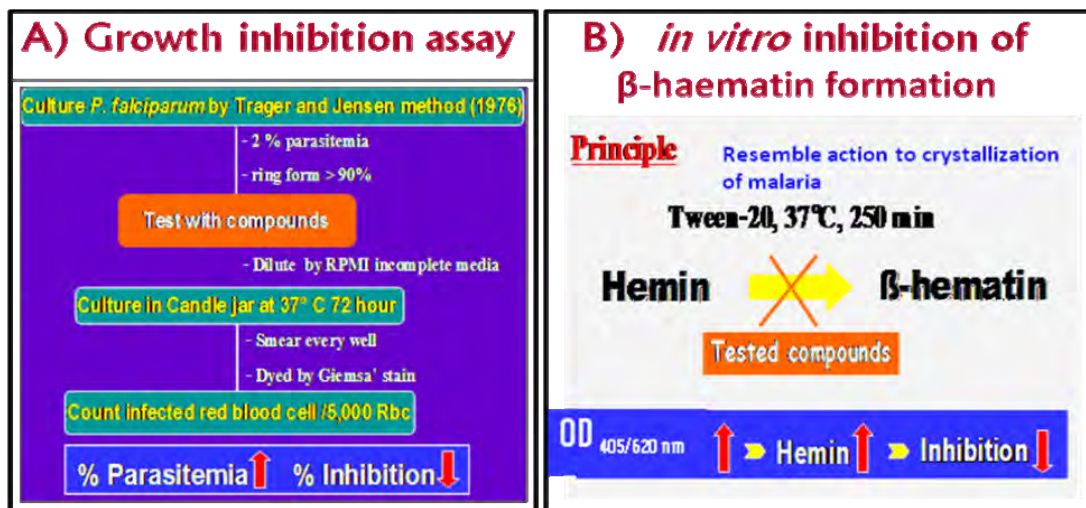


รูปที่ 6 แสดงผังการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของมาลาเรีย *P. falciparum* โดยวิธี Trager and Jensen

10. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้ง β -haematin ในมาลาเรีย (*in vitro* inhibition of β - haematin formation)

เติมสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-1, AB-2, AB-3, AB-5, AB-6, AB-7, AB-8, AB-9, AB-10, AB-20 และ AB-53), piperine และ chloroquine ในระดับความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/ml}$ หลุมละ 50 μl (final concentration 100 $\mu\text{g/ml}$) ใน 96-well plate จากนั้นเติม Hemin chloride (200 μM) หลุมละ 50 μl และ Tween-20 (0.024 g/l) หลุมละ 100 μl ส่วนหลุมควบคุม (A_{control}) ให้เติมน้ำกลั่น 150 μl และ Hemin chloride 50 μl หลุมควบคุมที่มีค่าการดูดกลืนแสงน้อยที่สุด (A_{min}) ให้เติมน้ำกลั่น 50 μl , Hemin chloride 50 μl และ Tween-20 ปริมาณ 100 μl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C จนครบ 250 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 405 และ 620 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (รูปที่ 7 B) คำนวณ % β -haematin inhibition ตามสูตรดังนี้

$$\% \beta\text{-haematin inhibition} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{min}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{min}}} \times 100$$



รูปที่ 7 แสดงผังการทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งมาลาเรีย *P. falciparum*.

A) Growth inhibition assay B) *in vitro* inhibition of β - haematin formation

11. ทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรินในการยับยั้งโปรโตซัวในลำไส้ *B. hominis*

เพาะเลี้ยงโปรโตซัว *B. hominis* ที่ได้จากอุจจาระสดเพื่อให้ได้ระยะ G0 จำนวนเริ่มต้น 3×10^3 cell/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Jones' medium ที่มีส่วนผสมของ 20% human serum โดยแต่ละหลอดมีส่วนผสมของ piperine ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5 mg/ml ทำควบคู่กับ reagent control คือ DMSO ที่ความเข้มข้น 2.5%, 7.5% และ 12.5% ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นของตัวทำละลายเท่ากับที่มีในสารทดสอบตามความเข้มข้นที่ใช้ ส่วน metronidazole ซึ่งใช้เป็น reference

drug จะทดสอบที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mg/ml โดยทำควบคู่กับ reagent control คือ acetic acid ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.25% และ 0.5% ตามลำดับ โดยมีน้ำเป็นหลอดควบคุม (negative control) ในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำความเข้มข้นละ 2 หลอด หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 18 และ 72 ชั่วโมง จะทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ซึ่งจะไม่ติดสี eosin-brilliant cresyl blue ด้วย haemocytometer ทำการนับจากตัวอย่างจำนวน 2 ครั้งในแต่ละหลอด นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เฉลี่ยในแต่ละหลุมกับหลอดควบคุม (negative control) และ reagent control

12. ทดสอบความเป็นพิษของสารสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5

ทำการทดสอบ cytotoxicity ด้วยวิธี MTT assay ที่วัดปริมาณ cell proliferation และ cell viability โดยดูการ cleavage ของเกลือ tetrazolium WST-1 เปลี่ยนเป็น formazan โดยอาศัยเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์ที่มีชีวิต เริ่มโดยเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 (Alexander cell) ใน Minimal Essential Medium (MEM, GIBCO BRL) ที่ความเข้มข้น 1×10^5 cell/ml เพาะเลี้ยงใน 96-well plate โดยใส่เซลล์หลุมละ 100 μ l บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 48 ชั่วโมง แทนที่ supernatant ด้วยสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-14 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-1, AB-2, AB-3 และ AB-53) และ piperine ที่ความเข้มข้น 250, 100 และ 10 μ g/ml หลุมละ 100 μ l โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 3 หลุม (triplicate) ส่วนหลุม blank จะมีเฉพาะ maintenance media (M-MEM) อย่างเดียว หลุม reagent control ประกอบด้วยเซลล์ใน maintenance media ที่มีตัวทำละลายของสมุนไพรคือ 1% DMSO และ cell control จะมีเฉพาะเซลล์ใน maintenance media นำไปบ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจะแทนที่ supernatant ด้วย maintenance media หลุมละ 200 μ l บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง แทนที่ supernatant ด้วย 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่เจือจางด้วย maintenance media ในอัตราส่วน 1:10 หลุมละ 20 μ l กันจากการโดนแสงและบ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม DMSO หลุมละ 100 μ l วัดค่า OD ด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณ % Viability ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Viability} = \frac{(\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{blank}})}{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}})} \times 100$$

13. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งการหลั่ง HBs Antigen ของไวรัสในหลอดทดลอง

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5 (Alexander cell) ใน MEM media ที่ความเข้มข้น 1×10^5 cell/ml ใน 96-well plate บ่ม 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง แทนที่ supernatant ด้วยสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-14 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-1, AB-2, AB-3 และ

AB-53) และ piperine ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml หลุมละ 100 µl โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 3 หลุม (triplicate) ส่วนหลุม blank จะมีเฉพาะ maintenance media (M-MEM) อย่างเดียว หลุม reagent control ประกอบด้วยเซลล์ใน maintenance media ที่มี 1% DMSO และ cell control จะมีเฉพาะเซลล์ใน maintenance media นำไปบ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด จะแทนที่ supernatant ด้วย maintenance media หลุมละ 200 µl บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ นาน 24 ชั่วโมง นำ supernatant ที่ได้อย่างละ 100 µl ไปวัดปริมาณ HBs Antigen ที่เซลล์ผลิตออกมา ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบ MONOLISA[®] HBs Ag ULTRA (Bio-Rad) ดำเนินการทดสอบ ตามคำแนะนำของชุดทดสอบ วัดค่า OD ของสีที่เกิดด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 nm และคำนวณการยับยั้งการหลั่ง HBs Antigen เป็นอัตราส่วน (ratio) ระหว่างค่า OD ของ test ต่อค่า OD ของ cell control

