รหัสโครงการ SUT1-104-55-24-09

รายงานการวิจัย

การหาขนาดที่เหมาะสมและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากหัวกวาวเครือแดงในหนูทดลองเพศผู้

(Optimal dose and toxicity test of Flavonoids isolated from the tuberous Roots of *Butea superba* Roxb in male mice)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-55-24-09

รายงานการวิจัย

การหาขนาดที่เหมาะสมและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากหัวกวาวเครือแดงในหนูทดลองเพศผู้

(Optimal dose and toxicity test of Flavonoids isolated from the tuberous Roots of *Butea superba* Roxb in male mice)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ภก.ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ศักดารัตน์

ดร. กาญจนา ธรรมนู

นางสาวสุดารัตน์ แทนพลกรัง

นายกิตติพจน์ สิริชัยเวชกุล

นางสาววณัทกมล นาคณรงค์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการหาขนาดที่เหมาะสมและทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดฟลาโวนอยด์จากหัวกวาวเครือแดงในหนูทดลองเพศผู้ ในครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555-2556 ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณ คุณสุดารัตน์ แทนพลกรัง ที่ช่วยในการสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์สารทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี คุณวณัทกมล นาคณรงค์ ที่ช่วยในการสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์สารเพิ่มเติม ตลอดจนทำการทดสอบสารกับหนูทดลอง และคุณกิตติพจน์ สิริชัยเวชกุล ที่ช่วยทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัด ช่วยทำการทดสอบสารกับหนูทดลองและวิเคราะห์ผลงานวิจัยในครั้งนี้ กลุ่มงานพยาธิวิทยากายวิภาค โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกในการเรื่องของการตรวจสอบพยาธิของเนื้อเยื่อและตัวอสุจิ คุณจรรจิรา วงศ์วิวัฒนา ที่ช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัด ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อนุเคราะห์ทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยจนประสบผลสำเร็จ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

กวาวเครือแดง ได้ถูกนำมาใช้ในผู้ชายไทยเป็นยากระตุ้นกำหนัดและถูกใช้ป้องกันการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ แต่อย่างไรก็ตาม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและขนาดที่ใช้ ยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกวาวเครือแดงต่อระบบสืบพันธุ์ของ หนูไมซ์เพศผู้

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า สารที่สกัดได้จากหัวกวาวเครือแดงได้แก่ ไบโอชานินเอ เจนิสตีน ซึ่งทั้งสองสารถูกพบว่าสามารถสกัดได้จากกวาวเครือแดงเป็นครั้งแรก อีกสารที่สกัดได้คือ ไดซีน การทดลองโดยป้อนหนูไมซ์ด้วยไดซีนหรือเจนิสตีนเดี่ยวๆ และสารผสมของไดซีนและเจนิสตีน ผลการทดลองพบว่า หนูไมซ์ที่ได้รับสารไอโซฟลาโวนส์ทุกกลุ่ม ทั้งเดี่ยวๆและผสม มีจำนวนตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ระดับคอเรสเทอรอล และระดับเทสทอสเทอโรน สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า เมื่อให้ไดซีนผสมกับเจนิสตีนจะให้ผลเสริมฤทธิ์กัน ซึ่งเป็นรายงานการค้นพบเป็นครั้งแรก ส่งผลให้ระดับต่างๆทั้งของอสุจิ คอเรสเทอรอล และระดับเทสทอสเทอโรน สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มกลุ่มอื่นๆทั้งหมด

ดังนั้นการเสริมฤทธิ์กันของไอโซฟลาโวนส์เหล่านี้ อาจนำไปใช้ประโยชน์ ในการรักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศ เช่นความต้องการทางเพศและการแข็งตัวขององคชาต และรักษาการเป็นหมันในเพศชายที่มีสาเหตุจากการมีอสุจิปริมาณน้อยและอ่อนแอ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Butea superba Roxb. (BS) has been used in Thai men as an aphrodisiac, and prevent erectile dysfunction. Nevertheless, the active ingredients, dosages, have not been cleared. Hence, this study was to investigate the effect of compounds from the BS on the reproductive parameters of male mice.

The results revealed that BS was extracted to afford biochanin A, genistein, which were the first report on BS, and daidzein. The mice were treated by daidzein, genistein alone and in combination. The results showed that the sperm number and motility, cholesterol, and testosterone level of all isoflavones treated groups were significantly higher than controls (p<0.01). Obviously, daidzein plus genistein exhibited a synergistic effect, which is also the first report, resulted in significantly displayed higher levels of these parameters compared to others.

So, the synergistic activity of these isoflavones may useful in improving libido, erectile capacity, and assist infertility of poor spermatozoa in men.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ ……	ก
บทคัดย่อภาษาไทย ……..……	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ……..…….	ค
สารบัญ …….	ง
สารบัญตาราง …….	ฉ
สารบัญภาพ …….	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ……..…….	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย ……..……..	3
สมมติฐานการวิจัย……...	4
ขอบเขตของการวิจัย ……..…….	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย ……..…….	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
แหล่งที่มาของวัตถุดิบพืช.....	8
สารเคมี.....	9
เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิจัย.....…….	9
การสกัดสาร การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร……..	10
สัตว์ทดลองและวิธีดำเนินการ……	11
พารามิเตอร์ที่ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด.....	12
จำนวนและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ…….	12
ระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน……..……	13
การวิเคราะห์โลหิตวิทยา สารเคมีในเลือดและคอเลสเทอรอล……..……	13
ผลกระทบต่ออวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักตัว……..	13
การเสริมฤทธิ์ และการวิเคราะห์ทางสถิติ……	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 ผลการวิจัยอภิปรายผลการวิจัย
โครงสร้างและปริมาณของสารสกัด…….. 15
ผลต่อน้ำหนักตัวหนูทดลอง……. 20
ผลต่อจำนวนและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิ……. 21
ผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ…… ……..…… 24
ผลต่อจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดสร้างอสุจิ……..……..…… 26
ผลต่อระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนและคอเลสเทอรอล..... 27
ผลต่อส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักอวัยวะที่สำคัญ……..… 30
ผลต่อโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือด..... 34
บทที่ 4 สรุปผลการศึกษา…… 37
บรรณานุกรม …….. 39
ภาคผนวก 44
Output ที่ได้จากโครงการวิจัย 45
ประวัติผู้วิจัย..... 46

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงค่า ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR chemical shifts ของสารประกอบ 1, 2 และ 3 วัดใน acetone-d_6, ส่วนผสม $CDCl_3$ + CD_3OD และ DMSO ตามลำดับ…….. 19

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูไมซ์..... 32

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสำคัญของหนูไมซ์……. 33

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือดของหนูไมซ์…… 35

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปภาพ **หน้า**

รูปที่ 1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ ฟลาโวนอยด์ซึ่งแยกจากรากของ *Butea superba* แสดงกราฟมาตรฐานของ genistein และ biochanin A โดยวิธี HPLC……. 17

รูปที่ 2 กราฟวิเคราะห์ MRM chromatograms ของ A, Dai. Std. = Daidzein standard; B, Cpd.3 = Compound 3…… 18

รูปที่ 3 โครงสร้างของสารสกัด 1, 2, และ 3…… 20

รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักหนูทดลอง (กรัม)…….. 21

รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อจำนวนอสุจิของหนูไมซ์……. 23

รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิของหนูไมซ์…… 25

รูปที่ 7 ภาพถ่ายโครงสร้างในระดับจุลภาคของหลอดอัณฑะของหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากกวาวเครือแดง daidzein, genistein เดียวๆ และผสมกันและ sildenafil… 26

รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อระดับของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนของหนูไมซ์…….. 29

รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อระดับของคอเลสเทอรอลของหนูไมซ์…….. 30

บทที่1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศของชาย (Erectile Dysfunction : ED) หมายถึงการที่องคชาติไม่สามารถแข็งตัวได้หรือแข็งได้ไม่นานพอที่จะมีเพศสัมพันธ์ได้จนสำเร็จเป็นที่พึงพอใจอยู่เป็นประจำหรืออย่างต่อเนื่อง อาจมีสาเหตุจากหลายประการทั้งทางร่างกายและจิตใจ โดยสาเหตุทางร่างกายอาจมาจาก โรคหลอดเลือด เบาหวาน โรคซึมเศร้า หรือภายหลังการผ่าตัดต่อมลูกหมาก มีชายไม่น้อยกว่า 30 ล้านคนในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ประสบปัญหานี้ สำหรับประเทศไทยมีข้อมูลระบุว่า ชายไทยวัย 40 ปีขึ้นไปกว่า 30 % มีปัญหาหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (กระทรวงสาธารณสุข, 2006) และคาดว่ามีผู้ชายอย่างน้อย 100 ล้านคนทั่วโลกที่เผชิญกับปัญหานี้ โรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศมีผลต่อทั้งสามีและภรรยา ซึ่งอาจนำไปสู่การนอกใจและหย่าร้างกันในที่สุด ปัจจุบันผู้ชายที่มีอาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศทั่วโลกไม่ต้องทนทุกข์อยู่กับเรื่องงมงายว่าตนเองไม่ใช่ชายชาตรี ไร้สมรรถภาพทางเพศอีกต่อไป เมื่อมียา Sildenafil (Viagra®) ได้รับอนุมัติให้สามารถจำหน่ายได้ในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นครั้งแรกของโลก เมื่อวันที่ 27 มีนาคม 2541 ไวอาก้า ก็เป็นยาที่สร้างยอดขายที่สูงที่สุดในประวัติศาสตร์วงการเภสัชกรรมของประเทศนั้น ยาอื่นๆที่ได้รับการขึ้นทะเบียนให้รักษาโรคนี้ในสหรัฐอเมริกาได้แก่ Tadalafil และ Vardenafil (Harvey et al., 2009)

สำหรับประเทศไทยนับเป็นประเทศลำดับที่ 8 ของโลกและเป็นประเทศแรกในเอเชียที่อนุมัติให้ขึ้นทะเบียนตำรับยาไวอาก้า และเป็นยาที่ อ.ย. กำหนดให้มีมาตรฐานควบคุมการใช้และจำหน่ายมากที่สุดเท่าที่เคยมีมาก่อน และมีการซื้อขายกันในตลาดมืดในราคาที่สูงลิ่ว และเกี่ยวข้องกับผลประโยชน์จำนวนมหาศาล นอกจากนี้แล้ว ยาไวอาก้ายังถือได้ว่าเป็นยาที่ประชาชนให้ความสนใจมากที่สุดและผู้คนต้องการข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ยาตัวนี้เป็นจำนวนมากอย่างที่ไม่เคยเป็นมาก่อน หลังจากที่เริ่มมีการนำยาไวอาก้ามาใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นได้ระยะหนึ่งก็ปรากฏมีผลข้างเคียง ได้แก่ ปวดศีรษะ หน้าแดง อาหารไม่ย่อย คัดจมูก และตาบอดสีชั่วคราว ตลอดจนเป็นอันตรายสำหรับโรคหลอดเลือดหัวใจ และมีข่าวการเสียชีวิตของผู้ที่ใช้ยานี้

ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศ นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ การค้นหาตัวยารักษาโรคตัวใหม่จากสมุนไพรไทย ที่มีราคาถูกกว่า ปลอดภัยกว่า และยังมีคุณภาพที่ดีกว่า

สามารถพึ่งพาตัวเองได้ ลดการนำเข้ายาที่มีราคาแพงและไม่ปลอดภัยจากต่างประเทศ เป็นการเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรไทย และเพิ่มรายได้ให้เกษตรกร และผู้ผลิต โดยสมุนไพรไทยที่น่าสนใจและนำมาทำการวิจัยมากก็คือ กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb. : BS) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ถูกใช้เป็นยาสมุนไพรแผนโบราณเพื่อเป็นความหนุ่มขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพทางเพศหรือป้องกันไม่ให้การทำงานหย่อนสมรรถภาพทางเพศ กวาวเครือแดงใช้เป็นยาอายุวัฒนะทำให้คนสูงอายุกลับกลายเป็นหนุ่ม สามารถใช้ในการกระตุ้นกำหนัดในเพศชายได้ และบำบัดอาการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศของผู้ชายได้ ทำให้องคชาติแข็งตัวเร็วขึ้น และจะแข็งตัวได้นานขึ้นภายหลังการหลั่งแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสร้างน้ำอสุจิได้มากขึ้น ทำให้มีผลต่อการตื่นตัวขององคชาติในช่วงเวลากลางคืน หัวของสารสกัดกวาวเครือแดงที่มีส่วนประกอบคาร์โบไฮเดรตแสดงให้เห็นกิจกรรมการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงสุดในหลอดทดลอง (Burana-Osot et al., 2010) นอกจากนี้ผลการรักษาระยะยาวในหนูแรทและหนูถีบจักรด้วยสารสกัดจากหัวของกวาวเครือแดงแสดงการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนสเปิร์มและเพิ่มการเคลื่อนที่ของสเปิร์มให้เร็วขึ้น (Tocharus et al., 2005) งานวิจัยของ Manosroi et al. พบว่าให้สารสกัดหยาบของผงกวาวเครือแดงที่ความเข้มข้น 1250 mg/kg เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถทำให้น้ำหนักของอัณฑะของหนูทดลองเพิ่มขึ้นและจำนวนสเปิร์มเพิ่มขึ้นประมาณ 16% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Manosroi et al., 2006) ต่อมามีงานวิจัยรายงานว่าสารสกัดหยาบของกวาวเครือแดงที่ 1 mg/kg มีประสิทธิภาพในการเสริมการตั้งตรงขององคชาติของหนู โดยอาจผ่านวิถี cAMP/cGMP (Tocharus et al., 2006). งานวิจัยที่ทำการทดลองกับอาสาสมัคร โดยให้ทานสารสกัดหยาบจากกวาวเครือแดงเปรียบเทียบกับยา sildenafil แล้วให้อาสามัครตอบแบบทดสอบพบว่าผู้ที่ทานสารสกัดหยาบจากกวาวเครือแดงให้ผลการทดสอบพอใจมากกว่าผู้ที่ทานยา silnadefil (Cortés-González et al., 2010). ซึ่งสอดคล้องกับงานของ (Cherdshewasart and Nimsakul, 2003) ที่ได้ทำวิจัยกับอาสาสมัครชายอายุ 30-70 ปี พบว่าผู้ป่วยที่ทานสารสกัดหยาบของกวาวเครือแดงมีผลให้อาการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (ED) ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้ทำวิจัยกับสารสกัดหยาบของกวาวเครือแดง โดยไม่มีงานวิจัยใดทราบว่าสารที่ออกฤทธิ์คืออะไร เคยมีงานวิจัยของ Roengsumran et al, (2000) พบว่ารสกัดจากหัวกวาวเครือแดง ได้แก่ 3,7,3-Trihydroxy-4-methoxyflavone และ 3,3-dihydroxy-4-methoxyflavone-7-0-(3-D-glucopyranoside) (IC_{50} = 190 และ 58 μg/ml ตามลำดับ) สามารถยับยั้ง cAMP phosphodiesterase ได้ดีกว่า caffeine และ theophylline (IC_{50} = 420 และ 615 μg/ml ตามลำดับ).

เมื่อดูรายงานการวิจัยเกี่ยวกับพิษวิทยาของสารสกัดจากกวาวเครือแดงพบว่า ที่ 1000 mg/kg/day มีผลให้เกิด micronuclei in polychromatic erythrocytes มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลอง (Pongpanparadon A, 2002). เมื่อดูถึงสารสกัดจากหัวกวาวเครือแดงว่ามีพิษต่อเซลล์อย่างไร พบว่าสารกัด Formononetin และ Prunetin มีผลต่อ KB (ที่ IC_{50} 37.3 $\pm$ 2.5 และ 71.1 $\pm$ 0.8 ตามลำดับ) และ BC cell lines (ที่ IC_{50} 32.7 $\pm$ 1.5 และ 47.3 $\pm$ 0.3 ตามลำดับ) (Ngamrojanavanich et al., 2007). สำหรับสารสกัดหยาบจากหัวกวาวเครือแดง ได้มีผู้ทำวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษในหนูทดลองพบว่า เมื่อให้ขนาด 150 mg/kg BW/day เวลา 90 วัน จะทำให้ม้ามมีขนาดโตขึ้น ระดับ ALP และ AST เพิ่มขึ้น และที่ขนาด 200 mg/kg BW/day เวลา 90 วัน มีผลทำให้ neutrophil ลดลง, eosinophil เพิ่มขึ้น, creatinine ลดลง และ testosterone ลดลง (Cherdshewasart et al., 2008). เป็นที่ทราบกันว่า การกระตุ้นความต้องการทางเพศนั้นทำให้ระดับของ nitric oxide สูงขึ้น มีผลทำให้ activity of guanylyl cyclase มากขึ้น และส่งผลทำให้ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) สูงขึ้น ระดับ cGMP ที่สูงขึ้น ทำให้กล้ามเนื้อลายของ corpus cavernosum คลายตัว และมีเลือดมาหล่อเลี้ยงมากขึ้น ในท้ายที่สุด องคชาตจะเกิดการตั้งตรงขึ้น (Harvey et al., 2009)

ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาจะเห็นว่า ยังไม่มีงานวิจัยใดเลยที่ทราบว่าสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ที่สามารถเพิ่มสมรรถนะของตัวอสุจิและฮอร์โมนในชายได้ มีแต่การใช้สารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งทำให้ประสบปัญหา เรื่องการไม่ทราบปริมาณที่แน่นอน ของสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์และปริมาณที่ให้หนูทดลองกินสารสกัดหยาบของแต่ละผู้วิจัยก็ไม่แน่นอนและมีขนาดห่างกันมาก การรับประทานในคน ถ้าขนาดของสารออกฤทธิ์ที่ได้รับมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อระบบเลือดและฮอร์โมนได้ ตลอดจนงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่สามารถไปจดทะเบียนขอขึ้นตำรับยาแผนปัจจุบันกับคณะกรรมการอาหารและยาได้ เนื่องจากยังขาดข้อมูลสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์และการทดสอบทางพิษวิทยาของสารนั้น ผู้วิจัยตระหนักถึงปัญหานี้ จึงได้ทำการวิจัยสกัดสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์ในกลุ่ม Flavonoids และนำมาทำการทดลองเพื่อหา Dose-respond relationship จนได้ขนาดที่เหมาะสมในการใช้ จากนั้นจะหาขนาดที่ทำให้เกิดพิษ เพื่อให้สามารถจดสิทธิบัตรและขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนปัจจุบัน กับคณะกรรมการอาหารและยาได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 เพื่อสกัดสารในกลุ่ม Flavonoids จากหัวกวาวเครือแดง และหาสูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม Flavonoids ที่บริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์

2 เพื่อหาขนาดที่เหมาะสมของสารสกัด Flavonoids จากหัวกวาวเครือแดงในหนูทดลอง ที่ทำให้เกิดการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ได้ดีที่สุด

3 เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัด Flavonoids จากหัวกวาวเครือแดงในหนูทดลอง จะได้ทราบขนาดที่ทำให้เกิดพิษต่อระบบต่างๆในหนูทดลองได้

สมมติฐานการวิจัย

สารในกลุ่ม Flavonoids ที่สกัดได้จากหัวกวาวเครือแดง สามารถหาสูตรโครงสร้างและพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ สารที่สกัดได้นี้สามารถแสดงฤทธิ์ในการเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิ จำนวนอสุจิและฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในหนูไมซ์เพศผู้ได้ โดยขนาดที่ใช้ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อระบบต่างๆในหนูทดลอง

ขอบเขตของการวิจัย

หัวกวาวเครือแดงจะได้จากบริเวณภาคเหนือของไทยเช่น จ.ลำปาง สารสกัดที่นำมาทดลอง จะเลือกสารในกลุ่ม Flavonoids ส่วนสัตว์ทดลอง จะเลือกหนู male mice ที่มีอายุ ขนาด น้ำหนักใกล้เคียงกัน สารที่สกัดได้เฉพาะที่มีศักยภาพจะถูกนำมาทดสอบว่ามีผลต่อ จำนวนและการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหรือไม่ ผลต่อระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน การทดสอบความเป็นพิษ จะดูผลของสารสกัดต่อ testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicle และ prostate gland นอกจากนั้นจะดูผลต่อ haematology and blood chemistry

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

จะสามารถทราบขนาดการใช้ที่เหมาะสมของสารสกัด Flavonoids จากหัวกวาวเครือแดง โดยอาจใช้เป็นยาเพิ่มสมรรถภาพทางเพศแผนปัจจุบันสูตรใหม่เพื่อช่วยเพิ่มจำนวนตัวและการเคลื่อนไหวของอสุจิ และอาจใช้ในการรักษา Erectile dysfunctionในชาย โดย มทส. จะสามารถช่วยเหลือภาคอุตสาหกรรมการผลิตยาซึ่งเป็นการสนับสนุน ภารกิจหลักและยุทธศาสตร์การพัฒนา มทส ตลอดจนช่วยแก้ปัญหาในชายที่เป็นโรคนี้ซึ่งนับวันจะมากขึ้นเรื่อยๆ และจะสามารถเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยขั้นต่อไป เช่น การวิจัยในอาสาสมัคร เพื่อพัฒนาเป็นยาได้ในที่สุด

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ทบทวนวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Butea superba หรือ "กวาวเครือแดง" เป็นพืชสมุนไพรไทยแผนโบราณที่ถูกนำมาใช้ในประเทศไทยเป็นระยะเวลานาน การใช้สมุนไพรจากพืชชนิดนี้นั้นเชื่อว่าจะให้ความแข็งแรง ให้พลังงานและฟื้นฟูสมรรถภาพทางเพศหรือการป้องกันการหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Suntara, 1931) การใช้ตามการแพทย์แผนโบราณนั้นเชื่อว่าจะช่วยให้ผู้สูงอายุนั้นมีพลังเหมือนกลับไปเป็นวัยรุ่นอีกครั้ง และกระตุ้นให้เกิดความต้องการทางเพศและใช้สำหรับการรักษาการเสื่อมสภาพของเพศชาย (Sutjit, 2003)

กวาวเครือแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Butea superba* อยู่ในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ Papilionaceae มีชื่อสามัญได้แก่ Kwao kreu (Phayub), Jan-Kwao (Isaan), Ton-Jom-Thong(Chumporn), Thong-Kwao (Thai), Pho-Ta Ku (Karen-Kanchanaburi), Pho-Mue (Karen-Mae Hong Son) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือแดงนั้น มีลักษณะต้นสูง 5-10 เมตร มีใบขนาดใหญ่ ลำต้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-10 ซม., เปลือกมีสีน้ำตาลเข้ม กิ่งไม้มีลักษณะเป็น 1 กิ่งมีใบ 3 ใบและดอกเป็นสีส้มสีเหลืองกว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตรเมื่อบานเต็มที่ ฝักมีลักษะณะแบนยาวและมีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เมล็ดมีขนาดใหญ่มีสีน้ำตาลอ่อน รากนั้นจะถูกฝังอยู่ใต้พื้นดินคล้ายรากหัวของมันเทศ รากพืชชนิดนี้มีความยาว 30-50 เซนติเมตร ซึ่งหากมีการตัดรากพืชจะมีน้ำเลี้ยงสีแดงออกมา (Smitinand, 2001). มักจะถูกพบส่วนใหญ่ในป่าในภาคเหนือ, ภาคกลาง, ภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพบในแหล่งที่อยู่อาศัยเดียวกับกวาวเครือขาวและยังสามารถพบได้ในบริเวณภูเขา ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและราก

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ความแตกต่างของการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*), กวาวเครือแดง *(Butea superba* Roxb.) และกวาวเครือดำ (*Mucuna collettii*) นั้นพบว่า สารสกัดจากพืชในกลุ่มกวาวเครือนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 ซึ่งได้ประเมินหลังจากเลี้ยงเซลล์ 4 วัน ผลลัพธ์แสดงให้เห็นว่ากวาวเครือขาวมีผลคล้ายเอสโตรเจนในการกระตุ้น เซลล์ MCF-7 ให้เจริญเจริญเติบโต และยับยั้งเอสตราไดออล (Estradiol (E2)) (Cherdshewasart et al., 2004). นอกจากนี้มีการรายงานผลของกวาวเครือแดงในหนูเพศผู้

พบว่าทำให้น้ำหนักตัวสัมพัทธ์ของหนูทุกตัวเพิ่มขึ้นและไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคและเนื้อเยื่อของหัวใจ,ไตและต่อมหมวกไตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Manasathien, 2001). นอกจากนี้ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือแดงต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูได้มีการศึกษา ซึ่งพบว่าอัตราส่วนร้อยละน้ำหนักสัมพัทธ์ของ seminal vesicle และต่อมลูกหมากของหนูทดลองนั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นน้ำหนักอัณฑะของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบที่ให้ขนาดของสารที่ 1,250 มก./กก. นั้น พบว่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้จำนวนอสุจิของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบที่ 1,250 มก./กก. พบว่ามีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม 16% (Manosroi et al., 2006). นอกจากนี้แล้ว กวาวเครือแดงนั้นยังเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสมุนไพรไทยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งฮอร์โมนเอสโตรเจน จากผลจากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า การให้สารสกัดหยาบกวาวเครือแดงกับหนูที่ถูกตัดรังไข่ ในขนาดที่ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน นั้นจะเพิ่มความหนาของมดลูกและจำนวนของต่อมในมดลูก (Malaivijitnond et al., 2009). ยิ่งไปกว่านั้น งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า ผลของสารสกัดหยาบจากกวาวเครือแดงเมื่อเปรียบเทียบกับ sildenafil ที่ใช้เป็นยาสำหรับการรักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction; ED) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ให้กวาวเครือแดง 27 คน (84%) นั้นตอบสนองในทางที่ดีขึ้น (บวก) เมื่อเทียบกับ 26 คน (81%) ในกลุ่มที่ได้รับ sildenafil (Cortes-Gonzalez et al., 2010).

