

ฤทธิ์ระงับปวดของสิ่งสกัดด้วยเอธานอลจากต้นเพชรสังฆาต



นางสาวสินทิพ วุฒิธรณฤทธิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1136-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 22662545

ANALGESIC EFFECTS OF THE ETHANOLIC EXTRACT
FROM *CISSUS QUADRANGULARIS* DRIED STEM

Miss Sintip Vudhironarit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-1136-7

471616

สินทิพ วุฒิธฤฤทธิ์ : ฤทธิ์ระงับปวดของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลจากต้นเพชรสังฆาต. (ANALGESIC EFFECTS OF THE ETHANOLIC EXTRACT FROM *CISSUS QUADRANGULARIS* DRIED STEM) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ร.ท.หญิง ภัสราภา โทวิวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. นิจศิริ เรืองรังษี 109 หน้า. ISBN 974-53-1136 -7.

ได้มีการนำต้นเพชรสังฆาตซึ่งเป็นไม้เลื้อยขนาดเล็กมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านในการรักษาโรคริดสีดวงทวาร ในการทดลองครั้งนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ระงับปวดของสิ่งสกัดจากต้นเพชรสังฆาตขนาดต่างๆกันในหนูถีบจักร โดยทดลองวางหนูถีบจักรไว้บนแผ่นร้อนและจับเวลาที่หนูถีบจักรสามารถทนอยู่บนแผ่นร้อนได้ (Hot-plate test) ทั้งก่อนและหลังฉีดน้ำเกลือ มอร์ฟีน (10 มก./กก.) แอสไพรีน (150 มก./กก.) หรือสิ่งสกัดจากต้นเพชรสังฆาต ขนาด 43.5, 87.5, 175, 350 และ 700 มก./น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที โดยเวลาสูงสุดที่อนุญาตให้หนูถีบจักรอยู่บนแผ่นร้อนเท่ากับ 45 วินาที และนำเวลาที่หนูถีบจักรสามารถทนต่อความร้อนได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์สูงสุดที่หนูถีบจักรสามารถทนต่อความร้อนได้ (%MPE) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟระหว่าง %MPE และเวลา (area of analgesia) จากการทดลองพบว่า สิ่งสกัดทุกขนาดที่ใช้ในการทดสอบสามารถทำให้หนูถีบจักรทนต่อความร้อนได้นานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูถีบจักรจะสามารถทนต่อความร้อนได้เพิ่มขึ้นตามขนาดของสิ่งสกัดที่สูงขึ้น โดยฤทธิ์ระงับปวดของสิ่งสกัด (175, 350 และ 700 มก./กก.) ถูกยับยั้งได้ด้วยนาแลทริกโซน แสดงว่าสิ่งสกัดจากต้นเพชรสังฆาตน่าจะออกฤทธิ์ผ่านวิถีของ opioid ในการทดลองที่ทำให้หนูเกิดความเจ็บปวดด้วยความร้อนโดยการส่องไฟที่หางของหนูถีบจักร (tail-flick test) และจับเวลาที่หนูถีบจักรสามารถทนต่อความร้อนได้จนกระทั่งกระดกหางหนี (เวลาสูงสุดที่อนุญาตให้ส่องไฟที่หางหนูเท่ากับ 4 วินาที) พบว่าสิ่งสกัดขนาดตั้งแต่ 87.5 มก./กก. ขึ้นไป สามารถเพิ่มเวลาที่หนูทนความร้อนโดยไม่กระดกหางหนีได้นานขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการทดสอบ 7 ครั้งภายในเวลา 4 ชั่วโมงหลังให้สารทดสอบ

ในการทดสอบที่ทำให้หนูขาวเจ็บปวดโดยใช้แรงกดบนอุ้งเท้าหลังของหนูขาว (Randall Selitto test) และเปรียบเทียบน้ำหนักของแรงกดที่หนูขาวสามารถทนได้ก่อนและหลังให้น้ำเกลือ มอร์ฟีน แอสไพรีน หรือสิ่งสกัดจากต้นเพชรสังฆาต ขนาด 43.5- 700 มก./น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง ที่เวลา 15, 30, 45, 60, 90, 120 และ 240 นาที พบว่าสิ่งสกัดในขนาดตั้งแต่ 175 มก./กก. ขึ้นไปมีฤทธิ์ระงับปวดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการทดสอบฤทธิ์ระงับปวดของสิ่งสกัดในหนูขาวที่ทำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหลังข้างขวาด้วยคาร์จาจิน พบว่าเมื่อฉีดน้ำเกลือ มอร์ฟีน อินโดเมทาซิน (5 มก./กก.) หรือสิ่งสกัดขนาด 43.5-700 มก./กก. เข้าทางช่องท้องก่อนฉีดคาร์จาจินแน และทำการทดสอบแรงกดอุ้งเท้าทั้งสองข้างที่หนูขาวสามารถทนได้หลังจากฉีดคาร์จาจินแน 2 ชั่วโมง พบว่า สิ่งสกัดขนาด 300 และ 700 มก./กก. ทำให้หนูขาวสามารถทนต่อแรงกดที่อุ้งเท้าข้างที่ถูกทำให้เกิดการอักเสบได้เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า สิ่งสกัดจากต้นเพชรสังฆาตมีฤทธิ์ระงับปวด และฤทธิ์ระงับปวดจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของสิ่งสกัดที่เพิ่มขึ้นและกลไกการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับตัวรับของ opioid