ผลการทดลอง

1. ความสามารถในการละลายของสารสมุนไพรในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

เนื่องจากสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอริน มีคุณสมบัติการละลายน้ำได้ไม่ดี จึงทำการทดสอบการละลายของสารสมุนไพรด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น DMSO, Methanol, 95% alcohol และ Tween-80 ผลปรากฏว่า สารสมุนไพรทุกตัวอย่างที่ใช้ทดลองนี้สามารถละลายได้ใน DMSO ส่วน Methanol และ 95% alcohol ทำให้สารละลายได้เป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อทำการเจือจางสารใน broth มากขึ้น พบว่าทำให้สารละลายขุ่นขึ้นมาได้ ในกรณีนี้พบว่าเมื่อผสม Tween-80 ลงไปในสารละลายที่เจือจางจะช่วยให้การละลายกลับดีขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ DMSO ผสม Tween-80 เป็นตัวทำละลายของสมุนไพรที่ใช้ทดสอบ

2. ความเป็นพิษของตัวทำละลายต่อเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ มาลาเรีย โปรโตซัวในลำไส้ และเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของตัวทำละลาย DMSO, Methanol และ Tween-80 พบว่า DMSO และ Methanol ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ bacteriostatic กับเชื้อแบคทีเรีย ด้วยค่า MIC และ MBC ของ DMSO อยู่ในช่วง 6 ถึง 20 และ 12 ถึงมากกว่า 40 ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ของ Methanol อยู่ในช่วง น้อยกว่า 5 ถึง 16 และ น้อยกว่า 6 ถึงมากกว่า 40 ตามลำดับ แต่ DMSO และ Methanol ออกฤทธิ์ยับยั้งแบบ fungicidal ต่อยีสต์ ด้วยค่า MIC และ MBC ของ DMSO อยู่ในช่วง 8 ถึง 10 และ 8 ถึง 12 ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ของ Methanol อยู่ในช่วงเดียวกันคือ 10 ถึง 15 นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของค่า MIC ในแต่ละ isolate ของเชื้อชนิดเดียวกันที่ใช้ทดสอบ (strain variation) ดังผลในตารางที่ 4 และพบว่า Tween-80 ไม่เป็นพิษต่อแบคทีเรียจนถึงความเข้มข้น 25% ดังนั้นจึงเลือกใช้ส่วนผสมของ 1% DMSO กับ 1-5% Tween-80 เป็นตัวทำละลายในการทดสอบสำหรับแบคทีเรียและยีสต์ต่อไป โดยทำ reagent control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเชื้อมาลาเรียของตัวทำละลาย DMSO และ Methanol พบว่าปริมาณของเชื้อ (parasitemia) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI-1640, DMSO และ Methanol มีค่าเท่ากับร้อยละ 3.33, 2.86 และ 2.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบว่า % parasitemia ใน media ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$) และในการทดสอบต่อไปได้ทำ reagent control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

ตารางที่ 4 สรุปผลการทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

Type of microorganism	microorganism	DMSO (% v/v)		Methanol (% v/v)		Tween-80 (% v/v)	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Gram positive bacteria	<i>S. aureus</i>	14 - 20	>40	11 - 12	30	>25	ND
	<i>E. faecalis</i>	12 - 13	>35	10 - 15	>40	ND	ND
Gram negative bacteria	<i>E. coli</i>	11 - 14	25 - 40	<11 - 16	13 - >26	>25	ND
	<i>Salmonella</i> spp.	12 - 13	12 - 35	11 - 13	>15	ND	ND
	<i>Vibrio</i> spp.	<10	14 - 15	<6 - 7	<6 - 10	ND	ND
	<i>P. aeruginosa</i>	6 - 12	13 - 25	<5 - 6	9 - >25	>25	ND
Yeast	<i>C. albicans</i> *	8 - 10	10 - 12	10 - 15	10 - 15	ND	ND
	<i>C. neoformans</i> *	8 - 10	8 - 10	ND	ND	ND	ND

* สำหรับยีสต์จะผสม 1% Tween-80 ไปในการทดสอบร่วมกับ DMSO และ Methanol

MIC = Minimal Inhibitory Concentration MBC = Minimal Bacteriocidal Concentration

ND = Not done

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ของตัวทำละลายต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย *P. falciparum*

ตัวทำละลาย	% Parasitemia	95% Confident interval
RPMI-1640	3.33	2.01-3.52
2% DMSO in RPMI-1640	2.86	2.20-3.71
2% Methanol in RPMI-1640	2.66	2.69-4.12

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเชื้อ *B. hominis* ของตัวทำละลาย DMSO (ความเข้มข้น 2.5%, 7.5% และ 12.5%) และ acetic acid (ความเข้มข้น 0.05%, 0.25% และ 0.5%) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสมุนไพรและยา Metronidazole ตามลำดับ ในส่วนผสมที่มีความเข้มข้นต่างๆ พบว่า DMSO มีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อขึ้นกับความเข้มข้นของตัวทำละลายและความไวในการตอบสนองของแต่ละสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ B23 ที่มีการตอบสนองช้า พบว่าความเข้มข้น MRG5080111

ของตัวทำละลายมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อลง 40% คือ DMSO 12.5% ที่ 18 ชั่วโมง และความเข้มข้นตั้งแต่ 7.5% ที่ 72 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ B24 ที่มีการตอบสนองเร็วพบการลดปริมาณเชื้อลง 40% ที่ DMSO ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5% ที่ 18 ชั่วโมง และ ไม่มีผลต่อการลดปริมาณเชื้อที่ 72 ชั่วโมง ส่วน acetic acid ที่ความเข้มข้น 0.25% มีผลต่อการลดปริมาณเชื้อลงประมาณ 35% และ 54% ที่ 18 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.5% มีความเป็นพิษต่อเซลล์เกือบทั้งหมด ดังนั้นในการทดสอบต่อไปจึงทำ reagent control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

เมื่อทดสอบ cytotoxicity ต่อเซลล์ PLC/PRF/5 ของ 1% DMSO ใน maintenance media ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารทดสอบพบว่า % viability เท่ากับ 99.87% ซึ่งใกล้เคียงกับ cell control (100%) ดังนั้นความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้จึงไม่มีผลในการทำลายเซลล์ และในการทดสอบต่อไปได้ทำ reagent control ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งแบคทีเรีย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) อนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-2, AB-5, AB-6, AB-8, AB-20 และ AB-53) และ piperine โดยใช้วิธี broth microdilution ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบรวม 6 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. และ *P. aeruginosa* พบว่าที่ความเข้มข้นสูงถึง 500 µg/ml สารทดสอบสมุนไพรเหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่จากการทดลองเบื้องต้นที่ความเข้มข้นสูงถึง 1,024 µg/ml พบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Vibrio* spp. ในบางสายพันธุ์ได้ (data not shown) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูงจะมีอุปสรรคเรื่องการละลายของสารสมุนไพร

4. ทดสอบการใช้สมุนไพรร่วมกับ ciprofloxacin เพื่อเสริม/ต้านฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

เมื่อทดสอบการใช้อย่างร่วมกันระหว่าง piperine และ ciprofloxacin ในการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าเชื้อ *S. aureus* (2/5 isolates) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกมีค่า MIC ของ ciprofloxacin ลดลง 2 เท่า เมื่อใช้ร่วมกับ piperine ที่ความเข้มข้น 50, 12.5 และ 3.125 µg/ml (ตารางที่ 6) ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ คือ *E. coli* (2/3 isolates) และ *P. aeruginosa* (1/3 isolates) จะพบค่า MIC ของ ciprofloxacin เพิ่มขึ้น 2 เท่า เมื่อใช้ร่วมกับ piperine ที่ความเข้มข้น 1.56 µg/ml ดังในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า piperine อาจช่วยเสริมฤทธิ์ ciprofloxacin ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบเช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีแนวโน้มในเชิงต้านฤทธิ์ ส่วนเชื้อ *E. faecalis*, *Salmonella* spp. และ *Vibrio* spp. ไม่พบการเสริม/ต้านฤทธิ์ของ ciprofloxacin เมื่อทดสอบร่วมกับ piperine, สารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-14) หรืออนุพันธ์ของพิเพอริน (AB-8) (data not shown)