กวาวเครือแดงนั้นสามารถช่วยรักษาความผิดปกติของอวัยวะเพศชายได้ การทดลองทางคลินิกเมื่อให้อาสาสมัครทานรากกวาวเครือแดงป่นที่ 1000 มก./วัน เป็นเวลาสามเดือน พบว่าสามารถเพิ่มคะแนนจากการประเมินผลจากแบบสอบถามอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่า 82.4% ของผู้ป่วยนั้นแสดงให้เห็นอาการที่ดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ผลทางโลหิตวิทยาและการวิเคราะห์สารเคมีในเลือดนั้นพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัด ซึ่งแสดงผลให้เห็นว่ากวาวเครือแดงนั้นสามารถเพิ่มสมรรถภาพทางเพศในผู้ป่วยที่มีการทำงานที่ผิดปกติของอวัยวะเพศชายและไม่เกิดผลข้างเคียงที่ทำให้เกิดพิษ (Cherdshewasart and Nimsakul, 2003). นอกจากนี้ผลระยะยาวของกวาวเครือแดงต่อความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของอสุจิในหนูกับพยาธิสภาพของอัณฑะได้มีการทดลอง โดยให้สารสกัดหยาบจากรากกวาวเครือแดงที่ 0.01, 0.1 หรือ 1.0 มก. / กก / วันเป็นเวลา 6 เดือน ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของตัวอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและช่วยยืดระยะการเคลื่อนที่ของอสุจิให้นานขึ้น โดยตัวอสุจิไม่มีความผิดปกติและไม่เกิดพยาธิสภาพที่อัณฑะ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้กวาวเครือแดงเป็นเวลานานนั้นสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิและทำให้อสุจินั้นเคลื่อนที่เป็นเวลานานขึ้นในหลอดทดลองในขณะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สารสกัดแอลกอฮอล์ของกวาวเครือแดงอาจจะมีประโยชน์ในการช่วยการปฏิสนธิ (Tocharus et al., 2005). จากกราย

งานการวิจัยพบว่า ประมาณ 30% ของคู่สมรสที่มีบุตรยากมีสาเหตุมาจากเพศชาย โดยสาเหตุหลักๆมาจากการลดลงของการผลิตอสุจิและคุณภาพของอสุจิ (Isidori et al., 2006). อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเป็นหมันได้แก่ คอเลสเตอรอล (Cholesterol) เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เทสทอสเทอโรน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างตัวอสุจิและระบบสืบพันธุ์เพศชาย (Maqdasy et al., 2013). นอกจากนี้งานวิจัยยังพบอีกว่า ผู้ที่มีเทสทอสเทอโรนรวม (Total testosterone; TT) หรือ เทสทอสเทอโรนอิสระ (Free testosterone) เป็นปัจจัยร่วมที่เพิ่มความเสี่ยงต่อโรคความจำเสื่อม (Dementia of the Alzheimer's Type; DAT) ในเพศชาย (Hogervorst et al., 2004). อย่างไรก็ตามมีบางงานวิจัยรายงานว่า กับผลของสารสกัดหยาบจากรากของกวาวเครือแดงต่อเทสทอสเทอโรน, ฮอร์โมน ลูทิไนด์ซิ่ง (Luteinizing hormone) และความเป็นพิษในหนูเพศผู้ ซึ่งผลการทดลองนั้นพบว่าผงสกัดหยาบจากรากของกวาวเครือแดงนั้นมีฤทธิ์ลดฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในเลือด แต่ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน ลูทิไนด์ซิ่งอย่างมีนัยสำคัญ (Cherdshewasart et al., 2008). นอกจากนี้แล้ว ยังมีงานวิจัย ในอาสาสมัครที่มี จำนวนตัวอสุจิต่ำอย่างมาก (oligospermia) รุนแรงที่ได้รับ phytoestrogens ที่ 80 มก./วัน ที่มีส่วนประกอบ 40-45% genistein, daidzein 40-45% และ 10-20% glycitein ผลการทดลองพบว่า จำนวนอสุจิ, การเคลื่อนที่ของอสุจิ มีค่าสูงขึ้นอย่างมันัยสำคัญภายหลังได้รับสารเป็นเวลาสามเดือน (Casini et al., 2006). นอกจากนี้แล้ว งานวิจัยในหนูวิสตาร์-ยูนิลีเวอร์เพศผู้ที่ได้รับ สารอาหารที่มีส่วนผสม isoflavone จากถั่วเหลือง (200 หรือ 2000 มก /อาหาร 1กิโลกรัม) ที่มีส่วนประกอบเป็น genistein 45%, daidzein 23% และ glycitein 4% เป็นเวลา 12 เดือน ผลปรากฏว่าสารอาหารเหล่านี้ไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนอสุจิ, การผลิตอสุจิหรือรูปร่างของตัวอสุจิ อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มใดๆ (Faqi et al., 2004). รายงานการวิจัยเกี่ยวกับ องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากกวาวเครือแดง โดย Roengsumran, et al, (2000) รายงานการแยกสารจากรากพืชของกวาวเครือแดง

ซึ่งพบ 3,7,3 '-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ 3,5'-glucopyranoside dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-β-D glucopyranoside พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของ 3,7,3 '-trihydroxy-4'-methoxyflavone และ 3,5'-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-β-D glucopyranoside นั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง phosphodiesterase เอนไซม์มากกว่า theophylline และคาเฟอีนซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของร่างกายในส่วนที่ทำให้เกิดโรคเสื่อมสมรรถภาพทางเพศได้ (Roengsumran S, 2000). รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ได้ถูกแยกจากกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica)* พืชในตระกูล Leguminosae เช่นกัน (Cherdshewasart et al., 2007). นอกจากนั้นยังมีรายงานการวิจัยในการแยกสาร หาโครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีของหัวกวาวเครือแดง

และการทดสอบความเป็นพิษ นั้นพบว่าสารเคมีที่พบคือ carpin, medicarpin และมีสารกลุ่ม isoflavone 4 ชนิด คือ formononetin, 7,4-dimethoxyisoflavone, prunetin และ 7-hydroxy,4-6-dimethoxyisoflavone ผลการทดสอบของสาร formononetin และ prunetin นั้นพบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ KB ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 37.3 ± 2.5 และ 71.1 ± 0.8 ไมโครโมล (μM) ตามลำดับและมีพิษต่อเซลล์ BC ซึ่งมีค่า IC50 เท่ากับ 32.7 ± 1.5 และ 47.3 ± 0.3 ไมโครโมล (μM) ตามลำดับ (Ngamrojanavanich et al., 2007).

จากการตรวจพบสารเคมีเหล่านี้ในกวาวเครือขาว *(Pueraria mirifica)* จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการตรวจสอบว่ากวาวเครือแดง (*Butea superba*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับกวาวเครือขาว จะมีสารเคมีที่เหมือนหรือต่างกันอย่างไร เมื่อมองในแง่ของการประยุกต์ใช้ในผู้มีบุตรยากแล้ว มีการศึกษาหนึ่งที่แสดงผลการวิจัยว่า ความเข้มข้นของอสุจิ ร้อยละการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และสัณฐานของเซลล์อสุจิปกติ มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังการได้สาร Sildenafil มากกว่าก่อนการได้รับสาร (Dimitriadis et al., 2010). โดยการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ว่า การเคลื่อนไหวของอสุจิในชายหนุ่มที่มีบุตรยากเพิ่มขึ้นมากเมื่อได้รับ Sildenafil เพียงครั้งเดียว (Pomara et al., 2007). นอกจากนี้แล้ว Sildenafil สามารถนำมาใช้อย่างประสบความสำเร็จในการเพิ่มความสำเร็จของอสุจิในการปฏิสนธิกับไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการรักษาผู้มีบุตรยาก (du Plessis et al., 2004). อย่างไรก็ตาม Sildenafil มีผลกระทบจากอาการที่ไม่พึงประสงค์เช่นปวดหัว, หน้าแดง, อาหารไม่ย่อย, คัดจมูกและการรบกวนในการมองเห็นสี ผลกระทบร้ายแรงอาจรวมถึงกล้ามเนื้อหัวใจตายเมื่อใช้เดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับยาในกลุ่มไนเตรต (Flomenbaum, 2006). แม้ว่าหลายงานวิจัยได้ทำการทดลองในสารสกัดหยาบของกวาวเครือแดง แต่สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ขนาดที่ใช้ และระยะเวลาที่ใช้ให้เหมาะสมยังม่มีนักวิจัยใดทำการศึกษา นอกจากนี้ ผลการวิจัยที่ผ่านมาบางอย่างยังมีความขัดแย้งกัน และผลลัพธ์ที่ได้ยังคงไม่ชัดเจน เช่น ผลของสารสกัดจากกวาวเครือแดง เพิ่มคอเลสเตอรอลฮอร์โมนเพศชายในหนูเพศผู้จริงหรือไม่? ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาผลของสารสกัดจากกวาวเครือแดง ต่อจำนวนและการเคลื่อนที่ของอสุจิ, ฮอร์โมนเพศชายและระดับคอเลสเตอรอลของหนูเพศผู้ การศึกษาครั้งนี้จะช่วยให้ใหม่เกี่ยวกับ สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ ที่แยกได้จากหัวกวาวเครือแดง เพื่อที่จะช่วยรักษาความผิดปกติของอสุจิหรือฮอร์โมนเพศชาย เพื่อทดแทนการใช้ยาสังเคราะห์เพียงอย่างเดียว

2.2 แหล่งที่มาของวัตถุดิบพืช

หัวสดของกวาวเครือแดงนั้นถูกเก็บจากจังหวัดเชียงรายในประเทศไทย ตัวอย่างของพืชชนิดนี้นั้นได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าถูกต้องทางสายพันธุ์ โดย Dr.Paul J Grote ผู้เชี่ยวชาญในการพิสุจน์เอกลักษณ์

พรรณไม้ มทส. โดยเทียบกับตัวอย่างจากหอพรรณไม้กรุงเทพฯ หัวกวาวเครือแดงถูกล้างให้สะอาดและทำให้แห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตัวอย่างแห้งที่ได้จะถูกบดเป็นผง

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดและใช้เป็นตัวชะสำหรับ Thin-Layer Chromatography และ Column chromatography นั้นเป็นเกรดธรรมดาและนำมากลั่นก่อนการใช้งาน สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์และเกรดสำหรับ HPLC ดังต่อไปนี้:

Ethyl acetate	Carlo Erba
Hexane	Carlo Erba
Methanol	Carlo Erba
Dichloromethane	Carlo Erba
Chloroform	Carlo Erba
Acetone	Carlo Erba
Acetone-d_6	Aldrich
Chloroform-d_1	Aldrich
Methanol-d_4	Aldrich

2.4 เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิจัย

Rotary evaporator	Buchi
Heating bath: Buchi heating bath B-490	
Rotavapor: Buchi rotavapor R-200	
Controller: Buchi vacuum controller V-800	
UV/VIS Spectrophometer series CARY 1E	Varian
UV-Cabinet II	Camag
FT-IR Spectrophotometer Model	Nicolet
NMR Spectrometer INOVA 300	Varian

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ข้อมูล UV สเปคตรัมได้จากเครื่อง Varian CARY 1E UV-Vis สเปกโทรโฟโตมิเตอร์, FT-IR ถูกบันทึกด้วยเครื่อง Nicolet สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR สเปคตรัมถูกบันทึกด้วยเครื่อง Varian INOVA 300 NMR สเปกโทรมิเตอร์ ในสารละลาย acetone-d_6 สำหรับสารประกอบ 1, ในสาร $CDCl_3$+CD_3OD ผสมสำหรับสารประกอบ 2, chemical shifts ถูกแสดงในหน่วย δ (ppm) สำหรับ solvent signals, การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบ 3 ได้ใช้ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), 6400 Series Triple Quadrupole B.05.00 (B5027.0), quadrupole mass spectrometer ติดตั้งด้วย electrospray ionization (ESI) turbo ion interface โดยเทียบกับสารมาตรฐาน แมสสเปกโทรมิเตอร์ (mass spectrometer) ถูกบันทึกด้วยเครื่อง Hewlett Packard 5989 HP mass spectrometer, คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column Chromatography) ได้ทำการทดลองโดยคอลัมน์ชนิดซิลิกาเจล (silica gel 60 Art 7734 และ 9385) และโดยเครื่อง Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) silica gel GF254

2.5 การสกัดสาร การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สาร

วิธีการสกัดกวาวเครือแดง, การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารได้ดัดแปลงมาจาก Cherdshewasart *et al.* (2007) และ Kayano *et al*. (2012) (Cherdshewasart et al., 2007; Kayano et al., 2012) โดยสรุปคือ ผงหัวกวาวเครือแดง (*B. superba* : 2 กิโลกรัม) ถูกสกัดอย่างต่อเนื่องด้วยเอทานอลผ่าน Soxhlet 12 ชั่วโมง กวาวเครือแดงที่ถูกสกัดแล้วจะกรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman ครั้งที่ 1) หลังจากนั้นนำสารไปผ่านการระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันจนได้สาร 30.5 กรัมมีลักษณะเป็นน้ำเชื่อมสีน้ำตาลเข้ม สารสกัดเอทานอล (25 กรัม) จะถูกแยกออกโดยคอลัมน์ chromatography ชนิดซิลิกาเจล คอลัมน์นี้ถูกชะล้างตามลำดับด้วย เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, อะซิโตนและเมทานอล ซึ่งแฟลกชันที่ได้นั้นจะถูกทำให้เข้มข้นทุกแฟลกชันจนได้ สารสกัดหยาบในเฮกเซน (0.5 กรัม), สารสกัดในคลอโรฟอร์ม (1.6 กรัม), สารสกัดในอะซีโตน (7.4 กรัม) และสารสกัดในเมทานอล (8.6 กรัม)

สารสกัดอะซีโตนจะถูกแยกโดยใช้คอลัมน์ chromatography ชนิดซิลิกาเจล คอลัมน์นี้ถูกชะอย่างต่อเนื่องด้วยเฮกเซน-อะซิโตน (1:1), อะซีโตน, คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (1:1) และเมทานอล ทุกแฟลกชันนั้นจะถูกเก็บและทำให้เข้มข้นขึ้นซึ่งจะมีส่วนแฟลกชันที่สำคัญ 4 ส่วน (Fr.l 1.7 กรัม, Fr.2 l.8 กรัม, Fr.3 1.1 กรัม, Fr.4 2.0 กรัม และ Fr.5 4.0 กรัม)

ส่วนของแฟลกชัน 1 (1.0 กรัม) นั้นจะถูกแยก่อในซิลิกาเจล 60 คอลัมน์ คอลัมน์นี้ถูกชะอย่างต่อเนื่องด้วยเฮกเซน, 1:4 เฮกเซน -อะซีโตน, 2:3 เฮกเซน-อะซีโตน, 3:2 เฮกเซน-อะซิโตน, 4:1 เฮกเซน-อะซิโตน, และอะซีโตนตามลำดับ ทุกแฟลกชันนั้นจะถูกเก็บรวบรวมและทำให้เข้มข้นขึ้น จนได้ปริมาตรน้อยลงและแฟลกชันที่ได้ทั้งหมดรวมหกส่วน (Fr. l-1 2.8 มก., Fr. l-2 81.2 มก., Fr. l-3 59.5 มก., Fr. l-4 126.5 มก., Fr. l-5 53.2 มก. และ Fr.1-6 54.8 มก.)

แฟลกชัน l-2 (81.2 มก.) จะถูกแยกโดยให้คอลัมน์ 60 chromatography ชนิดซิลิกาเจล ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการใช้ preparative thin layer chromatography (PTLC) (เฮกเซน: อะซิโตน 2:1) จะได้สองแฟลกชัน (A 57.6 มก., B 9.4 กรัม) แฟลกชัน A (5.76 มก.) ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย PTLC โดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันซึ่งจะได้สารที่ 1 (2.11 มก.) ซึ่งจะถูกทำให้เป็นผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอลเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ 1 (18.1 มก.) ซึ่ง เป็นผงสีเหลืองอ่อน

แฟลกชัน 1-5 (53.2 มก.) ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการใช้ PTLC (เฮกเซน: อะซิโตน 1:1) เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ 2 (8.5 มก.) ซึ่งเป็นผงสีขาว

ส่วนของแฟลกชัน 5 (2.0 กรัม) นั้นจะถูกแยกต่อในคอลัมน์ชนิดซิลิกาเจล 60 คอลัมน์นี้ถูกชะอย่างต่อเนื่องด้วย เฮกเซน-อะซีโตน (1:1) ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย TLC โดยใช้ทำละลายเดียวกันซึ่งจะให้สารประกอบที่ 3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่แยกได้ ได้ดำเนินการตามวิธีของ Shaw *et al.* (2013) (Shaw et al., 2013) กล่าวโดยสรุปคือ LC-MS, 6400 Series Triple Quadrupole B.05.00 (B5027.0), quadrupole mass spectrometer equipped ESI turbo ion interface ถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบที่ 3 โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน โดยที่แมสสเปกโทรมิเตอร์ถูกดำเนินการโดยใช้ positive ion detection mode การวิเคราะห์เชิงปริมาณถูกวิเคราะห์โดยวิธี multiple-reaction monitoring (MRM) โดยวิเคราะห์ร่วมกับ วิธี precursor-to-product ion pair

2.6 สัตว์ทดลองและวิธีดำเนินการ

ได้ทำการทดลองในของหนูไมซ์เพศผู้ทั้งหมดห้าสิบตัวโดยมีอายุประมาณ 130 วัน, น้ำหนัก 30-40 กรัม, ซึ่งได้รับการเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง, มทส ประเทศไทย โดยวิธีการการทดลองได้รับการอนุมัติตามแนวทางสำหรับการดูแลและการใช้สัตว์ทดลองโดยคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย

มทส. (ACUC), ใบอนุญาตเลขที่ 13/2555, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และได้ดำเนินการตามแนวปฏิบัติของสหภาพยุโรป

หนูไมซ์ถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 10 ตัวโดยแต่ละกลุ่ม ก่อนการให้สาร (Pre-treatment) หนูทั้งหมดในกลุ่มจะถูกเจาะเลือดทางหาง และเก็บอสุจิโดยการผ่าตัดช่องท้องเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่าหลังการให้สาร (Post-treatment) หนูถูกเลี้ยงด้วยสูตรอาหาร casein-based open formula purified diet โดยที่อาหารเหล่านี้ไม่มี estrogenic isoflavones genistein, daidzein หรือ glycitein (Fielden et al., 2003) ในช่วงระยะเวลาการทดลอง กลุ่มแรกได้รับการป้อนน้ำมันข้าวโพด 0.1 มล.(Sigma, St Louis, MO, USA) ทุกวัน โดยการให้อาหารด้วยที่ป้อนอาหารลงสู่กระเพาะ กลุ่มที่สองได้รับการป้อนด้วยน้ำมันข้าวโพด 0.1 มล. บวกด้วย sildenafil ที่ 10.00 mg/kg BW/วัน ทุกวัน โดยการให้อาหารด้วยที่ป้อนอาหารลงสู่กระเพาะ ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมแบบบวก และ กลุ่มที่ สาม สี่ และ ห้า ได้รับอาหารผ่านทางปากด้วยที่ป้อนอาหารลงสู่กระเพาะ ได้แก่กลุ่มที่ได้รับ daidzein, genistein และ daidzein ผสมกับ genistein ในน้ำมันข้าวโพด โดยขนาดของสารคือ 1.0, 1.0 and 0.2 + 0.2 mg/kg BW/วัน ตามลำดับ โดยขนาดการทดลองที่ใช้พัมนามาจากการวิจัยก่อนหน้านี้ของ Pinmongkholgul (2001) และการทดลอง Pilot study ของคณะผู้วิจัย และน้ำหนักของหนูไมซ์จะถูกบันทึกไว้ทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง ซึ่งการทดลองได้ดำเนินการตลอดทั้ง 40 วันติดต่อกัน เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการให้สารหนูทุกตัวจะถูกเมตตาฆาต โดยทำให้สลบด้วย Sodium thiopental และอวัยวะที่ต้องตรวจสอบก็ถูกตัดเนื้อเยื่อมาตรวจสอบต่อไป ตลอดจนเลือดและอสุจิถูกเก็บรวบรวมเพื่อเปรียบเทียบจำนวน และการเคลื่อนไหวของอสุจิ คอเลสเตอรอล และระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนกับก่อนได้รับสารในแต่ละตัว (Cherdshewasart et al., 2008; Sharma et al., 2013)

2.7 พารามิเตอร์ที่ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัด

2.7.1 จำนวนและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ทำตามวิธีการของ Sharma et al., (2013) (Sharma et al., 2013)โดยใช้สูตร

การเคลื่อนที่ (%) = (จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ / อสุจิทั้งหมด) x 100

ท่อเก็บอสุจิถูกตัดและชั่งน้ำหนัก การแขวนลอยตัวอสุจิถูกเตรียมโดยละลายในน้ำเกลือ 0.85% 1 มล. อสุจิเหล่านี้ได้รับการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมากรอง

ผ่านผ้ากรองสองชั้น และนำไปนับตัวอสุจิใน Makler counting chamber จากนั้นอสุจิถูกย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (CH-2, Olympus, Japan) ที่กำลังขยาย 100X อสุจิที่มีหัวและหางผิดปกติ (ไม่เกิน 200 เซลล์ ต่อสัตว์ 1 ตัว) จะถูกบันทึกไว้

2.7.2 ระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน

ความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนของหนูถูกวัดโดยใช้เทคนิค radioimmunoassay ตามวิธีขององค์การอนามัยโลกและสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ค่าสัมประสิทธิ์ระหว่างการทดสอบของการเปลี่ยนแปลงเป็น 7% สำหรับฮอร์โมนเพศเทสทอสเทอโรน (Sharma et al., 2013)

2.7.3 การวิเคราะห์โลหิตวิทยา สารเคมีในเลือดและคอเลสเทอรอล

เลือดถูกเก็บก่อนและหลังการได้รับสาร สำหรับวิเคราะห์คอเลสเทอรอลในตอนท้ายของการทดลองจะมีการเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะผ่านหัวใจหลังจากการดมยาสลบ (อีเทอร์) เวลา 9.00-10.00 AM ซึ่งเลือดถูกใช้ประเมินทางโลหิตวิทยา เลือดถูกปั่นเหวี่ยงที่ 1,000×g เป็นเวลา 30 นาทีและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โลหิตวิทยา สารเคมีในเลือดและคอเลสเทอรอล โดยดำเนินการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องตรวจระบบอัตโนมัติที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (Cherdshewasart et al., 2008)

2.7.4 ผลกระทบต่ออวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักตัว

ในตอนท้ายของระยะเวลาให้สารสกัดตามที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้หนูทุกตัวจะถูกเมตตาฆาต และตัวอย่างก็ถูกนำมาวิเคราะห์อวัยวะสำคัญโดยการตัดชิ้นเนื้อ และระบบอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะ, หลอดน้ำอสุจิ, หลอดนำอสุจิ, ถุงน้ำเชื้อและต่อมลูกหมาก) ถูกตัดออกเพื่อตรวจสอบผลของสารต่ออวัยวะเหล่านั้น และพยาธิสภาพของอวัยวะเหล่านั้น ตลอดจนเปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะเหล่านี้สัมพัทธ์ในแต่ละกลุ่ม โดยน้ำหนักของหนูทดลองทุกตัวถูกบันทึกไว้ทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลอง (Sharma et al., 2013)