สาขาวิชา เภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่ออนิสิต.....สินทิพ วุฒิธฤฤทธิ์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ภ.ท.หญิง ภัสราภา โทวิวัฒน์.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....นิจศิริ เรืองรังษี.....

#4589170320 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *Cissus quadrangularis*/ ANALGESIA/ HOT-PLATE/ TAIL-FLICK/ PAW PRESSURE

SINTIP VUDHIRONARIT: ANALGESIC EFFECTS OF THE ETHANOLIC EXTRACT FROM *CISSUS QUADRANGULARIS* DRIED STEM. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. LT. PASARAPA TOWIWAT, PH.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. NIJSIRI RUANGRUNGSI, PH.D., 109 pp. ISBN 974-53-1136 -7.

Cissus quadrangularis Linn. (Phet-Cha-Sung-Khat), a rambling shrub, has been widely used in folk medicine for hemorrhoid treatment. In these studies, we initially determined the analgesic property of a range of the crude extract of *C. quadrangularis* dried stems (CQ) doses in the mouse hot-plate test. Hot-plate latencies (cut-off 45 sec) were determined in male ICR mice prior to the intraperitoneal (i.p.) administration of 0.9% normal saline solution (NSS), morphine (MO: 10 mg/kg), acetylsalicylic acid (ASA: 150 mg/kg) or various doses of CQ (43.75, 87.5, 175, 350, and 700 mg/kg). Hot-plate latencies were subsequently determined at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min. The mean percent maximum possible effect (%MPE) was calculated and used in the determination of the area of analgesia (%MPE-min). All doses of CQ produced a dose-dependent analgesic response. CQ (175-700 mg/kg) produced analgesic response that was naltrexone-sensitive suggesting opioid-mediated mechanism. In the mouse tail-flick analgesia test, tail-flick latencies (cut-off 4 sec) were determined in male ICR mice prior to the i.p. administration of NSS, MO, ASA or various doses of CQ (43.75-700 mg/kg) and subsequently determined at 7 intervals over a four-hour period. CQ in doses of 87.5 mg/kg and higher produced a significant dose-related analgesic response.

Studies then determined the analgesic effect of CQ using the Randall-Selitto analgesia test. Paw-pressure latencies were determined in male Wistar rats prior to i.p. administration of NSS, MO, ASA or various doses of CQ (43.75- 700 mg/kg). Paw-pressure latencies were subsequently determined at 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240 min. CQ doses of 175 mg/kg and higher produced a significant dose-related analgesic response. Paw-pressure latencies were also determined in male Wistar rats prior to the i.p. administration of NSS, MO, Indomethacin (5 mg/kg) or various doses of CQ (43.75- 700 mg/kg). Carrageenan was then administered into subplantar area of a right hind paw to induce inflammatory response. Withdrawal threshold were determined 2 hours after carrageenan administered on both inflamed and non-inflamed paw. CQ doses of 350 and 700 mg/kg produced significant analgesic responses in the inflamed paw. Taken together these results demonstrate that the crude extract of *C. quadrangularis* dried stems produced analgesic effect that was dose-dependent in all analgesic testing models and mechanism of action seems to be related to opioid receptor.

Field of study Pharmacology
Academic year 2004

Student's signature.....*Sintip Yudhironarit*
Advisor's signature.....*Pasarapa Towiwat*
Co-advisor's signature.....*Nijsiri Ruangrungsi*

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and appreciation to my advisor, Assistant Professor Lieutenant Dr. Pasarapa Towiwat, for her intensive advice, guidance, comments and encouragement during my research study. Thanks are also extended to the committee member: Associate Professor Dr. Boonyong, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, Associate Professor Chandhanee Itthipanichpong and Associate Professor Supatra Srichairat for their guidance, helpful and useful comments.