ตารางที่ 6 แสดงค่า MIC ของ ciprofloxacin ต่อเชื้อ *S. aureus* เมื่อใช้ร่วมกับ piperine

Piperine concentration (µg/ml)	MIC of ciprofloxacin (µg/ml)				
	SA-ATCC 29213	SA-1 (CIP-S)	SA-3 (MRSA)	SA-5 (MRSA)	SA-6 (MRSA)
100	0.125	0.25	32	128	32
50	0.125	0.25	32	128	32
25	0.25	0.25	32	128	32
12.5	0.25	0.25	32	128	32
6.25	0.25	0.25	64	128	32
3.125	0.25	0.25	64	128	32
1.56	0.25	0.5	64	128	32
0	0.25	0.5	64	128	32

SA = *Staphylococcus aureus*,

CIP-S = *Ciprofloxacin susceptible*,

MRSA = *Methicillin Resistance S. aureus*

ตารางที่ 7 แสดงค่า MIC ของ ciprofloxacin ต่อเชื้อ *E. coli* เมื่อใช้ร่วมกับ piperine

Piperine concentration (µg/ml)	MIC of ciprofloxacin (µg/ml)		
	Esc-ATCC 25922 (CIP-S)	Esc -1 (CIP-R)	Esc -17 (ESBL)
100	0.015	256	64
50	0.015	256	64
25	0.015	256	64
12.5	0.015	256	64
6.25	0.015	256	64
3.125	0.015	256	64
1.56	0.015	256	64
0	0.015	128	32

Esc = *Escherichia coli*

ESBL = Extended-spectrum beta-lactamase

CIP-S = *Ciprofloxacin susceptible*

CIP-R = *Ciprofloxacin resistant*

ตารางที่ 8 แสดงค่า MIC ของ ciprofloxacin ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* เมื่อใช้ร่วมกับ piperine

Piperine concentration (µg/ml)	MIC of ciprofloxacin (µg/ml)		
	PsA-ATCC 27853 (CIP-S)	PsA -4 (CIP-R)	PsA -8 (CIP-R)
100	1	16	256
50	1	16	256
25	1	16	256
12.5	1	16	256
6.25	1	16	256
3.125	1	16	256
1.56	1	16	256
0	0.5	16	256

PsA = *Pseudomonas aeruginosa* CIP-S = Ciprofloxacin susceptible CIP-R = Ciprofloxacin resistant

5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งยีสต์

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ของสารสมุนไพรโดยวิธี broth microdilution พบว่า piperine และสารสกัดจากพริกไทยดำ (AB-13, AB-14, AB-15 และ AB-17) ซึ่งทดสอบกับ *C. albicans* และ *C. neoformans* และอนุพันธ์ของฟิเพอริน (AB-2, AB-6, AB-8, AB-10, AB-20 และ AB-53) ซึ่งทดสอบกับ *C. albicans* ไม่มีสารทดสอบสมุนไพรใดที่สามารถยับยั้งยีสต์ทั้งสองชนิดได้แม้ใช้ความเข้มข้นของสารสูงถึง 500 µg/ml

6. ทดสอบการใช้ฟิเพอรินร่วมกับ Amphotericin B เพื่อเสริมต้านฤทธิ์การยับยั้งยีสต์ *C. albicans*

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเสริมหรือต้านฤทธิ์ของฟิเพอริน ต่อ Amphotericin B ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยวิธี checkerboard titration assay พบว่า piperine มีฤทธิ์ต้าน Amphotericin B เมื่อความเข้มข้นของ piperine อยู่ระหว่าง 12.5-250 µg/ml ซึ่งพบค่า MIC ของ ciprofloxacin เพิ่มขึ้น 2 เท่า แต่ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml ของ piperine กลับทำให้ค่า MIC ของ Amphotericin B ลดลงเท่ากับที่ไม่มี piperine (0 µg/ml) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า MIC ของ Amphotericin B ที่ piperine ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทดสอบกับ *C. albicans* (CA-2)

Piperine concentration (µg/ml)	MIC of Amphotericin B (µg/ml)
500	8
250	16
200	16
100	16
50	16
25	16
12.5	16
0	8

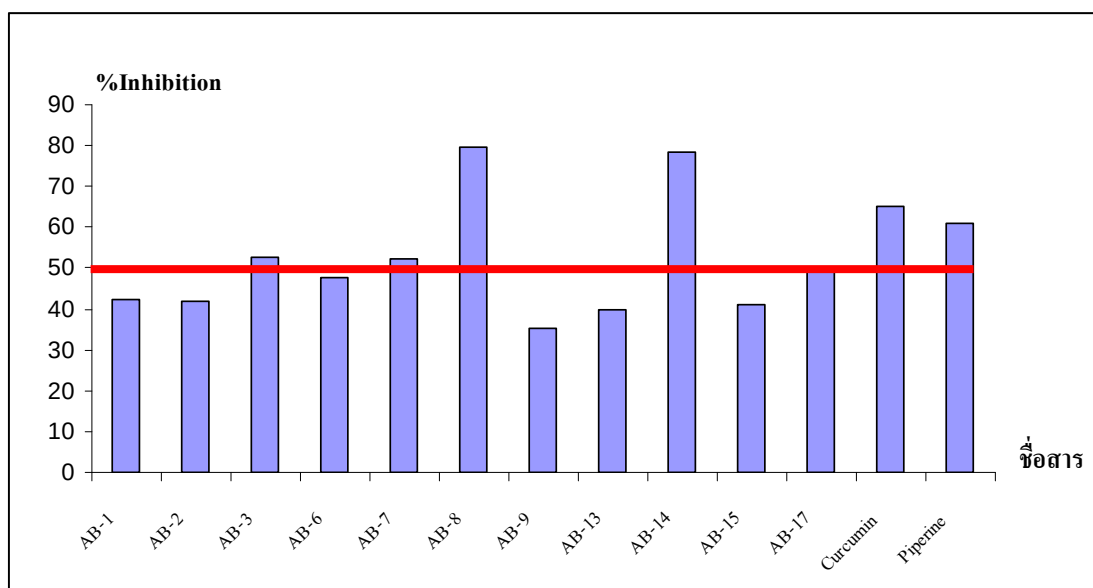
7. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งมาลาเรีย *P. falciparum*

จากการทดสอบสารสกัดพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอริน จำนวน 12 ตัวอย่าง พบว่าสารสมุนไพรที่ความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม สายพันธุ์ K1 ได้แตกต่างกัน โดยค่า % Growth inhibition อยู่ระหว่างร้อยละ 35.19-79.53 (ตารางที่ 10) สารสมุนไพรที่ให้ค่า % growth inhibition มากกว่า 50% คือ AB-3, AB-7, AB-8, AB-14 และ piperine (รูปที่ 8) โดยอนุพันธ์ของพิเพอริน AB-8 และสารสกัดพริกไทยดำ AB-14 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้สูงสุดถึง 79.53% และ 78.48% ตามลำดับซึ่งมากกว่า Piperine (65%)