2.8 การเสริมฤทธิ์ และการวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (S.E.M) การคำนวณการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารผสมสองตัวทำได้โดยการคำนวณค่า Fractional Effective Concentration Index (FECI) ของการใช้สารร่วมกัน เช่น ค่า FECI ของสารผสม genistein และ daidzein

คำนวณจาก Fractional Effective Concentration (FEC) ของ genistein บวกกับ FEC daidzein โดยที่ FEC genistein ได้จาก ความเข้มข้นของ genistein ที่แสดงประสิทธิภาพโดยมีควมแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังได้รับสาร (statistical significant difference; SSD) ในสารผสม / ความเข้มข้นของ genistein ที่แสดงประสิทธิภาพโดยมีควมแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังได้รับสาร (statistical significant difference; SSD) เมื่อใช้เดี่ยวๆ ในขณะที่ FEC daidzein ได้จากความเข้มข้นของ daidzein ที่แสดง SSD ในสารผสม / ความเข้มข้นของ genistein ที่แสดง SSD เมื่อใช้เดี่ยวๆ; ด้วยเหตุนี้ FECI ของสารผสม = FEC genistein + FEC daidzein เมื่อ FECI ของสารผสม มีค่าน้อยกว่า 1.0 จะเรียกว่ามีฤทธิ์เสริมฤทธิ์กัน, เมื่อ FECI เท่ากับ 1.0 แสดงว่า ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวกระทำ (no interaction) และ เมื่อค่า FECI ที่มากกว่า 1.0 บ่งชี้ว่า สารประกอบสองสารต่อต้านกัน (antagonism) (Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009)

น้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์สัมพัทธ์และน้ำหนักตัวของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ถูกเปรียบเทียบความแตกต่างว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่โดยใช้การเปรียบเทียบแบบ ANOVA (Armstrong et al., 2002; Van Breukelen, 2006) ความแตกต่างของโลหิตวิทยา สารเคมีในเลือด คอเลสเตอรอล เทสทอสเทอโรน อัตราการเจริญเติบโตและการวิเคราะห์อสุจิ ระหว่างกลุ่มก่อนและหลังการได้รับสาร ถูกคำนวณโดย paired student's *t-test* จากนั้นความแตกต่างว่ามีนัยสำคัญหรือไม่ระหว่างกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ ANCOVA โดยใช้ Tukey HSD ในเปรียบเทียบ post hoc โดยที่ p <0.01 (Borm et al., 2007; Van Breukelen, 2006; Winkens et al., 2007) ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกัน ในแต่ละกลุ่มแสดงถึงความแตกต่างกนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแต่ละกลุ่ม

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1 โครงสร้างและปริมาณของสารสกัด

สารสกัดหยาบในส่วนของอะซีโตนถูกแยกโดย column chromatography and PTLC จนได้สารบริสุทธิ์ 3 สาร สารชนิดแรกได้แก่ 5,7-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone (compound 1) เป็นผงแข็งสีเหลืองอ่อน (18.1 mg, 0.0009% yields from dried powder). การวิเคราะห์โดย UV-Vis spectrum แสดง absorption bands (λ_{max}) ที่ 260 and 325 nm. การวิเคราะห์โดย IR spectrum of compound 1 แสดงทั้ง strong absorption band at 1651 cm^{-1} ซึ่งบ่งบอกว่ามี α,β-unsaturated carbonyl carbon และ broad stripe of the hydroxyl group ระหว่าง 3100 and 3400 cm^{-1} และ aromatic phenyl group ที่ 1622 and 1609 cm^{-1}. การวิเคราะห์โดย mass spectrum แสดง molecular ion peak ที่ *m/z* 284 [M^+] และ EIMS แสดงว่าสูตรโมเลกุลได้แก่ $C_{16}H_{12}O_5$. การวิเคราะห์โดย ^{1}H-NMR spectrum ของ compound 1 แสดง 4 signals ของ aromatic protons ที่ δ 6.28 ppm (1H, *d, J* = 2.10 Hz), 6.40 ppm (1H, *d, J* = 2.10 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-6 and H-8 ใน A ring, และ a doublet signal at δ 7.53 ppm (2H, *d, J* = 8.40 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-2′ and H-6′ และ doublet signal at δ 6.98 ppm (2H, *d, J* = 8.40 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-3′ and H-5′ ใน B ring. ส่วนที่เป็น aromatic ของ ^{1}H-NMR spectrum ของ compound 1 บ่งบอกถึง characteristic resonance ของ H-2 ของ isoflavone ที่ δ 8.15 ppm (1H, *s*). ผลการวิเคราะห์เหล่านี้บ่งบอกถึงลักษณะของ isoflavone และ three singlet signals ที่ δ 12.99 ppm (proton signal disclosed downfield shift) และ 9.60 ppm บ่งบอกถึง hydroxyl groups ที่ H-5 and H-7, และการมี methoxy group ดูได้จากการที่มี singlet signal ที่ δ 3.83 ppm.

การวิเคราะห์ ^{13}C-NMR spectrum ของ compound 1 แสดงให้เห็นถึง 14 carbon signals ของ 15 skeletal carbon atoms (flavonoid characteristic). สารนี้มี 1 carbonyl group ที่ประกอบด้วย the most downfield shift at δ 180.94 ppm, one methoxy carbon signal at δ 54.97 ppm, seven methine carbon on five signals at δ 153.83 ppm (C-2), 130.46 ppm (C-2′, C-6′), 113.91 ppm (C-3′, C-5′), 99.28 (C-6) and 93.90 (C-8), and seven quaternary carbon signals at δ 164.37 ppm (C-7), 163.31 ppm (C-5), 160.08 ppm (C-4′), 158.42 ppm (C-9), 123.58 ppm (C-1′), 123.20 ppm (C-3), and 105.58 ppm (C-10). การวิเคราะห์โดย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR chemical shifts ของ compound 1 ดังแสดงในตารางที่ **1**. เมื่เปรียบเทียบค่า ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts ของ compound 1 กับค่าจากการตีพิมพ์ในวาสารของ biochanin A พบว่า compound 1 ได้แก่ 5,7-dihydroxy-4′-methoxyisoflavone หรือ biochanin A. (Talukdar et al., 2000) (รูปที่ **3**).

สาร 5,7,4'-trihydroxyisoflavone (compound 2) ที่ได้เป็นของแข็งสีขาว (0.0085 g, 0.0004% yields from dried powder). การวิเคราะห์โดย UV-Vis spectrum แสดง absorption bands (λ_{max}) ที่ 254 and 369 nm. การวิเคราะห์โดย IR spectrum ของ compound 2 แสดง absorption band ของ a hydroxyl group ที่ 3000-3500 cm^{-1} และ strong absorption band ที่ 1659 cm^{-1} บ่งชี้ว่ามี α,β-unsaturated carbonyl carbon.

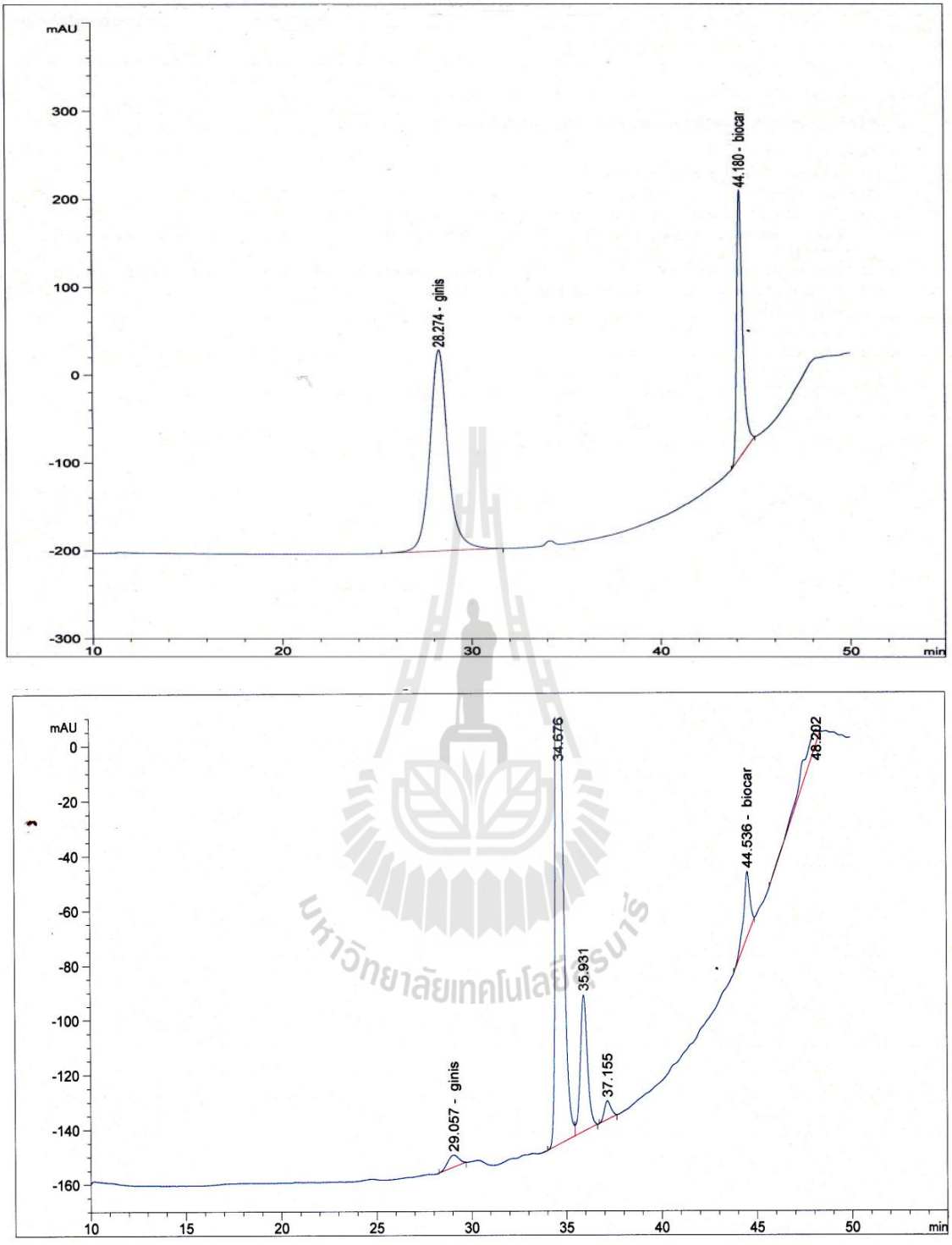
การวิเคราะห์โดย ^{1}H-NMR spectrum ของ compound 2 แสดงให้เห็นถึง four signals ของ aromatic protons ที่ δ 6.28 ppm (1H, *d*, *J* = 2.10 Hz) และ 6.37 ppm (1H, *d*, *J* = 2.10 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-6 และ H-8 ใน A ring, และที่ δ 7.53 ppm (2H, *d*, *J* = 8.70 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-2′ และ H-6′, และ a doublet signal ที่ δ 6.89 ppm (2H, *d*, *J* = 8.70 Hz) สำหรับตำแหน่ง H-3′ และ H-5′ ใน B ring. ส่วนที่เป็น aromatic จากการวิเคราะห์โดย ^{1}H-NMR spectrum ของ compound 2 บ่งชี้ลักษณะ resonance สำหรับ H-2 ของ isoflavone ที่ δ 7.92 ppm (1H, *s*).

การวิเคราะห์โดย ^{13}C-NMR spectrum ของ compound 2 บ่งชี้ถึง 13 carbon signals สำหรับ 15 skeletal carbon atoms (flavonoid characteristic). ตำแหน่งของ downfield carbon signal ที่ δ 181.24 ppm, บ่งชี้ถึงการมี carbonyl carbon (C-4), 7 methine carbon signals ที่ δ 153.23 ppm (C-2), 130.37 ppm (C-2′, C-6′), 115.57 ppm (C-3′, C-5′), 99.46 (C-6) และ 94.18 (C-8), และ 7 quaternary carbon signals ที่ δ 164.57 ppm (C-7), 162.49 ppm (C-5), 158.56 ppm (C-4′), 157.47 ppm (C-9), 123.86 ppm (C-1′), 122.18 ppm (C-3), และ 105.54 ppm (C-10).

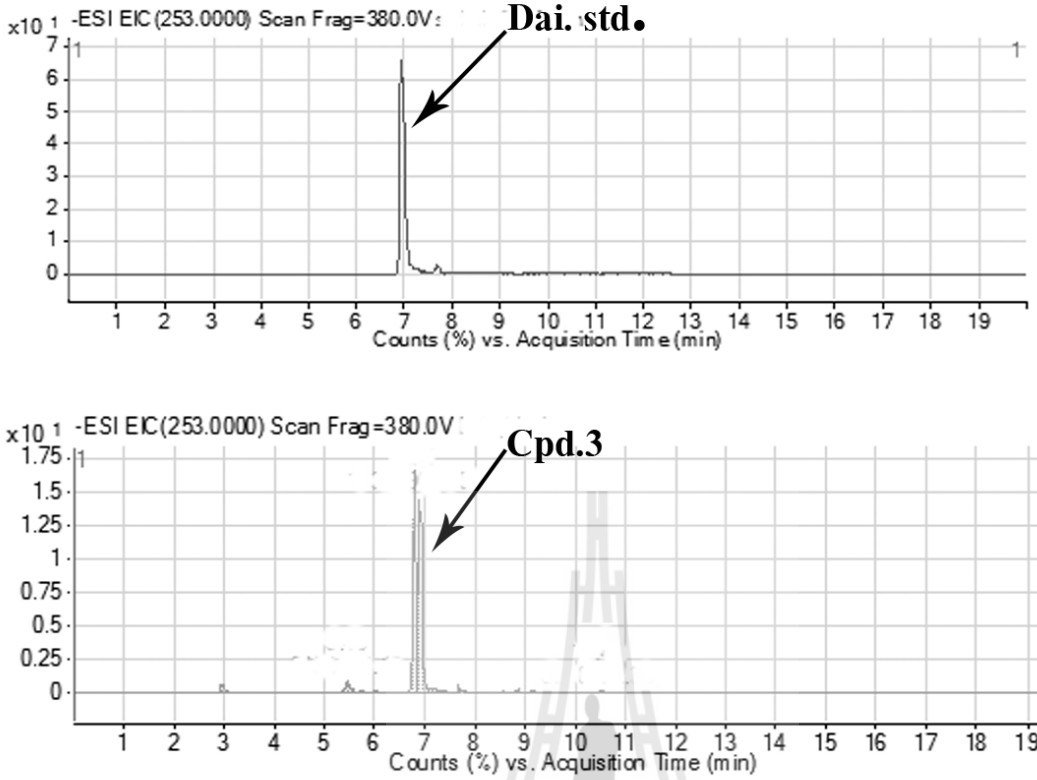
กาวิเคราะห์โดย mass spectrum ของ compound 2 แสดง molecular ion peak ที่ *m/z* 270 [M^{+}] และสูตรโมเลกุลจากการวิเคราะห์โดย EIMS ได้แก่ $C_{15}H_{10}O_5$

จากการวิเคราะห์โดย ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ค่า chemical shifts ของ compound 2 ดังแสดงในตารงที่ **1**. เมื่อวิเคราะห์จากข้อมูลทั้งหมดแล้ว compound 2 ได้แก่ 5,7,4′-trihydroxyisoflavone หรือ genistein โดยข้อมูลเหล่านี้ได้ถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้แล้ว (Zhao et al., 2009) (รูปที่ **3**).

สารที่ 3 ที่ได้จากการสกัดได้แก่ 7,4'-Dihydroxyisoflavone (compound 3) เป็นของแข็งสีขาว (0.425 g, 0.02 % yields from dried powder). สารนี้และสารมาตรฐานได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดย HPLC-ESI-MS/MS ดังที่ได้เอ่ยมาในสารที่ 1 และ 2 แล้ว สารที่ 3 (compound 3) ได้ถูกเปรียบเทียบค่า retention time (RT) และ ion fragments กับ daidzein standard. พบว่าทั้ง compounds 3 และ daidzein standard มีค่า RT ที่ 6.93 minutes (รูปที่ 2) และ positive ion ค่า *m/z* 253.10 [M^{+}]. ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่า compound 3 คือ daidzein (รูปที่ 3).



รูปที่ 1 แสดงผลจากการวิเคราะห์ ฟลาโวนอยด์ซึ่งแยกจากรากของ *Butea superba* แสดงกราฟมาตรฐานของ genistein และ biochanin A โดยวิธี HPLC

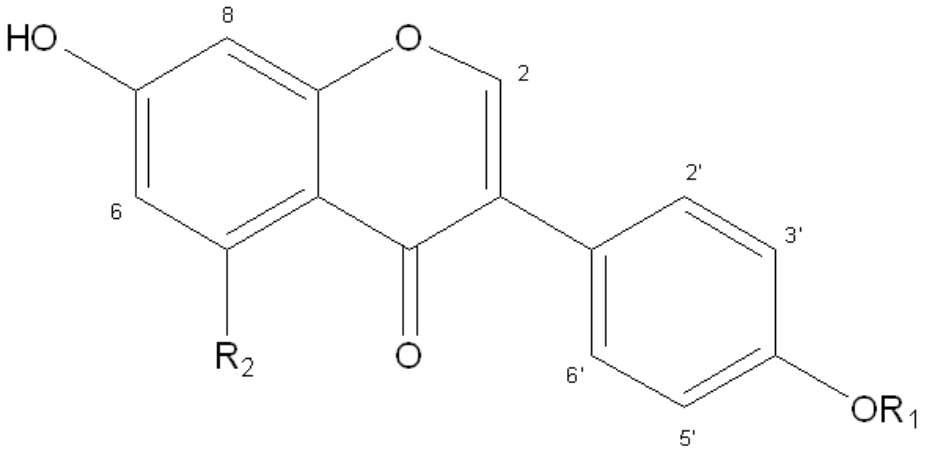


รูปที่ 2 กราฟวิเคราะห์ MRM chromatograms ของ A, Dai. Std. = Daidzein standard; B, Cpd.3 = Compound 3.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 1 แสดงค่า ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR chemical shifts ของสารประกอบ 1, 2 และ 3 วัดใน acetone-d_6, ส่วนผสม $CDCl_3$ + CD_3OD และ DMSO ตามลำดับ

Atom position	**^{1}H (*J* in Hz) of compound**			**^{13}C (*J* in Hz) of compound**		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
2	8.15 (*s*)	7.92 (*s*)	8.30 (*s*)	153.82	153.23	153.36
3	-	-	-	123.20	122.18	123.04
4	-	-	-	180.94	181.24	179.82
5	12.99 (*s*)	-	-	163.31	162.49	135.56
5-OH	6.28 (*d, J* = 2.1)	-	-	99.28	-	-
6	9.60 (*s*)	6.28 (*d, J* = 2.1)	6.95 (*d, J* = 8.7, 1.6)	164.37	99.46	112.24
7	-	-	-		164.57	165.24
7-OH	6.40 (*d, J* = 2.1)	-	-	93.90	-	-
8	-	6.37 (*d, J* = 2.1)	6.90 (*d, J* = 1.6)	158.42	94.19	99.80
9	-	-	-	105.58	157.47	157.2
10	12.99 (*s*)	-	-	153.82	105.54	114.76
1′	-	-	-	153.82	123.86	126.62
2′	7.53 (*d, J* = 8.4)	7.35 (*d, J* = 8.7)	7.40 (*d, J* = 8.4)	123.20	130.37	130.14
3′	6.98 (*d, J* = 8.4)	6.89 (*d, J* = 8.7)	6.94 (*d, J* = 8.4)	180.94	115.57	115.02
4′	-	-	-	163.31	158.56	157.56
4′-OH	-	-	-	-	-	-
4′-OCH_3	3.83 (*s*)	-	-	54.97	-	-
5′	6.98 (*d, J* = 8.4)	6.89 (*d, J* = 8.7)	6.94 (*d, J* = 8.4)	113.91	115.57	115.04
6′	7.53 (*d, J* = 8.4)	7.35 (*d, J* = 8.7)	7.40 (*d, J* = 8.4)	130.46	130.37	130.18

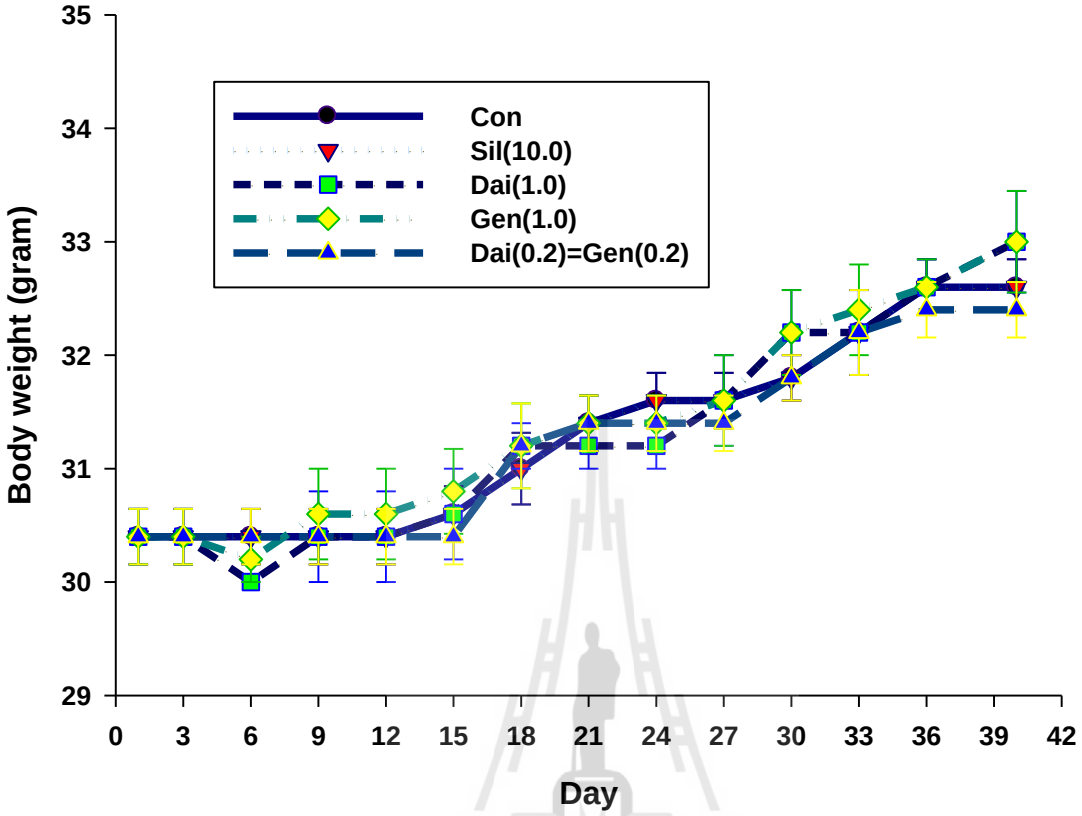


1: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$
2: $R_1 = H$, $R_2 = OH$
3: $R_1 = H$, $R_2 = –$

รูปที่ 3 โครงสร้างของสารสกัด 1, 2, และ 3.