I wish to thank Dr. Nijisiri Ruangrunsi, my thesis co-advisor for his valuable advice and help with *C. quadrangularis* extraction for this study.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong for her kind assistance in identification technique.

I also would like to thank all staff members in Inter-Department of Pharmacology, The Graduate School, Chulalongkorn University for their helps.

Finally, I would like to thank my family, my partner-lab and my friend for their helpful, advice and encouragement throughout my thesis study.

This work was supported partly by the Graduate School, Chulalongkorn University.

CONTENTS

	Page
ABSTRACTS (THAI)	IV
ABSTRACT (ENGLISH)	V
ACKNOWLEDGEMENTS	VI
CONTENTS	VII
LIST OF TABLES	X
LIST OF FIGURES	XI
LIST OF ABBREVIATIONS	XIV
CHAPTER	
I INTRODUCTION	
Pain	1
Background and Rationale	7
Purpose of the Study	9
Hypothesis	9
Expected Benefit and Application	9
II LITERATURE REVIEW	
<i>Cissus quadrangularis</i>	10
Analgesic Testing Model	23
III MATERIALS AND METHODS	
Experimental animals	30
Preparation of the crude extract of <i>Cissus quadrangularis</i>	30
Chemical Identification Test (TLC)	32
Chemicals	33
Experimental methods	34
Data treatment and analyse	38
IV RESULTS	
Mouse Hot-plate Test	43
Mouse Tail-flick Test	65

CONTENTS (CONT.)

	Page
Rat Paw-pressure Test.....	72
Rat Inflamed Paw-pressure Test.....	70
V DISCUSSION & CONCLUSION.....	85
REFERENCES.....	89
APPENDICES	
Appendix A.....	95
Appendix B.....	97
Appendix C.....	99
Appendix D.....	101
Appendix E.....	103
Appendix F.....	105
Appendix G.....	107
VITAE.....	109

LIST OF TABLE

Table	page
E-1. %MPE-Time in Hot-plate test 0-240 min of CQ dose 43.5-700 mg/kg i.p.....	96
E-2. %MPE-Time in Tail-flick test 0-240 min of CQ dose 43.5-700 mg/kg i.p.....	98
E-3. %MPE-Time in Paw-pressure test 0-240 min of CQ dose 43.5-700 mg/kg i.p.....	100
E-4. Δ withdrawal threshold in inflamed Paw-pressure test 0-240 min of CQ dose 43.5-700 mg/kg i.p.....	102
E-5. %MPE-Time in Hot-plate test 0-240 min of NSS, Naloxone (NAL; 1 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NAL + CQ (1/175, 1/350, 1/700 mg/kg) i.p.....	104
E-6. %MPE-Time in Hot-plate test 0-240 min of NSS, Naltrexone (NALT; 5 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NALT + CQ (175, 350 and 700 mg/kg) i.p.....	106
E-7. %MPE-Time in Hot-plate test 0-240 min of NSS, NMDA (0.38 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NMDA + CQ (0.38/175, 0.38/350, 0.38/700 mg/kg) i.p.....	108

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2-1	<i>C. quadrangularis</i> Linn.....	12
2-2	Structures of compounds identified in <i>C. quadrangularis</i>	13
2-3	Hot-plate analgesia meter and Tail-flick analgesia meter.....	27
2-4	Paw pressure analgesia meter.....	30
4-1	The chromatogram of the crude extract from <i>C. quadrangularis</i> used in this study.....	40
4-2	The chromatogram of the crude extract from <i>C. quadrangularis</i> used as reference.....	41
4-3	The TLC plate of the crude extract from <i>C. quadrangularis</i> spraying with the mixture solution of anisaldehyde-sulfuric acid.....	42
4-4	AUC of NSS and morphine in mouse hot-plate test.....	45
4-5	AUC of NSS and ASA in mouse hot-plate test.....	46
4-6	AUC of NSS and various doses of CQ in mouse hot-plate test.....	47
4-7	AUC of NSS, morphine, acetylsalicylic acid, and various doses of CQ in mouse hot-plate test.....	48
4-8	Linear coefficient (r^2) of CQ (43.5-700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	49
4-9	Linear coefficient (r^2) of CQ (43.5-350 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	50
4-10	Linear regression of %MPE (Probit unit) at 90 minutes after i.p. various doses of CQ (83.5-700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	51
4-11	Individual time courses of the response (%MPE versus time (min)) after i.p. of various doses of CQ in mouse hot-plate test.....	52
4-12	AUC of NSS, Naloxone (NAL; 1 mg/kg), CQ (175 mg/kg), and NAL + CQ (1/175 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	53
4-13	AUC of NSS, Naloxone (NAL; 1 mg/kg), CQ (350 mg/kg), and NAL + CQ (1/350 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	54
4-14	AUC of NSS, Naloxone (NAL; 1 mg/kg), CQ (700 mg/kg), and NAL + CQ (1/700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	55