จากผลการทดสอบข้างต้น เมื่อนำอนุพันธ์ของพิเพอริน AB-8 และสารสกัดพริกไทยดำ AB-14 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้สูงสุด มาทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมได้ร้อยละ 50 (Inhibitory Concentration, IC₅₀) โดยเปรียบเทียบกับยาอ้างอิง (Chloroquine และ Artesunate) พบว่า IC₅₀ ของ AB-8, AB-14, Piperine, Chloroquine และ Artesunate เท่ากับ 0.29, 0.41, 0.34, 34.58 และ 0.008 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรียพลาสมาเรีย สายพันธุ์ K1 ของ สารสกัดพริกไทยดำ พิเพอริน อนุพันธ์ของพิเพอรินและยาอ้างอิง ที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

ชนิดของสาร	% Growth inhibition
AB-1	47.29
AB-2	41.89
AB-3	52.78
AB-6	47.85
AB-7	52.22
AB-8	79.53
AB-9	35.19
AB-13	39.63
AB-14	78.48
AB-15	41.05
AB-17	49.34
Piperine	65.00



รูปที่ 8ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ด้วยสารสกัดพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอรินที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

ตารางที่ 11 ค่า IC_{50} ของสารสกัดพริกไทยดำ พิเพอรีน อนุพันธ์พิเพอร์รีน และยาอ้างอิง

ชนิดของสาร	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	95% Confident interval
AB-8	0.29	0.20-0.44
AB-14	0.41	0.16-1.06
Piperine	0.34	0.10-1.23
Chloroquine	34.58	33.76-35.42
Artesunate	0.008	0.0058-0.0111

IC = Inhibition Concentration

8. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งฤทธิ์ β -haematin ในมาลาเรีย (*in vitro* inhibition of β - haematin formation)

เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต่อมาลาเรียของสารสกัดพริกไทยดำ พิเพอรีน และอนุพันธ์ของพิเพอรีน จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้าง β -haematin ในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบกับ Chloroquine พบว่าสารสกัดพริกไทยดำและอนุพันธ์ของพิเพอรีน สามารถยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้ระหว่างร้อยละ 0 - 91.63 โดย AB-13, AB-7, AB-53, และ AB-5 สามารถยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้ร้อยละ 91.63, 89.13, 69.39 และ 67.93 ซึ่งมากกว่า Chloroquine (62.28%) ส่วน Piperine ยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้ร้อยละ 34.33% ซึ่งน้อยกว่า Chloroquine (62.28%) แต่ AB-6, AB-14, AB-15 และ AB-17 ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลการยับยั้งการสร้าง β -haematin ในหลอดทดลองด้วยสารสกัด
พริกไทยดำ พิเพอรินและอนุพันธ์ของพิเพอริน

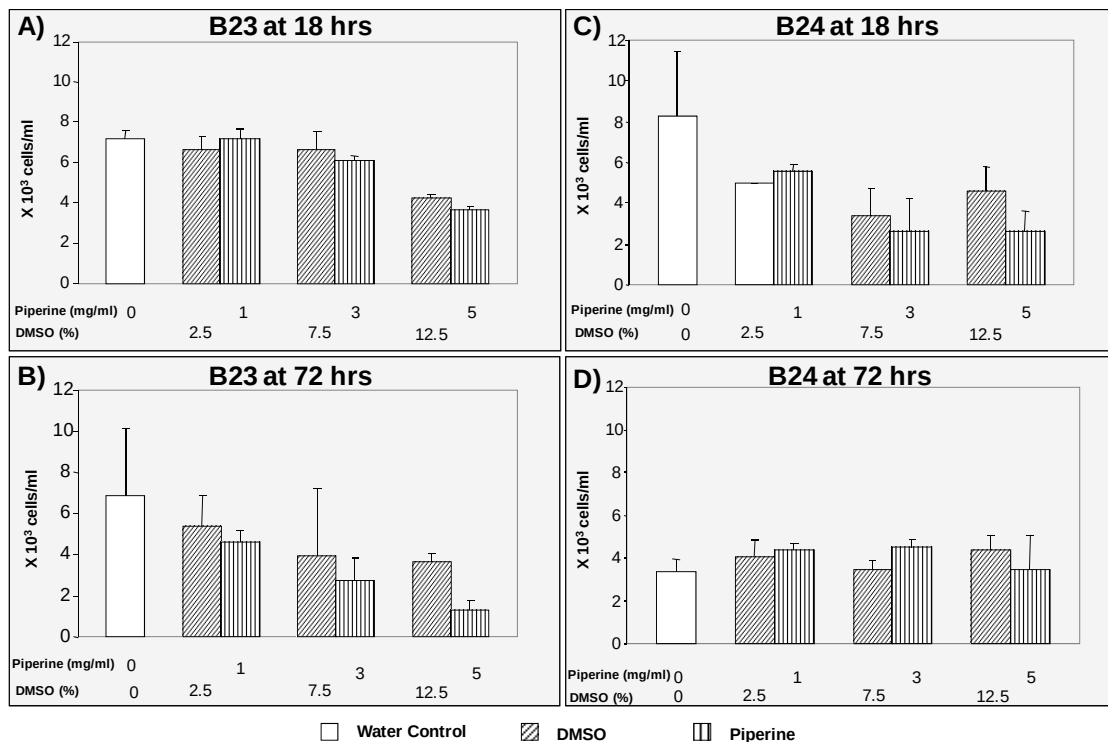
ชนิดของสาร	% β -haematin inhibition
AB-1	30.4
AB-2	32.72
AB-3	33.99
AB-5	67.93
AB-6	0
AB-7	89.13
AB-8	65.63
AB-9	30.03
AB-10	1.11
AB-13	91.63
AB-14	0
AB-15	0
AB-17	0
AB-20	22.57
AB-53	69.39
Piperine	34.33
Chloroquine	62.28

9. ทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรินในการยับยั้งโปรโตซัวในลำไส้ *B. hominis*

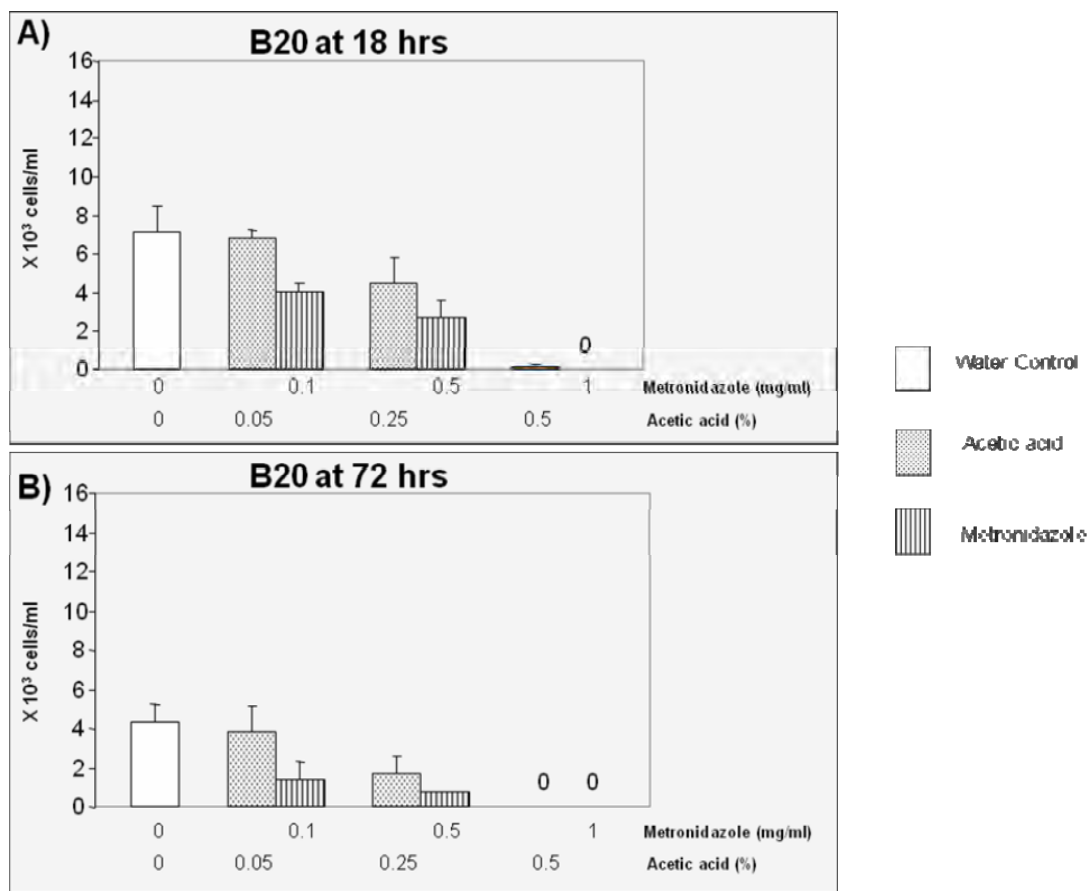
จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของพิเพอรินในการยับยั้ง *B. hominis* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ B23 (รูปที่ 9 A, B) และ B24 (รูปที่ 9 C, D) ที่เวลา 18 และ 72 ชั่วโมง พบว่า piperine ที่ความเข้มข้น 3 และ 5 mg/ml เริ่มมีผลออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์ B24 (18 ชั่วโมง, รูปที่ 9 C) เร็วกว่าสายพันธุ์ B23 (72 ชั่วโมง, รูปที่ 9 B) โดยสายพันธุ์ B23 มีปริมาณเชื้อลดลง 18.17% ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ piperine ความเข้มข้น 3 mg/ml