3.2 ผลต่อน้ำหนักตัวหนูทดลอง

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักตัวหนูทดลองนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในอัตราการเจริญเติบโตที่สัมพัทธ์ระหว่างกลุ่ม โดยวัดจากน้ำหนักของตัวของหนูที่ได้รับสาร Sildenafil, Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ และ Diadzein ผสม Genistein เมื่อเทียบกลุ่มควบคุม (p <0.01) (รูปที่ 4) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cherdshewasart และคณะ (Cherdshewasart et al., 2008) ที่พบว่าหนูที่ได้รับผงกวาวเครือแดง (*Butea superb*) ขนาด 150 และ 200 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการวัดอัตราการเจริญเติบโตโดยน้ำหนักตัวหนูทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



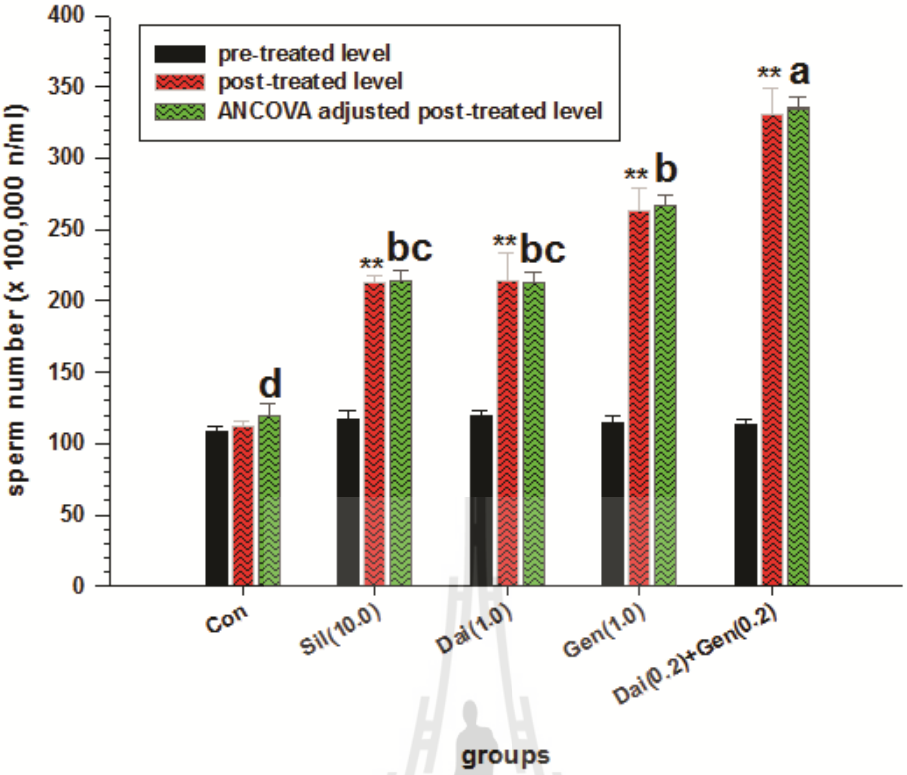
รูปที่ 4 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักหนูทดลอง (กรัม) Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day ผสม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ทุกกลุ่มได้รับสารเป็นเวลา 40 วัน เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยใช้ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ^{a} = p <0.01

3.3 ผลต่อจำนวนและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอสุจิ

รูปที่ 5 แสดงผลของสาร sildenafil, daidzein, และ genistein เดี่ยวๆ และ daizein ผสมกับ genistein ต่อจำนวนสเปิร์ม (x100,000 n/ml) ของหนูทดลอง ผลการวิจัยพบว่าจำนวนตัวอสุจิในกลุ่มที่ได้รับสารทั้งเดี่ยวๆและผสม มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบระหว่างก่อนและหลังการทดสอบ (p<0.01) ยกเว้น

กลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผลการวิจัยพบว่า เมื่อหนูทดลองได้รับสาร daidzein ผสมกับ genistein ทำให้จำนวนอสุจิมากขึ้นสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น (p<0.01) โดยมีค่า FECI เท่ากับ 0.4 ผลการทดสอบยังพบว่าจำนวนอสุจิของกลุ่มได้รับสารทดสอบทุกกลุ่ม ยังสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวสุจิที่ได้รับสารทดสอบเหล่านี้เผยให้เห็นลักษณะปกติและมีจำนวนสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่ได้แสดงภาพ) ผลลัพธ์เหล่านี้สอดคล้องกับผลวิจัยของ Manosroi, et al และคณะ (Manosroi et al., 2006) ที่พบว่าอสุจิในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากรากกวาวเครือแดงในปริมาณ 1,250 มก/กก/วัน สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 16% ยังมีผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าจำนวนอสุจิ, ความใคร่ทางเพศและขนาดของการแข็งตัวของอวัยวะเพศของหนูที่ได้รับสารสกัดหยาบจากหัวกวาวเครือแดงขนาด 0.5 และ 5 มก/มล/วัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Pinmongkholgul, 2001).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

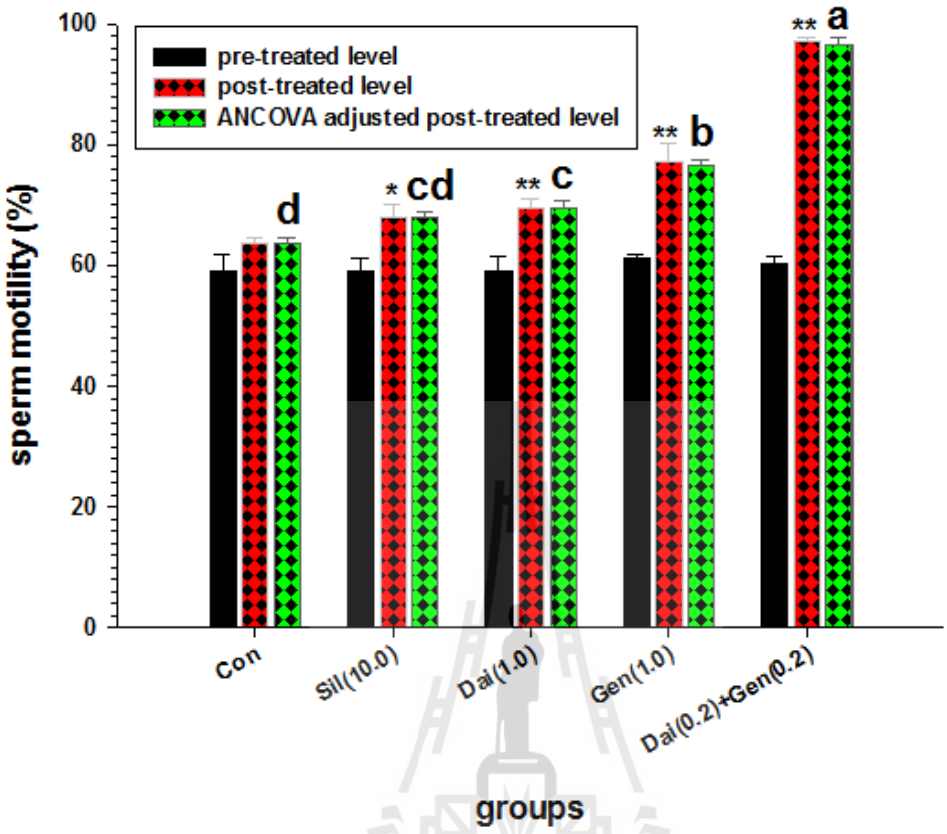


รูปที่ 5 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อจำนวนอสุจิของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $^{*}p<0.05$; ** $p<0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

3.4 ผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ผลของสาร sildenafil, daidzein, genistein เดี่ยวๆ และ daizein ผสมกับ genistein ต่อ การเคลื่อนที่ของอสุจิของหนูทดลอง ถูกนำเสนอในรูปที่ 6 ผลการทดลองพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของการเคลื่อนที่อย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการได้รับสาร ยกเว้นกลุ่มควบคุม ($p<0.05$ และ $p<0.01$) นอกจากนี้ การเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่ได้รับสารผสม daidzein และ genistein พบว่ามีค่าการเคลื่อนไหวสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆทั้งหมดรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับ Sildenafil ($p<0.01$) อันเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์เสริมฤทธิ์กันของสารทั้งสอง โดยดูได้จากค่า FECI เท่ากับ 0.4 ผลการทดลองยังพบว่า การเคลื่อนไหวของอสุจิในกลุ่มที่ได้รับ Sildenafil ขนาด 10.00 มิลลิกรัม/กก.น้ำหนักตัว/วัน ก็ยังสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.01$) การค้นพบนี้ทำให้เราเชื่อได้ว่า daidzein และ genistein อาจมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิ ซึ่งผลการทดสอบการเคลื่อนไหวก็สอดคล้องกับผลต่อจำนวนอสุจิ ผลลัพธ์เหล่านี้ทำให้เราเชื่อได้ว่า daidzein และ genistein สามารถเพิ่มทั้งจำนวนและการเคลื่อนไหวของอสุจิ

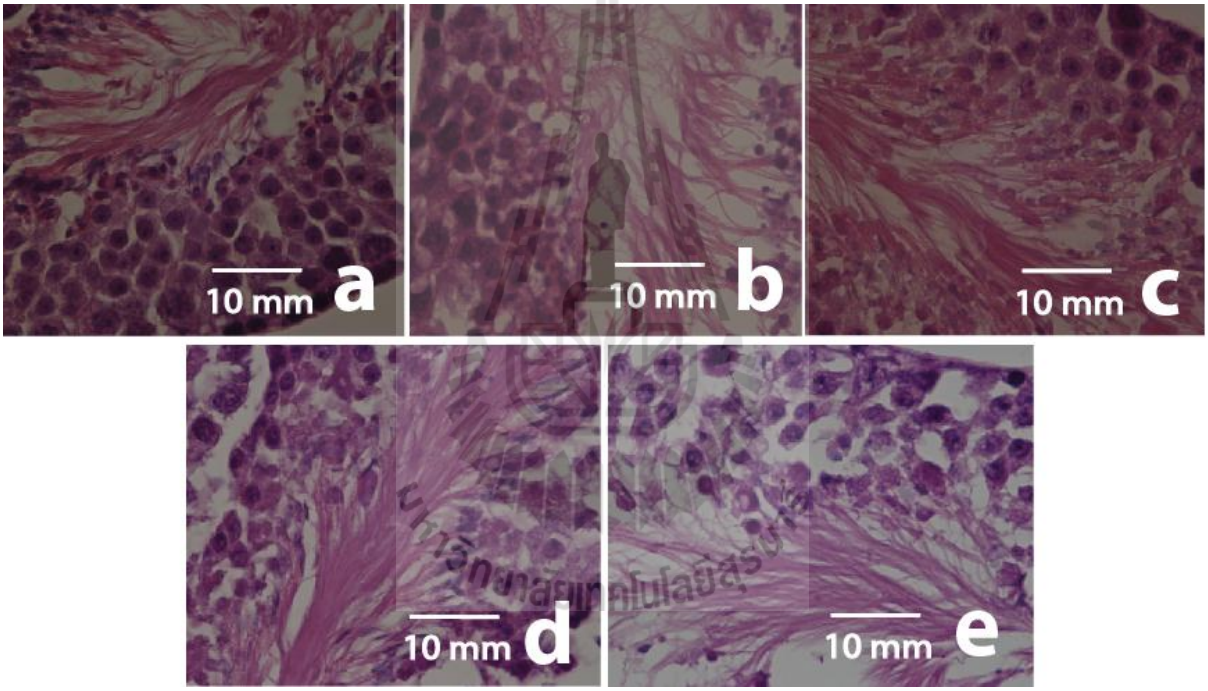
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 6 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $^{*}p<0.05$; ** $p<0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

3.5 ผลต่อจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดสร้างอสุจิ

ผลของสารสกัดต่อจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดสร้างอสุจิ สามารถเห็นได้จากรูปที่ 7 ว่าอสุจิของกลุ่มได้รับสารทั้งหมดมีกระบวนการเจริญเติบโตของ spermatids และกระบวนการสร้างอสุจิมากกว่ากลุ่มควบคุม กระบวนการเหล่านี้สูงขึ้นทั้งกระบวนการเจริญของ spermatid และจำนวน spermatid การค้นพบนี้เป็นสิ่งบ่งชี้ว่า daidzein และ genistein ที่แยกได้จากกวาวเครือแดง เมื่อใช้ทั้งเดี่ยวๆ และผสมกัน สามารถเพิ่มจำนวนอสุจิและพัฒนาการของอสุจิ



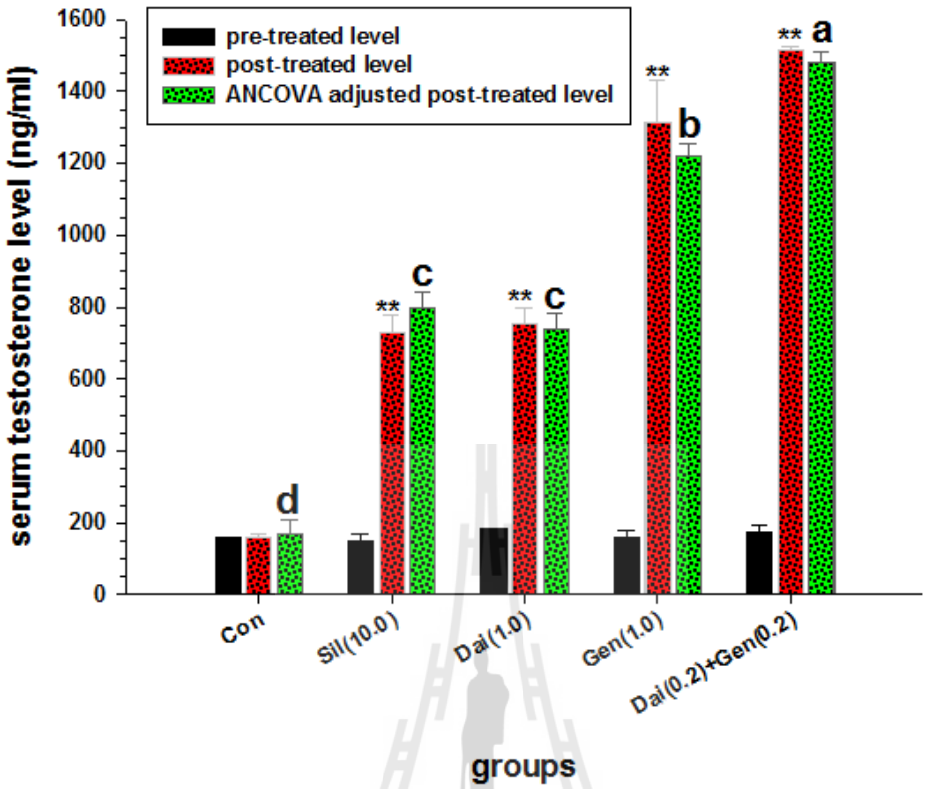
รูปที่ 7 ภาพถ่ายโครงสร้างในระดับจุลภาคของหลอดอัณฑะของหนูหลังจากได้รับสารสกัดจากกวาวเครือแดง daidzein, genistein เดียวๆ และผสมกันและ sildenafil; **a** = Control, **b** = Sildenafil ที่ 10.00 mg/kg BW/day, **c** = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, **d** = Genistein ที่ 1.0 mg/kg BW/day, **e** = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day ผสมกับ Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ภาพถ่ายระดับจุลภาคทั้งหมดแสดงที่กำลังขยาย 100 เท่า, บาร์สเกล = 10 ไมโครเมตร

3.6 ผลต่อระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนและคอเลสเทอรอล

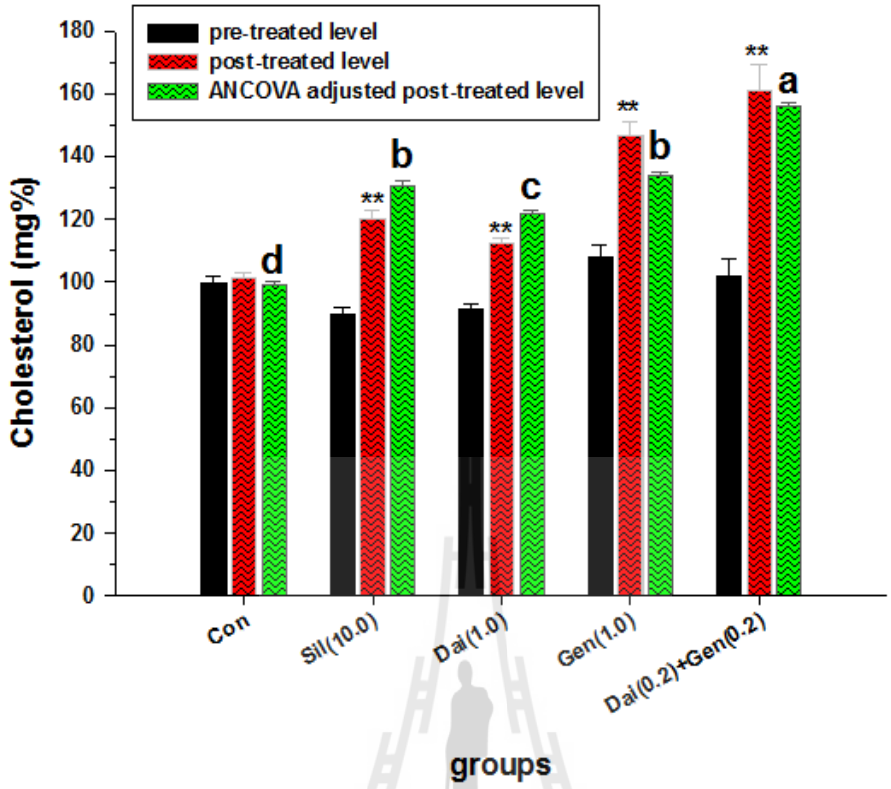
ผลการศึกษาการได้รับสารสกัดจากกวาวแดง ได้แก่ daidzein, genistein เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสมต่อฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนและคอเลสเทอรอล ได้แสดงดังรูปที่ 8 และ 9 ผลการทดลองจะเห็นว่าฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทุกกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบเมื่อเทียบระหว่างก่อนและหลังการได้รับสาร ยกเว้นกลุ่มควบคุม (p<0.01) ในทำนองเดียวกันทุกกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบมีระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) ยิ่งไปกว่านั้นสารผสมระหว่าง daidzein และ genistein พบว่ามีค่าดัชนี FECI เท่ากับ 0.4 ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ (p<0.01) ผลการวิจัยยังพบว่าระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ในกลุ่มที่ได้รับ Sildenafil ที่ 10 มิลลิกรัม/กก./วัน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มที่ได้รับ daidzein อย่างเดียว (p>0.10) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Saraiva et al (Saraiva et al., 2009) ที่ว่าหนูทดลองที่ได้รับ Sildenafil พบว่ามีระดับที่เพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบอีกว่า Leydig cells มีโครงสร้างที่เปลี่ยนไป เช่น vesicular smooth endoplasmic reticulum, large vacuoles, enlarged discontinue cristaes of mitochondria and vesicles of whorled membranes at the periphery ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่แสดงว่า เซลล์ที่หลั่งสเตียรอยด์ถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามรายงานการวิจัยของ Cherdshewasart et al พบว่า หนูที่ได้รับสารสารสกัดหยาบจากกวาวเครือแดงปริมาณ 150 และ 200 มก./กก./วัน มีระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนลดลง โดยขึ้นกับปริมาณสารที่ได้รับ (Cherdshewasart et al., 2008) ผลการวิจัยระดับคอเลสเทอรอลพบว่าระดับคอเลสเทอรอลมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการได้รับสาร เมื่อเทียบกับก่อนการได้รับสารในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มควบคุม (p<0.01) เมื่อเทียบผลของสารต่อระดับคอเลสเทอรอลระหว่างกลุ่มแล้ว จะสามารถเรียงลำดับจากสูงสุดไปต่ำสุดดังนี้ daidzein ผสม genistein > genistein เดี่ยวๆ ≅ Sildenafil > daidzein เดี่ยวๆ > กลุ่มควบคุม (p<0.01) (รูปที่ 9) ค่าดัชนีของความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพ (FECI) ที่ 0.4 บ่งชี้ว่าสารผสมของ daidzein และ genistein มีการออกฤทธิ์เสริมกันอย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Manasathien (2001) ที่ว่าหนูที่ได้รับสารสกัดหยาบจากเอทานอลของควาวเครือแดงที่ขนาด 50 มก./มล./วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าทำให้เซลล์ตับมีขนาดใหญ่ขึ้นและความระดับของคอเลสเทอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Manasathien, 2001) จากผลการวิจัยก่อนหน้าพบว่าเซลล์ Leydig สามารถถูกกระตุ้นโดย Sildenafil เมื่อเซลล์ Leydig ถูกกระตุ้น จะผลิตฮอร์โมนเพศชาย เช่นฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนจะกระตุ้นการสร้างอสุจิ, ส่งเสริมการเจริญเติบโตทางกายภาพและการทำงานของตัวอสุจิ ส่งเสริมการเจริญ

ของเซลล์ต่างๆในระบบสืบพันธุ์เพศชาย (Martini et al., 2006) เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสังเคราะห์จากสารตั้งต้นคอเลสเทอรอล (Maqdasy et al., 2013; Midzak et al., 2009) ดังนั้นการค้นพบเหล่านี้ เป็นสิ่งบ่งชี้ว่า คอเลสเทอรอลที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่รับสารทดสอบเหล่านี้ ส่งผลต่อเนื่องให้ระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสูงขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 8 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อระดับของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ ** $p<0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$



รูปที่ 9 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อระดับของคอเลสเทอรอลของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ ** $p<0.01$ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มนั้น ใช้การทดสอบแบบ ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่มโดย ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

3.7 ผลต่อส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักอวัยวะที่สำคัญ

น้ำหนักอัณฑะสัมพัทธ์ของหฯที่ได้รับ Sildenafil และสารสกัดทุกกลุ่ม มีค่าหนักกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ยิ่งไปกว่านี้แล้ว น้ำหนักสัมพัทธ์ของหลอดน้ำอสุจิและถุงพักน้ำเชื้อ (epididymis and seminal vesicle) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด genistein เดี่ยวๆ และผสมกับ daidzein ก็มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆอย่าง

มีนัยสำคัญ (p<0.01) อย่างไรก็ตามน้ำหนักสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร daidzein ผสม genistein มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) (ตารางที่ 2) ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Manosroi et al, ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากรากกวาวเครือแดง แสดงแนวโน้มในการเพิ่มน้ำหนักอัณฑะและจำนวนอสุจิในหนูทดลอง (Manosroi et al., 2006)

ผลการทดสอบสารต่ออวัยวะสำคัญพบว่า น้ำหนักม้ามสัมพัทธ์ของกลุ่มที่ได้รับสาร genistein เดี่ยวๆ และ genistein ผสมกับ daidzein มีน้ำหนักมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ sildenafil และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) ยิ่งไปกว่านั้น กระเพาะอาหารของกลุ่มที่ได้รับ genistein เดี่ยวๆและผสม มีน้ำหนักเบากว่ากลุ่มที่ได้รับ Sildenafil อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) (ตารางที่ 3) ส่วนผลของสารเหล่านี้ต่อ หัวใจ ตับ ปอด และไต ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด (p>0.01)

พยาธิสภาพของหัวใจ, ตับ, ม้าม, ไต, และกระเพาะอาหารของทุกกลุ่มที่ได้รับสารนั้นพบลักษณะปกติเมื่อเทียบกับอวัยวะของกลุ่มควบคุม (ไม่ได้แสดงรูปภาพ)

จากการทดสอบนี้แสดงหลักฐานให้เห็นว่าสารสกัดจาก *Butea superba* สามารถเพิ่มระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน,จำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิของหนูเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่าสารสกัดนี้จะมีผลทำให้น้ำหนักของกระเพาะอาหารลดลงและมีผลทำให้น้ำหนักของม้าม, อัณฑะ, ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ, หลอดเก็บอสุจิและระดับคอเลสเทอรอลในกลุ่มที่ได้รับ สารผสม daidzein และ genistein นั้นสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการค้นพบในครั้งนี้อาจถูกนำมาพัฒนาต่อเพื่อใช้เพิ่มฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน,จำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิในเพศชายต่อไป

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ข้อมูลถูกแสดงในค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 10) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการวิเคราะห์นั้นจะใช้สถิติการทดสอบโดย ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

Reproductive organ (g)	**Con**	**Sil(10.00)**	**Dai(1.0)**	**Gen(1.0)**	**Dai(0.2)+Gen(0.2)**
Testis	0.18 ± 0.023^{b}	0.30 ± 0.045^{a}	0.29 ± 0.014^{a}	0.25 ± 0.008^{ab}	0.24 ± 0.013^{ab}
Epididymis	0.08 ± 0.002^{b}	0.08 ± 0.01^{c}	0.09 ± 0.01^{c}	0.16 ± 0.003^{a}	0.14 ± 0.007^{ab}
Vas deferens	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.004
Seminal vesicle	0.12 ± 0.004^{b}	0.13 ± 0.004^{b}	0.12 ± 0.005^{b}	0.31 ± 0.001^{a}	0.30 ± 0.022^{a}
Prostate gland	0.06 ± 0.005^{a}	0.04 ± 0.005^{b}	0.06 ± 0.003^{a}	0.02 ± 0.002^{a}	0.02 ± 0.002^{b}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสำคัญของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ข้อมูลถูกแสดงในค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 10) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการวิเคราะห์นั้นจะใช้สถิติการทดสอบโดย ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