LIST OF FIGURES (CONT.)

xi

Figure		Page
4-15	AUC of NSS, Naloxone (NAL; 1 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NAL + CQ (1/175, 1/350, 1/700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	56
4-16	AUC of NSS, Naltrexone (NALT; 5 mg/kg), CQ (175 mg/kg), and NALT + CQ (175 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	57
4-17	AUC of NSS, Naltrexone (NALT; 5 mg/kg), CQ (350 mg/kg), and NALT + CQ (350 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	58
4-18	AUC of NSS, Naltrexone (NALT; 5 mg/kg), CQ (700 mg/kg), and NALT + CQ (700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	59
4-19	AUC of NSS, Naltrexone (NALT; 5 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NALT + CQ (175, 350 and 700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	60
4-20	AUC of NSS, NMDA (0.38 mg/kg), CQ (175 mg/kg), and NMDA + CQ (0.38/175 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	61
4-21	AUC of NSS, NMDA (0.38 mg/kg), CQ (350 mg/kg), and NMDA + CQ (0.38/350 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	62
4-22	AUC of NSS, NMDA (0.38 mg/kg), CQ (700 mg/kg), and NMDA + CQ (0.38/700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	63
4-23	AUC of NSS, NMDA (0.38 mg/kg), CQ (175, 350 and 700 mg/kg), and NMDA + CQ (0.38/175, 0.38/350, 0.38/700 mg/kg) in mouse hot-plate test.....	64
4-24	AUC of NSS and morphine in mouse tail-flick test.....	66
4-25	AUC of NSS and acetylsalicylic acid in mouse tail-flick test.....	67
4-26	AUC of NSS and CQ various doses in mouse tail-flick test.....	68
4-27	AUC of NSS, morphine, acetylsalicylic acid, and CQ various doses in mouse tail-flick test.....	69
4-28	Linear coefficient (r^2) of CQ (43.5-700 mg/kg) in mouse tail-flick test.....	70
4-29	Individual time courses of the response (%MPE versus time (min)) after i.p. of various doses of CQ in mouse tail-flick test.....	71
4-30	AUC of NSS and morphine in rat paw-pressure test.....	73

LIST OF FIGURES (CONT.)

xii

Figure		Page
4-31	AUC of NSS and acetylsalicylic acid in rat paw-pressure test.....	74
4-32	AUC of NSS and CQ various doses in rat paw-pressure test.....	75
4-33	AUC of NSS, morphine, acetylsalicylic acid, and CQ various doses in rat paw-pressure test.....	76
4-34	Linear coefficient (r^2) of CQ (43.5-700 mg/kg) in rat paw-pressure test.....	77
4-35	Individual time courses of the response (%MPE versus time (min)) after i.p. of various doses of CQ in rat paw-pressure test.....	78
4-36	AUC of NSS and morphine in rat inflamed paw-pressure test.....	79
4-37	AUC of NSS and IND in rat inflamed paw-pressure test.....	80
4-38	AUC of NSS and CQ various doses in rat inflamed paw-pressure test.....	81
4-39	Mean different pressure between NSS, CQ, MO, and indomethacin in rat inflamed paw-pressure test.....	82
4-40	Linear coefficient (r^2) of CQ (43.5-700 mg/kg) in rat inflamed paw-pressure test.....	83

LIST OF ABBREVIATIONS

μm	= micrometer
m/sec	= metre per second
β	= beta
$^{\circ}\text{C}$	= degree of Celsius
μl	= microlitre
α	= alpha
Ca^{2+}	= calcium ion
K^{+}	= potassium ion
PEA	= palmitoylethanolamide
IASP	= International Association for the Study of Pain
%MPE	= percentage of the maximum possible effect
/	= per
min	= minute
cm	= centimetre
g	= gram
h	= hour
ml/kg	= millilitre per kilogram
mg/kg	= milligram per kilogram
i.p.	= intraperitoneal
sec	= second
et al.	= et alii (and other)
N	= sample size
AUC	= area under the curve
L	= litre
ED_{50}	= median effective dose
AUC	= area under the curve (area of analgesia)
CQ	= the crude extract from <i>Cissus quadrangularis</i> dried stem

LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)

MO	= Morphine
ASA	= acetylsalicylic acid
NAL	= Naltrexone
NALT	= Naltrexone
NMDA	= N-methyl-D-aspartate