ส่วนยา metronidazole ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อ *B. hominis* พบว่า metronidazole มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. hominis* ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 mg/ml ทั้งที่ 18 และ 72 ชั่วโมง ส่วนที่ความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่าฆ่าหรือยับยั้งเชื้อได้ 100 %

อีกนัยหนึ่งปริมาณเชื้อที่ลดลงมากนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นที่มากของ acetic acid (0.5%) ที่ใช้เป็นตัวทำลาย เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการให้ยาจะพบว่า metronidazole ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml *B. hominis* สายพันธุ์ B20 มีปริมาณเชื้อเมื่อเทียบกับหลอดควบคุมลดลง 37.55% ที่เวลา 18 ชั่วโมง (รูปที่ 10 A) และลดลงมากขึ้นเป็น 54.4% ที่เวลา 72 ชั่วโมง (รูปที่ 10 B)



รูปที่ 9 แผนภูมิแท่งแสดงผลของ piperine ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5 mg/ml ต่อเชื้อ *B. hominis* สายพันธุ์ B23 (A, B) และสายพันธุ์ B24 (C, D) ที่เวลา 18 ชั่วโมง (A, C) และ 72 ชั่วโมง (B, D) โดยแกน y แสดงปริมาณของเชื้อ *B. hominis* หน่วยเป็น 10^3 cells/ml และแกน x แสดงความเข้มข้นของ piperine (mg/ml) และตัวทำลาย DMSO (%)



รูปที่ 10 แผนภูมิแท่งแสดงผลของ metronidazole ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 mg/ml ต่อเชื้อ *B. hominis* สายพันธุ์ B20 ที่เวลา 18 ชั่วโมง (A) และ 72 ชั่วโมง (B) แกน y แสดงปริมาณของเชื้อ *B. hominis* หน่วยเป็น $\times 10^3$ cells/ml และแกน x แสดงความเข้มข้นของ metronidazole (mg/ml) และตัวทำละลาย Acetic acid (%)

10. ความเป็นพิษของสารสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง PLC/PRF/5

ผลการทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity) ต่อเซลล์ PLC/PRF/5 ของ piperine ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีค่า % viability เท่ากับ 94.59, 54.62 และ 25.14 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) อนุพันธ์ของพิเพอรินทั้ง 4 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ มี % viability มากกว่า 80% ในทั้งสามความเข้มข้น (ตารางที่ 13) ส่วนสารสกัดจากพริกไทยดำ AB-14 (Methanol) และ AB-17 (CH_2Cl_2) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ มี % viability มากกว่า 80% และลดลงเหลือประมาณ 20% ที่ความเข้มข้น 100 และ 250 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งลดลงเร็วกว่าการทดสอบด้วย piperine เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสมุนไพร จะพบว่า piperine และส่วนสารสกัดจากพริกไทยดำ AB-14 (Methanol) และ AB-17 (CH_2Cl_2) มีความเป็นพิษต่อเซลล์ PLC/PRF/5 มากกว่าอนุพันธ์ของพิเพอริน โดยมีค่า ID_{50} ที่ประมาณ 120, 50 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆต่อเซลล์ PLC/PRF/5

ชนิดของสาร	สารที่ใช้ทดสอบ	% viability ในแต่ละความเข้มข้น (µg/ml)		
		250	100	10
Chemical reagent	Piperine	25.14	54.62	94.59
Crude extracts	AB-14 (Methanol)	20.28	18.48	95.33
	AB-17 (CH ₂ Cl ₂)	18.88	19.95	79.56
Piperine analogues	AB-1	97.54	103.96	102.22
	AB-2	110.34	92.26	103.04
	AB-3	89.69	87.35	106.24
	AB-53	104.36	101.41	122.78
Cell control	Media only	100	100	100
Reagent control	DMSO	99.87	99.87	99.87

DMSO = Dimethyl sulfoxide

11. ทดสอบฤทธิ์ของสารสมุนไพรในการยับยั้งการแสดงออกของ HBs Antigen ของไวรัสในหลอดทดลอง

จากการวัดปริมาณ HBs antigen ที่หลังจากเซลล์ PLC/PRF/5 ด้วยวิธี ELISA หลังการทดสอบด้วยสารสมุนไพร ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่ามีเพียงสารสกัดจากพริกไทยดำ AB-14 (Methanol) และ AB-17 (CH₂Cl₂) ที่ให้ค่า ratio ต่ำกว่า 1 คือ 0.68 และ 0.34 ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากพริกไทยดำทั้ง 2 ชนิดนี้อาจมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง HBs antigen ของเซลล์ PLC/PRF/5 ส่วนอนุพันธ์ของพิเพอรีนไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง HBs antigen เมื่อเทียบกับ cell control โดยมีค่า ratio ใกล้เคียง 1 และในทางกลับกันค่า ratio ของ piperine มีค่ามากกว่า 1 คือ 1.44 (ตารางที่ 14) แสดงว่า piperine อาจเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการหลั่ง HBs antigen ของเซลล์ได้

ตารางที่ 14 ผลการวัดปริมาณ HBs antigen จากเซลล์ PLC/PRF/5 โดยวิธี ELISA หลังทดสอบด้วยสารสมุนไพร 10 µg/ml

ชนิดของสาร	สารที่ใช้ทดสอบ	HBs antigen ratio
Chemical reagent	piperine	1.44
Crude extracts	AB-14 (Methanol)	0.68
	AB-17 (CH ₂ Cl ₂)	0.34
Piperine analogues	AB-1	0.99
	AB-2	1.06
	AB-3	1.10
	AB-4	1.02
	AB-53	0.98
Cell control	Media only	1.00

$$\text{HBs antigen ratio} = \text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{control}}$$