Vital organ (g/100gBW)	**Con**	**Sil(10.00)**	**Dai(1.0)**	**Gen(1.0)**	**Dai(0.2)+Gen(0.2)**
Heart	0.14±0.002	0.13±0.003	0.14±0.003	0.13±0.010	0.15±0.011
Liver	1.74±0.005	1.71±0.022	1.76±0.005	1.70±0.05	1.73±0.017
Spleen	0.05 ± 0.005^{c}	0.04 ± 0.003^{c}	0.07 ± 0.007^{bc}	0.11 ± 0.025^{ab}	0.12 ± 0.007^{ab}
Lung	0.19 ± 0.01^{ab}	0.17 ± 0.02^{ab}	0.21 ± 0.004^{a}	0.16 ± 0.012^{ab}	0.16 ± 0.011^{ab}
Kidney	0.8±0.06	0.6±0.01	0.73±0.003	0.59±0.048	0.63±0.026
Stomach	1.04 ± 0.06^{ab}	1.19 ± 0.008^{a}	1.09 ± 0.06^{ab}	0.70 ± 0.109^{bc}	0.72 ± 0.089^{bc}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.8 ผลต่อโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือด

ผลการวิจัยทางโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือดนั้นแสดงในตารางที่ 4 ผลการวิจัยพบว่าระดับ hemoglobin และ hematocrit ของกลุ่มที่ได้รับ Sildenafil นั้นมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการได้รับสารเมื่อเทียบกับก่อนให้สาร $p<0.01$ นอกจากนั้นแล้ว พบว่าระดับ PMN ของกลุ่มที่ได้รับสารผสม Daidzein และ Genistein มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังการได้รับสารเมื่อเทียบกับก่อนให้สาร $p<0.01$ อย่างไรก็ตามระดับของ hemoglobin, hematocrit และ PMN ที่ลดลงและเพิ่มขึ้นภายในกลุ่มนั้น ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม นอกจากนี้ระดับ MPV ในกลุ่มที่ได้รับ Sildenafil และ Daidzein นั้นต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ส่วนค่าทางโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือดอื่นๆที่ไม่ได้เอ่ยถึงทั้งหมดนั้น ค่าไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบก่อนและหลังการได้รับสาร และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ($p>0.01$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดจากรากของ *Butea superba* ได้แก่ Diadzein, Genistein เดี่ยวๆ, Diadzein ผสม Genistein และ Sildenafil ต่อโลหิตวิทยาและสารเคมีในเลือดของหนูไมซ์ Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil ที่ 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein ที่ 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day รวม Genistein 0.2 mg/Kg BW/day ข้อมูลถูกแสดงในค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 10) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทดสอบในแต่ละกลุ่มถูกเปรียบเทียบโดยใช้ paired Student t-test ที่ $^{**}p<0.01$ ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการวิเคราะห์นั้นจะใช้สถิติการทดสอบโดย ANCOVA และใช้ Tukey HSD ในการทดสอบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละกลุ่ม ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.01$

Parameter	Con		Sil(10.0)		Dai(1.0)		Gen(1.0)		Dai(0.2)+Gen(0.2)	
	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test
Cholesterol (mg%)	116.4±6.2	123.8±9.9	86.0±6.4	130.8±9.2	88.4±3.42	134±15.6	108±4.04	142.2±13.1	112±17.64	155.2±15.82**
RBC ($x10^6$/µL)	8.3±0.2	7.5±0.3	9.0±0.3	7.7±0.2	8.1±19	8.1±1.02	9.23±0.34	8.14±0.10	9.50±0.11	8.71±0.54
Hemoglobin (g/dL)	14.2±0.5	12.8±0.5^{b}	17.4±0.2	14.1±0.2^{**ab}	14.7±0.4	12.8±0.5^{b}	14.8±0.80	13.8±0.20^{ab}	15.8±0.20	14.4±0.67^{ab}
Hematocrit (%)	42.0±14	37.8±1.5	49.8±0.5	42.0±0.8**	44.2±1.0	37.8±2.3	45.6±2.15	39.8±0.58	50.2±1.20	44.0±3.86
WBC ($x10^3$/µL)	9.3±1.3	7.8±1.3	8.7±1.3	6.8±1.7	7.3±0.9	6.9±0.5	7.34±1.85	6.08±0.78	10.1±0.46	8.80±0.71
PMN (%)	15.2±4.0	17.6±3.7^{abc}	13.8±1.9	15.0±1.4^{ab}	11.4±1.7	9.6±1.4^{c}	5.40±1.60	13.40±2.42^{abc}	4.80±0.86	9.40±1.43^{**abc}
Lymphocyte (%)	84.6±4.0	84.8±4.3	85.4±1.9	82.8±4.3	88.6±1.7	94.2±1.8	90.2±2.87	84.0±2.70	95.2±0.86	91.2±2.13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Parameter	Con		Sil(10.0)		Dai(1.0)		Gen(1.0)		Dai(0.2)+Gen(0.2)	
	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test	Pre-test	Pos-test
Platelet ($x10^3$ /µL)	821.4±21.7	793±32.5	820.4±21.7	792±32.5	821.5±21.7	792±32.5	636±19	826.6±50.08	912.2±22.71	859.8±17.04
MCV (fL)	50.0±0.6	50.2±0.3	52.5±0.6	51.2±0.7	54.1±0.2	51.2±0.3	49.1±0.53	48.96±0.65	51.7±0.85	50.5±1.24
MCH (pg/cell)	17.0±0.05	17.5±0.2	18.3±0.1	18±0.3	16.6±1.3	17.8±0.3	16.2±0.27	16.6±0.18	16.5±0.20	16.88±0.21
MCHC (g/dL)	34.1±0.09	34.0±0.18	34.8±0.2	35.1±0.3	31.1±0.6	34.7±0.6	33.0±0.37	34.0±0.52	31.9±0.35	33.6±0.51
RDW (%)	23.8±3.0	21.9±2.3	16.0±0.8	16.8±1.0	14.6±0.2	18.0±1.3	21.8±2.48	18.5±0.64	16.6±0.60	17.5±0.79
MPV (fL)	5.86±0.3	$6.96±0.2^{ab}$	5.2±0.1	$5.6±0.1^{cd}$	6.2±0.03	$5.8±0.1^{d}$	6.82±0.11	$7.22±0.24^{abc}$	6.60±0.13	$6.9±0.40^{abc}$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

สรุปผลการศึกษา

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอะซีโตนของหัวกวาวเครือแดงถูกสกัดออกมาจนได้สารออกฤทธิ์สามสาร เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์แล้ว สารดังกล่าวได้แก่ 5,7-dihydroxy-4'-methoxyisoflavone (biochanin A), 5,7,4'- trihydroxyisoflavone (genistein) และ 7,4'-Dihydroxyisoflavone (daidzein) เป็นที่น่าสนใจว่าสาร biochanin A และ genistein เป็นการค้นพบครั้งแรกในกวาวเครือแดง

ผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากรากกวาวเครือแดง เพิ่มขึ้นความเข้มข้นของตัวอสุจิและลดการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในหนูทดลอง (Tocharus et al., 2005) นอกจากนี้ผลการวิจัยก่อนหน้านี้ยังพบว่า genistein, daidzein และ glycitein สามารถเพิ่มจำนวนอสุจิ, เพิ่มการเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนสัณฐานวิทยาของ oligospermia ในอาสาสมัคร (Casini et al., 2006) จากเหตุผลที่เอ่ยถึง งานวิจัยชิ้นนี้จึงได้ศึกษา ผลของสารสกัด daidzein และ genistein ที่แยกได้จากหัวกวาวเครือแดง ต่อระบบสืบพันธุ์ จำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิ, ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนและระดับคอเลสเทอรอลในหนูไมซ์เพศผู้ ผลการวิจัยพบว่า ทั้งสามสารที่ถูกสกัดออกมาได้แก่ biochanin A, genistein และ daidzein ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ isoflavones การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดพบว่า ทั้ง daidzein และ genistein เมื่อใช้เดี่ยวๆและผสม สามารถเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ ตลอดจนพัฒนาการของตัวอสุจิ นอกจากนั้น ระดับคอเลสเตอรอลและฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในหนูทดลองได้ ยิ่งไปกว่านั้นแล้ว กลุ่มที่ได้รับสารผสม daidzein และ genistein จะมีค่าพารามิเตอร์ที่ทดสอบดังกล่าวสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อันเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้งสอง (FECI = 0.4) เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนถูกสังเคราะห์จากสารตั้งต้นได้แก่คอเลสเทอรอล (Maqdasy et al., 2013; Midzak et al., 2009) ดังนั้นการค้นพบนี้แสดงหลักฐานที่ชัดเจนว่าคอเลสเทอรอล ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหล่านี้ ส่งผลให้ฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนเพิ่มขึ้นด้วย ผลลัพธ์เหล่านี้สามารถอธิบายได้ด้วยสมมติฐานที่ว่าการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน สามารถส่งผลให้จำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่สูงขึ้น อันเป็นผลมาจากอสุจิและการเจริญเติบโตของตัวอสุจิถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนนี้ (Martini et al., 2006) นอกจากนี้แล้วรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนมีค่าต่ำลงในผู้ป่วยชายที่มีอาการเลวร้ายจากจากโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) (Moffat et al., 2004) นอกเหนือจากนี้แล้วในเพศชายที่มีอายุมากขึ้นและมีการผลิตฮอร์โมนเพศชายลดลง เมื่อได้รับเทสทอสเทอโรนพบว่า ทำให้สมรรถถาพทางเพศการตั้งตรงของอวัยวะเพศดีขึ้น

(Traish et al., 2011) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าสามารถทำให้ ความจำและความรู้ความเข้าใจในผู้ชายดีขึ้นเล็กน้อย (Cherrier, 2009) การวิจัยนี้บ่งชี้อย่างชัดเจนว่า ระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน, การเคลื่อนไหวของอสุจิในกลุ่มที่ได้รับ genistein เดี่ยวๆและผสมกับ daidzein มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ Sildenafil และกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน (p<0.01) จากผลการวิจัยดังกล่าวนี้ daidzein และ genistein ที่แยกได้จากหัวกวาวเครือแดง อาจมีประโยชน์ในการเพิ่มระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (AD) และอาจสามารถบำบัดสมรรถภาพทางเพศ ความใคร่และการตั้งตรงขององคชาต ในเพศชายสูงวัยที่มีการผลิตฮอร์โมนเพศชายต่ำกว่าปกติ (hypogonadal) นอกจากนี้แล้ว ลักษณะสัณฐานวิทยาของลูกอัณฑะ (หลอดสร้างอสุจิ) (รูปที่ 7) เป็นสิ่งสนับสนุนว่ามีการเสริมฤทธิ์กันของ daidzein และ genistein โดยพบว่าจำนวนอสุจิ มีจำนวนสูงสุดและขนาดของเซลล์ Sertori มีขนาดใหญ่ที่สุดส่งผลให้อสุจิของกลุ่มนี้มีขั้นตอนการเจริญเติบโตจนเป็น spermatids กว่ากลุ่มอื่นๆ ผลการเสริมฤทธิ์กันของสารที่แยกได้นี้ ทำให้เราเชื่อได้ว่าการเพิ่มขึ้นของคอเลสเทอรอลและระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ตลอดจนจำนวนอสุจิ ถูกกระตุ้นโดย daidzein และ genistein โดยอาจมาจากขั้นตอนที่แตกต่างกันของกลไกการออกฤทธิ์

ผลการวิจัยพบว่า น้ำหนักม้ามสัมพัทธ์ของกลุ่มที่ได้รับสาร genistein เดี่ยวๆ และ ผสมกับ daidzein หนักมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ระดับ MPV ในกลุ่มที่ได้รับ Daidzein นั้นต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เป็นที่ทราบกันว่า ม้ามทำหน้าที่ สร้างแอนติบอดี ในการต่อต้านเชื้อโรค และยังผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดงขึ้นมาใหม่ได้ด้วย ดังนั้นการที่ม้ามมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ไม่น่าจะเป็นอันตรายต่อร่างกายอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการนำสารมาพัฒนาเป็นยาและใช้กับมนุษย์ ต้องติดตามความผิดปกติของม้ามและค่า MPV เช่นกัน

กล่าวโดยสรุป การศึกษาในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า biochanin A, genistein และ daidzein ถูกสกัดได้จากราก(หัว)ของกวาวเครือแดง (*B. superba*) และเป็นที่น่าสนใจว่านี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่พบว่า biochanin A และ genistein ถูกสกัดแยกได้จากรากของกวาวเครือแดง ด้วยเหตุนี้ daidzein และ genistein ที่แยกได้จากกวาวเครือแดง ไม่ว่าจะใช้เดี่ยวๆ หรือรวมกัน อาจเป็นประโยชน์ในการเพิ่มระดับฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนในผู้ป่วย AD เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ และการตั้งตรงของอวัยวะเพศชายในผู้ชายสูงวัยที่มีภาวะฮอร์โมนเพศชายต่ำและอาจช่วยในเทคโนโลยีที่จะช่วยชายที่มีบุตรยาก โดยสามารถช่วยในการเพิ่มคุณภาพตัวอสุจิในผู้ชายที่มีคุณภาพตัวอสุจิสมบูรณ์ โดยพบว่าในขนาดที่ใช้ทดสอบ มีความปลอดภัยต่อหนูทดลอง

บรรณานุกรม

Armstrong, R.A., Eperjesi, F. and Gilmartin, B., 2002. The application of analysis of variance (ANOVA) to different experimental designs in optometry. Ophthalmic Physiol Opt. 22, 248-56.

Borm, G.F., Fransen, J. and Lemmens, W.A., 2007. A simple sample size formula for analysis of covariance in randomized clinical trials. J Clin Epidemiol. 60, 1234-1238.

Burana-Osot, J., Pattanapanyasat, K., Soonthornchareonnon, N., Sukapirom, K. and Toida, T., 2010. Characterisation and immuno-stimulating activity of polysaccharides from Thai medicinal plants. Nat Prod Res. 24, 1403-1412.

Casini, M.L., Gerli, S. and Unfer, V., 2006. An infertile couple suffering from oligospermia by partial sperm maturation arrest: can phytoestrogens play a therapeutic role? A case report study. Gynecol Endocrinol. 22, 399-401.

Cherdshewasart, W., Bhuntaku, P., Panriansaen, R., Dahlan, W. and Malaivijitnond, S., 2008. Androgen disruption and toxicity tests of *Butea superba* Roxb., a traditional herb used for treatment of erectile dysfunction, in male rats. Maturitas. 60, 131-137.

Cherdshewasart, W., Cheewasopit, W. and Picha, P., 2004. Anti-proliferation effects of the white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*) and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of HeLa cells. J Sci Res Chula Univ. 29, 27-32.

Cherdshewasart, W. and Nimsakul, N., 2003. Clinical trial of *Butea superba*, an alternative herbal treatment for erectile dysfunction. Asian J Androl. 5, 243-246.

Cherdshewasart, W., Subtang, S. and Dahlan, W., 2007. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal. 43, 428-434.

Cherrier, M.M., 2009. Testosterone effects on cognition in health and disease. Front Horm Res. 37, 150-62.

Cortés-González, J.R., Arratia-Maqueo, J.A., Gómez-Guerra, L.S. and Holmberg, A.R., 2010. The use of *Butea superba* (Roxb.) compared to sildenafil for treating erectile dysfunction. BJU Int. 105, 225-228.

Dimitriadis, F., Tsambalas, S., Tsounapi, P., Kawamura, H., Vlachopoulou, E., Haliasos, N., Gratsias, S., Watanabe, T., Saito, M. and Miyagawa, I., 2010. Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on

Leydig cell secretory function in oligoasthenospermic infertile men: a randomized trial. BJU Int. 106, 1181-1185.

du Plessis, S.S., de Jongh, P.S. and Franken, D.R., 2004. Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. Fertil Steril. 81, 1026-1033.

Faqi, A.S., Johnson, W.D., Morrissey, R.L. and McCormick, D.L., 2004. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. Reprod Toxicol. 18, 605-611.

Fielden, M., Samy, S., Chou, K. and Zacharewski, T., 2003. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. Food Chem Toxicol. 41, 447-454.

Flomenbaum, N.E., Goldfrank, L.R., Hoffman, R.S., Howland, M.A., Lewin, N.A., Nelson, L.S., 2006. Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 8th Edition, McGraw-Hill, New York, USA.

Harvey, R.A., Champe, P.C., Finkel, R. and Cubeddu, L., 2009. Other Therapies: Drugs used to treat erectile dysfunction, in: Harvey, R.A. and Champe, P.C. (Eds.), Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, Fourth Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 341.

Hogervorst, E., Bandelow, S., Combrinck, M. and Smith, A.D., 2004. Low free testosterone is an independent risk factor for Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 39, 1633-1639.

Isidori, A.M., Pozza, C., Gianfrilli, D. and Isidori, A., 2006. Medical treatment to improve sperm quality. Reprod Biomed Online. 12, 704-14.

Kayano, S.-i., Matsumura, Y., Kitagawa, Y., Kobayashi, M., Nagayama, A., Kawabata, N., Kikuzaki, H. and Kitada, Y., 2012. Isoflavone C-glycosides isolated from the root of kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic activities. Food Chem. 134, 282-287.

Malaivijitnond, S., Ketsuwan, A.n., Watanabe, G., Taya, K. and Cherdshewasart, W., 2009. Androgenic activity of the Thai traditional male potency herb, *Butea superba* Roxb., in female rats. J Ethnopharmacol. 121, 123-129.

Manasathien, A., 2001. Comparision of the Effects of Red Kwao Kreur (*Butea superba* Roxb.) From Two Different Areas on Heart, Liver, Kidney, Adrenal Gland and Blood Components of Male Albino Rats (*Rattus norvegicus*), School of Biology. Suranaree University of Technology, Nakhon-Ratchasima, pp. 138.

Manosroi, A., Sanphet, K., Saowakon, S., Aritajat, S. and Manosroi, J., 2006. Effects of *Butea superba* on reproductive systems of rats. Fitoterapia. 77, 435-438.

Maqdasy, S., Baptissart, M., Vega, A., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A. and Volle, D.H., 2013. Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted? Mol Cell Endocrinol. 368, 30-46.

Martini, F.H., Timmons, M.J. and Tallitsch, R.B., 2006. Human Anatomy 5th Edition, 5 ed. Pearson; Benjamin Cummings, San Francisco; USA.

Midzak, A.S., Chen, H., Papadopoulos, V. and Zirkin, B.R., 2009. Leydig cell aging and the mechanisms of reduced testosterone synthesis. Mol Cell Endocrinol. 299, 23-31.

Moffat, S.D., Zonderman, A.B., Metter, E.J., Kawas, C., Blackman, M.R., Harman, S.M. and Resnick, S.M., 2004. Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. Neurology. 62, 188-93.

Ngamrojanavanich, N., Loontaisong, A., Pengpreecha, S., Cherdshewasart, W., Pornpakakul, S., Pudhom, K., Roengsumran, S. and Petsom, A., 2007. Cytotoxic constituents from *Butea superba* Roxb. J Ethnopharmacol. 109, 354-358.

Pinmongkholgul, S., 2001. Comparision of the Effects of Red Kwao Kreur *(Butea superba* Roxb.) From Two Different Areas on Reproductive Behavior and Erection in Male Albino Rats (*Rattus norvegicus*)., School of Biology. Suranaree University of Technology, Nakhon-Ratchasima, pp. 159.

Pomara, G., Morelli, G., Canale, D., Turchi, P., Caglieresi, C., Moschini, C., Liguori, G., Selli, C., Macchia, E., Martino, E. and Francesca, F., 2007. Alterations in sperm motility after acute oral administration of sildenafil or tadalafil in young, infertile men. Fertil Steril. 88, 860-865.

Pongpanparadon A, Aritajat S, Saenphet K., 2003. The toxicology of *Butea superba*, Roxb. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 33, 155-158.

Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojanavanich N, Rugsilp T, Sittiwicheanwong P, Khorphueng P, Cherdshewasart W, Chaichantipyuth C., 2000. Flavonoid and Flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP Phosphodiesterase Inhibitory Activity. J Sci Res Chula Univ. 25, 169-176.

Saraiva, K.L., Silva, A.K., Wanderley, M.I., De Araujo, A.A., De Souza, J.R. and Peixoto, C.A., 2009. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. Int J Exp Pathol. 90, 454-62.

Sharma, V., Boonen, J., Spiegeleer, B.D. and Dixit, V., 2013. Androgenic and Spermatogenic Activity of Alkylamide-Rich Ethanol Solution Extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. Phytother Res. 27, 99-106.

Shaw, L.H., Chen, W.M. and Tsai, T.H., 2013. Identification of multiple ingredients for a Traditional Chinese Medicine preparation (bu-yang-huan-wu-tang) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Molecules. 18, 11281-98.

Smitinand, T., 2001. Thai plant names, Forest Herbarium.

Suntara, A., 1931. The Remedy Pamphlet of Kwao Kure Tuber of Luang Anusarnsuntarakromkarnpisit, Upatipongsa Press, Chiang Mai, Thailand.

Sutjit, W., 2003. The Antioxidant Test, Ames' Test and Micronuclei Test of Chemical Exteact from White Kwao Krua (*Pueraria mirifica*), Red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.), Black Kwao Krua (*Mucuna collettii*) and Kudza (*Pueraria labata*). School of Biology, Faculty of Science. Chulalongkorn University, Bangkok.

Talukdar, A., Jain, N., De, S. and Krishnamurty, H., 2000. An isoflavone from *Myristica malabarica* Phytochemistry. 53, 155-157.

Tocharus, C., Jeenapongsa, R., Teakthong, T. and Smitasiri, Y., 2005. Effects of Longterm Treatment of *Butea superba* on Sperm Motility and Concentration. Naresuan U J. 13, 11-17.

Tocharus, C., Smitasiri, Y. and Jeenapongsa, R., 2006. *Butea superba* Roxb. enhances penile erection in rats. Phytother Res. 20, 484-489.

Traish, A.M., Miner, M.M., Morgentaler, A. and Zitzmann, M., 2011. Testosterone deficiency. Am J Med. 124, 578-587.

Van Breukelen, G.J., 2006. ANCOVA versus change from baseline: more power in randomized studies, more bias in nonrandomized studies [corrected]. J Clin Epidemiol. 59, 920-5.

Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine. 16, 97-110.

Winkens, B., van Breukelen, G.J., Schouten, H.J. and Berger, M.P., 2007. Randomized clinical trials with a pre-and a post-treatment measurement: repeated measures versus ANCOVA models. Contemp Clin Trials. 28, 713-719.

Zhao, S., Zhang, L., Gao, P. and Shao, Z., 2009. Isolation and characterisation of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. Food Chem. 114, 869-873.

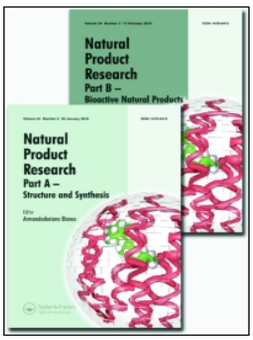
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กระทรวงสาธารณสุข, 2006. ชายไทยอายุหลักสี่น่าเป็นห่วง 30% หย่อนสมรรถภาพทางเพศ http://pr.moph.go.th/iprg/include/admin_hotnew/show_hotnew.php?idHot_new=91.

ภาคผนวก

Output ที่ได้จากโครงการ

Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., and Naknarong, W. 2017. "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice," Natural Product Research. 31(6), 672-675. DOI:10.1080/14786419.2016.1180603. (***Impact Factor 2015 = 1.057***).



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20

The synergy effect of daidzein and genistein isolated from Butea superba Roxb. on the reproductive system of male mice

Griangsak Eumkeb, Sudarat Tanphonkrang, Kittipot Sirichaiwetchakoon, Tanaporn Hengpratom & Wanatkamon Naknarong

To cite this article: Griangsak Eumkeb, Sudarat Tanphonkrang, Kittipot Sirichaiwetchakoon, Tanaporn Hengpratom & Wanatkamon Naknarong (2017) The synergy effect of daidzein and genistein isolated from Butea superba Roxb. on the reproductive system of male mice, Natural Product Research, 31:6, 672-675, DOI: 10.1080/14786419.2016.1180603

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1180603

View supplementary material

Published online: 29 Apr 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 28

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gnpl20

Download by: [Griangsak Eumkeb] **Date:** 11 January 2017, At: 15:53

NATURAL PRODUCT RESEARCH, 2017
VOL. 31, NO. 6, 672–675
http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1180603

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

SHORT COMMUNICATION

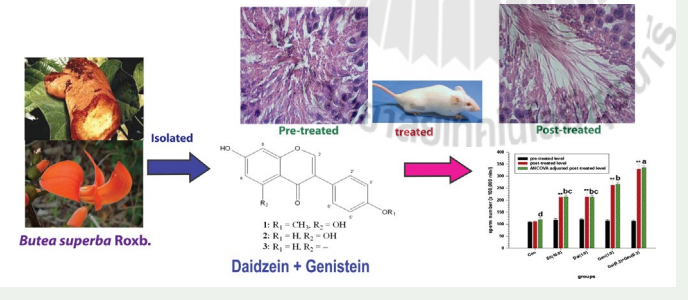
The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice

Griangsak Eumkeb[a], Sudarat Tanphonkrang[b], Kittipot Sirichaiwetchakoon[a], Tanaporn Hengpratom[a] and Wanatkamon Naknarong[a]

[a]School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand; [b]School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

ABSTRACT

Butea superba Roxb. (BS) has been used in Thai men as an aphrodisiac, and prevent erectile dysfunction. Nevertheless, the active ingredients, dosages, have not been cleared. Hence, this study was to investigate the effect of compounds from the BS on the reproductive parameters of male mice. The results revealed that BS was extracted to afford biochanin A and genistein, which were first reported on BS, and daidzein. The mice were treated by daidzein and genistein alone and in combination. The results showed that the sperm number and motility, cholesterol and testosterone level of all isoflavones-treated groups were significantly higher than controls ($p < 0.01$). Obviously, daidzein plus genistein exhibited a synergistic effect, which is also the first report, and resulted in significantly displayed higher levels of these parameters compared to others. So, the synergistic activity of these isoflavones may be useful in improving libido, erectile capacity and assist infertility of poor spermatozoa in men.