12. เปรียบเทียบโครงสร้างสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์พิเพอรินกับฤทธิ์ต้านจุลชีพต่างๆ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ มาลาเรีย โปรโตซัวในลำไส้ และการยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสสั่น พบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอรินบางชนิดมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาสชิปารัม และยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสจากเซลล์ PLC/PRF/5 ที่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ได้ดี พบว่าอนุพันธ์ของพิเพอรินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาสชิปารัมด้วย % growth inhibition มากกว่า 50 ได้แก่ สาร AB-3, AB-7, AB-8, piperine และสารสกัดจากพริกไทยดำด้วยเมทานอล ในจำนวนสารสกัดของพริกไทยดำที่ใช้ทดสอบนั้นสารสกัดจากเมทานอลออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น น้ำ และสารสกัดจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเช่น Hexane และ CH₂Cl₂ ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชือน่าจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลาง ซึ่งจากผลที่ได้สอดคล้องกับผลจากการศึกษาของอนุพันธ์ของพิเพอริน เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างจะเห็นได้ว่าหมู่ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาสชิปารัมมีโครงสร้างที่บริเวณ side chain เป็นหมู่ carboxylic acid (AB-3 และ AB-7) และเป็นหมู่ amide (AB-8 และ piperine) โดยจะเห็นได้ว่าโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เป็น amide มีค่า % growth inhibition สูงกว่าหมู่อนุพันธ์ carboxylic acid โดยเฉพาะสาร AB-8 ซึ่งมีค่า % growth inhibition และ IC₅₀ ดีที่สุดในการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็

ตามอนุพันธ์ของ carboxylic acid ที่มีจำนวน double bond ที่เท่ากัน (AB-7) ก็ออกฤทธิ์ได้ดี การลดจำนวน double bond ในอนุพันธ์ของ carboxylic acid ในสาร AB-3 ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ แต่ถ้าตัดส่วนของ double bond ในโครงสร้างออกไปเลย (AB-2) จะทำให้ผลในการออกฤทธิ์ลดลง ส่วนผลของ double bond ต่อโครงสร้างที่เป็น amide ยังไม่สามารถสรุปได้จากการทดลองนี้ ซึ่งควรทำการทดสอบเพิ่มเติมกับสาร AB-20 ต่อไป

ส่วนผลต่อฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง β -haematin ในเชื้อมาลาเรียฟาคิพารัม พบว่าสาร piperine เองมีฤทธิ์ค่อนข้างต่ำ แต่อนุพันธ์ amide (AB-5 และ AB-8) และหมู่ carboxylic acid (AB-7 และ AB-53) ให้ค่า % β -haematin inhibition มากกว่า 60 ซึ่งผลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับยาอ้างอิง Choloquine และบางสารมีผลสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด อนุพันธ์ฟิเพอริน AB-7 และ AB-8 เป็นอนุพันธ์ที่น่าสนใจที่มีฤทธิ์ดีในยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาคิพารัมด้วยกลไกการยับยั้งการสร้าง β -haematin นอกจากนี้สารสกัดจากพริกไทยดำ AB-13 (water extract) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง β -haematin ในเชื้อมาลาเรียฟาคิพารัมที่ดีมากด้วย (91% inhibition) ส่วนสารสกัดจากพริกไทยดำ AB-14 (methanol extract) มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีทั้งเชื้อมาลาเรียฟาคิพารัมและการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัส และสารสกัดจากพริกไทยดำ AB-17 (CH_2Cl_2 extract) มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสจากเซลล์ PLC/PRF/5 ได้ดีกว่า 60% แม้จะเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าสารอื่น

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ ฟิเพอริน และอนุพันธ์ของฟิเพอริน ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. และ *P. aeruginosa*) และยีสต์ (*C. albicans* และ *C. neoformans*) โดยวิธี broth microdilution พบว่าที่ความเข้มข้นสูงถึง 500 $\mu\text{g/ml}$ สารทดสอบสมุนไพรเหล่านี้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ได้ อาจเนื่องจากสารเหล่านี้ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์โดยตรง หรือต้องการยาในปริมาณที่สูง ซึ่งปริมาณยาที่สูงนั้นอาจมีผลข้างเคียงได้มากเช่นกัน นอกจากนี้ในการทดลองยังมีข้อจำกัดเรื่องการละลายของสาร ซึ่งฟิเพอรินจัดเป็นสารที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มไขมัน (lipid) ทำให้ละลายได้ไม่ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วสูงเช่นน้ำ แต่สามารถละลายได้ในสารละลายอื่น เช่น Petroleum ether, chloroform, ethanol และ methanol (1, 23) ในการทดลองนี้แม้จะใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายได้ในการเตรียมความเข้มข้นสารตั้งต้น แต่ในการทดสอบที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้สารทดสอบสมุนไพรบางชนิดเกิดการตกตะกอนได้

เมื่อไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์โดยตรงของสารสกัดจากพริกไทยดำ ฟิเพอริน และอนุพันธ์ของฟิเพอริน จึงทำการทดสอบดูว่าสารสมุนไพรเหล่านี้สามารถใช้ร่วมกับยาด้าน

จุลชีพปัจจุบันเพื่อช่วยเสริมฤทธิ์ของยาได้หรือไม่ เพื่อประโยชน์ในการลดปริมาณการใช้ยา และลดโอกาสการดื้อยา เมื่อทดสอบการไยาร่วมกันระหว่าง piperine และ ciprofloxacin ในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกมีค่า MIC ของ ciprofloxacin ลดลง 2 เท่า ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ คือ *E. coli* และ *P. aeruginosa* จะพบค่า MIC ของ ciprofloxacin เพิ่มขึ้น 2 เท่า จึงสรุปได้ว่า piperine อาจช่วยเสริมฤทธิ์ ciprofloxacin ในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบเช่น *E. coli* และ *P. aeruginosa* มีแนวโน้มในเชิงต้านฤทธิ์ ผลที่แตกต่างกันของเชื้อสองกลุ่มนี้อาจสืบเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบของเซลล์ กลไกการนำสารเข้าเซลล์หรือขับสารออก (efflux pump) และเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสาร แนวโน้มที่แสดงการเสริมฤทธิ์ของ piperine ต่อ ciprofloxacin ในการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ในการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกับรายงานของ Khan IA และคณะ (8, 24) นอกจากนี้ยังพบว่าผลการเสริมฤทธิ์ของ piperine ต่อ ciprofloxacin และค่าความเข้มข้นของ piperine ที่มีผลต่อการลดลงของค่า MIC ของ ciprofloxacin มีความแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบ เช่น เชื้อ MRSA ที่มีการแสดงออกของปั๊ม NorA มาก (NorA efflux pump hyperexpressing strain) จะตอบสนองได้ดีต่อการเสริมฤทธิ์ของ piperine มากกว่า MSSA และ MRSA อื่นๆ (25) มีหลายรายงานที่สนับสนุนบทบาทของ piperine และอนุพันธ์ของพิเพอรินในการทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการปั๊มยาออก (efflux pump inhibitor; EPI) เช่น ยับยั้ง NorA efflux pump ต่อยา ciprofloxacin (25, 24) และ MdeA efflux pump ต่อยา mupirocin (26) ในเชื้อ *S. aureus* ยับยั้ง Rv1258c (putative efflux pump) ต่อยา rifampicin ในเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (27) และยับยั้งการปั๊ม ethidium bromide ออกในเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* (28).

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอริน ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Plasmodium falciparum* K1 strain ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Chloroquine ในหลอดทดลองด้วยวิธี Growth inhibition assay พบว่า อนุพันธ์ของพิเพอริน AB-8 และสารสกัดจากพริกไทยดำด้วยเมธานอล AB-14 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* มากกว่า Chloroquine แต่น้อยกว่า Artesunate ซึ่งเป็นยาต้านมาลาเรียที่ใช้ในปัจจุบัน เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญได้ดี พบว่าน่าจะเป็นสารที่มีขั้วปานกลาง และโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เป็น amide (AB-8) มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญได้มากกว่าหมู่อนุพันธ์ carboxylic acid การลดจำนวน double bond ในอนุพันธ์ของ carboxylic acid จะไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ แต่ถ้าตัดส่วนของ double bond ในโครงสร้างออกไปเลย จะทำให้ผลในการออกฤทธิ์ลดลง

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ และอนุพันธ์ของพิเพอริน ด้วยวิธี *In vitro* inhibition of β -haematin formation โดยเปรียบเทียบกับ MRG5080111

Chloroquine ที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำด้วยน้ำ AB-13 และอนุพันธ์ของพิเพอริน AB-7 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง β -haematin มากกว่า Chloroquine และสารทดสอบอื่น เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้ดี พบว่าน่าจะเป็นสารที่มีขั้วสูง และโครงสร้างของอนุพันธ์ที่เป็น carboxylic acid (AB-7) มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการสร้างได้มากกว่าหมู่อนุพันธ์ amide ซึ่งตรงข้ามกับโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของมาลาเรีย

จากรายงานการวิจัยของ Rasoanaivo และคณะในปี ค.ศ.1999 (29) พบว่าสารสมุนไพรที่ควรนำไปศึกษาต่อเพื่อหาสารต้านมาลาเรียจะต้องมีค่า IC_{50} น้อยกว่า 5 $\mu\text{g/ml}$ แม้ว่าสารสกัดพริกไทยดำจากเมธานอล AB-14 ($IC_{50} = 0.41 \mu\text{g/ml}$) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *P. falciparum* ได้ดีแต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง β -haematin ได้น้อย แสดงว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต่อ *P. falciparum* ในพริกไทยดำสามารถสกัดได้ด้วยเมธานอลและสารนั้นไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านกลไกการยับยั้งขบวนการ Biocrystallization ใน *P. falciparum* ดังนั้นจึงควรศึกษาหากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำด้วยเมธานอล AB-14 ในการยับยั้ง *P. falciparum* ต่อไป ส่วนอนุพันธ์พิเพอริน AB-7 และ AB-8 ($IC_{50} = 0.29 \mu\text{g/ml}$) เป็นอนุพันธ์ที่น่าสนใจที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาคิปารัมด้วยกลไกการยับยั้งการสร้าง β -haematin ดีกว่า Chloroquine จึงน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาเชิงลึกด้านโครงสร้าง กลไกการออกฤทธิ์ พิษวิทยาและเภสัชวิทยาเพื่อพัฒนาใช้ในการรักษาโรคมาลาเรียต่อไป แม้สารสกัดจากพริกไทยดำด้วยน้ำ AB-13 จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาคิปารัมได้ไม่ดี แต่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสร้าง β -haematin ซึ่งกลไกการยับยั้งการสร้าง β -haematin นับเป็นกลไกหลักของยาต้านมาลาเรียหลายชนิด เช่น Quinoline (Chloroquine), Azoles, Isonitriles, Xanthone, Methylene blue, Porphyrins and metalloporphyrin complexes (30) กลไกการสร้าง β -haematin นอกจากจะพบในเชื้อมาลาเรียแล้ว ยังพบได้ใน *Rhodnius prolixus* (the kissing bug), *Schistosoma mansoni*, *Echinostoma trivolvis* และ *Haemoproteus columbae* ได้ (31) ดังนั้นสารนี้อาจนำไปศึกษาต่อในเชื้อกลุ่มอื่นที่มีกลไกการสร้าง β -haematin เช่นกัน

สารสกัดจากพริกไทยดำ และอนุพันธ์ของพิเพอรินบางชนิด นอกจากจะมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นยาต้านมาลาเรียแล้ว ยังน่าสนใจที่จะศึกษาความสามารถในการเป็นสารเสริมฤทธิ์กับยาอื่น ดังรายงานที่แสดงผลการเพิ่มการดูดซึม (bioavailability) ของ curcumin เมื่อใช้ร่วมกับ piperine (32) และผลการศึกษาการใช้ยาร่วมระหว่าง Artemisinin, curcumin และ piperine (33, 34)

การทดสอบฤทธิ์ของพิเพอรินในการยับยั้ง *B. hominis* ครั้งนี้นับเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ โดยวิธี xenic culture และทดสอบเฉพาะพิเพอริน เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก จึงต้องการสารทดสอบปริมาณ

มากเช่นกัน แต่ปริมาณสารทดสอบที่มีอยู่มีจำกัด อีกทั้งสารพิเพอรินมีความสามารถในการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบได้ไม่ดี จึงจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลาย DMSO ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงเพื่อให้การละลายสมบูรณ์ขึ้น ทำให้ผลการยับยั้ง *B. hominis* ที่ได้ส่วนหนึ่งเป็นผลจาก DMSO ดังนั้นการอ่านผลจึงเทียบกับ DMSO control ซึ่งเห็นผลการยับยั้งของพิเพอรินดีกว่า DMSO control เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ผลการตอบสนองยังขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งเชื้อของพิเพอรินกับยา metronidazole ยังพบว่าต้องใช้พิเพอริน (3 mg/ml) ที่ความเข้มข้นสูงกว่า metronidazole (0.1 mg/ml) ถึง 30 เท่า นับเป็นปริมาณที่มาก ซึ่งต่างจากการศึกษาในหนูทดลองโดยใช้สารสกัดจากพริกไทยดำและดีปลี ซึ่งมีพิเพอรินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml สามารถยับยั้ง *G. intestinalis*, *E. histolytica* และ *B. hominis* ได้ (14) ผลที่แตกต่างอาจมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น การศึกษาในหนูทดลองเป็นแบบ *in vivo* ที่อาจมีปัจจัยของโฮสต์และการ metabolite ของสาร และสารที่ใช้ทดสอบเป็นสารสกัดที่อาจมีสารอื่นเจือปนที่ทำหน้าที่เสริมฤทธิ์กันได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ xenic culture ที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นการเพาะเลี้ยง *B. hominis* ปนไปกับแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอุจจาระ โดยเติมยาปฏิชีวนะเพื่อลดการเจริญของแบคทีเรีย แม้ว่าการเพาะเลี้ยงวิธีนี้จะง่ายและใกล้เคียงสภาพความเป็นจริงในการเจริญของ *B. hominis* แต่มีข้อจำกัดในกรณีการเพาะเลี้ยงในระยะยาว แบคทีเรียอาจเจริญมากจนรบกวนการเจริญของ *B. hominis* ทั้งแย่งอาหารและสร้างสารพิษและอาจมีผลต่อการทดสอบยา การเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ปลอดแบคทีเรียเป็นอีกวิธีที่น่าจะลดปัญหาเหล่านี้ แต่การทำยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง (35,36)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอริน ในการยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสในหลอดทดลอง โดยทดสอบกับเซลล์ PLC/PRF/5 ที่สร้างจากเซลล์ตับของผู้ป่วย chronic hepatitis ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การทดสอบครั้งนี้ นับเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น จากการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 10 µg/ml สกัดจากพริกไทยดำ AB-14 (Methanol) และ AB-17 (CH₂Cl₂) มีแนวโน้มที่จะให้ผลดีในการยับยั้งการหลั่ง HBs Antigen ของไวรัสบนเซลล์ PLC/PRF/5 ส่วนพิเพอรินและอนุพันธ์ของพิเพอรินไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง HBs antigen เมื่อเทียบกับ cell control ดังนั้นพิเพอรินเองอาจไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือต้องการสารเสริมฤทธิ์ที่พบได้ในสารที่สกัดด้วยเมทานอลและ CH₂Cl₂ ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไป

สรุปจากการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ มาลาเรีย โปรโตซัวในลำไส้ และการยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสนั้น พบว่าสารสกัดจากพริกไทยดำ พิเพอริน และอนุพันธ์ของพิเพอรินบางชนิดมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาซิปาร์ม (AB-8 และ AB-14) ยับยั้งการสร้าง β-haematin ของเชื้อมาลาเรียฟาซิปาร์ม (AB-7 และ AB-13) และยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสจากเซลล์ PLC/PRF/5 (AB-14 และ AB-17)