ARTICLE HISTORY
Received 6 January 2016
Accepted 23 March 2016

KEYWORDS
Butea superba Roxb; biochanin A; genistein; daidzein; sperm number; testosterone; synergistic effect

1. Introduction

The *Butea superba* Roxb. (BS) herb has been employed as traditional herbal medicines, for rejuvenation, improve sexual performance, or prevent erectile dysfunction function, in Southeast Asian Nations since ancient times. The tubers of BS extract that contained

CONTACT Griangsak Eumkeb griang@sut.ac.th
Supplemental data for this article can be accessed at http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1180603.

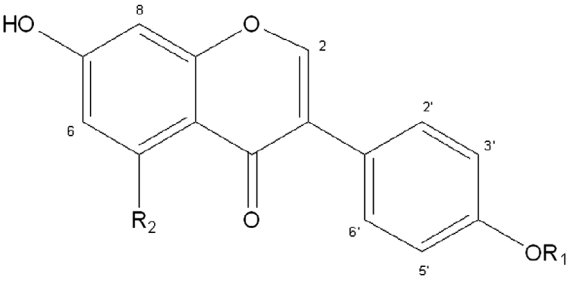
© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

carbohydrates showed the highest immuno-stimulating activity *in vitro* (Burana-Osot et al. 2010). The results of long-term treatment in rats and mice with tuberous roots of BS extract exhibited that significantly increased the sperm concentration and delayed the decreased motility with time (Tocharus et al. 2005), although, the effect of the tuberous roots of the BS extract on orchidectomized mature albino rats showed no androgenic and aphrodisiac activities (Smitasiri et al. 1992). Alternatively, low serum total testosterone may be a co-morbid feature and could also exacerbate risk factor for Dementia of the Alzheimer's Type in men (Hogervorst et al. 2004). Whereas, Wistar-Unilever male rats received the soy isoflavone mixture that contain 45% genistein, 23% daidzein and 4% glycitein exhibited no significant effects on sperm count sperm production, or sperm morphology in any group (Faqi et al. 2004). Although, many of the experiments were carried out on the tuberous roots of BS crude extract, however, the active ingredients, dosages, duration of these compounds have not been cleared . Moreover, up to date, the *in vivo* results are still ambiguous whether the effect of the tuberous roots of BS extract increases cholesterol, testosterone on male mice or not.

2. Results and discussion

2.1. Structural elucidation and quantity of extract compounds

The crude acetone extracted was isolated by column chromatography and PTLC to pass on compound 1 (cp1), compound 2 (cp2) and compound 3 (cp3). The UV–vis spectrum showed absorption bands (λ_{max}) at 260 and 325 nm (cp1), 254 and 369 nm (cp2), and 303, 259, 249 and 238 nm (cp3). The IR spectrum of compounds 1–3 show both a strong absorption band at 165 l cm^{-1} (cp1), 1659 cm^{-1} (cp2), and 1634, 1462 and 1389 cm^{-1} (cp3) designating the presence of an α,β-unsaturated carbonyl carbon and a broad stripe of the hydroxyl group between 3400–3100 cm^{-1} (cp1), 3500–3000 cm^{-1} (cp2) and 3600–3550 cm^{-1} (cp3). The mass spectrum showed the molecular ion peak at *m/z* 284 [M^+](cp1), 270 [M^+](cp2) and 254 [M^+] (cp3), and its molecular formula was determined as $C_{16}H_{12}O_5$(cp1), $C_{15}H_{10}O_5$(cp2) and $C_{15}H_{10}O_4$(cp3) by EIMS. The ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts value of compounds 1–3 is shown in Table S1. Based on the above spectral data, characteristics and comparison of the ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts of these compounds with published data, the structure of compounds 1–3 were identified as of biochanin A, genistein and daidzein, respectively (Figure 1; Talukdar et al. 2000; Zhao et al. 2009; Singh et al. 2014).



1: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$
2: $R_1 = H$, $R_2 = OH$
3: $R_1 = H$, $R_2 = –$

Figure 1. The structure of compounds 1–3.

2.2. Sperm count and morphology

The results of sperm count demonstrated the synergistic activity of daidzein plus genistein at FIC index 0.4 showing significantly higher and the highest sperm number than others ($p < 0.01$) (Figure S1). The morphology of these sperms was revealed to be normal (Figure S3). Obviuosly, these findings provide evidence that this combination clearly increases sperm number.

2.3. Sperm motility

The results exhibited that there were significant increases in sperm motility of all post-treated groups compared to pre-treatment except for control ($p < 0.05$ and $p < 0.01$). Apart from this, the highest motility level was found in the combination of daidzein and genistein-treated group compared to others ($p < 0.01$) as a result of synergy effect of these compounds with FIC index 0.4 (Figure S2). Clearly, these results imply that the combination undoubtedly rises sperm motility.

2.4. Histology of seminiferous tubules

It can be seen from Figure S3 that the spermatogenesis of all treated groups had more maturation of spermatids than the control .

2.5. Testosterone and cholesterol level

The results of these tested agents on testosterone and cholesterol exhibited that there were significant increases in testosterone and cholesterol level of all post-treated groups compared to pre-treatment except for the control ($p < 0.01$). Also, the synergistic activity of daidzein plus genistein observed with FIC index at 0.4 resulted in a significant great increase in testosterone and cholesterol level compared to other groups ($p < 0.01$) (Figures S5 and S6). Our findings provide the first evidence that this combination clearly enhances testosterone and cholesterol level.

2.6. Selected reproductive organs and body weight

The relative testis and seminal vesicle weight of genistein alone and combined with daidzein-treated groups were significantly heavier than others ($p < 0.01$) (Table S2).

3. Conclusion

The present work demonstrated that the tuberous roots of BS were isolated to afford biochanin A, genistein and daidzein. Interestingly, biochanin A and genistein were first reported on BS.

Our results found that using daidzein and genistein alone or in combination caused a significantly higher sperm number and motility, testosterone and cholesterol level than the controls ($p < 0.01$). Also, these parameters of the combination-treated group were significantly highest compared to other groups due to the synergistic activity. These findings

provide evidence that cholesterol increased in these treated groups. As a consequence, testosterone also increased. For this reason, the daidzein and genistein isolated from BS used either alone or combined provide evidence that these would be useful to increase testosterone level in AD patients, improve libido and erectile function in hypogonadal males and assisted infertility technology to improve sperm quality of poor quality spermatozoa in men after safety level is investigated.

Supplementary material

The experimental section, Tables (S1–S2), and Figures (S1–S5) are available in the supplementary data.

Acknowledgements

The writers are indebted and grateful to the Thailand Research Fund for assistance in research fund support [grant number PHD58I0015 Code 5712035].

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Thailand Research Fund [grant number PHD58I0015 Code 5712035].

References

Burana-Osot J, Pattanapanyasat K, Soonthornchareonnon N, Sukapirom K, Toida T. 2010. Characterisation and immuno-stimulating activity of polysaccharides from Thai medicinal plants. Nat Prod Res. 24:1403–1412.

Faqi AS, Johnson WD, Morrissey RL, McCormick DL. 2004. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. Reprod Toxicol. 18:605–611.

Hogervorst E, Bandelow S, Combrinck M, Smith AD. 2004. Low free testosterone is an independent risk factor for Alzheimer's disease. Exp Gerontol. 39:1633–1639.

Singh H, Singh S, Srivastava A, Tandon P, Bharti P, Kumar S, Maurya R. 2014. Conformational analysis and vibrational study of daidzein by using FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 120:405–415.

Smitasiri Y, Kaewmung B, Kanunthai W, Supasai S. 1992. Androgenic and Aphrodisiac medicinal plants research and development project. Chiang Mai: Chiang Mai University Press.

Talukdar A, Jain N, De S, Krishnamurty H. 2000. An isoflavone from *Myristica malabarica*. Phytochemistry. 53:155–157.

Tocharus C, Jeenapongsa R, Teakthong T, Smitasiri Y. 2005. Effects of longterm treatment of *Butea superba* on sperm motility and concentration. Naresuan Univ J. 13:11–17.

Zhao S, Zhang L, Gao P, Shao Z. 2009. Isolation and characterisation of the isoflavones from sprouted chickpea seeds. Food Chem. 114:869–873.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice

Griangsak Eumkeb,[a*] Sudarat Tanphonkrang,[b] Kittipot Sirichaiwetchakoon,[a] Tanaporn Hengpratom[a] and Wanatkamon Naknarong[a]

[a]*School of Pharmacology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, 3000, Thailand*

[b]*School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, 3000, Thailand*

Abstract

Butea superba Roxb. (BS) has been used in Thai men as an aphrodisiac, and prevent erectile dysfunction. Nevertheless, the active ingredients, dosages, have not been cleared. Hence, this study was to investigate the effect of compounds from the BS on the reproductive parameters of male mice.

The results revealed that BS was extracted to afford biochanin A, genistein, which were the first report on BS, and daidzein. The mice were treated by daidzein, genistein alone and in combination. The results showed that the sperm number and motility, cholesterol, and testosterone level of all isoflavones treated groups were significantly higher than controls (p<0.01). Obviously, daidzein plus genistein exhibited a synergistic effect, which is also the first report, resulted in significantly displayed higher levels of these parameters compared to others.

So, the synergistic activity of these isoflavones may useful in improving libido, erectile capacity, and assist infertility of poor spermatozoa in men.

Keywords: *Butea superba* Roxb; biochanin A; genistein; daidzein; sperm number; testosterone; synergistic effect

Index

Page number	Content	Title
3-7	Experimental	*General experimental procedures*, *Plant materials*, *Extraction, isolation, and identification*, *Experimental animals and procedures*, *Sperm motility and sperm count assays*, *Serum testosterone assay*, *Cholesterol analysis*, *Effect on reproductive organs and body weight*, *Synergy and Statistical Analysis*
8	Table S1	The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts value of compound 1, 2, and 3 measured in acetone-d_6, $CDCl_3$ + CD_3OD mixture and DMSO respectively
9	Table S2	Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination and sildenafil on the reproductive organ weight of mice.
10	Figure S1	Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on sperm count of mice.
11	Figure S2	Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination and sildenafil on sperm motility (%) of mice.
12	Figure S3	Micrographs of seminiferous tubules section of mice after treatment with daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil.
13	Figure S4	Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on the serum testosterone level of mice.
14	Figure S5	Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on cholesterol (mg%) of mice.
15	Supplementary References	The references appear in the supplementary

1. Experimental

1.1 Instrumentation

The UV spectra were obtained with Varian CARY 1E UV-Vis spectrophotometer. The FT-IR spectra were recorded on Nicolet spectrophotometer. The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra were recorded on Varian INOVA 300 NMR spectrometer in acetone-d_6 solution for compound 1, $CDCl_3$+CD_3OD mixture for compound 2, the chemical shifts are expressed in δ (ppm) concerning the solvent signals. The Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), 6400 Series Triple Quadrupole B.05.00 (B5027.0), quadrupole mass spectrometer equipped with the electrospray ionization (ESI) turbo ion interface was used to identify compound 3 in comparison with the standard compound. The mass spectrometer was recorded on Hewlett Packard 5989 HP mass spectrometer. Column chromatography was performed on silica gel 60 Art 7734 and 9385 and Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) silica gel GF254.

1.2 Plant materials

Extract preparation. Fresh tuberous roots of BS were collected from Chiang Rai province, Thailand. The plant specimens were authenticated by Associate Professor Yuthana Smitasiri who has many experiences in working with this plant and identification was done in comparison with the voucher specimen no. BCU 1046. The specimen was deposited at Forest Herbarium, National Park, Wildlife, and Plant Conservation Department, Ministry of Natural Resources and Environment, Thailand. The tuberous roots were washed thoroughly and dried in an oven at 60 °C for 72 hours. The dried samples were ground to a fine powder.

1.3 Extraction, isolation, and identification

The methods of BS extraction, isolation and identification were modified from Cherdshewasart *et al.* (2007) and Kayano *et al*. (2012) (Cherdshewasart et al. 2007, Kayano et al. 2012). Briefly, dried powdered tuber roots of *B. superba* (2 kg) were extracted continuously with ethanol by Soxhlet extraction for 12 hours. The ethanol extracted was evaporated under reduced pressure to pass on the ethanol crude extract (30.5 g). The ethanol extract (25.0 g) was separated by silica gel column chromatography. The column was eluted sequentially with hexane, chloroform, acetone, and methanol. All fractions were concentrated to give hexane crude extract (0.5 g), chloroform crude extract (1.6 g), acetone crude extract (7.4 g), and methanol crude extract (8.6 g).

The acetone crude extract was subjected to silica gel column chromatography. The column was eluted successively with hexane-acetone (1:1), acetone, chloroform-methanol (1:1), and methanol. Every fraction was concentrated to a small volume to give four major fractions (Fr.l 1.7 g, Fr.2 l.8 g, Fr.3 1.1 g, Fr.4 2.0 g and Fr.5 4.0 g).

A portion of fraction 1 (1.0 g) was chromatographed on silica gel 60 column. The column was eluted successively with hexane, l:4 hexane-acetone, 2:3 hexane-acetone, 3:2 hexane-acetone, 4:l hexane-acetone, and acetone respectively. Every fraction was collected and concentrated to a small volume to give six fractions (Fr. l-1 2.8 mg, Fr. l-2 81.2 mg, Fr. l-3 59.5 mg, Fr. l-4 126.5 mg, Fr. l-5 53.2 mg and Fr.1-6 54.8 mg).

Fraction l-2 (81.2 mg) was further purified by preparative thin layer chromatography (hexane: acetone 2:1) to afford two fractions (A 57.6 mg, B 9.4 g). Fraction A (57.6 mg) was further purified by preparative thin layer chromatography using the same developer solvent to give the crude compound 1 (21.1 mg) which was recrystallized from chloroform-methanol mixed solvent to obtain pure compound 1 (18.1 mg) as a light yellow powder.

Fraction l-5 (53.2 mg) was further purified by preparative thin layer chromatography (hexane: acetone l: 1) to give pure compound 2 (8.5 mg) as a white powder.

A portion of fraction 5 (2.0 g) was chromatographed on silica gel 60 column. The column was successively eluted with a serial dilution of hexane:acetone, 1:1, separated by monitoring with TLC till compound 3 was collected. Structural identification of the isolated compounds was carried out following the method of Shaw *et al*. (2013) (Shaw et al. 2013) with a minor modification. Briefly, the LC-MS, 6400 Series Triple Quadrupole B.05.00 (B5027.0), quadrupole mass spectrometer equipped ESI turbo ion interface was performed to identify compound 3 in comparison with the standard compound. The mass spectrometer was completed in the positive ion detection mode. The analysis was quantified by multiple-reaction monitoring (MRM) mode performing with the precursor-to-product ion pair.

1.4 Experimental animals and procedures

Fifty adult male mice, aged about 130 days, weighing 30-40 g, were obtained from the National Laboratory Animal Centre, Thailand. The experimental protocol was approved in accordance with guidelines for the care and use of laboratory animal by animal care

and use committee (ACUC), Permit No. 13/2555, the Suranaree University of Technology, which was conducted in accordance with European community guidelines.

Mice were divided into five groups with 10 animals each. Before treatment (pre-treatment), all mice in these groups were collected blood and sperm for comparison with after treatment (post-treatment). These mice were fed with a diet that was a casein-based open formula purified diet with non-detectable levels of the estrogenic isoflavones genistein, daidzein or glycitein (Fielden et al. 2003). During the treatment period, the first group was treated by daily gavage with 0.1 ml of corn oil (Sigma, St Louis, MO, USA). The second group was treated by daily gavage with 0.1 ml of corn oil, plus sildenafil, a positive control, at 10.00 mg/kg BW/day. The third, fourth and fifth groups were orally gavaged with daidzein, genistein, and daidzein plus genistein in corn oil for a nominal dose of 1.0, 1.0 and 0.2 + 0.2 mg/kg BW/day respectively. The animal's weight was recorded daily throughout the experimental period. The experimentation was performed throughout 40 consecutive days. At the end of the treatment period, all mice were sacrificed under thiopental sodium anaesthesia and subjected to necropsy. The blood and sperm were collected to compare sperm motility, sperm number, cholesterol, and testosterone level with pre-treatment in each mouse (Cherdshewasart et al. 2008, Sharma et al. 2013).

1.5 Sperm motility and sperm count assays

Sperm motility was done following the method of Sharma et al., (2013) (Sharma et al. 2013).

Motility (%) = (number of motile spermatozoa / total number of spermatozoa) X 100

The cauda epididymis was cut and weighed. A cell suspension was prepared by macerating the cauda in 1.0 ml of 0.85% saline. The cell suspension was kept for 24 hours at four ºC. The suspension was then filtered through a double gauze layer, and an aliquot of the sample was used for sperm count in an Makler counting chamber. An aliquot of the epididymis sperm suspension was smeared, stained with haematoxylin and Essen, and then examined under a light microscope (CH-2, Olympus, Japan) at a magnification of 100X. The head and tail abnormalities (200 sperms per animal) were recorded.

1.6 Serum testosterone assay

Concentrations of mice testosterone were measured by radioimmunoassay techniques of the World Health Organization and extracted with diethyl ether. The intra-assay

coefficients of variation were 7% for testosterone and reagents obtained from the National Hormone and Pituitary Program (Sharma et al. 2013).

1.7 Cholesterol analysis

Blood was collected for cholesterol analysis before and after treatment. At the end of the experiment, blood samples were collected by cardiac puncture under thiopental sodium anesthesia from 9.00 to 10.00 a.m. and blood serum was prepared by centrifugation at 1,000×*g* for 30 minutes and kept at −20 ºC for cholesterol analysis. The assays were performed with an automated analysis system at the service laboratory of Suranaree University of Technology Hospital (Cherdshewasart et al. 2008).

1.8 Effect on reproductive organs and body weight

At the end of treatment period as described previously, all mice were sacrificed and subjected to necropsy. The reproductive organs (testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicle and prostate gland) were removed to examine relative organ weight and histopathology of seminiferous tubules was studied**.** These relative organ weights in each group were compared. The animal's weight was recorded every day throughout the experimental period (Sharma et al. 2013).

1.9 Synergy and Statistical Analysis

All data are presented as the mean ± S.E.M. The interaction between the two agents was estimated by calculating the fractional inhibitory concentration of the combination (FIC) index. The FIC of each agent was calculated by dividing the concentration of the compound present in that treated group in combination where post-treated group showed significantly higher levels (SHL) than a pre-treated group of that compound alone to increase that measured parameter. The FIC index was calculated using the following formula: FIC of daidzein = SHL daidzein in combination/SHL of daidzein alone; FIC of genistein = SHL of genistein in combination/SHL of genistein alone; hence FIC index = FIC of daidzein + FIC of genistein. When the FIC index of the combination is less than 1.0, the combination is termed as synergistic; when FIC index is equal 1.0, it indicates 'no interaction' between the agents, and a value above 1.0 indicates antagonism between the two compounds (Wagner & Ulrich-Merzenich 2009).

Significant differences between the relative selected reproductive organ weight or body weight control and treatment groups were analysed by ANOVA (Armstrong et al. 2002, Van Breukelen 2006). The differences of cholesterol, testosterone level, growth rate and sperm analysis between pre- and post-treatment groups were calculated

by paired student's *t-test*. Then, a significant difference between each group was compared using ANCOVA (Borm et al. 2007, Van Breukelen 2006, Winkens et al. 2007). The Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$, means sharing the different superscript letters, were also considered statistically significant difference between each group.

Table S1**.** The ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR chemical shifts value of compound 1, 2, and 3 measured in acetone-d_6, $CDCl_3$ + CD_3OD mixture and DMSO respectively.

Atom position	**^{1}H (*J* in Hz) of compound**			**^{13}C (*J* in Hz) of compound**		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
2	8.15 (*s*)	7.92 (*s*)	8.30 (*s*)	153.82	153.23	153.36
3	-	-	-	123.20	122.18	123.04
4	-	-	-	180.94	181.24	179.82
5	12.99 (*s*)	-	-	163.31	162.49	135.56
5-OH	6.28 (*d, J* = 2.1)	-	-	99.28	-	-
6	9.60 (*s*)	6.28 (*d, J* = 2.1)	6.95 (*d, J* = 8.7, 1.6)	164.37	99.46	112.24
7	-	-	-		164.57	165.24
7-OH	6.40 (*d, J* = 2.1)	-	-	93.90	-	-
8	-	6.37 (*d, J* = 2.1)	6.90 (*d, J* = 1.6)	158.42	94.19	99.80
9	-	-	-	105.58	157.47	157.2
10	12.99 (*s*)	-	-	153.82	105.54	114.76
1′	-	-	-	153.82	123.86	126.62
2′	7.53 (*d, J* = 8.4)	7.35 (*d, J* = 8.7)	7.40 (*d, J* = 8.4)	123.20	130.37	130.14
3′	6.98 (*d, J* = 8.4)	6.89 (*d, J* = 8.7)	6.94 (*d, J* = 8.4)	180.94	115.57	115.02
4′	-	-	-	163.31	158.56	157.56
4′-OH	-	-	-	-	-	-
4′-OCH_3	3.83 (*s*)	-	-	54.97	-	-
5′	6.98 (*d, J* = 8.4)	6.89 (*d, J* = 8.7)	6.94 (*d, J* = 8.4)	113.91	115.57	115.04
6′	7.53 (*d, J* = 8.4)	7.35 (*d, J* = 8.7)	7.40 (*d, J* = 8.4)	130.46	130.37	130.18

Table S2. Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on the reproductive organ weight of mice. Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil at 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein at 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. Data was displayed in mean±SEM (n=10). The significant difference between each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$.