ซึ่งน่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาต่อยอด ทั้งในเชิงโครงสร้างสำคัญในการออกฤทธิ์ กลไกการออกฤทธิ์ และการใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาอื่น รวมทั้งทดสอบในเชื้อที่ใช้กลไกใกล้เคียงกัน และเชื้อดื้อยาต่างๆ นอกจากนี้ควรศึกษาและพัฒนาเรื่องการละลายของสารควบคู่ไปกับมาตรฐานการผลิตและการเก็บรักษาจากสมุนไพร เพื่อจะยังประโยชน์ในการใช้ภูมิปัญญาท้องถิ่นอย่างคุ้มค่า มีประสิทธิภาพและพอเพียง

และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ควรทำการศึกษาและพัฒนาต่อยอดสารสกัดจากพริกไทยดำและอนุพันธ์ของพิเพอรินที่มีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียฟาสิปารัม (AB-8 และ AB-14) ยับยั้งการสร้าง β -haematin ของเชื้อมาลาเรียฟาสิปารัม (AB-7 และ AB-13) และยับยั้งการหลั่งของ HBs Antigen ของไวรัสจากเซลล์ PLC/PRF/5 (AB-14 และ AB-17) ทั้งในเชิงโครงสร้างสำคัญในการออกฤทธิ์ กลไกการออกฤทธิ์ และการใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาอื่น รวมทั้งทดสอบในเชื้อที่ใช้กลไกใกล้เคียงกันและเชื้อดื้อยาต่างๆ นอกจากนี้ควรศึกษาและพัฒนาเรื่องการละลายของสารควบคู่ไปกับมาตรฐานการผลิตและการเก็บรักษาจากสมุนไพร

Reference

1. Kolhe SR, Borole P, Patel U. Extraction and evaluation of piperine from *piper nigrum* Linn. Int J Appl Biol Pharm Tech 2011;2(2):144-9.
2. Pradeep CR, Kuttan G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. Clin Exp Metastasis 2002;19:703-8.
3. Szallasi A. Piperine: researchs discover new flavor in ancient spice. Trends Pharmacol Sci 2005;9:437-9.
4. Badmaev V., Majeed M, Prakash L. Piperine derived from black pepper increases the plasma levels of coenzyme Q₁₀ following oral supplementation. J Nutr Biochem 2000; 11:109-13.
5. Bano G, Raina RK, Zutshi U, Bedi KL, Johri RK, Sharma SC. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propanolol and theophylline in healthy volunteers. Eur J Clin Pharmacol 1991;41:615-7.
6. Kwon Park IL, Lee SG, Shin SC, Park JD, Ahn YJ. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. J Agric Food Chem 2002;50:1866-70.

7. Hiwale AR, Dhuley JN, Naik SR. Effect of co-administration of piperine on pharmacokinetics of beta-lactam antibiotics in rats. *Indian J Exp Biol.* 2002;40(3):277-81.
8. Khan IA, Mirza ZM, Kumar A, Verma V, Qazi GN. Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(2):810–2.
9. Lee SE, Park BS, Kim MK, Choi WS, Kim HT, Cho KY, et al. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop Protect* 2001;20:523-8.
10. Kapil A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Planta Med.* 1993;59(5):474.
11. Raay B, Medda S, Mukhopadhyay S, Basu MK. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian J Biochem Biophys* 1999;36(4):248-51.
12. Ribeiro TS, Freire-de-Lima L, Previato JO, Mendonca-Previato L, Heise N, de Lima ME. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14(13):3555-8.
13. Tripathai DM, Gupta N, Lakshmi V, Saxena KC, Agrawal AKI. Anti Giardial and immunostimulatory effect of *Piper longum* on giardiasis due to *Giardia lamblia*. *Phytother Res* 1999;13(7):561-5.
14. Sawangjaroen N, Sawangjaroen K, Poonpanang P. Effects of *Piper longum* fruit, *Piper sarmentosum* root and *Quercus infectionia* nut gall on caecal amebiasis in mice. *J Ethnopharmacol* 2004;91(2-3):357-60.
15. Sawangjaroen N, Sawangjaroen K. The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the in vitro growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis*. *J Ethnopharmacol* 2005;98(1-2):67-72.
16. Sheenhan DJ, Raucher BG, McKittrick JC. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *J Clin Microbiol* 1986;24(4):548-50.

17. Hailemariam G, Kassu A, Abebe G, Abate E, Damte D, Mekonnen E, et al. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS and HIV seronegative individuals in a teaching hospital, Ethiopia. *Jpn J infect Dis*. 2004;57(2):41-3.
18. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2002;2:209-18.
19. Kirk K, Wong HY, Elford BC, Newbold CI, Ellory JC. Enhanced choline and Rb⁺ transport in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J*. 1991;278:521-5.
20. Chen CY, Nace GW, Irwin PL. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 2003;55(2):475-9.
21. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976;193:673-5.
22. Jones WR. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*. *Ann Trop Med Parasitol* 1946;40:130-40.
23. Hamrapurkar PD, Jadhav K, Zine S. Quantitative estimation of piperine in *Piper nigrum* and *Piper longum* using high performance thin layer chromatography. *J Appl Pharm Sci* 2011;01(03):117-20.
24. Kumar A, Khan IA, Koul S, Koul JL, Taneja SC, Ali I, et al. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1270–6.
25. Payare L, Sangwan A, Jawahir L, Koul A, Surrinder KA, Mallepally V, et al. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. *Bioorg Medicinal Chem* 2008;16: 9847–57.
26. Mirza ZM, Kumar A, Kalia NP, Zargar A, Khan IA. Piperine as an inhibitor of the MdeA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 2011;60:1472–8.
27. Sharma S, Kumar M, Sharma S, Nargotra A, Koul S, Khan IA. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1694–701.

28. Jin J, Zhang J, Guo N, Feng H, Li L, Liang J, et al. The plant alkaloid piperine as a potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis*. J Med Microbiol 2011;60:223–9.
29. Rasoanaivo P, Rasoanaivo S, Ratsimamanga-U D, Amanitrahasimbola H, Rafrato A, Rakoto-R. Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine. J Ethopharmacol 1999;64:117–26.
30. Kumar S, Guha M, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: A mechanistic update. Life Sci 2007;80:813–28.
31. Egan TJ. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. J Inorg Biochem 2008;120:1288-99.
32. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Medica 1998;64:353–6.
33. Nandakumar DN, Nagaraj VA, Vathsala PG, Rangarajan P, Padmanaban G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1859–60.
34. Martinelli A, Rodrigues LA, Cravo P. *Plasmodium chabaudi*: Efficacy of artemisinin + curcumin combination treatment on a clone selected for artemisinin resistance in mice. Exp Parasitol 2008;119:304–7.
35. Ho LC, Singh M, suresh G, Ng GC, Yap EH. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. Parasitol Res 1993;79(7):614-6.
36. Vdovenko AA, Williams JE. Blastocystis hominis: Nutral red supravital staining and its application to in vitro drug susceptibility testing. Parasitol Res. 2000;86(7):573-81.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ -
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ
มีการพัฒนาสู่การเรียนการสอนภาคนิพนธ์และการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่จาก
นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคนิคการแพทย์ 10 คน
3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ
 - 3.1 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง Antibacterial effects of black pepper extracts and piperine analogues ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7 วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี
 - 3.2 การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง In vitro Antimalarial activity of black pepper extracts and piperine analogues ในการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8 วันที่ 16-18 ตุลาคม 2551 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
 - 3.3 Kittiniyom K, Ngengarmliert W, Inthagard J, Khorana N, Vorachit M. Antimicrobial effects of black pepper extracts and piperine analogues. Program and abstracts of Keystone Symposia (S4) Pathogenesis and Control of Emerging Infectious and Drug Resistant Organisms, Royal Orchid Sheraton Hotel, Bangkok, Thailand, October 22-27, 2008, page 91. (Poster Presentation)