Reproductive organ (g)	**Con**	**Sil(10.00)**	**Dai(1.0)**	**Gen(1.0)**	**Dai(0.2)+Gen(0.2)**
Testis	0.18 ± 0.023^{b}	0.30 ± 0.045^{a}	0.29 ± 0.014^{a}	0.25 ± 0.008^{ab}	0.24 ± 0.013^{ab}
Epididymis	0.08 ± 0.002^{b}	0.08 ± 0.01^{c}	0.09 ± 0.01^{c}	0.16 ± 0.003^{a}	0.14 ± 0.007^{ab}
Vas deferens	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.003	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.004
Seminal vesicle	0.12 ± 0.004^{b}	0.13 ± 0.004^{b}	0.12 ± 0.005^{b}	0.31 ± 0.001^{a}	0.30 ± 0.022^{a}
Prostate gland	0.06 ± 0.005^{a}	0.04 ± 0.005^{b}	0.06 ± 0.003^{a}	0.02 ± 0.002^{a}	0.02 ± 0.002^{b}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

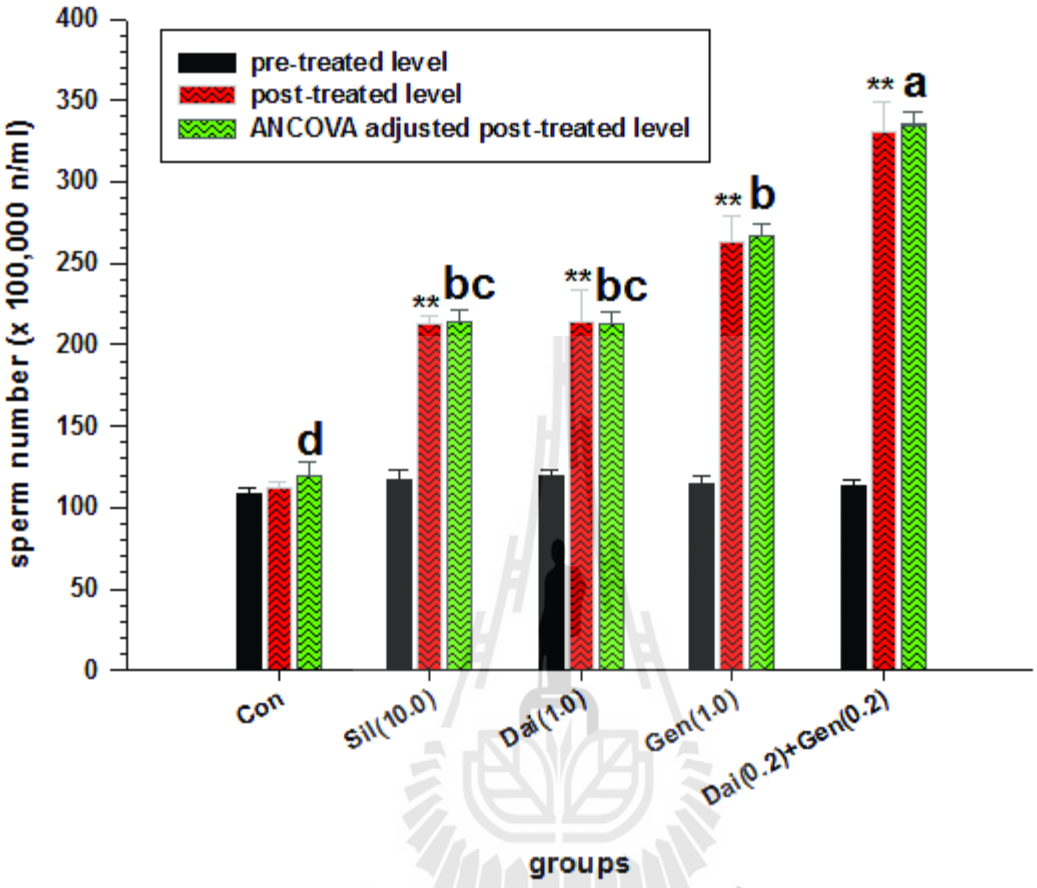


Figure S1. Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on sperm count of mice**.** Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil at 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein at 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. The significant difference between pre- and post-test in each group was compared using paired Student t-test at ** $p<0.01$. A significant difference between ANCOVA adjusted post-treated level in each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANCOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$.

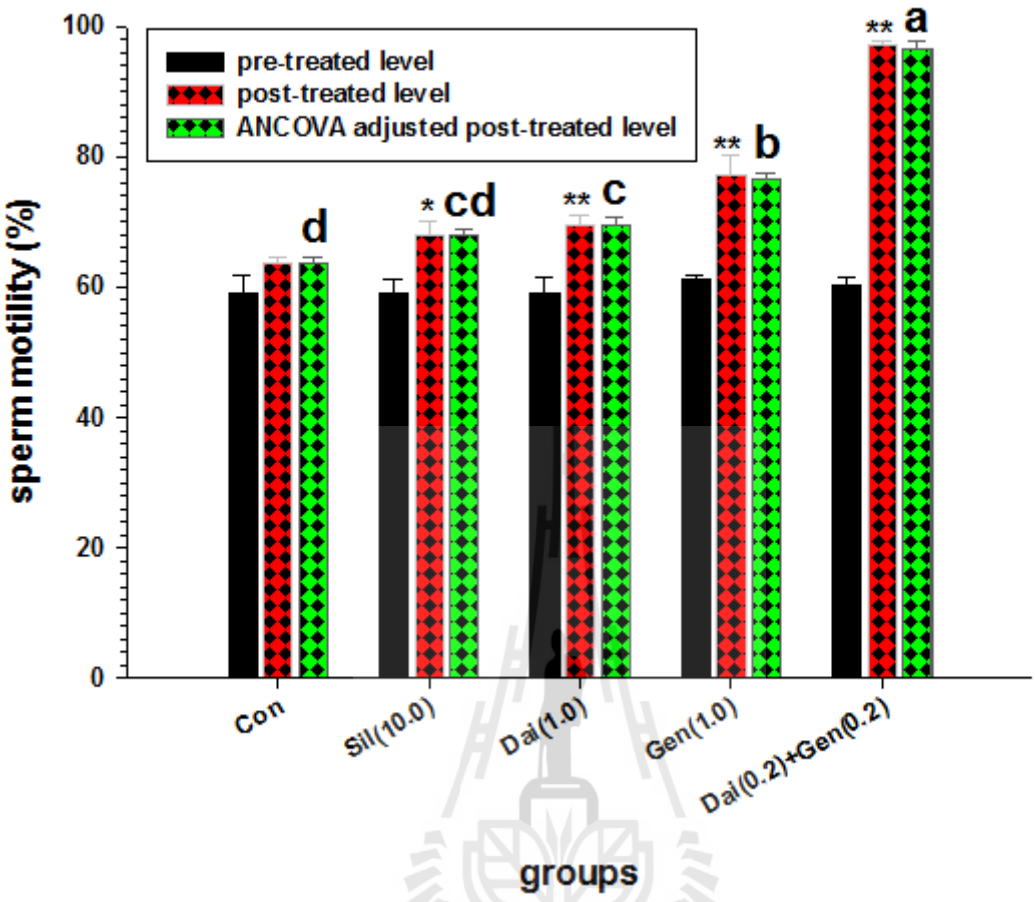


Figure S2. Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on sperm motility (%) of mice. Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil at 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein at 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. The significant difference between pre- and post-test in each group was compared using paired Student t-test at $^{*}p<0.05$; $^{**}p<0.01$. A significant difference between ANCOVA adjusted post-treated level in each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANCOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$.

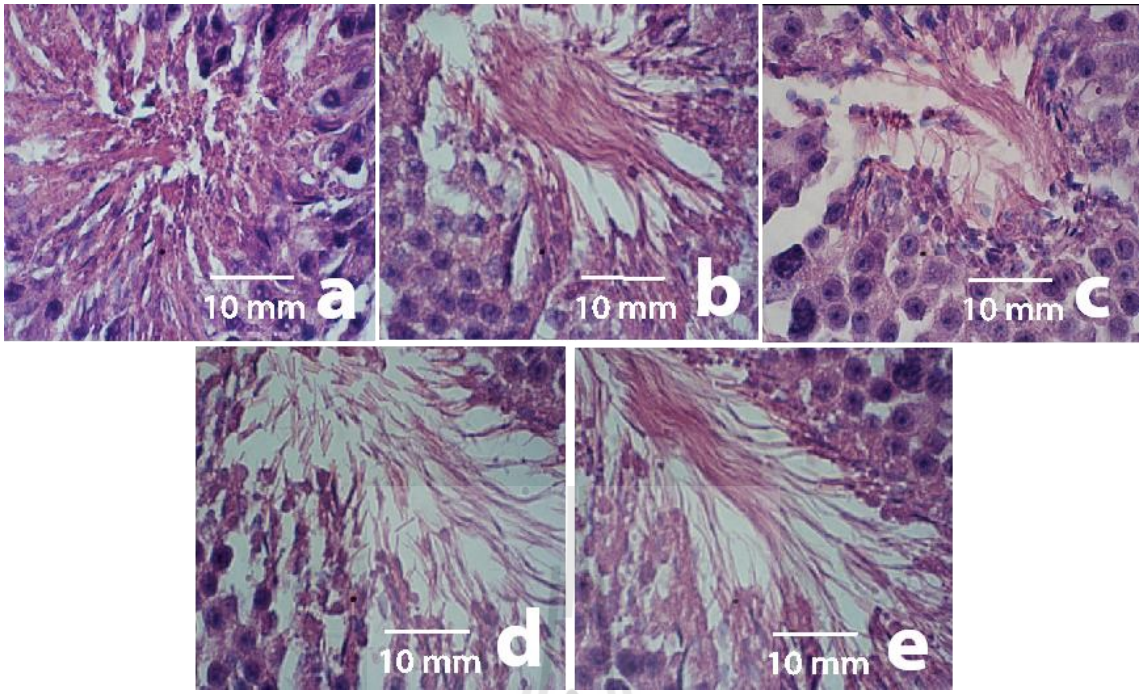


Figure S3**.** Micrographs of seminiferous tubules section of mice after treatment with daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil; **a** = Control, **b** = Sildenafil at 10.00 mg/kg BW/day, **c** = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, **d** = Genistein at 1.0 mg/kg BW/day, **e** = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. All micrographs displayed at X100 magnification. Bar = 10 mm.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

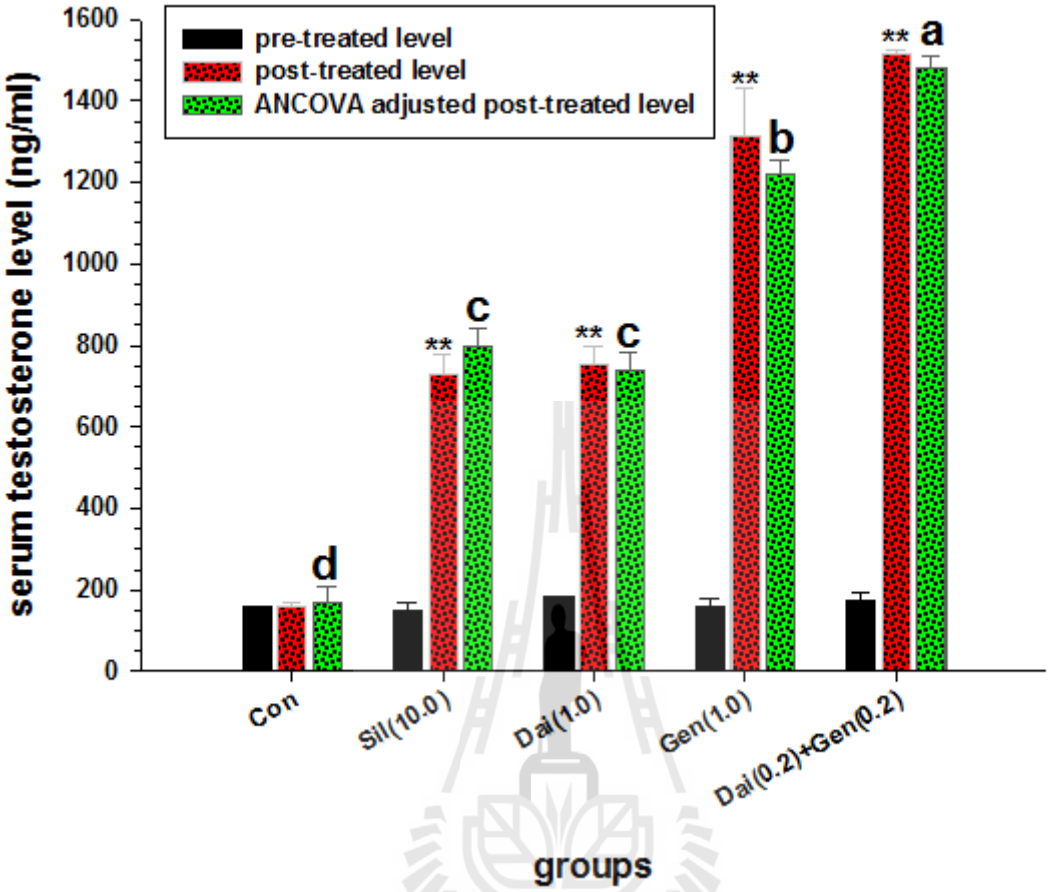


Figure S4. Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on the serum testosterone level of mice. Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil at 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein at 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. The significant difference between pre- and post-test in each group was compared using paired Student t-test at ** $p<0.01$. A significant difference between ANCOVA adjusted post-treated level in each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANCOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$.

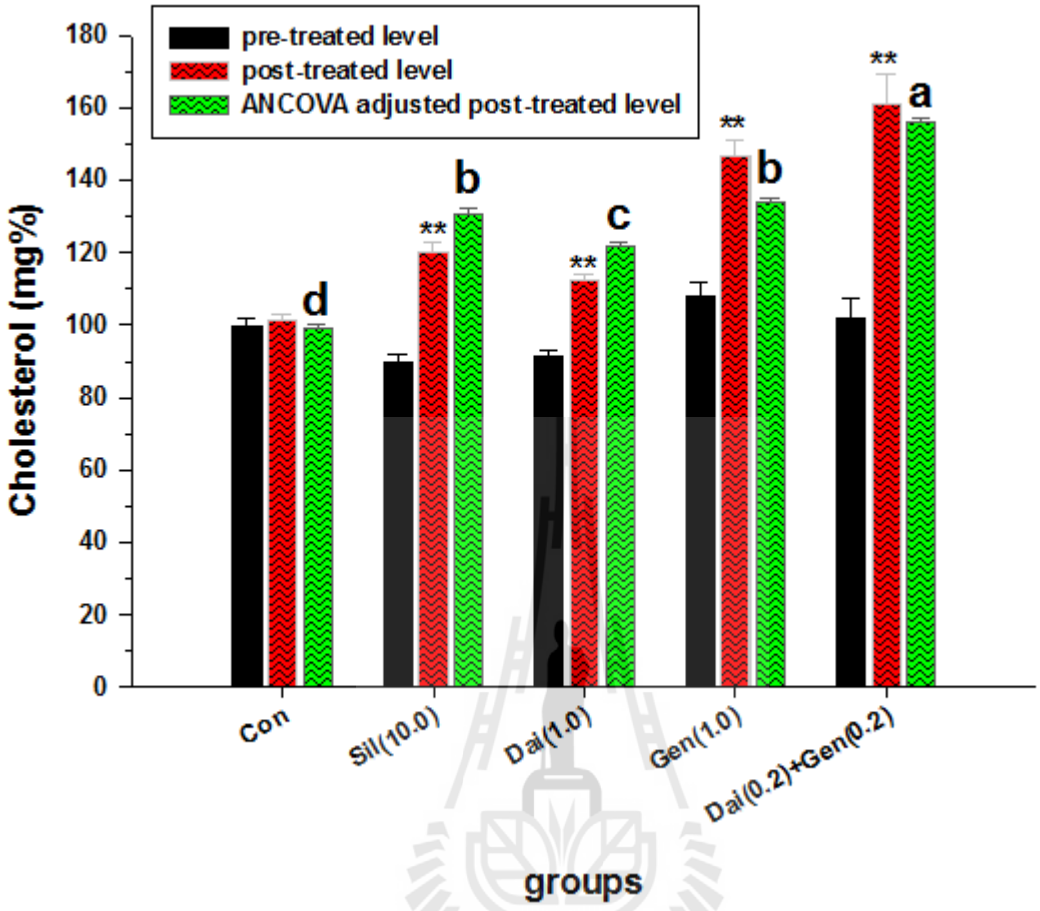


Figure S5. Effects of daidzein, genistein isolated from the BS alone and in combination, and sildenafil on cholesterol (mg%) of mice. Con = Control, Sil(10.0) = Sildenafil at 10 mg/Kg BW/day, Dai(1.0) = Daidzein at 1.0 mg/Kg BW/day, Gen(1.0) = Genistein at 1.0 mg/Kg BW/day, Dai(0.2)+Gen(0.2) = Daidzein 0.2 mg/Kg BW/day plus Genistein 0.2 mg/Kg BW/day. The significant difference between pre- and post-test in each group was compared using paired Student t-test at ** $p<0.01$. A significant difference between ANCOVA adjusted post-treated level in each group, means sharing the different superscript letters, was compared using ANCOVA and Tukey's HSD post hoc test at $p<0.01$.

Supplementary References

Armstrong RA, Eperjesi F, Gilmartin B. 2002. The application of analysis of variance (ANOVA) to different experimental designs in optometry. Ophthalmic Physiol Opt. 22:248-256.

Borm GF, Fransen J, Lemmens WA. 2007. A simple sample size formula for analysis of covariance in randomized clinical trials. J Clin Epidemiol. 60:1234-1238.

Cherdshewasart W, Bhuntaku P, Panriansaen R, Dahlan W, Malaivijitnond S. 2008. Androgen disruption and toxicity tests of *Butea superba* Roxb., a traditional herb used for treatment of erectile dysfunction, in male rats. Maturitas. 60:131-137.

Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W. 2007. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal. 43:428-434.

Fielden MR, Samy SM, Chou KC, Zacharewski TR. 2003. Effect of human dietary exposure levels of genistein during gestation and lactation on long-term reproductive development and sperm quality in mice. Food Chem Toxicol. 41:447-454.

Kayano S-i, Matsumura Y, Kitagawa Y, Kobayashi M, Nagayama A, Kawabata N, Kikuzaki H, Kitada Y. 2012. Isoflavone C-glycosides isolated from the root of kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic activities. Food Chemistry. 134:282-287.

Sharma V, Boonen J, Spiegeleer BD, Dixit VK. 2013. Androgenic and spermatogenic activity of alkylamide-rich ethanol solution extract of *Anacyclus pyrethrum* DC. Phytother Res. 27:99-106.

Shaw LH, Chen WM, Tsai TH. 2013. Identification of multiple ingredients for a Traditional Chinese Medicine preparation (bu-yang-huan-wu-tang) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Molecules. 18:11281-11298.

Van Breukelen GJ. 2006. ANCOVA versus change from baseline: more power in randomized studies, more bias in nonrandomized studies [corrected]. J Clin Epidemiol. 59:920-925.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine. 16:97-110.

Winkens B, van Breukelen GJ, Schouten HJ, Berger MP. 2007. Randomized clinical trials with a pre- and a post-treatment measurement: repeated measures versus ANCOVA models. Contemp Clin Trials. 28:713-719.

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **Name and Rank**: Associate Professor Dr. Griangsak Eumkeb
2. **Department / School**: School of Preclicic (Pharmacology), Institute of Science
3. **University**: Suranaree University of Technology
4. **Degree**:

Degree	Field	Date Awarded	Institute / Country
Ph.D.	Pharmacology	1999	The Robert Gordon University, United Kingdom
B.Sc.	Pharmacy	1989	Chulalongkorn University, Thailand

5. **Experiences**:

5.1 Administration Experience:

Period	Position	Institution / Firm
2015-Present	Associate Professor	Institute of Science, Suranaree University of Technology (SUT)
2004-2015	Assistant Professor	Institute of Science, Suranaree University of Technology (SUT)
2002-2005	Assistant Director of Center for Scientific and Technology equipment,	Center for Scientific and Suranaree Technology equipment, University of Technology
1999-2002	Lecturer	School of Pharmacology, Inst. of Science, SUT.
1989-1994	Pharmacist	MaharatNakhonRatchasima Hospital, Thailand

6. **Current Professional Field Registration**:

Pharmacology and toxicology, Medicinal plant, Clinical Pharmacy

7. **Members**:
   1. Thai society of toxicology
   2. Thai society of pharmacist
   3. Thai pharmacy council
   4. The alumni association of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

8. Research Grants Awarded:

2016- Newton fund: grant for PhD supervisor (1 Grant): British Council, Newton Fund and Thailand Research Fund (TRF)

2015- The Research and Researchers for Industries-RRi Ph.D. Program Advisorships (1 Grant): The Thailand Research Fund, Thailand

2013- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grant): The Thailand Research Fund, Thailand

2012- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grant): The Thailand Research Fund, Thailand

2011- The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grant): The Thailand Research Fund, Thailand

2006-2008: Research Career Development Grant (Metheevijai): The Thailand Research Fund, Thailand

2003-2004: Research Grant for New Scholar : The Thailand Research Fund-Commission on Higher Education

2004-2011: Research Grants (9 Grants): National Research Council of Thailand/Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology, Thailand

2011: The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Advisorships (1 Grants): The Thailand Research Fund, Thailand

9. **Award** :

2016 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2015 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2013 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

2011 : Renowned deed in athletics leader, Suranaree University of Technology

2010 : Renowned deed in athletics manager, Suranaree University of Technology

2008 : Outstanding alumnus, Nonkipittakom school, Burirum, Thailand

2004 : Renowed Needle of Honor of the Queen Mother academic Olympics.

1994-1999: The Royal Thai Government Scholarship, MUA, to study Ph.D. in U.K. for 4 years.

1985-1988: Boonrod - Brewery Scholarship for 4 years, Chulalongkorn University,

1983-1984: Bangkok-Bank Scholarship for 2 years, Mahidol University

10. Scientific Publications :

Refereed articles:

Richards, R.M.E., **Eumkeb, G**. and Marshall, D. (1997). Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action? Microbios, 92, 183 - 197.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb**. (2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220.
(*IF 2015 = 2.711)*

Punopas, K., **Eumkeb, G**., Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:52-59.

Eumkeb, G. and Richards R.M.E. (2004). Reversing β- Lactam Antibiotic Resistance in Gram-positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.

Eumkeb, G., Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). "Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." Phytomedicine **18**(1): 40-45.
(*Impact Factor 2015 = 2.937*)

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicify Test of Galangin and ceftazidime in Mice." Thai Journal of Toxicology **26**(1): 5-13.

Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." J. Appl. Microbiol. 112, 55-64.
(*Impact Factor 2015 = 2.156)*

Munglue, P., **Eumkep, G**., Wray, S., Kupittayanant, S., 2013. The Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts and L-Citrulline on Rat Uterine Contractility. Reproductive Sciences. 20, 437-448.
(*Impact Factor 2015 = 2.429)*

Eumkeb, G., Siriwong, S., Thumanu, K., 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 117, 247-253.
(Impact Factor 2015 = 3.035)

Eumkeb, G., Chukrathok, S., 2013. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae* Phytomedicine. 20, 262-269.
(Impact Factor 2015 = 2.937).

Teethaisong, Y., Autarkool, N., Sirichaiwetchakoon, K., Krubphachaya, P., Kupittayanant, S. and **Eumkeb, G.,** (2014). Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* ***Journal of Biomedical Science.*** **21:90**
(Impact Factor 2015 = 2.935).

Siriwong, S., Pimchan, T., Naknarong, W. and **Eumkeb, G.**, 2015. Mode of action and synergy of ceftazidime plus baicalein against *Streptococcus pyogenes*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 14, 641-648.
(Impact Factor 2015 = 0.543).

Siriwong, S., Thumanu, K., Hengpratom, T., and **Eumkeb, G.** 2015 Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2015, Article ID 759459, 12 pages, doi:10.1155/2015/759459.**
(***Impact Factor 2015 = 1.931***).

Eumkeb, G., Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., and Naknarong, W. 2017. "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice," Natural Product Research. 31(6), 672-675. DOI:10.1080/14786419.2016.1180603. (***Impact Factor 2015 = 1.057***).

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Nakouti, I., Evans, K., and Hobbs, G. 2016. A combined disc method with resazurin agar plate assay for early phenotypic screening of KPC, MBL and OXA-48 carbapenemases among Enterobacteriaceae. J. Appl. Microbiol. 121:408-14. DOI: 10.1111/jam. 13196, 2016 Aug;121(2):408-14, PMID: 27253907
(***Impact Factor 2015 = 2.156)***

Siriwong, S., Teethaisong, Y., Thumanu, K., Dunkhunthod, B., and **Eumkeb, G.** (2016). The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. BMC Pharmacology and Toxicology. 17(1): 1-14. DOI: 10.1186/s40360-016-0083-8
(IF 2015 = 2.03)

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Chumnarnsilpa, S., Autarkool, N., Hobson, J., Nakouti, I., Hobbs, G., and Evans, K. (2016). Phenotypic detection of AmpC β-lactamases, extended-spectrum-β-lactamases and metallo-β-lactamases in Enterobacteriaceae using a resazurin microtitre assay with inhibitor-based methods. Journal of Medical Microbiology: is accepted. 2016 Aug 1. doi: 10.1099/jmm.0.000326. [Epub ahead of print], PMID: 27481506
(IF 2015 = 2.269)

Phitaktim, S., Chomnawang, M., Sirichaiwetchakoon, K., Dunkhunthod, B., Hobbs, G., and **Eumkeb, G.** (2016). Synergism and the mechanism of action of the combination of α-mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. BMC Microbiology. 16, 1-14. DOI: 10.1186/s12866-016-0814-4.
(IF 2015 = 2.581)

Mahidsanana, T., Gasalucka, P., and **Eumkeb, G.** (2017). A novel soybean flour as cryoprotectant in freeze-dried Bacillus subtilis SB-MYP-1. LWT - Food Science and Technology. 77, 152-159.
(IF 2015 = 2.711)

Dunkhunthod, B., Thumanu, K., and **Eumkeb, G.** (2017). Application of FTIR microspectroscopy for monitoring and discrimination of anti-adipogenesis activity of baicalein in 3T3-L1 adipocytes. Vibrational Spectroscopy. (is accepted) xx: xx-xx.
(IF 2015 = 1.682)

Patent

The combination of flavonoids and drugs against *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* : patent asking no: 0601001839 , 2006

Conference Proceedings:

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β-Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In : Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

Munglue, P., **Eumkep, G.**, Wray, S., Kupittayanant, S., (2012). Uterine Relaxant Effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Extracts. , in: The Physiology Society, (Ed.), Physiology 2012. The Physiology Society, Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, EH3 8EE, United Kingdom., 27, pp. PC364.

Siriwong, S., **Eumkeb, G**., 2012. Synergistic effect of penicillin with apigenin and kaempferol against Penicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co.,, Chiang Mai, Thailand, pp. 368-372.

Naknarong, W., **Eumkeb, G.**, 2012. The effects of Red Kwao Kreu (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co, Chiang Mai, Thailand, pp. 193-197.

Eumkeb, G., Phitaktim, S. and Teethaisong, Y. (2013). "Antibacterial Activity of α-Mangostin from the Pericarp Extract of *Garcinia mangostana* L. against Drug Resistant Bacteria." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38 (Suppl)**: 83-87.

Eumkeb, G., Naknarong, W. and Sirichaiwetchakoon, K. (2013). "The effects of Red Kwao krue (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38**(Suppl): 120-123.

Siriwong S, Krubphachaya P., Thumanu K, **Eumkeb G.** (2013). "Synergy effect of ceftazidime with flavonoids against *Streptococcus pyogenes*." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38**(Suppl): 115-118.

Autarkool, N., Teethaisong, Y., Kupittayanant, S., & **Eumkeb, G**. (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of Staphania suberosa extract against methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Rojtinnakorn, N., Kupittayanantb, S., Temsiripong, Y., & **Eumkeb, G**. (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of plasma fractions from Siamese crocodile (Crocodylus siamensis) on Ceftazidime-resistant Enterobacter cloacae* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Eumkeb, G., Duangkham, A., & Hengpratom, T. (2014, May 6-8, 2014.). *Subchronic toxicity test of quercetin and cloxacillin in mice.* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Teethaisong, Y., Autarkool, N., & **Eumkeb, G**. (2014, May 6-8, 2014). *Synergistic antibacterial activity of Boesenbergia rotunda extract and β-lactam antibiotic combination against multidrug-resistant bacteria.* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand.

Cheypratub, P., Leeanansaksirib, W., & Eumkeb, G. (2014, May 6-8, 2014). *Antibacterial activity of Cyperus rotundus extract against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Paper presented at the The 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO 5), Moevenpick Resort & Spa Karon Beach Phuket, Thailand

Research reports:

Eumkeb,G. and Jinakoon, N. (2003). The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province

Eumkeb, G., Duangkham, A., (2012). In vivo toxicity test of galangin. Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, pp. 38.

Eumkeb, G., Chukrathok, S., (2012). Investigation of the effect of galangin on some b-lactam antibiotics resistant bacteria. Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, pp. 33.

Eumkeb, G., Siriwong, S., (2012). Investigation of the effect of some flavonoids on some b-lactam antibiotics resistant bacteria. Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, pp. 57.

Eumkeb, G., Duangkham, A., 2012. In vivo toxicity test of some flavonoids. Suranaree University of Technology, NakhonRatchasima, pp. 59.

Technical articles (บทความทางวิชาการ)

Eumkeb, G., 2014. Galangal, From the kitchen to the pharmacy, The Siam Magazine. Siam I Am Co., Ltd., Nakhon Ratchasima, pp. 42-47.

Conference Abstracts:

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, **Abstracts Book** (Poster presentation, PP04 -59, pp. 450). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In :The 20th FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy **, Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers**,**
Abstracts Book (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Oral presentation,

13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrungsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. **Abstract Book** (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

Eumkeb, G., Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers **7th, Abstract Book** (Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26.). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee,Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

Eumkeb, G., Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with **β-**lactam antibiotics against **β-**lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers**, Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education**:** p. 144.

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with **β-**lactam antibiotics against **β-**lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education**:** p. 105.

Pimchan, T., Maensiri, D., Nilsson, A. and **Eumkeb, G.** (2016). Antibacterial and Synergy Effect of **α**-Mangostin from *Garcinia mangostana* L. and Ceftazidime Combination against Drug-Resistant Bacteria. The Seventeenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XVII). The Thailand Research Fund. Abstract Book (Poster presentation, S5-P28). June 8-11, 2016, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund: p. 308.

Teethaisong, Y., Hobbs, G., Evans, K., Nakouti, I. and **Eumkeb, G.** (2016). A Disc Diffusion Method Along with a Resazurin Agar Plate Assay for the Early Characterisation of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. The Seventeenth RGJ-Ph.D. Congress (RGJ-Ph.D. Congress XVII). The Thailand Research Fund. Abstract Book (Oral presentation, S4-O3). June 8-11, 2016, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi., The Thailand Research Fund: p. 157.

Teethaisong, Y., **Eumkeb, G.**, Evans, E. and Hobbs, G., (2016). Evaluation of Resazurin microtitre plate assay for early phenotypic characterisation of ESBL, AmpC and MBL β-lactamases producing Enterobacteriaceae, in: Society, M. (Ed.), Annual Conference 2016. Microbiology Society, ACC, Abstract Book (Poster presentation, S19/P18). 21-24 March 2016, Liverpool, UK, p. 95.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเตอร์เนต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัด"ข่า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย** วันที่ 14 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัยพบ"ข่า"ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 15 มกราคม 2548 เวลา 12:39 น. http://www.manager.co.th/

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ เร่งวิจัย"ข่า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์บ้านเมือง** ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ "ข่า"สยบเชื้อดื้อยา เล็งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร **หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ** ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ วิจัย"ข่า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมดื้อ **หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน** ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ พัฒนาสารสกัดจาก"ข่า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง **หนังสือพิมพ์สยามรัฐ** ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ สารสกัด"ข่า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา **หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์** ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5.

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล ภาษาไทย นายสันติ ศักดารัตน์

ภาษาอังกฤษ Mr. Santi Sakdarat

2. เลขหมายบัตรประจำตัวบัตรประชาชน 3 110101782504

3. ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์) รองศาสตราจารย์ ดร.

ที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E. mail :

สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนน นมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044 – 224302 (ที่ทำงาน) 044-225554 (ที่หอพัก)

โทรสาร 044 – 224185

ที่อยู่ (ที่บ้าน) 44/55 ถนนพหลโยธิน ซอย 52 แขวงคลองขนม เขตสายไหม กรุงเทพฯ 10220

โทรศัพท์ 02-9738699

E-mail Address santi@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี B.Sc. Honors (Chemistry)

สถาบัน Prince of Songkla University **ประเทศ** ไทย **ปีที่จบ** พ.ศ. 2517

5.2 ปริญญาโท M.Sc. (Organic Chemistry)

สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล **ประเทศ** ไทย **ปีที่จบ** พ.ศ. 2519

5.3 ปริญญาเอก Ph.D. (Organic Synthesis)

สถาบัน University of Glasgow **ประเทศ** อังกฤษ **ปีที่จบ** พ.ศ. 2522

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการที่มีความชำนาญพิเศษ

6.1 Searching New Drugs from Thai Traditional Medicinal Plants and Natural Products by Extraction, Isolations, Structure. Elucidation and Biological Evaluation

6.2 Applications of LC-MS for analysis determination of natural products, drugs residues in environment food and toxicology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย ในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 การทดสอบหาวิธีการสกัดสาร Galangin จากข่า [*Alpinia galanga* (L) Willd or *Alpinia officinarum* Hance.] และ การพิสูจน์เอกลักษณ์

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือ โครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย ได้แก่ ผลงานวิชาการดังต่อไปนี้

1. **Sakdarat, S**. and Robins, D.J. 1979. "Synthesis of the Pyrrolizidine Base, (+)-Supinidine" J.Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1734.
2. **Sakdart, S**. and Robins, D.J. 1979. "Synthesis of the 8β -Pyrrolizidine Base, (+)-Isoretronecanol, (+) – Supinidine, and (+)-Laburnine" J.chem. Soc., Chem. Commun., 1181.
3. **Sakdarat, S**. and Robins, D.J.1980. "Synthesis of 13, 13-Dimethy1-1, 2-dihydrocrotalanine"., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 282
4. **Sakdarat, S**. and Robins, D.J. 1981. "Synthesis of Optically Active Pyrrolizidine Bases". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 909.
5. **Sakdarat, S**. Robins, D.J.and Devlin, J.A. 1982 ."Pyrrolizidine Alkaloid Analogues. Synthesis of Eleven-membered Macrocyclic Diester of Retronecine". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 1117.
6. **Sakdarat, S**. and Williams, D.R. 1983. "Opportunities for Selective Removal of Methoxyethoxymethyl (MEM) Ethers". Tetrahedron Lett. 24, 3965.
7. **Sakdarat, S**. and Kowalski, C.J. "Ester Homologation via Ynolate Anions" J. Organic Synthesis, submitted.
8. **Sakdarat, S**. and Kowalski, C.J. "Silyl Ynol Ethers for Alkoxymethylene Introduction, Including the Synthesis of d, 1-Oudemansin". Journal of the American Chemical Society, submitted.
9. **Sakdarat, S**. and Kowalski, C.J. 1990. "Reaction of Silyl Ynol Ethers with Aldehyde and Acetals: An Alternative to the Horner-Wadsworth-Emmons Condensation". Journal of Organic Chem. 55, 1977-1979.
10. **Sakdarat, S**., Barrett, A.G.M., Cheng, M.C., Spilling, C.D. and Taylor, S.J. 1989. "Sterecontrolled Total Synthesis of the Penicillanate ester (25, 5R)-benzyl 3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylate". Tetrahedron Lett. 30, 2349.
11. **Sakdarat, S**. and Barrett, A.G.M. 1990. "Total Synthesis of Penicillanic Acid S, S-Dioxide and 6-Aminopenicillanic Acid Using (Benzyloxy) nitromethane". Journal of Organic Chem, 55, 5110-5117.
12. Smitasiri, Y., and **Sakdarat, S** 1995. "The Means of Application of *Pueraria mirifica* for Pigeon *(Columba sp.)* Birth control". Suranaree J. Sci. Technol. 2, 89-96.
13. **Sakdarat, S**. and Robins, D.J. 1999. Chemical constituents from Bitter Cucumber, *Momordica charantia* Linn. Abstract of the 25th Congress on Science and Technology of Thailand, at Pissanulog, A-158, 404-5
14. Dechatiwongse Na Ayudhya T, **Sakdarat S**, Shuyprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents from the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. 2001. Abstract of the 27th Congress on Science and Technology of Thailand, at Songkhla, 16-03p-05, 156

15. Dechatiwongse Na Ayudhya T, **Sakdarat S**, Shuyprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents of the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. Thai Journal of Phytopharmacy. 8(1) , 1 – 8.

16. **Sakdarat S** SA, Pientong C, Ekalaksananan T, Thongchai S. 2009. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. Bioorg Med Chem 17:1857-1860.

17. Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, **Sakdarat S**, Sullivan PA, Ketudat Cairns JR. 2005. Purification of an isoflavonoid 7-O-beta-apiosyl-glucoside beta-glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. Phytochemistry 66:1880-1889.

18. Eumkeb, G., **Sakdarat, S**., Siriwong, S. (2010). "Reversing beta-lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime." Phytomedicine **18**(1): 40-45. **(*Impact Factor 2015 = 2.937*)**

19 Eumkeb, G., Siriwong, S., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Sakdarat, S. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." J. Appl. Microbiol. 112, 55-64.
(Impact Factor 2015 = 2.156)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ** (ภาษาไทย) นาง ดร. กาญจนา ธรรมนู

   (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Dr. Kanjana Thumanu

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3 3099 00098 85 6

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ดร.

4. **หน่วยงานที่อยู่** ที่ติดต่อได้พร้อมเบอร์โทรศัพท์และโทรสาร

   สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์กรมหาชน)

   111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000.

   โทร : 0 - 4421 - 7040 **โทรสาร**: 0-44 21- 7047

   E-mail : kthumanu@gmail.com

5. **ประวัติการศึกษา**

2533 : ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, ประเทศไทย

2537 : ปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ, ประเทศไทย

2546 **:** Ph.D. (Biochemistry) ; Biochemistry department, School of Biosciences, Birmingham, **United Kingdom**

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ** (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Infrared spectroscopy and IR microspectroscopy with Multivariate analysis, IR imaging with cluster analysis, Enzyme mechanisms, Protein folding, Stopped flow apparatus with FTIR spectroscopy, Antibiotic resistance, Cell signaling

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

7.1 ผู้ประสานงานกลุ่มวิจัย IR microspectroscopy :

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.2.1 Development of Attenuated total reflectance IR spectroscopy for detecting resistance bacterial cells when treating with flavonoid and antibiotic

7.2.2 Correlation between IR spectrum and Organic carbon Carbon/Elementary Carbon from each emission source at Songkhla Province, Thailand

7.2.3 Feasibility study on design and application of IR microspectroscopy

7.3 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

ผลงานตีพิมพ์

7.3.1 **Thumanu, K**. Cha, J., Fisher, Jed F., Perrins, R., Mobashery, S. and Wharton, C.W. (2006). Discrete steps in sensing of beta-lactam antibiotics by BlaR1 protein of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103 (28) : 10630-10635

7.3.2 Tattum, M.H. Cohen-Krausz, S., **Thumanu, K.**, Wharton, C.W., Khalili-Shirazi, A., Jackson, G.S., Orlova, E.V., Collinge, J., Clarke, A.R. and Saibil, H.R. (2006). Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. J. Mol. Biol. 357 (4) : 975-985

7.3.3 Santisopasri, V., **Kurotjanawong, K**., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Sriroth, K., and Oates, C. G. (2001). Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. Industrial Crops and Products. 13(2): 115-129.

7.3.4 Sriroth, K., V. Santisopasri, C. Petchalanuwat, K. Piyachomkwan, **K. Kurotjanawong** and C.G. Oates. (1999). Cassava starch granule structure-function properties : Influence of time and conditions at harvest on four varieties of cassava starch. Carbohydrate polymers. 38(2) : 161-170.

7.3.5 **Thumanu, K.** (2008) IR microspectroscopy and IR imaging : a new tool for characterization neuron stem cells and application to biomedical sciences , **Abstracts book** (Oral presentation) Workshop on " recent advance of embryonic and somatic stem cells in biomedical science, 28 July-3 Aug 2008

7.3.6 **Thumanu, K**. Tanthanuch, W., Lorthongpanich., and Parnpai, R. (2008). Chemical Mapping of mouse blastocyst using FTIR microspectroscopy. **Abstracts book** (Poster presentation) The 5th Annual conference, Asian Reproductive Biotechnology Society. November 27 to December 1, 2008, Kunming, Yunnan, China

7.3.7 **Thumanu, K**. Tanthanuch, W., Lorthongpanich., and Parnpai, R. (2008). Comparison between synchrotron infrared microspectroscopy mappings and focal plane array imaging of mouse blastocyst. **Abstracts book** (Poster presentation) Proceedings of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, Maha Sarakham, Thailand on October 14-17th

7.3.8 Tanthanuch, W., **K. Thumanu**., C. Lorthongpanich., and Parnpai, R. (2008). Characterization a single cell of mouse neural stem cells by Synchrotron infrared microspectroscopy. The 5th Annual conference, Asian Reproductive Biotechnology Society. November 27 to December 1, 2008, Kunming, Yunnan, China

7.3.9 **Thumanu, K.,** S. Pongpiachan., K.H. Ho., S.C. Lee and P. Sompongchaiyakul. (2008). Correlation between IR spectrum and Organic carbon Carbon/Elementary Carbon from each emission source at Songkhla Province, Thailand: Impact of atmospheric aerosols on climate system. *Manuscript in preparation*

7.3.10 Pongpiachan, S., K., **Thumanu, K**., K.H. Ho., S.C. Lee and P. Sompongchaiyakul. (2008). Estimation of gas-particle partitioning coefficient (Kp) of polycyclic aromatic hydrocarbons by organic carbon/ elemental carbon and evaluation of occupational exposure at Songkla province, Thailand. *Manuscript in preparation*

7.3.11 **Thumanu, K**. (2008). "Feasibility report on design and application of IR microspectroscopy", this work is conducted as a part of *Feasibility study of IR beamline at NSRC.*

7.3.12 **Thumanu, K** and C.W. Wharton. (2005). Stopped-flow time resolved Infrared spectroscopic study of the acylation of BlaR sensor domain from *Staphylococcus aureus*. 11thEuropean Conference o n the Spectroscopy of Biological molecules. Aschaffenburg, German, Sep3-Sep8

7.3.13 **Thumanu, K** and Wharton,C.W. (2003). IR studies of absorption (MM) complexes and acylenzyme intermediates in α-chymotrypsin catalysis. Proceedings of the 10th European Conference on the Spectroscopy of Biological molecules. Szeged, Hungary Aug30-Sept 4

7.3.14 **Kurotjanawong, K**. Piyachomkwan and C.G. Oates. (1998). Comparison of Varieties and Harvesting Time on Changes in Extracted Starch from Cassava Roots. In P.J. Larkin (ed.). Agricultural Biotechnology: Laboratory, Field and Market. Proceedings of the 4th Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology. Darwin. 13-16 July 1998. Canberra, UTC Publishing. pp. 391-394.

7.3.15 **Thumanu, K.** (2007) Feasibility study of design and application of IR microspectroscopy" at NSRC (Oral presentation) The seminar on "Feasibility study of design and application of IR microspectroscopy" at NSRC, 1-2 October

7.3.16**. Thumanu, K.** (2008) IR microspectroscopy at Siam Photon Light Source" (Poster presentation), Annual User meeting, 26 Jun 2008

7.3.17 **Thumanu, K.** (2007) Application of IR microspectroscopy (Oral presentation) Science camp, at NSRC

7.3.18 **Thumanu K**, Tanthanuch W, Ye D, Sangmalee A, Lorthongpanich C, Parnpai R and Heraud P (2011) Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell-derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. Journal of biomedical optics **16**:057005.

7.3.19 Siritapetawee J, **Thumanu K,** Sojikul P and Thammasirirak S (2012) A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from Artocarpus heterophyllus latex. Biochimica et biophysica acta 1824:907-912.

7.3.20 Machana S, Weerapreeyakul N, Barusrux S, **Thumanu K** and Tanthanuch W (2012) FTIR microspectroscopy discriminates anticancer action on human leukemic cells by extracts of Pinus kesiya; Cratoxylum formosum ssp. pruniflorum and melphalan. Talanta 93:371-382.

7.3.21 Jandaruang J, Siritapetawee J, **Thumanu K**, Songsiriritthigul C, Krittanai C, Daduang S, Dhiravisit A and Thammasirirak S (2012) The effects of temperature and pH on secondary structure and antioxidant activity of Crocodylus siamensis hemoglobin. The protein journal 31:43-50.

7.3.22 Eumkeb, G., Siriwong, S., **Thumanu, K**., (2012). Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 117, 247-253. (***Impact Factor 2015 = 3.035***)

7.3.23 Siriwong, S., **Thumanu, K**., Hengpratom, T., and Eumkeb, G. 2015 Synergy and mode of action of ceftazidime plus quercetin or luteolin on *Streptococcus pyogenes*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol.** 2015, Article ID 759459, 12 pages, doi:10.1155/2015/759459. **(*Impact Factor 2015 = 1.931*).**

7.3.24 Siriwong, S., Teethaisong, Y., **Thumanu, K**., Dunkhunthod, B., and Eumkeb, G**.** (2016). The synergy and mode of action of quercetin plus amoxicillin against amoxicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. BMC Pharmacology and Toxicology. 17(1): 1-14. DOI: 10.1186/s40360-016-0083-8 ***(IF 2015 = 2.03)***

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

NAME: MISS SUDARAT TANPHONKRANG

Born: 3 April, 1984 in Nakhon Ratchasima, Thailand

Education:

2003-2006 Bachelor of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham province, Thailand.

Experience:

2009-present Teaching assistant at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Presentation:

Tanphonkrang, S., and Sakdarat, S. (2011). Isolation and identification of chemical constituents of *Butea superba* Roxb. The 3rd Science Research Conference, at Phitsanulok, Thailand.

Internatinal Article

Eumkeb, G.**, Tanphonkrang, S**., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., and Naknarong, W. 2016. "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice" Natural Product Research, pp. 1-4, DOI:10.1080/14786419.2016.1180603. **(*Impact Factor 2015 = 1.057*).**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย กิตติพจน์ นามสกุล สิริชัยเวชกุล

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Kittipot Sirichaiwetchakoon

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1101400472234

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษา

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเภสัชวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 081-7628410 โทรสาร 044-224633

E-mail: kittipot_rs68@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชา เภสัชศาสตร์ สถาบัน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2550

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

6.1 Pharmacology

6.2 Phytochemistry

6.3 Drug Toxicology

7 งานวิจัยเรื่องนี้ได้เผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติดังนี้

7.1 Teethaisong, Y., Autarkool, N., **Sirichaiwetchakoon, K**., Krubphachaya, P., Kupittayanant, S., & Eumkeb, G. (2014). Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of biomedical science, 21(1), 1-11. ***(Impact Factor 2015 = 2.935).***

7.2 Phitaktim, S., Chomnawang, M., **Sirichaiwetchakoon, K**., Dunkhunthod, B., Hobbs, G., and Eumkeb, G. (2016). Synergism and the mechanism of action of the combination of α-mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. BMC Microbiology. 16, 1-14. DOI: 10.1186/s12866-016-0814-4. ***(IF 2015 = 2.581)***

7.3 Eumkeb, G.**,** Tanphonkrang, S., **Sirichaiwetchakoon, K**., Hengpratom, T., and Naknarong, W. 2016. "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice," Natural Product Research, pp. 1-4, DOI:10.1080/14786419.2016.1180603. **(*Impact Factor 2015 = 1.057*).**

งานวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอผลงานดังนี้

7.3.2.1 Eumkeb G, Naknarong W**, Sirichaiwetchakoon K**. (2014). The effects of Red Kwao Krue (*Butea superba* Roxb.) extract on sperm quality and testosterone level in mice. In: Proceeding of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Proceeding book (Poster presentation, BP-17/pp.120-123). 10-12 January 2014, Bangkok, Thailand: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn university, Thailand.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ผู้ร่วมวิจัย

1. **ชื่อ** (ภาษาไทย) นางสาว วณัทกมล นามสกุล นาคณรงค์

(ภาษาอังกฤษ) Miss. Wanatkamon Naknarong

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 2 3099 00005 221

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยนักวิจัย และนักศึกษาบัณฑิตศึกษา สาขาชีววิทยาสิ่งแวดล้อม

หน่วยงานที่อยู่ ที่ติดต่อได้พร้อมเบอร์โทรศัพท์และโทรสาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาคารสัตว์ทดลอง

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422-5009 โทรสาร -

E-mail : enterae1112@hotmail.com

M5110384@g.sut.ac.th

ประวัติการศึกษา

2550 : คุรุศาสตรบัณฑิต (สาขาชีววิทยา) เทคโนโลยีและนวัตกรรมทางการศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Medicinal Plant, Toxicology

ผลงานตีพิมพ์

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A., **Naknarong, W.**, Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with β-lactam antibiotics against β-lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, **Abstract Book** (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education**:** p. 105.

Eumkeb, G., **Naknarong, W.** and Sirichaiwetchakoon, K. (2013). "The effects of Red Kwao krue (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice." Proceedings of the 30th Annual Research Conference in Pharmaceutical Sciences. Thai J. Pharm. Sci. **38**(Suppl): 120-123.

Naknarong, W., Eumkeb, G., 2012. The effects of Red Kwao Kreu (*Butea superba* Roxb.) extract on reproductive system of male mice, in: Manosroi, A., Manosroi, J. (Ed.), NATPRO 4, Natural Products for Health and Beauty, The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Sangreeya Publishing Co, Chiang Mai, Thailand, pp. 193-197.

Naknarong, W., 2013. Biological activity of extract compounds from the tuberous roots of *Butea superba* Roxb, School of Biology. Suranaree University of technology, Nakhon-Ratchasima, pp. 105.

Siriwong, S., Pimchan, T., **Naknarong, W**. and Eumkeb, G., 2015. Mode of action and synergy of ceftazidime plus baicalein against *Streptococcus pyogenes*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 14, 641-648. ***(Impact Factor 2015 = 0.543)*.**

Eumkeb, G.**,** Tanphonkrang, S., Sirichaiwetchakoon, K., Hengpratom, T., and **Naknarong, W.** 2016. "The synergy effect of daidzein and genistein isolated from *Butea superba* Roxb. on the reproductive system of male mice," Natural Product Research, pp. 1-4, DOI:10.1080/14786419.2016.1180603. **(*Impact Factor 2015 = 1.057*).**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี