

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเฮกเซนที่แยกได้จากหญ้าลั่นทม
STUDY OF CYTOTOXICITY ON CANCER CELLS OF CRUDE HEXANE
EXTRACT FROM *HEDYOTIS CORYMBOSA* LAMK.

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล

ดร.จินดา เต็มบรรจง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ดร.พรทิพา ทิชา

กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

615.32352
ส815ร

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเฮกเซนที่แยกได้จากหญ้าฉันทนาม
STUDY OF CYTOTOXICITY ON CANCER CELLS OF CRUDE HEXANE
EXTRACT FROM *HEDYOTIS CORYMBOSA* LAMK .

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร.สุนันท์ ชัยชนะกุล

ดร.จินดา แต่มบรรจง

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ดร.พรทิพา ทิชา

กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2545

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P 388 ของสารสกัดเฮกเซนจากหญ้าลิงงู มีค่า ED_{50} เท่ากับ 30 $\mu\text{g/mL}$ จากการนำสารสกัดเฮกเซนมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ คอลัมน์ได้ aurantiamide acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P 388 ด้วยค่า ED_{50} > 100 $\mu\text{g/mL}$ และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง อีก 3 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 7.20 17.00 and 21.00 $\mu\text{g/mL}$

Abstract

The crude hexane extract from *Hedyotis corymbosa* Lamk. was tested for cytotoxicity against P388 leukemic cells. The ED_{50} of the hexane extract was 30 $\mu\text{g/mL}$. The hexane extract was purified by chromatographic techniques to afford aurantiamide acetate with ED_{50} over 100 $\mu\text{g/mL}$ and other three minor toxic fractions with ED_{50} values of 7.20 17.00 and 21.00 $\mu\text{g/mL}$,

ประกาศคุณูปการ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายแพทย์ สมหมาย ทองประเสริฐที่ให้การสนับสนุนจัดหา
สมุนไพร ขอขอบคุณ คุณอรัญญา งามขำและคุณสุธานุช อ่อนดี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ขอขอบคุณ
สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณมหาวิทยาลัย
ศรีนครินทรวิโรฒ ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	4
ความสำคัญของงานวิจัย	4
ขอบเขตของงานวิจัย	5
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	13
อุปกรณ์ / เครื่องมือและสารเคมี	13
การสกัดสารจากหญ้าฉันทน์ การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์	14
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	14
4 ผลการวิจัย	
ผลการสกัดสารจากหญ้าฉันทน์	17
ผลการแยกสารสกัด hexane และทำให้บริสุทธิ์	17
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	25
5 สรุปผล และอภิปรายผล	35
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	45

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มะเร็ง (malignant tumor or cancer) เป็นเนื้องอกชนิดร้ายเกิดเนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกลายเป็นก้อนเนื้อใหญ่ หรือที่เรียกกันว่าเนื้องอก (tumors) ถ้าเป็นเนื้องอกชนิดร้ายจะมีการเจริญเติบโตรุกราน (invasion) และแพร่กระจาย (metastasis) ไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่น ๆ ได้ มะเร็งระยะแรกจะไม่มีอาการเจ็บปวด ได้มีการศึกษาและพบหลักฐานหลายอย่างที่ยืนยันว่าไวรัสก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง ไวรัสที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งในคนนั้นมักจะทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง (transformation) ได้ในหลอดทดลอง เรียกไวรัสเหล่านั้นว่า tumor virus หรือ oncogenic virus พบว่ามีทั้งชนิดที่เป็น DNA และ RNA virus

สมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในการต่อต้านเซลล์เนื้องอกนอกเหนือไปจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งยาหลายชนิดมีฤทธิ์แรงและออกฤทธิ์ที่ phase จำเพาะของ cell cycle จึงมีฤทธิ์เฉพาะต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว แต่ยาที่ใช้กันจะมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่นกัน จึงทำให้มีข้อจำกัดในการรักษาด้วยเคมีบำบัด บทบาทของสมุนไพรที่มีมานานจึงมีแนวโน้มมาเกี่ยวข้องมากขึ้นจะเห็นได้จากชาวจีน สมัยก่อนได้นำสาร podophyllum ที่มีเรซินจากรากและเหง้าของ *Podophyllum peltatum* และ *Podophyllum emodi* สาร lignan และสารพวงกลัยโคไซด์ใน podophyllum ถูกนำมารักษามะเร็งของอวัยวะและ small-cell lung cancer ในยุคต่อ ๆ มาได้มีการใช้น้ำคั้นจากสวนเนื้อไม้ของพืชสกุลมะเขือรักษาเนื้องอก หูด ยังพบอีกว่ามีการนำเห็ดรา หลายชนิด เช่น *Cladonia* sp. และ *Usnea* sp. ซึ่งให้สาร usnic acid มาใช้เป็นยาพื้นบ้านรักษาโรคมะเร็ง สารโปรตีนที่สกัดได้จาก *Viscum album* แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์เนื้องอก นอกจากนี้ mezeirin ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท diterpene จาก *Daphne mezereum* ก็แสดงฤทธิ์ในทำนองเดียวกัน การใช้ยาบำบัดมะเร็งต้องพิจารณาถึงประเภทของเนื้องอก ขนาด ตำแหน่งที่เป็น การกระจายตัว และระยะการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกด้วย

สารที่ผ่านการทดลองแล้วว่าเป็นสารแสดงฤทธิ์มักจะเป็นสารธรรมชาติที่ค่อนข้างใหม่ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้าง แต่ก็มีสารเพียงไม่กี่ชนิดของแต่ละโครงสร้างนั้น ๆ ที่น่าสนใจและนำไปศึกษาต่อในขั้นทดลองทางคลินิกหรือกำลังอยู่ในขั้นพัฒนาเพื่อนำไปทดลองทางคลินิกต่อไป เช่น ศึกษาวิธีการแยกสกัดสารให้มีปริมาณมากพอ การพัฒนารูปแบบตำรับที่มีประสิทธิภาพทางการรักษา พบว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีพวกแอลคาลอยด์และไดเทอร์ปีน เป็นกลุ่มที่มี

การศึกษาวิจัยอย่างมาก จนบางสารได้ผ่านเข้าไปในการทดลองทางคลินิก phase II สมุนไพรที่นำมาศึกษาและน่าสนใจเหล่านี้ เช่น

Bruceantin ได้จาก *Brucea antidysenterica* และ *B.javanica* (ราชดัด) เป็นสารประกอบพวก quassinoid มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ในปริมาณต่ำมากได้ผลในการรักษาน้อย กลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ polyphenylamine ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดผลกระทบต่อการสังเคราะห์ DNA

Camptothecin ได้จากสมุนไพรจีน *Camptotheca acuminata* วงศ์ Nyssaceae ซึ่งจีนใช้สมุนไพรนี้รักษามะเร็งชนิดต่างๆ มาแต่โบราณ ปัจจุบันผลิตได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *C.acuminata* และยังสามารถสกัดได้จากต้น *Mappia foetida* อีกด้วย ได้มีการทดลองทางคลินิกในโรคมะเร็งกระเพาะอาหารและ malignant อื่น ๆ ซึ่งได้ผลพอสมควรในสหรัฐอเมริกา แต่ก็มีอาการข้างเคียงไม่พึงประสงค์ การทดลองในจีนพบว่าใช้ได้ดีกับมะเร็งตับ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เจาะจงต่อ topoisomerase I

Ellipticine และ 9-methoxyellipticine ได้จาก *Ochrosia elliptica* O. moorei และ *Bleekeria coccinea* วงศ์ Apocynaceae ถูก metabolize ในร่างกายได้ 9-hydroxyellipticine ซึ่งเป็นสารแสดงฤทธิ์ สารนี้ให้ผลดีในการรักษามะเร็งเต้านมและมีผลตอบสนองกับมะเร็งที่โตด้วยกลไกการออกฤทธิ์เนื่องจากโมเลกุลสามารถแทรกตัวเข้าไประหว่าง base pair ใน DNA ได้เป็น intercalation และยังใช้ร่วมกับยาอื่นที่มีฤทธิ์ myelotoxic ได้เนื่องจากไม่มีฤทธิ์กดไขกระดูก

Homoharringtonine และ Harringtonine ได้จากพืชสกุล *Cephalotaxus* ที่มีในประเทศไทยคือ *C.griifithii* Hook หรือมะขามป้อมตง และจากสมุนไพรจีนคือ *C.harringtonia* สารดังกล่าวเป็น ester ของ cephalotaxine ซึ่งใช้ได้ในภาวะ myeloblastic leukemia และ monoblastic leukemia ชนิดเฉียบพลัน ในจีนได้รายงานว่าผู้ป่วยที่ทานยารักษามะเร็งเม็ดโลหิตชนิดอื่นมีการตอบสนองทางการรักษาที่ดีต่อสารทั้งสองนี้ กลไกการออกฤทธิ์พบว่าสารพวกนี้เป็น cell cycle nonspecific phase

Indicine-N-oxide ได้จาก *Heliotropium indicum* หรือหญ้างวงช้าง มีฤทธิ์ต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน และคาดว่าจะได้ผลกับมะเร็งลำไส้ใหญ่ผลจากการศึกษาใน phase II พบว่าให้ผลดีกับ acute leukemia แต่มีพิษต่อดับ

Maytansine ได้จาก *Maytenus serrata* วงศ์ Celastraceae เป็นสาร macrolide ที่มีผลต่อ neoplasm ขนาดที่ใช้ต่ำ ๆ กลไกการออกฤทธิ์เป็น antimitotic คล้ายแอลคาลอยด์ของแพงพวยฝรั่ง

Phyllanthoside ได้จากราก *Phyllanthus acuminatus* วงศ์ Euphorbiaceae ไม้สกุลเดียวกับลูกใต้ใบมะยม โครงสร้างอยู่ในรูปไกลโคไซด์ของ sesquiterpene มีฤทธิ์ต้าน B16 melanoma phyllanthoside

Taxol ได้จากเปลือกต้น *Taxus brevifolia* Nutt วงศ์ Taxaceae เป็นสารประเภท diterpene ที่เป็น tricyclic 6-8-6 ring system มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้ง B6-melanoma, L1210 Leukemia และ human tumor xenografts ให้ผลดีกับมะเร็งรังไข่และมะเร็งเต้านม โดย FDA รับรองให้ใช้รักษามะเร็งรังไข่ กลไกการออกฤทธิ์ของ Taxol จะไปยับยั้ง mitosis ที่ไม่เหมือนสาร antimitotic อื่น โดยสามารถเกาะและเพิ่มความคงตัวให้กับ microtubule มีผลต่อการชะลอการแบ่งตัวของเซลล์

Triptolide ได้จากรากของ *Tripterygium wilfordii* Hook วงศ์ Celastraceae โครงสร้างเป็นสาร terpene lactone ที่เป็น diterpene triepoxide มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่มีความเป็นพิษสูง มีการนำไปใช้เป็นยาฆ่าแมลงในบางโอกาส กลไกในการออกฤทธิ์จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA

Vincristine และ vinblastine ได้จาก *Madagascan periwinkle* หรือ แพงพวยฝรั่ง เป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะมาดากัสการ์มีปลูกอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดแอลคาลอยด์ vincristine ในรูป SO_4 ใช้ได้ผลดีในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันในเด็ก ส่วน vinblastine ใช้ร่วมกับ bleomycin cisplatin ใช้ในการรักษา disseminated nonseminomatous testicular cancer กลไกในการออกฤทธิ์เป็น antimitotic agent และเป็น M-phase specific ในวงจรชีวิต

การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านมะเร็งนั้นนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง จะเห็นได้จากสารที่ได้กล่าวนำมาแล้วข้างต้น ถึงแม้เราจะทราบโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง รวมทั้งพิษต่อเซลล์ในร่างกายความเข้าใจในเรื่องวงจรชีวิต ปัจจัยต่าง ๆ ที่ควบคุม cell เข้าสู่วงจรชีวิตก็มีส่วนสำคัญ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการรักษามะเร็งที่เจริญขึ้นเนื่องจากฤทธิ์ของยาต้านมะเร็งมีความสัมพันธ์กับวงจรชีวิต และการแบ่งตัวของเซลล์ก็ยังสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีอีกด้วย ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้สารบำบัดโรคมะเร็งที่มีศักยภาพ จึงต้องอาศัยการค้นคว้าวิจัยจากพืชสมุนไพรพร้อมกับการศึกษารายละเอียดของความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างกับการออกฤทธิ์ (ประพิมพ์พัคตร์ เกื่อนสุคนธ์, 1994)

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะพรรณพืชสมุนไพรและความหลากหลายทางวัฒนธรรมและภูมิปัญญาพื้นบ้าน มีการใช้สมุนไพรบำบัดโรคภัยไข้เจ็บสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก พันธุ์พืชสมุนไพรที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง เช่น ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz.) ผักคาวทอง (*Houttuynia cordata* Thunb.) แพงพวยฝรั่ง (*Cartharanthus roseus* G.Don) หนุ่ปากกิ้ง (*Commelina* sp.) แก้วแฉ (*Maclura cochinchinensis*) (Lour) Corn.) รา ข ดัด (*Brucea amarissima* Desv.) คองคาเดือด (*Arfevillea arborescens* Pierre.) พญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris* R.Br.)

ดองดิง (*Gloriosa superba* Linn.) และหน้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) (ดร.ณ เพ็ชรพลาย, ญัตติรา จันทรสุวานิชย์ และชาติรี ชาญประเสริฐ. 2538: 96) การพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยา เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศส่วนหนึ่ง กล่าวคือ เมื่อสมุนไพรบางชนิดได้รับการพัฒนาใช้เป็นยาแล้วประชาชนนิยมอย่างแพร่หลายก็จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้ และสามารถลดการนำเข้ายาบางส่วน

หน้าลิ้นงูเป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hedyotis corymbosa* Lamk. จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในสมุนไพรหลายชนิดที่มีการอ้างอิงในตำรับยารักษาโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคอื่นๆ เช่น ยาแก้ไข้มาลาเรีย แก้ลำไส้อักเสบ ล้างแผลฝีบวม แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก (วิทย์ เทียงบุญธรรม.2531:811)

จากรายงานวิจัยทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรตำรับหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) E well) หน้ापีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} มากกว่า $30 \mu\text{g/mL}$ และสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดและยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pornsiriprasert.1986:abstract) ต่อมาได้เพิ่มหน้าลิ้นงูลงไปในสมุนไพรตำรับนี้ ยาสมุนไพรตำรับนี้เชื่อว่าจะให้ผลในการรักษามะเร็งหลายชนิด

จากข้อมูลดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกหน้าลิ้นงูมาศึกษาเพื่อหาสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง เพื่อที่จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็งของหน้าลิ้นงูก่อนที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาด้านมะเร็งในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารสำคัญจากการสกัด hexane ที่ได้จากหน้าลิ้นงู
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารบริสุทธิ์
2. ได้ข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นหรือในสัตว์ทดลอง
3. ได้สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

1. นำสารสกัด hexane มาแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี
2. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และสารที่แยกได้โดยใช้เซลล์มะเร็ง P388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง
3. ศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

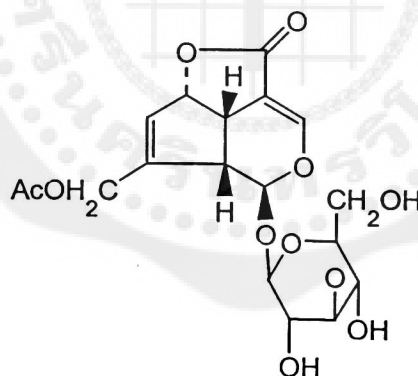


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญาลิ้นงูเป็นสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hedyotis corymbosa* Lamk. (เต็ม สมิตินันท์.2545 :172) จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่ออื่นๆ จั๋งจี้เช่า สู้ยเจียบฉ่าว หญาลิ้นงูเป็นพืชล้มลุก ลำต้นเลื้อยยาวไปตามผิวดินยาวประมาณ 6-20 นิ้ว แตกกิ่งก้านสาขามาก ใบรูปหอกแคบเล็กเรียวแหลม ดอกเล็กสีขาว ลักษณะเป็นกรวยแยก 4 กลีบ ออกดอกตามซอกใบ ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด หญาลิ้นงูมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น ลำต้นสดนำมาต้มน้ำรับประทานแก้ไข้มาลาเรีย ลำไส้อักเสบ และนำน้ำต้มมาพอกแผลฝีบวม แผลไฟไหม้ (วุฒิ วุฒิธรรม-เวช.2540 : 469)

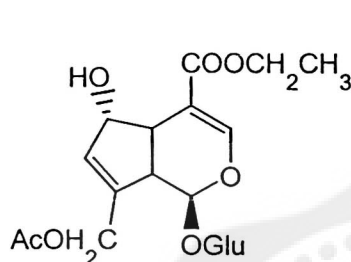
ปี ค.ศ. 1981 ได้มีรายงานการสกัดสารจากหญาลิ้นงู พบ iridoids 6 ชนิด ได้แก่ asperuloside scandoside methyl ester asperrulosidic acid scandoside geniposide acid และ deacetyl asperulosidic acid (Takagi,et al.1981:657-659)



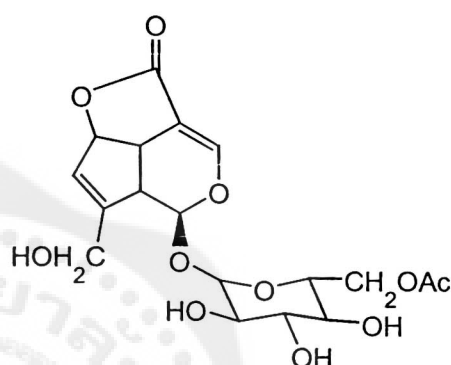
สูตรโครงสร้างของ asperuloside

ปี ค.ศ. 1997 ได้มีการศึกษาฤทธิ์ของ geniposidic acid และ geniposide ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Hedyotis diffusa* และ *Hedyotis corymbosa* พบว่าเมื่อนำมาศึกษาเกี่ยวกับการฉายรังสีสามารถขลอการเจริญของเนื้องอกในหนูสายพันธุ์ ICR ที่ได้รับการปลูกถ่าย sarcoma – 180 พบว่า geniposidic acid มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเนื้องอกมากกว่า geniposide และเพิ่มปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (Hsu,et al.1993:31-37)

ปี ค.ศ.1999 ได้มีการสกัดแยกสารจากต้น *Hedyotis chrysotricha* โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย และนำสารสกัดที่ได้มาละลายน้ำ นำส่วนที่ละลายน้ำมาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ irdoids glucosides 2 ชนิด ได้แก่ asperusidic acid ethyl ester และ 6-acetyl deacetyl asperuloside (Peng ,Feng&Liang , 1999:611-612)



asperusidic acid ethyl ester



6-acetyl deacetyl asperuloside

สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. chrysotricha*

การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรต้านเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ต้นไผ่เด็จนหัว (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Ewell) หญ้าปักไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) โดยนำสมุนไพรตำรับนี้มาสกัดด้วยน้ำ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED₅₀ มากกว่า 30 µg/mL ส่วนฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมในหนูขาว โดยให้หนูขาวได้รับสารก่อมะเร็ง 7, 12 - Dimethylbenzanthracene (7, 12 - DMBA) จำนวน 130 mg/kg พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพรสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอด ($p = 0.041$) และยืดอายุหนูได้ ($p = 0.025$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพร แต่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของขนาดมะเร็งได้ทางสถิติ ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้ไม่มีความเป็นพิษในระดับความเข้มข้นสูงถึง 10000 mg/kg โดยการกิน (Pornsiriprasert. 1986 : abstract)

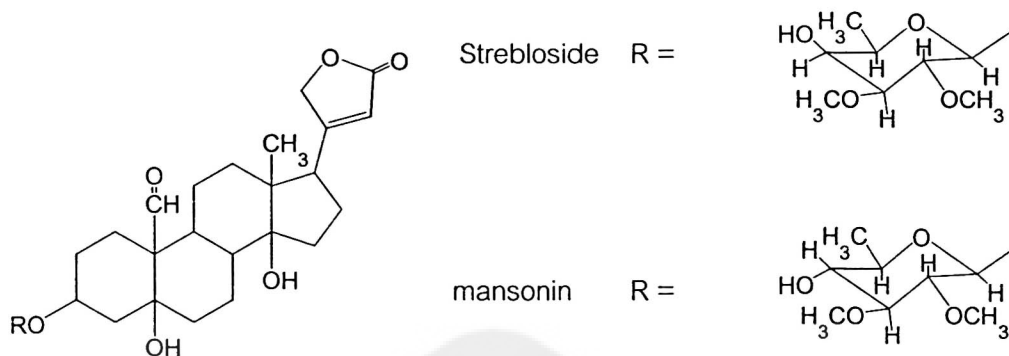
การศึกษาฤทธิ์ด้านมะเร็งของสมุนไพรอีกตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ไฟเดือนห้า หนุ่ยป่าไก่ดำ เหง้าพุทธรักษา เหง้าข้าวเย็นเหนือ และต้นลิ้นงูเห่า ส่วนที่ได้จากสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เกล็ดนิ่ม (*Manis javanica* Desmarest) ขนเม่น (*hystrix brachyura* Linn.) กระดองเต่า (*Damonia subtrijuca* Boulenger) เจี๋ยงกระเบน (*Dasyatis* spp.) และออกตะพานน้ำ (*Trionyx cartilagineus* Boulenger) พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลองที่ค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนการทดลองกับหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมโดยให้หนูกินสารก่อมะเร็ง 7, 12 DMBA พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำสกัดจากสมุนไพร 1500 mg/kg ของน้ำหนักร่างกาย สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 4 สัปดาห์แรก และมีผลช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำสกัดจากสมุนไพร นอกจากนี้การศึกษาพิษวิทยาของน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้ โดยให้สัตว์ทดลองกินน้ำสกัดประมาณ 1500 mg/kg ของน้ำหนักร่างกาย ติดต่อกัน 6 เดือน พบว่าไม่เกิดพิษทางการโลหิตทางพยาธิสภาพของเซลล์ และทางเคมีของเลือด ส่วนการศึกษาพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง พบว่าเมื่อให้สัตว์ทดลองกินน้ำสกัด 15000 mg/kg ของน้ำหนักร่างกาย เพียงครั้งเดียว ไม่มีสัตว์ทดลองตาย ส่วนค่า LD_{50} จากการฉีดน้ำสกัดจากสมุนไพรเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว มีค่าเท่ากับ 1350 mg/kg ของน้ำหนักร่างกาย (Na Bangchang. 1987 : abstract)

การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่เกศรา ณ บางช้าง ศึกษา (Na Banchang. 1987 : abstract) พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกลด์และจากการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ามีการเพิ่มความสามารถในการทำงานของ Natural Killer cells (NK cells) ต่อการทำลาย Yac - 1 cell (Lymphoma cells) ในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ NK cells (Wiwatwithaya. 1992 : abstract)

การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด และสัตว์ 5 ชนิด ตามที่สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา ศึกษา (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) โดยนำสมุนไพรตำรับนี้มาศึกษาฤทธิ์การทำงานของ NK cells ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเต้านม โดยให้ผู้ป่วยรับประทานน้ำสกัดจากสมุนไพรนาน 2 สัปดาห์ พบว่าความสามารถ NK cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการศึกษากการทำงานของ Monocyte/Macrophages ในการหลั่ง TNF - α พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของ Monocyte/Macrophages ในการหลั่ง TNF - α ได้ (Thisoda. 1995 : abstract)

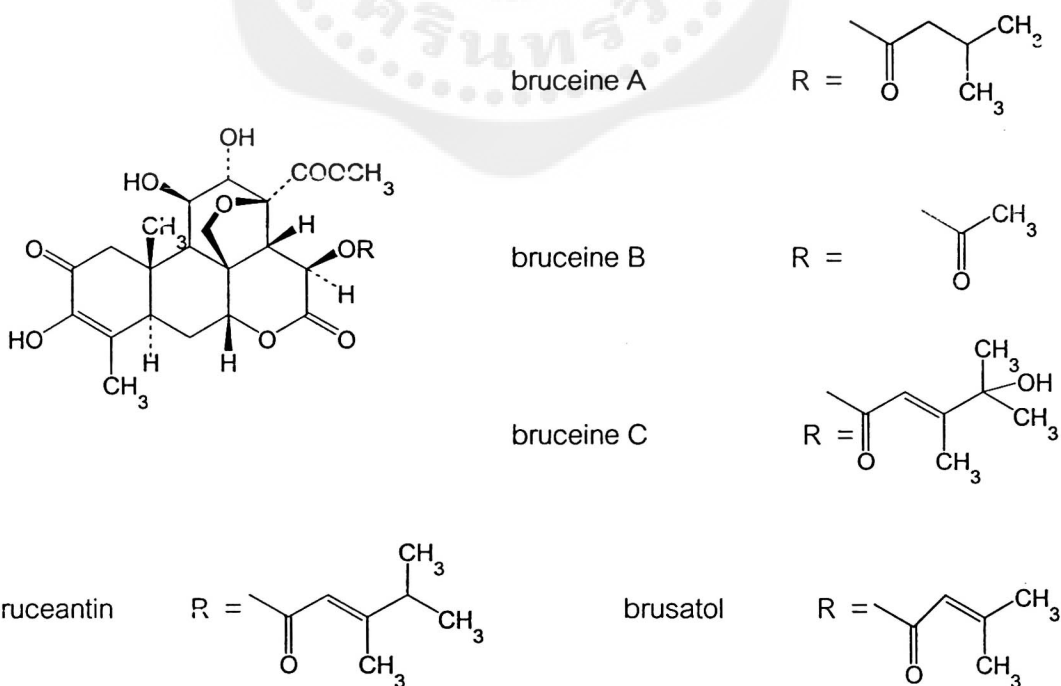
การศึกษากการแยกสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 ของเปลือกต้นข่อย (*Streblus asper*) ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารผสมของ cardiac glycoside เมื่อนำมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค TLC ได้สารประกอบ strebloside มีค่า R_f 0.60 และสารประกอบ mansonin มีค่า

R₁ 0.74 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ได้ค่า ED₅₀ ของสารประกอบทั้งสอง เท่ากับ 0.035 µg/mL และ 0.042 µg/mL ตามลำดับ (Fiebig. *et al.* 1985 : 981-985)



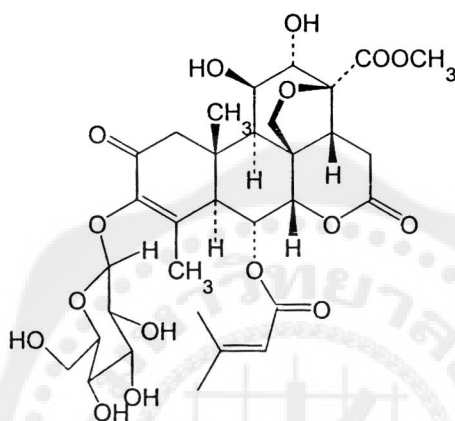
สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ CH₂Cl₂ ของข่อย (*Streblus asper*)

จากการศึกษาสารสกัดจากส่วนของผลราชดัด (*Brucea javanica* (Linn.) Merr.) ได้สารกลุ่ม quassinoid ได้แก่ สารประกอบ bruceine A, bruceine B, bruceine C, bruceantin และ brusatol ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลอง พบว่ามีค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.098 µg/mL 0.55 µg/mL 0.021 µg/mL 0.008 µg/mL และ 0.102 µg/mL ตามลำดับ (Anderson. *et al.* 1991 : 62-64)



สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากผลราชดัด (*Brucea javanica* (Linn.) Merr.)

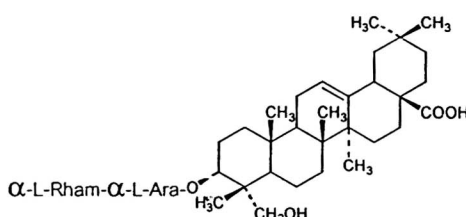
การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งชนิด KB A-549 HCT-8 RPMI CNS TE-671 P-388 ของสารประกอบ bruceoside C จากสารสกัดหยาบ EtOH ของผลราชดัด ได้ค่า ED_{50} ดังนี้ A-549 เท่ากับ 0.44 $\mu\text{g/mL}$ HCT-8 เท่ากับ 4.51 $\mu\text{g/mL}$ TE-671 เท่ากับ 0.29 $\mu\text{g/mL}$ และ P-388 เท่ากับ 5.11 $\mu\text{g/mL}$ ความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งชนิด KB และ RPMI ค่า ED_{50} น้อยกว่า 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (Fukamiya. *et al.* 1992 : 468-475)



สูตรโครงสร้างสาร bruceoside C

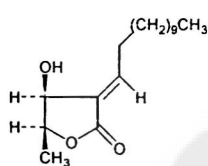
การแยกสารสกัดจากผลของราชดัดวิธีเดียวกันกับฟูกามิยะ ได้สารประกอบ bruceoside D bruceoside E และ bruceoside F ตามลำดับ ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ มะเร็งสมอง มะเร็งเม็ดสี มะเร็งรังไข่ มะเร็งไต มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเต้านม มีค่า Log GI_{50} เท่ากับ -4.14 ถึง -5.72 สารประกอบที่แยกจากสารสกัดหยาบ EtOH ของผลราชดัด (Ohnishi. *et al.* 1995 : 1032-1038)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง P-388 และมะเร็ง LL/2 จากเมล็ดเทียนดำ (*Nigella sativa*.) โดยทำการสกัดสารด้วย ethanol ได้สาร α -hederin ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง LL/2 มากกว่า cyclophosphamide อย่างมีนัยสำคัญ (Swamy & Tan. 2001 : 29-32)

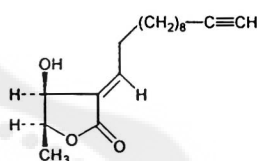


สูตรโครงสร้างของ α -hederin

การแยกสารจากเปลือกต้น *Lindera communis*. โดยทำการสกัดสารด้วย methanol พบสารใหม่ 2 ชนิด คือ lincomolide A และ lincomolide B ซึ่งเป็นสารประเภท butanolides และสารประกอบอื่นๆอีก 7 ชนิดได้แก่ isolinderanolide E sepesteonol β -sitosterol β -sitosterol- β -glucoside tetradecane nonanoic acid และ decanol เมื่อนำสาร lincomolide A และ lincomolide B ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่าสาร butanolides ทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 สูง โดยมีค่า ED_{50} เป็น 0.890 และ 1.620 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (Tsai, et al. 2001 : 865-867)



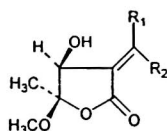
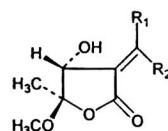
lincomolide A

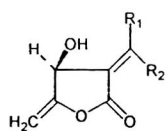
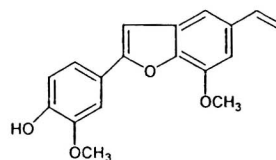


lincomolide B

สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเปลือกต้น *Lindera communis*.

การแยกสารจากใบของ *Litsea acutivena*. โดยทำการสกัดสารด้วย methanol แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารใหม่ 6 ชนิด ได้แก่ dehydroxymethylailanthoidol และสารประเภท butanolides 5 ชนิด ได้แก่ litseakolide D litseakolide E litseakolide F litseakolide G และ isolincomolide D เมื่อนำสารประกอบทั้ง 6 ชนิด ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่าสาร butanolides ทั้ง 5 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 สูง โดยมีค่า ED_{50} เป็น 1.73 2.94 2.04 0.97 และ 2.97 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (Cheng, et al. 2001 : 1502-1505)

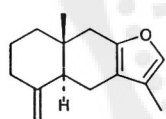
litseakolide D ($R_1 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$)litseakolide E ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)litseakolide F ($R_1 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$)litseakolide G ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$)

isolincomolide D ($R_1 = \text{H}$, $R_2 = (\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$)

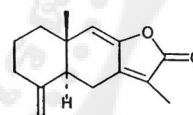
dehydroxymethylailanthoidol

สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากใบ *Litsea acutivena*.

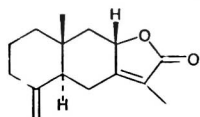
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด hexane ที่แยกได้จากเหง้า *Atractylodes ovata*. พบสาร atractylon, atractylenolide I, atractylenolide II และ atractylenolide III ซึ่งเป็นสารประเภท sesquiterpenoids และพบว่า atractylon และ atractylenolide I ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 $\mu\text{g/mL}$ จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ atractylenolide II และ atractylenolide III จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ต่ำ (Wang, Chen & Yang. 2002 : 204-208)



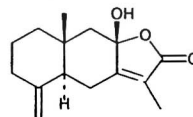
atractylon



atractylenolide I



atractylenolide II



atractylenolide III

สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้า *Atractylodes ovata*

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การสกัดสาร การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์จากหญาลินงู
2. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี

- คอลัมน์ขนาดต่าง ๆ
- ปีเปตขนาดต่าง ๆ
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240A)
- เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
- UV lamp
- Freeze - Dryer (FTS system FD-3-55D-MP)
- FT-IR (Perkin Elmer FT-IR spectrum BX)
- Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
- Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AM300,300 MHz)
- Rotary Evaporator (Buchi Rotavapor R-114)
- กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus,Tokyo)
- ขวดเลี้ยงเซลล์
- ตู้บ่ม
- Haemacytometer

สารเคมี

- ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Hexane chloroform ethanol ethyl acetate และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้

- Anisaldehyde
- conc.Sulfuric acid
- Glacial acetic acid
- Silica gel สำหรับโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
 - Silica gel 60 (<0.063 mm , E.Merck , AR grade)
 - Silica gel 60 (0.063-0.200 mm , E.Merck , AR grade)
- Silica gel 60 GF₂₅₄ สำหรับโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (E.Merck , AR grade)

- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (E.Merck , AR grade)
- Newborn Calf Serum (NCS)(Biowhittaker , USA)
- Roswell Park Memorial Institute medium number 1640 (RPMI 1640 medium)(Biowhittaker , USA)
- Trypan blue dye (BDH Chemical , UK)

วิธีการดำเนินการทดลอง

การสกัดสารจากหญ้าลั่นงู การแยกสารและทำให้บริสุทธิ์

1. นำหญ้าลั่นงูที่อบแห้งและบดละเอียด 1.60 kg มาสกัดด้วย hexane โดยแช่ใน hexane 12 L เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายที่ได้มากรอง ส่วนกากที่เหลือนำมาแช่ใน hexane อีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมด ระเหย hexane ออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้สารสกัด hexane น้หนัก 47 g นำสารบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2. นำสารสกัด hexane มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจลประมาณ 1:25 โดยน้ำหนัก แล้วชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่ได้ด้วย TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำส่วนที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้สารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง /หรือสารบริสุทธิ์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells,P388) เป็น cell suspension เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 mL พื้นที่ผิว 25 cm² โดยใช้ RPMI 1640 ผสมกับ NCS 10% เป็นอาหารเลี้ยงปรับค่า pH 7.00-7.20 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% และ subculture 2 ครั้ง/สัปดาห์ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 3-4 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) ดังนี้

1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่วขวด แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มา 0.20 mL ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.40% trypan blue dye ลงไป 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

1.2 การนับเซลล์

นำเซลล์ที่ย้อมสีแล้วหยดลงบน haemocytometer ซึ่งมี cover slide ปิดอยู่ แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue dye) คำนวณจำนวนเซลล์ที่นับได้

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ซึ่งสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ 4 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม DMSO 0.10 mL ละลายสารตัวอย่างให้หมดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ในปริมาตร 4 mL

3. การเตรียมสารละลาย negative control

ละลาย DMSO 0.25 mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 9.75 mL ได้ negative solvent control ที่มีความเข้มข้น 2.50% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 mL

4. การเตรียมสารละลาย positive control

ใช้ micropipette ดูดสารละลาย 5-Fluorouracil(5-FU) ที่มีความเข้มข้น 250 mg/5 mL มา 5 µL ซึ่งมีเนื้อสารเท่ากับ 250 µg ใส่ในหลอดทดลอง เติม 2.50% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 mL ได้สารที่มีความเข้มข้น 50 µg/mL เจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 4 µg/mL

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เติมสารตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2 หรือ positive control ที่เตรียมในข้อ 4 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี สารละลาย negative control ให้ได้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบตามความต้องการ แล้วนำไปป้อนในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 4 วัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

6. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 และ 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากผลที่นับได้นำมาหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}} \times 100 \quad (1)$$

7. การหาค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกน Y) ซึ่งคำนวณจากสมการ (1) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่าง (แกน X) บนกระดาษกราฟปกติ จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งเป็นค่า ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/mL

การศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี



บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู

นำหญ้าลิ้นงู 1.60 kg มาสกัดด้วย hexane ได้สารสกัด hexane เป็นสารเหนียวหนืด สีเขียวเข้มหนัก 47 g

ผลการแยกสารสกัด Hexane และทำสารให้บริสุทธิ์

1. นำสารสกัด hexaneหนัก 47 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วจะด้วยตัวทำละลาย hexane โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วย chloroform และ methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละประมาณ 200 mL ระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สาร 9 กลุ่ม (ตาราง 1) นำแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 10) จึงนำมาแยกต่อ

ตาราง 1 ผลการแยกสารสกัด hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : CHCl_3	(90 : 10)	H 1	3.12 g สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(80 : 20)	H 2	50.30 mg คราบสีขาว
	(60 : 40)	H 3	30.20 mg คราบสีขาว
	(50 : 50)	H 4	1.68 g สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
	(30 : 70)	H 5	2.05 g สารเหนียวสีน้ำตาล
	(10 : 90)	H 6	6.80 g สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
	(00 : 100)	H 7	3.38 g สารคล้ายขี้ผึ้งสีเขียว
CHCl_3 : MeOH	(96 : 4)	H 8	23.02 g สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(80 : 20)	H 9	1.50 g สารเหนียวสีเขียว

2. นำสารกลุ่ม H 8 หนัก 23.02 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้ว ชะ ด้วยตัวทำละลาย hexane โดยค่อยๆเพิ่มส่วนของตัวทำละลายด้วย ethyl acetate เก็บส่วนที่ชะได้ ครั้งละประมาณ 100 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 2) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 11) จึงนำมา แยกต่อ

ตาราง 2 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(95 : 5)	H 8.1	200.90 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(80 : 20)	H 8.2	21.50 mg	สารเหนียวสีเขียว
	(60 : 40)	H 8.3	1.36 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(40 : 60)	H 8.4	5.07 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(20 : 80)	H 8.5	12.05 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม

3. นำสารกลุ่ม H 8.5 หนัก 12.05 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วชะ ด้วยตัวทำละลาย hexane โดยค่อยๆเพิ่มส่วนของตัวทำละลายด้วย ethyl acetate เก็บส่วนที่ ชะได้ครั้งละประมาณ 70 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 3) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4 และ H 8.5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่ม อื่น (ตาราง 12) จึงนำมาแยกต่อ

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(90 : 10)	H 8.5.1	20.60 mg	คราบสีเหลือง
	(80 : 20)	H 8.5.2	1.49 g	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
	(60 : 40)	H 8.5.3	1.91 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(40 : 60)	H 8.5.4	965.80 mg	สารเหนียวสีเขียวอ่อน
	(20 : 80)	H 8.5.5	5.08 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม

4. นำสารกลุ่ม H 8.5.4หนัก 965.80 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย chloroform โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วย ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละประมาณ 20 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 4) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 13) จึงนำมาแยกต่อ

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl ₃ : EtOH (100 : 00)	H 8.5.4.1	15.10 mg	คราบสีเหลือง
(96 : 4)	H 8.5.4.2	75.30 mg	ของแข็งสีขาว
(92 : 8)	H 8.5.4.3	142.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
(80 : 20)	H 8.5.4.4	156.80 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

5. สารกลุ่ม H 8.5.4.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 15.10 mg เรียกว่าสารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED₅₀

6. นำสารกลุ่ม H 8.5.4.3หนัก 142.20 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย chloroform โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วยmethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละประมาณ 5 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 5) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 15) แต่สารมีปริมาณน้อยและมีสารอีกหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED₅₀

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl ₃ : MeOH	(98 : 2)	H 8.5.4.3.1	28.50 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(94 : 6)	H 8.5.4.3.2	30.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(90 : 10)	H 8.5.4.3.3	15.40 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(85 : 15)	H 8.5.4.3.4	40.40 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

7. นำสารกลุ่ม H 8.5.5 น้ำหนัก 5.08 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วจะด้วยตัวทำละลาย hexane โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วย ethyl acetate และ ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละประมาณ 50 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 6) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.5.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 14) จึงนำ มาแยกต่อ

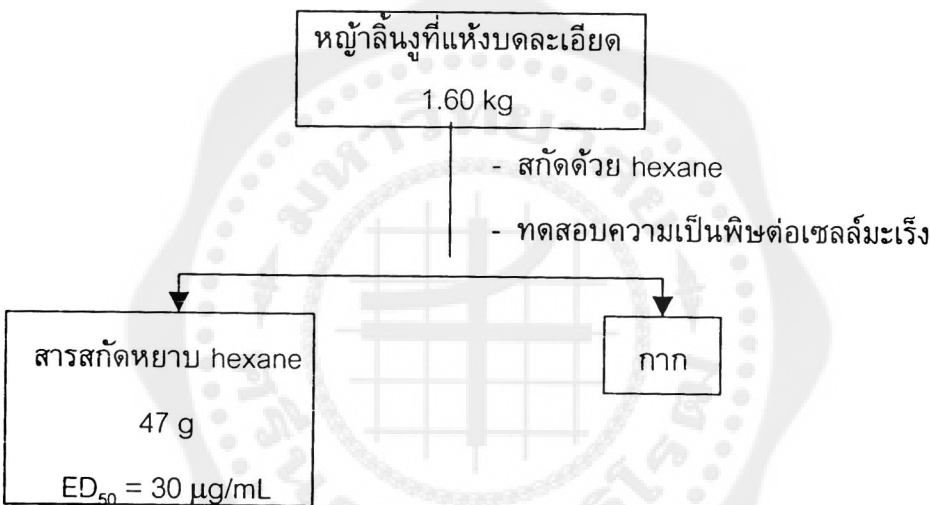
ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(80 : 20)	H 8.5.5.1	76.50 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(50 : 50)	H 8.5.5.2	250.20 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(30 : 70)	H 8.5.5.3	398.10 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(00 : 100)	H 8.5.5.4	1.24 g	สารเหนียวสีเขียว
EtOAc : EtOH	(90 : 10)	H 8.5.5.5	378.90 mg	สารเหนียวสีเขียว

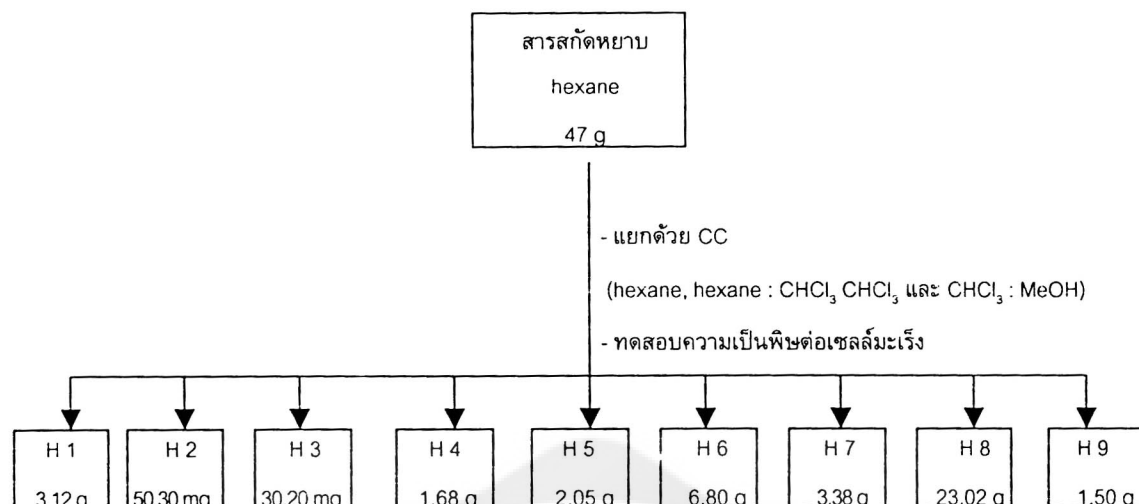
8. นำสารกลุ่ม H 8.5.5.3 น้ำหนัก 398.10 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วจะด้วยตัวทำละลาย chloroform โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวทำละลายด้วย methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละประมาณ 20 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 7) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 16) สารทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ายังมีสารอีกหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED₅₀

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

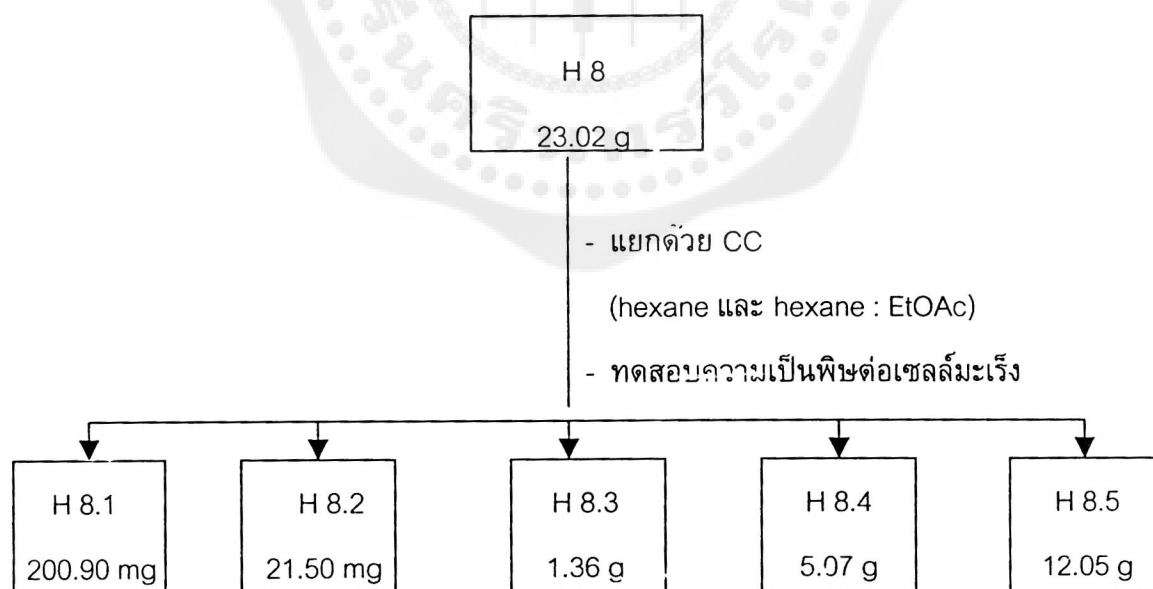
ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl ₃ : MeOH	(98 : 2)	H 8.5.5.3.1	30.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(94 : 6)	H 8.5.5.3.2	38.80 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(90 : 10)	H 8.5.5.3.3	52.00 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(80 : 20)	H 8.5.5.3.4	115.60 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม



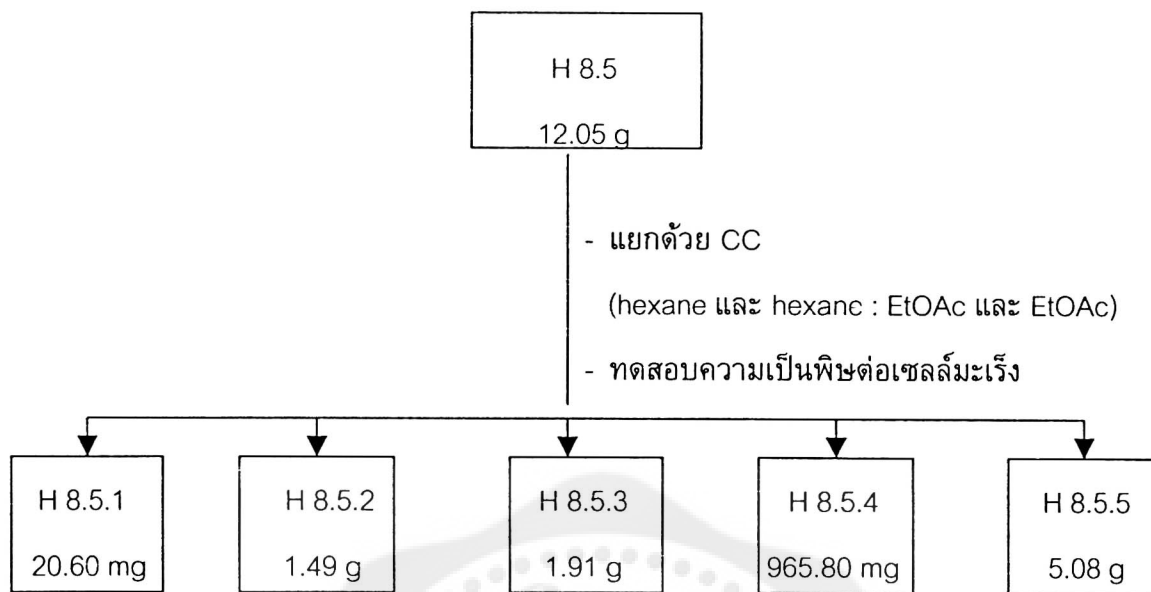
ภาพประกอบ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากหญาลิ้นงู



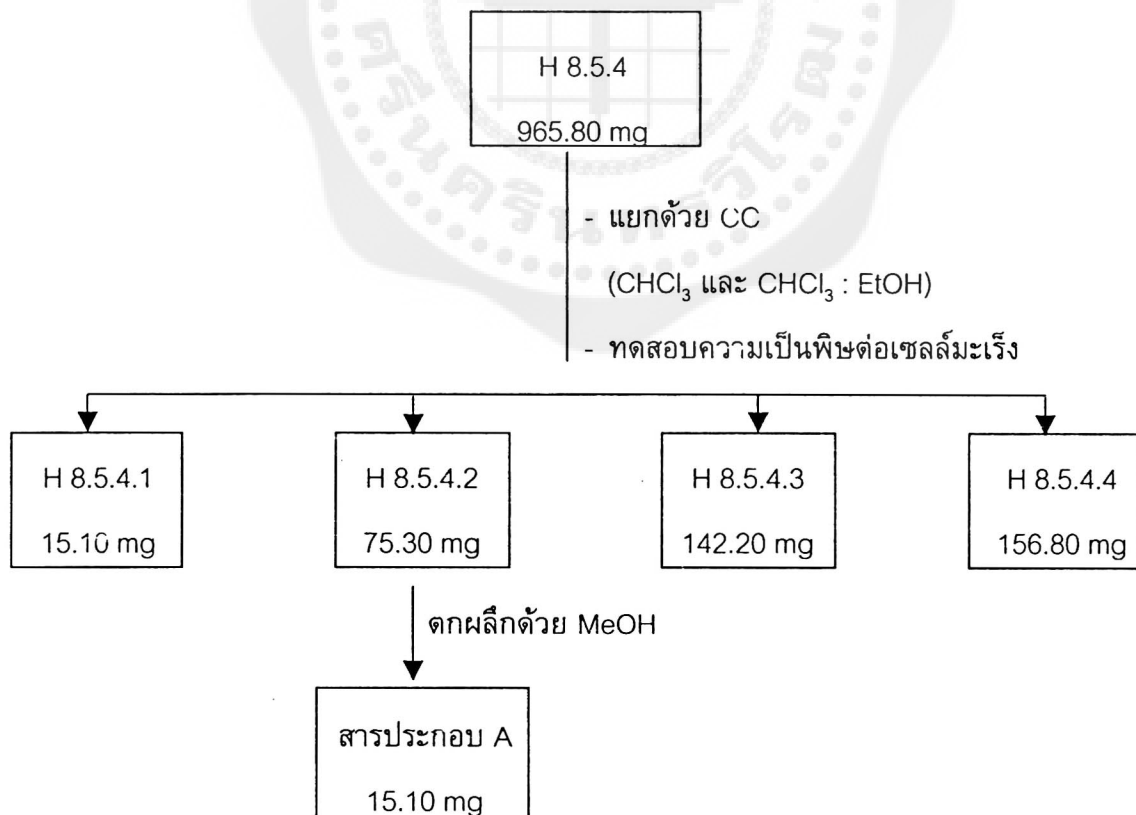
ภาพประกอบ 2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane



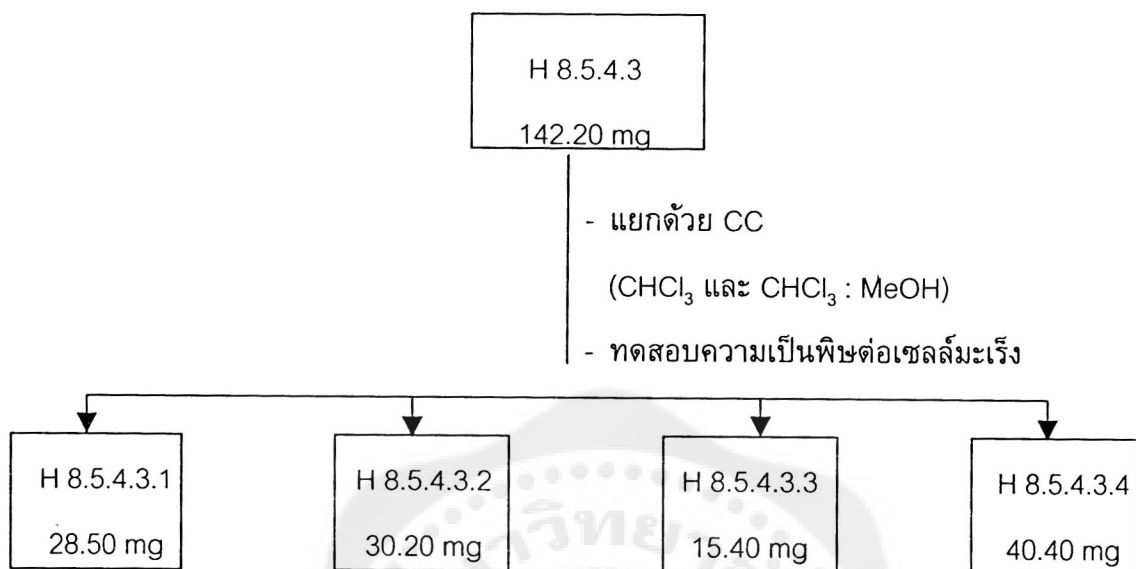
ภาพประกอบ 3 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8



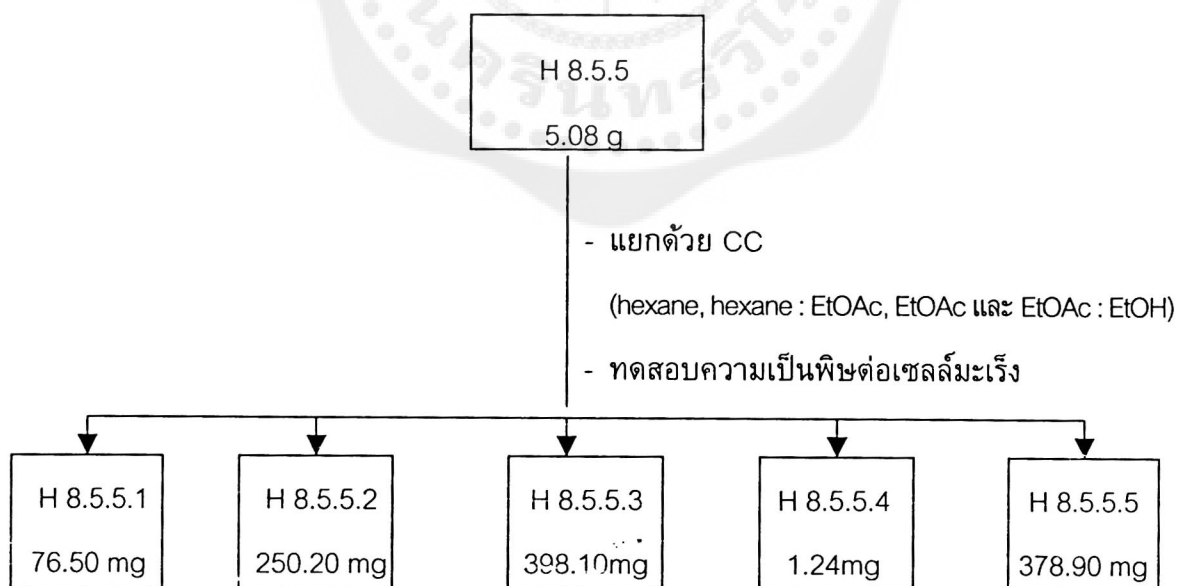
ภาพประกอบ 4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5



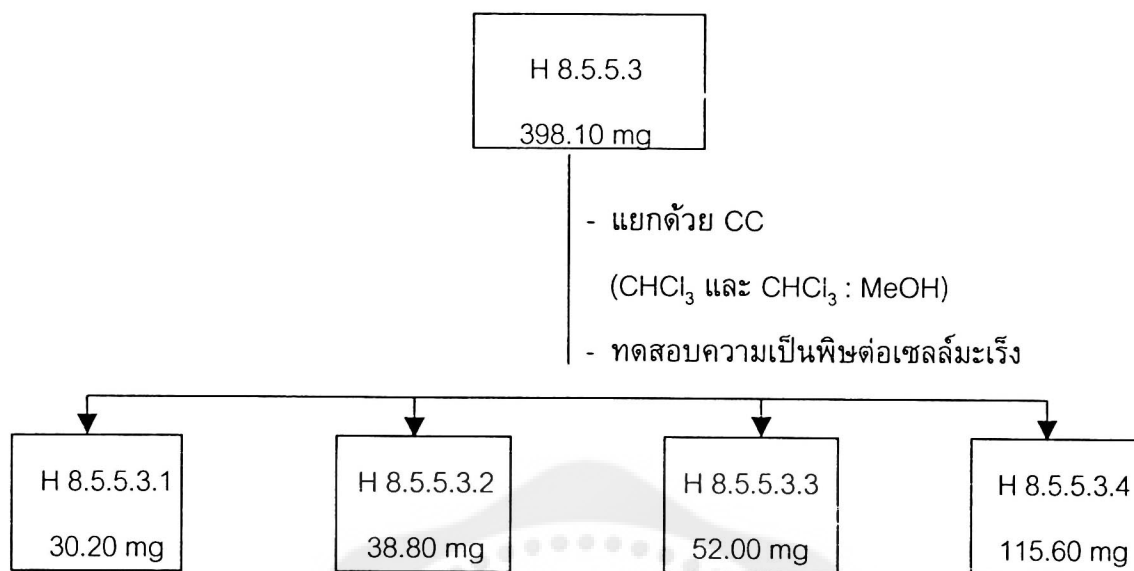
ภาพประกอบ 5 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3



ภาพประกอบ 7 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5



ภาพประกอบ 8 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3

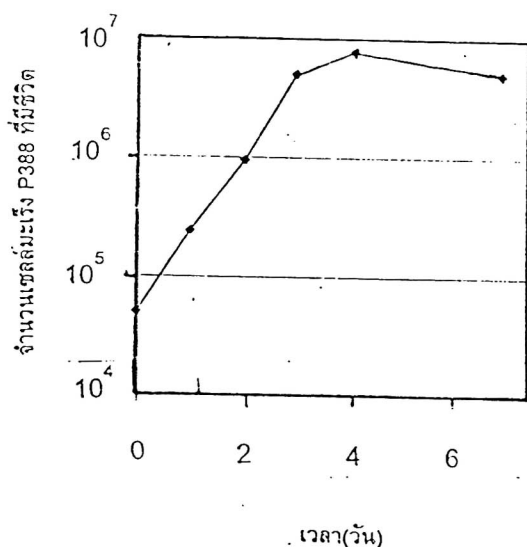
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ ผลที่ได้แสดงในตาราง 8 นำข้อมูลมาเขียน growth curve บนกระดาษกราฟแบบ semi - logarithm ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกน X) กับจำนวนวันที่ทำการทดลอง (แกน Y) แสดงในภาพประกอบ 9

ตาราง 8 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด (5 mL)
	ค่าเฉลี่ย
0	5.05×10^4
1	2.40×10^5
2	9.60×10^5
3	4.96×10^6
4	7.73×10^6
7	5.05×10^6



ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ P388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P388 เจริญเติบโตสูงสุดในระยะ 4 วันแรกที่ทำ การทดลอง จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้ DMSO 0.50% เป็น negative control ซึ่งไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และใช้ 5 - fluorouracil เป็น positive control เพื่อยืนยันว่าเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบนี้ สามารถตอบสนองต่อสารต้านมะเร็งได้ เนื่องจากปัจจุบันสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ใช้ 5 - fluorouracil ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเป็นจำนวนมาก และจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้ 5 - fluorouracil เป็น positive control ก็ให้ผลดีมาตลอด

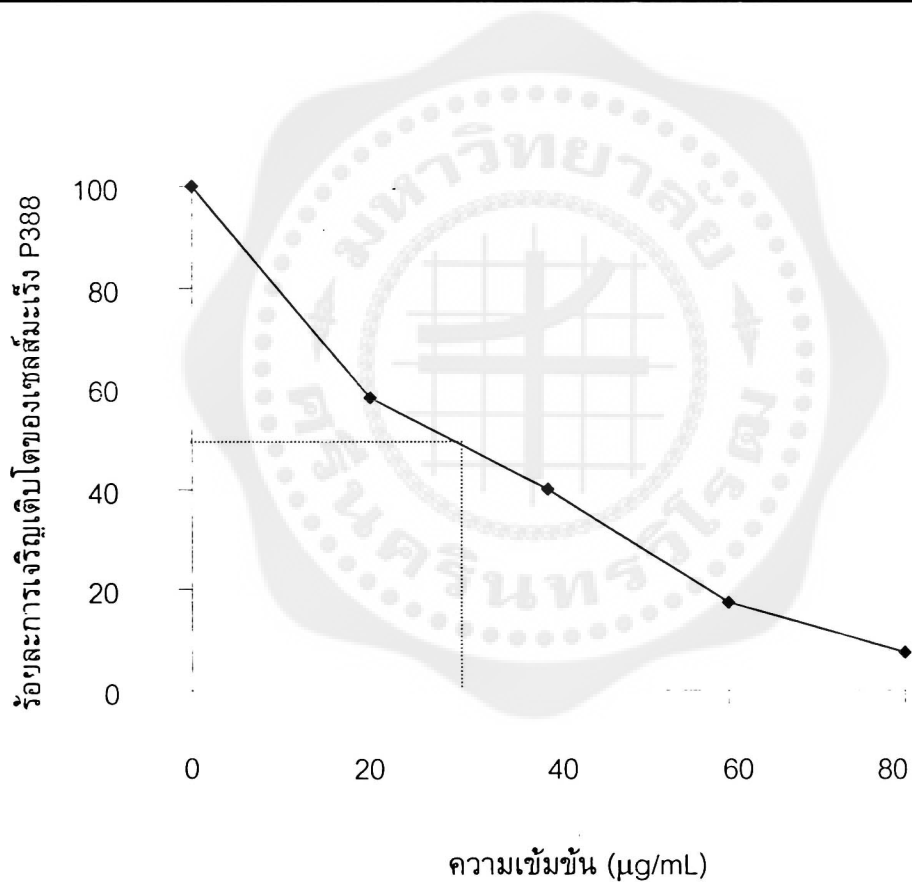
ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกากำหนดว่า สารสกัดจากธรรมชาติในรูปของสารสกัดหยาบ จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อมีค่า $ED_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (Geran, et al. 7 - 17) ดังนั้นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ จึงใช้ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane

นำสารสกัด hexane ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane $30 \mu\text{g/mL}$ แสดงในตาราง 9 และภาพประกอบ 10

ตาราง 9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	5.02×10^6	100.00
สารสกัด hexane	20	5.00×10^4	2.92×10^6	58.17
	40	5.00×10^4	2.00×10^6	39.849
	60	5.00×10^4	8.80×10^5	17.53
	80	5.00×10^4	3.80×10^5	7.57



ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารสกัด hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane
- 3.1 นำสารสกัด hexane มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 9 กลุ่ม นำสารทั้ง 9 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 1 ถึง H 9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	4.99×10^4	5.51×10^6	100.00
H 1	4.99×10^4	5.76×10^6	104.54
H 2	4.99×10^4	5.61×10^6	101.81
H 3	4.99×10^4	4.90×10^6	88.93
H 4	4.99×10^4	5.48×10^6	99.46
H 5	4.99×10^4	6.00×10^6	108.89
H 6	4.99×10^4	5.87×10^6	106.53
H 7	4.99×10^4	3.87×10^6	70.24
H 8	4.99×10^4	1.05×10^6	19.06
H 9	4.99×10^4	3.49×10^6	63.34

3.2 จากตาราง 10 สารกลุ่ม H 8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม H 8 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 5 กลุ่ม นำสารทั้ง 5 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.1 ถึง H 8.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.02×10^4	7.25×10^6	100.00
H 8.1	5.02×10^4	7.35×10^6	101.38
H 8.2	5.02×10^4	7.20×10^6	99.31
H 8.3	5.02×10^4	7.43×10^6	102.48
H 8.4	5.02×10^4	6.67×10^6	92.00
H 8.5	5.02×10^4	3.20×10^6	44.14

3.3 จากตาราง 11 สารกลุ่ม H 8.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่า สารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 5 กลุ่ม นำสารทั้ง 5 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.1 ถึง H 8.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต
	วันเริ่มต้น	ของเซลล์มะเร็ง P388	ของเซลล์มะเร็ง P388
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	(%)
กลุ่มควบคุม	5.16×10^4	5.59×10^5	100.00
H 8.5.1	5.16×10^4	5.58×10^5	99.82
H 8.5.2	5.16×10^4	5.73×10^5	102.56
H 8.5.3	5.16×10^4	5.38×10^5	96.24
H 8.5.4	5.16×10^4	1.79×10^5	3.20
H 8.5.5	5.16×10^4	1.19×10^5	2.13

3.4 จากตาราง 12 สารกลุ่ม H 8.5.4 และ H 8.5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารดังกล่าวมาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H 8.5.4 แยกได้ 4 กลุ่ม และสารกลุ่ม H 8.5.5 แยกได้ 5 กลุ่ม นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 13 และ 14

ตาราง 13 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.1 ถึง H 8.5.4.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	ของเซลล์มะเร็ง P388
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	(%)
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.20×10^5	100.00
H 8.5.4.1	5.00×10^4	4.88×10^5	93.85
H 8.5.4.2	5.00×10^4	4.00×10^5	76.92
H 8.5.4.3	5.00×10^4	3.00×10^4	0.60
H 8.5.4.4	5.00×10^4	4.38×10^5	84.23

ตาราง 14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.1 ถึง H 8.5.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.04×10^4	6.47×10^5	100.00
H 8.5.5.1	5.04×10^4	6.13×10^5	94.74
H 8.5.5.2	5.04×10^4	3.86×10^5	59.66
H 8.5.5.3	5.04×10^4	0.00	0.00
H 8.5.5.4	5.04×10^4	6.24×10^5	96.45
H 8.5.5.5	5.04×10^4	6.65×10^5	102.78

3.5 จากตาราง 13 และ 14 สารกลุ่ม H 8.5.4.3 และ H 8.5.5.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารดังกล่าวมาแยกฆ่าด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H 8.5.4.3 แยกได้ 4 กลุ่ม และสารกลุ่ม H 8.5.5.3 แยกได้ 4 กลุ่ม นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดสอบแสดงในตาราง 15 และ 16

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.1 ถึง H 8.5.4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.82×10^5	100.00
H 8.5.4.3.1	5.00×10^4	3.13×10^5	53.78
H 8.5.4.3.2	5.00×10^4	0.00	0.00
H 8.5.4.3.3	5.00×10^4	4.73×10^5	81.27
H 8.5.4.3.4	5.00×10^4	5.53×10^5	95.02

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ถึง H 8.5.5.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	7.40×10^6	100.00
H 8.5.5.3.1	5.00×10^4	0.00	0.00
H 8.5.5.3.2	5.00×10^4	4.40×10^5	5.95
H 8.5.5.3.3	5.00×10^4	3.85×10^6	52.03
H 8.5.5.3.4	5.00×10^4	4.70×10^6	63.51

3.6 เนื่องจากสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ แต่เนื่องจากมีสารปริมาณน้อย ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ จึงนำสารทั้ง 3 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 17 และภาพประกอบ 11 – 12

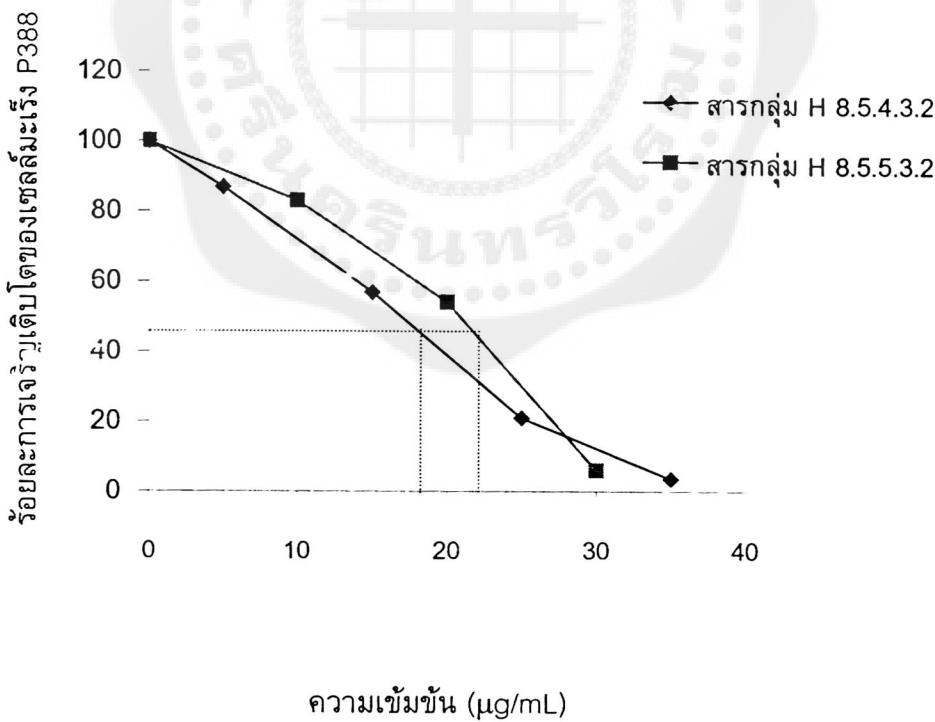
ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารกลุ่ม	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	5.02×10^4	6.82×10^6	100.00
H 8.5.4.3.2	5	5.02×10^4	5.93×10^6	86.95
	15	5.02×10^4	3.89×10^6	57.04
	25	5.02×10^4	1.43×10^6	20.97
	35	5.02×10^4	2.40×10^5	3.52
กลุ่มควบคุม	-	4.99×10^4	7.40×10^6	100.00
H 8.5.5.3.1	4	4.99×10^4	5.48×10^6	74.05
	7	1.09×10^4	3.92×10^6	52.97
	10	4.99×10^4	8.88×10^5	12.00
	10	4.99×10^4	6.14×10^6	82.97
H 8.5.5.3.2	20	4.99×10^4	4.00×10^6	54.05
	30	4.99×10^4	4.44×10^5	6.00

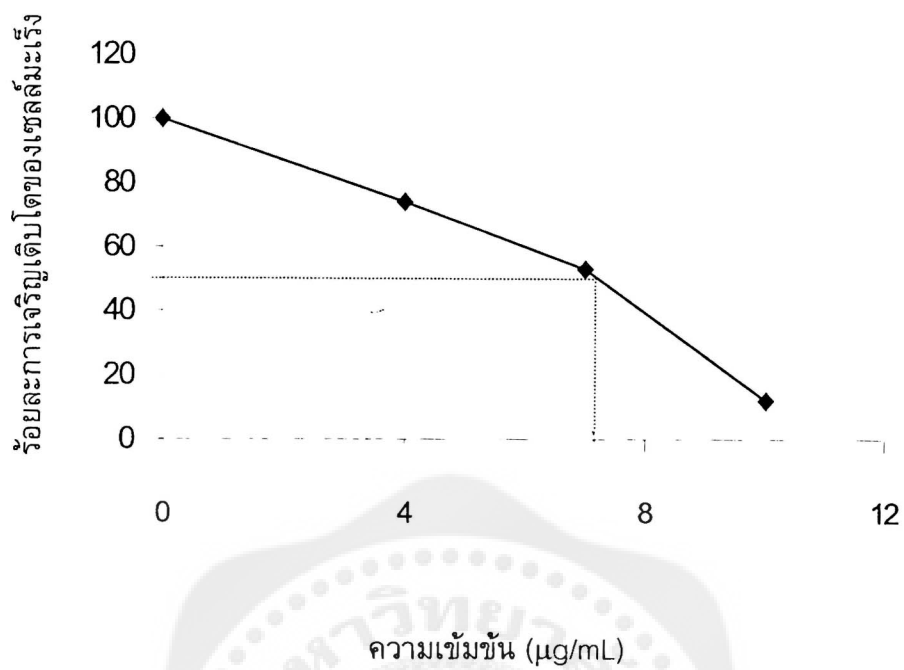
3.7 นำสารประกอบ A ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED₅₀ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/mL สารประกอบ A ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

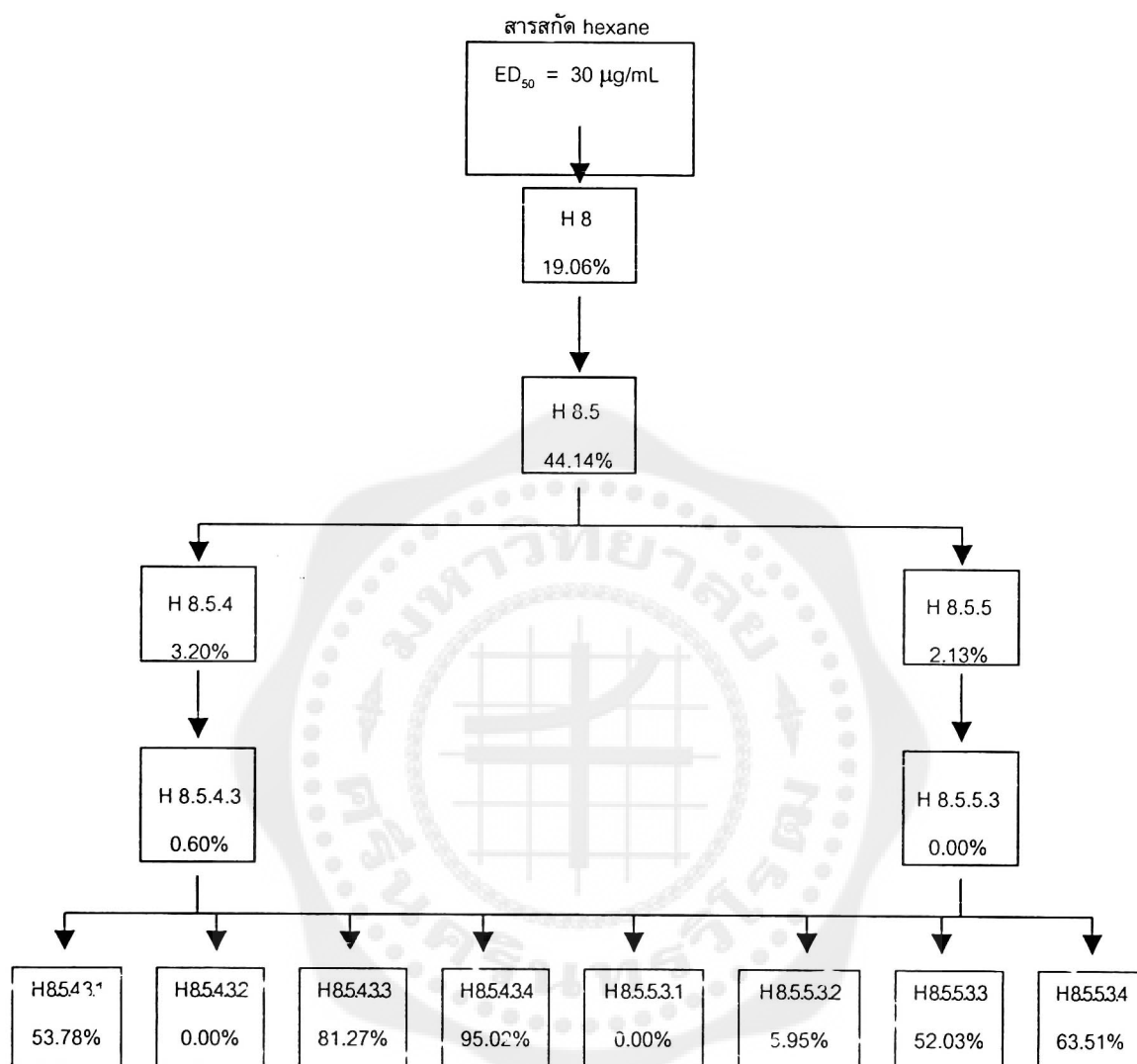
ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
	ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	4.99×10^4	5.40×10^6	100.00
30	4.99×10^4	5.61×10^6	103.70
60	4.99×10^4	5.60×10^6	103.70
100	4.99×10^4	5.47×10^6	101.30



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 และ H 8.5.5.3.2 ต่อเซลล์มะเร็ง P388



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388



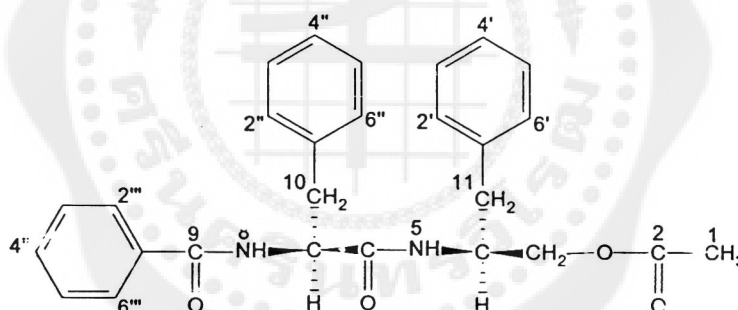
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิแสดงผลของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัด hexane
ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

บทที่ 5

สรุปผล และอภิปรายผล

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากหญ้าลิงงู โดยนำมาสกัดด้วย hexane นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัด hexane มีค่า ED_{50} เท่ากับ 30 $\mu\text{g/mL}$ นำสารสกัด hexane มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งสารสกัด hexane แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้ข้อมูลดังนี้

สารประกอบ A



สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 183 - 184 $^{\circ}\text{C}$ (185 - 186 $^{\circ}\text{C}$ Maiti & Thomson, 1976 :1106 - 1107) ค่า R_f = 0.68 (CHCl_3 : EtOH 96 : 4)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 15)

3313	NH
1726	C=O (ester)
1662, 1632	-C-N
1261	C-O
746, 698	=C-H (monosubstituted phenyl)

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 16)

2.03	s	3H (H-1)
2.70-2.80	m	2H (H-11)
3.07	dd	1H (H-10a, $J = 13.63, 8.45$ Hz)
3.22	dd	1H (H-10b, $J = 13.63, 8.45$ Hz)
3.82	dd	1H (H-3a, $J = 11.35, 4.89$ Hz)
3.93	dd	1H (H-3b, $J = 11.35, 4.89$ Hz)
4.30-4.40	m	1H (H-4)
4.73-4.80	m	1H (H-7)
5.98	d	1H (NH-5, $J = 8.45$ Hz)
6.76	d	1H (NH-8, $J = 7.56$ Hz)
7.05-7.09	m	2H (H-2', H-6')
7.13-7.18	m	2H (H-4', H-4'')
7.22-7.31	m	6H (H-3', H-5', H-3'', H-5'', H-2'', H-6'')
7.41-7.47	m	2H (H-3''', H-5''')
7.50-7.56	m	1H (H-4''')
7.70-7.74	m	2H (H-2''', H-6''')

ตาราง 19 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (ภาพประกอบ 17-18)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
1	20.79 (CH_3)		20.79
2	170.22 ($\text{C}=\text{O}$)		
3	64.56 (CH_2)		64.56
4	49.42 (CH)	49.42	49.42
5			
6	170.22 ($\text{C}=\text{O}$)		
7	54.97 (CH)	54.97	54.97
8			
9	167.09 ($\text{C}=\text{O}$)		
10	38.41 (CH_2)		38.41
11	37.42 (CH_2)		37.42
1'	136.67 (C)		
2'	128.63 (CH)	128.63	128.63
3'	129.12 (CH)	129.12	129.12
4'	127.13 (CH)	127.13	127.13
5'	129.12 (CH)	129.12	129.12
6'	128.63 (CH)	128.63	128.63
1''	136.59 (C)		
2''	128.75 (CH)	128.75	128.75
3''	129.27 (CH)	129.27	129.27
4''	126.74 (CH)	126.74	126.74
5''	129.27 (CH)	129.27	129.27
6''	128.75 (CH)	128.75	128.75
1'''	133.63 (C)		
2'''	127.03 (CH)	127.03	127.03
3'''	128.57 (CH)	128.57	128.57
4'''	131.91 (CH)	131.91	131.91
5'''	128.57 (CH)	128.57	128.57
6'''	127.03 (CH)	127.03	127.03

ตาราง 20 ข้อมูล ^1H - ^1H COSY สเปกตรัมของสารประกอบ A

δ_{H} (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_{H} (ppm)
2.75 (H-11)	$\leftrightarrow$	4.30-4.40 (H-4)
3.07 (H-10a)	$\leftrightarrow$	3.22 (H-10b) 4.73-4.80 (H-7)
3.22 (H-10b)	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a) 4.73-4.80 (H-7)
3.82 (H-3a)	$\leftrightarrow$	3.93 (H-3b) 4.30-4.40 (H-4)
3.93 (H-3b)	$\leftrightarrow$	3.82 (H-3a) 4.30-4.40 (H-4)
4.35 (H-4)	$\leftrightarrow$	2.70-2.80 (H-11) 3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b) 5.98 (NH-5)
4.77 (H-7)	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b) 6.67 (NH-8)
5.98 (NH-5)	$\leftrightarrow$	4.30-4.40 (H-4)
6.76 (NH-8)	$\leftrightarrow$	4.73-4.80 (H-7)

ตาราง 21 ข้อมูล HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ A

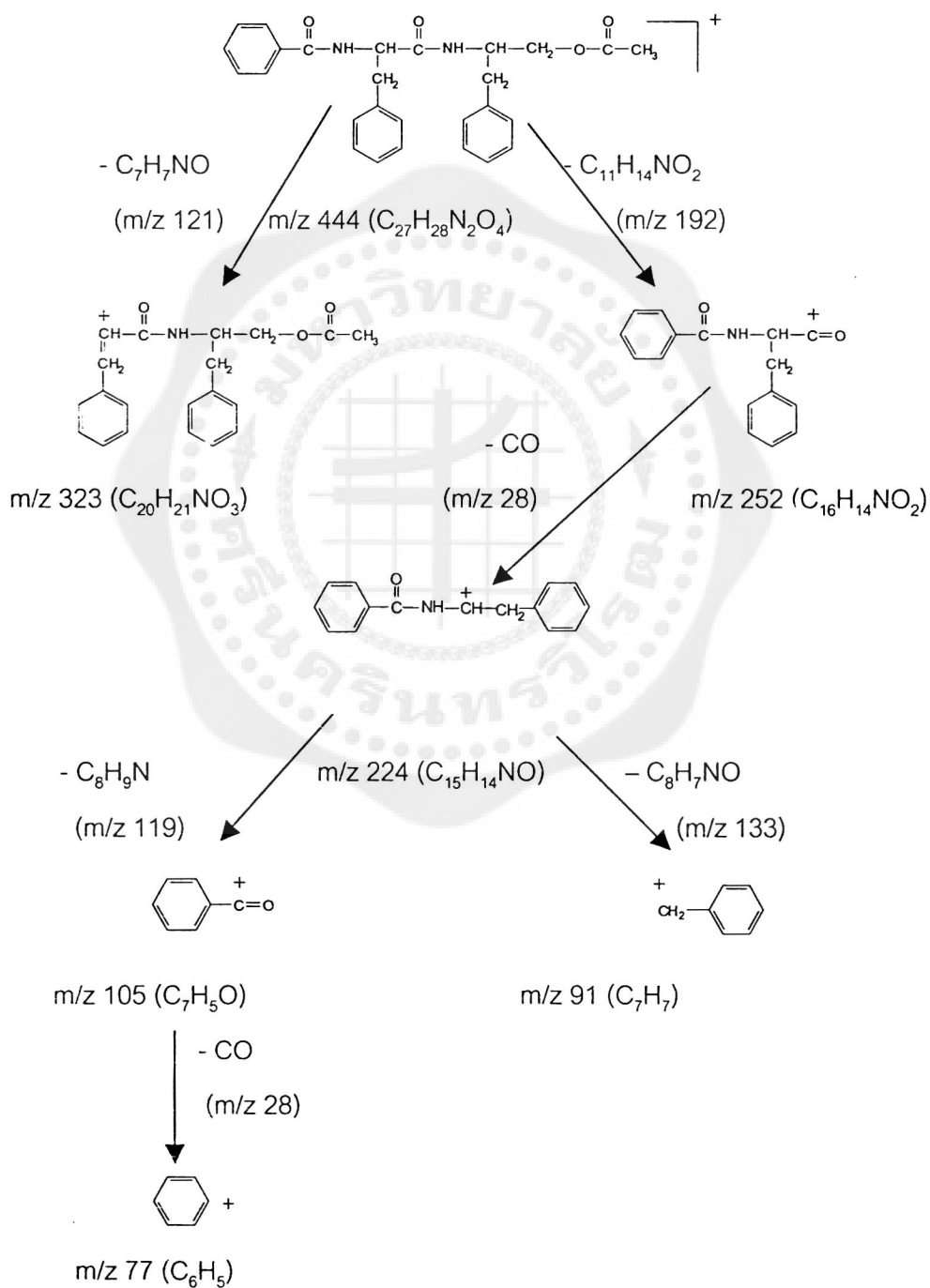
δ_{C} (ppm)		δ_{H} (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^1H
64.56 (C-3)	$\leftrightarrow$	3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b)	CH_2 -3
54.97 (C-7)	$\leftrightarrow$	4.73-4.8 (H-7)	CH-7
49.42 (C-4)	$\leftrightarrow$	4.30-4.40 (H-4)	CH-4
38.41 (C-10)	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b)	CH_2 -10
37.42 (C-11)	$\leftrightarrow$	2.70-2.80 (H-11)	CH_2 -11
20.79 (C-1)	$\leftrightarrow$	2.03 (H-1)	CH_3 -1

ตาราง 22 ข้อมูล HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ A

δ_c (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)		
170.22 (C-2)	$\leftrightarrow$	2.03 (H-1)	3.82 (H-3a)	3.93 (H-3b)
170.22 (C-6)	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a)	3.22 (H-10b)	4.73-4.80 (H-7)
		5.98 (NH-5)		
167.09 (C-9)	$\leftrightarrow$	4.73-4.80 (H-7)	6.67 (NH-8)	
		7.70-7.74 (H-2'') (H-6'')		
136.67 (C-1')	$\leftrightarrow$	2.70-2.80 (H-11)		
136.59 (C-1'')	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a)	3.22 (H-10b)	4.73-4.80 (H-7)
54.97 (C-7)	$\leftrightarrow$	3.07 (H-10a)	3.22 (H-10b)	
49.42 (C-4)	$\leftrightarrow$	2.70-2.80 (H-11)	3.82 (H-3a)	3.93 (H-3b)
38.41 (C-10)	$\leftrightarrow$	4.73-4.80 (H-7)	7.22-7.31 (H-2'') (H-6'')	
37.42 (C-11)	$\leftrightarrow$	3.82 (H-3a)	3.93 (H-3b)	4.30-4.40 (H-4)
		7.05-7.09 (H-2') (H-6')		

EI MS spectrum ของสารประกอบ A (ภาพประกอบ 19) ให้สัญญาณ

m/z (% relative intensity) ที่ 444 (3) (M^+ , $C_{27}H_{28}N_2O_4$) 323 (1) [$M - C_7H_7NO$] $^+$
 252 (61) [$M - C_{11}H_{14}NO_2$] $^+$ 224 (28) [$M - C_{12}H_{14}NO_3$] $^+$ 105 (100) [$M - C_{20}H_{23}N_2O_3$] $^+$ 91
 (9) [$M - C_{20}H_{21}N_2O_4$] $^+$ 77 (38) [$M - C_{21}H_{23}N_2O_4$] $^+$ ภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 การแตกพันธะของสารประกอบ A

จากข้อมูลของสารประกอบ A เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ aurantiamide acetate (Wahidulila, D'Souza & Kamat. 1991 : 3323 - 3325) สรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ aurantiamide acetate หรือ asperglaucide ซึ่งเป็นครั้งแรกที่แยก aurantiamide acetate ได้จากพืชสกุลนี้

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าลั่นทมต่อเซลล์มะเร็ง P388 ในหลอดทดลอง โดยนำเซลล์มะเร็ง P388 ซึ่งเป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยวิธีการย้อม dye exclusion viability staining โดยใช้สี trypan blue เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue ผลที่ได้จากการนับเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มที่ใส่สารตัวอย่างเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นำมาหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane พบว่าค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane เท่ากับ $30 \mu\text{g/mL}$ จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอยู่ในระดับที่น่าสนใจ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานของ NCI ของสหรัฐอเมริกา กำหนดว่า สารสกัดหยานที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

เมื่อนำสารสกัด hexane 60 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม คือ H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 น้ำหนัก 30.20 30.20 และ 38.80 mg ตามลำดับ และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่ไม่เคยพบจากพืชชนิดนี้มาก่อน คือ aurantiamide acetate น้ำหนัก 15.10 mg

เมื่อนำสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 H 8.5.5.3.2 และ aurantiamide acetate ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่าค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 21.00 และ $>100 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกา กำหนด

จากการที่สารสกัดหยาน hexane แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเท่ากับ เกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกาคำหนด เมื่อนำมาแยกแล้วพบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกาคำหนด ได้แก่ สารกลุ่ม

H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการแยกและการทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้น ได้กำจัดสารไม่แสดงฤทธิ์ออกไป ทำให้สารที่บริสุทธิ์แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งมากขึ้น ได้ค่า ED_{50} ลดลง

ส่วน aurantiamide acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ว่า สารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จะต้องมียุทธศาสตร์ $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ จากการรายงานของชายและคณะ (Tsai, et al. 1998 : 1663 - 1666) พบว่า aurantiamide acetate ที่แยกได้จากต้น *Polygonum chinensis* เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีกว่า trifluoperazine



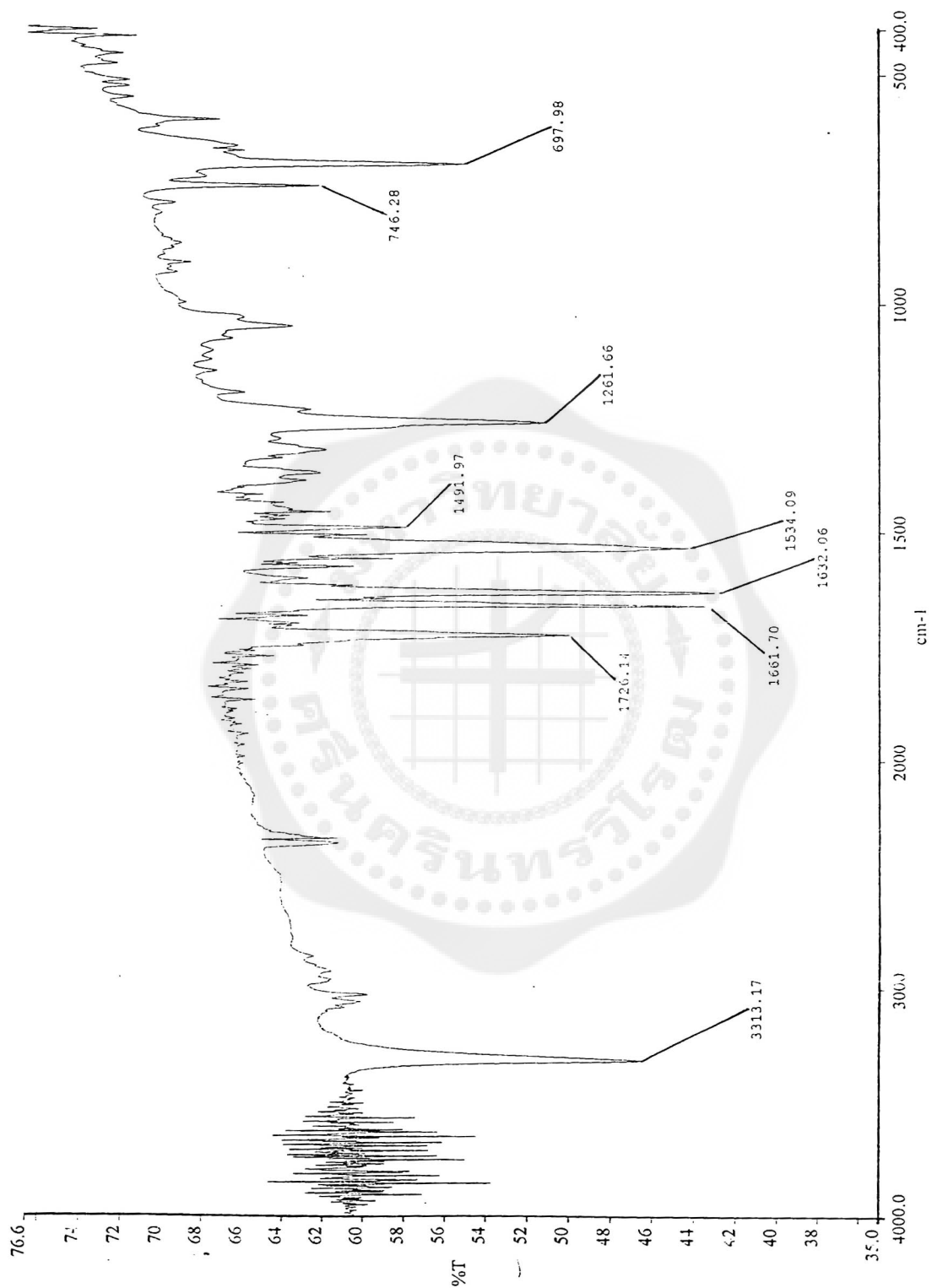
บรรณานุกรม

- ดรุณ เพ็ชรพลา, ญัตตรา จันทร์สุวานิชย์ และชาติรี ชาญประเสริฐ (2538).
พืชสมุนไพรในประเทศไทย. ตอนที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การทหารผ่านศึก
เต็ม สมิตินันท์ (2544). ชื่อพืชพรรณไม้ประเทศไทย. (ชื่อพฤกษศาสตร์ชื่อพื้นเมือง) กรุงเทพฯ :
พันธ์พิบลิชซิ่ง
- ประพิมพ์พัทตร์ เกื่อนสุคนธ์(2537) การศึกษาสารสกัดสมุนไพรต้านมะเร็ง. (Online)
<http://rdi.gpo.or.th/htmls/cancer.html>
- วิทย์ เทียงบุรณธรรม (2531). พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ โอเดียนสโตร์
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช(2540). ร่วมอนุรักษ์มรดกไทย สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย.
กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์
- Anderson, M. M. et al.(1991). "In vitro Cytotoxicity of a Series of Quassinoids from *Brucea javanica* Fruits Against KB Cell," *Planta med.*(57) :62-64.
- Cheng,H.-I., et al. (2001). "New Cytotoxic Butanolides from *Litsea acutivena*,"
J.Nat.Prod. 64 : 1502-1505.
- Fiebig, M. et al. (1985). "Plant Anticancer Agents, XLI. Cardiac Glycosides from
Streblus asper," *J.Nat.Prod.* 48(6) : 981-985.
- Fukamiya, N. et al. (1992). "Antitumor Agents, 127 . Bruceoside C , a New Cytotoxic
Quassinoid Glucoside, and Related Compounds from *Brucea javanica*,"
J.Nat.Prod. 55(4) : 468-475
- Geran, .R .I et al (1972) "Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products
Against Animal Tumors and other Biological Systems" *Cancer Chemother.*
*Rep.*3:7-17.
- Hsu,H.Y.et al(1997) "Comparisons of Geniposidic Acid and Geniposide on Antitumor
and Radioprotection after Sublethal Irradiation," *Cancer Lett* .113;31-37.
- Maiti,B.C.&Thomson,R.H(1976) "A Modified Dipeptide from the Alga *Cystoseira*
cormiculata Hauck," *Experientia* . 32:1106-1107.
- Na Bangchang, K. (1987).Study on Anticancer Activity of a Well-Know Thai Remedy.
Thesis, M.Sc.(Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photoccpied.
- Ohnishi, S. et al. (1995). "Bruceosides D , E and F Three New Cytotoxic Quassinoid
Glucosides from *Brucea javanica*," *J.Nat.Prod.* 58(7) : 1032-1038.

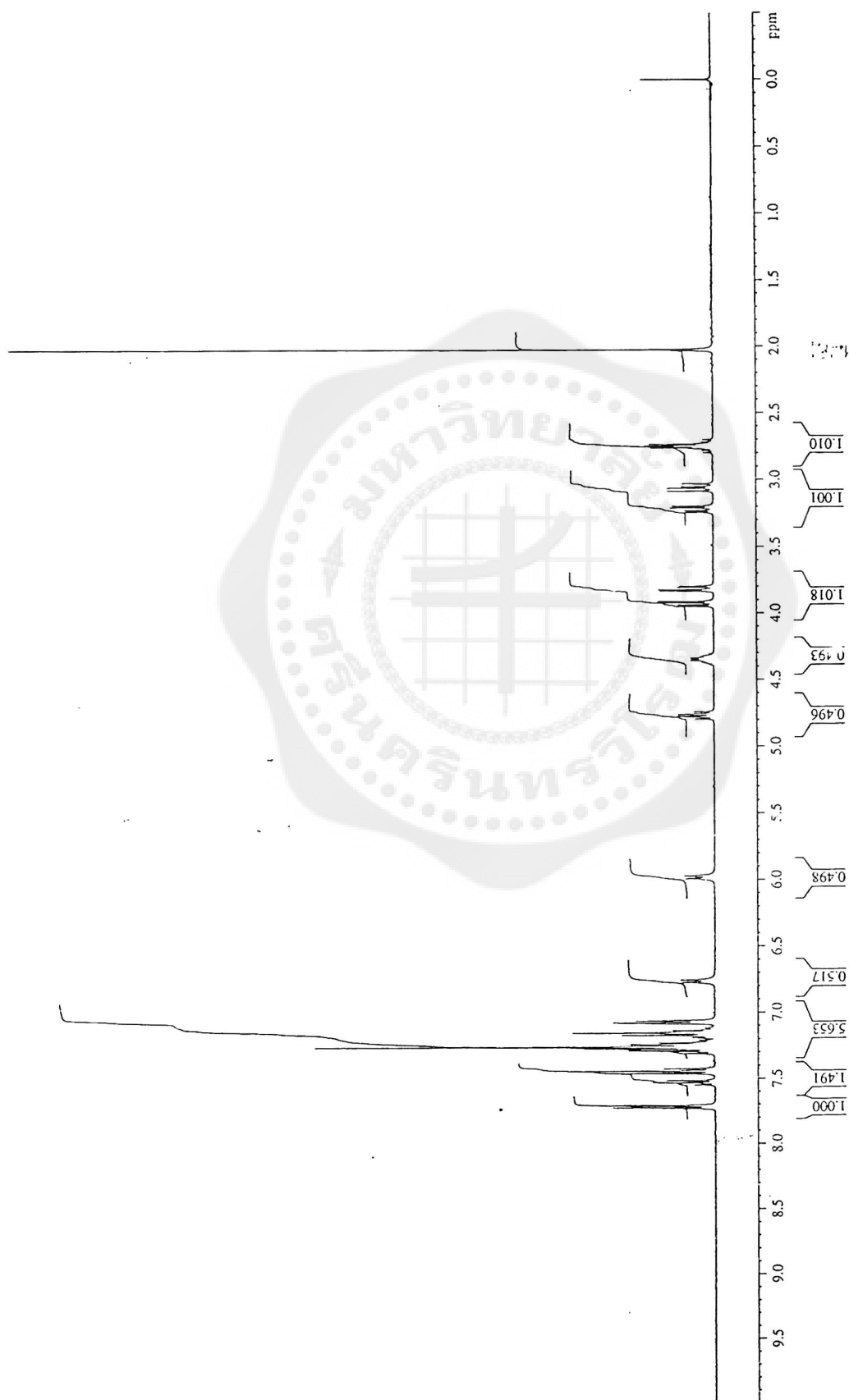
- Peng, J.N., Feng, X.Z. & Liang, X.T. (1999). "Two New Iredoids from *Hedyotis chrysotricha* ".
J.Nat.Prod. 62:611-612.
- Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of A Well-know Thai Folkloric Remedy* . Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol
- Swamy, S.M.K. & Tan, B.K.H. (2001). "Extraction, Isolate and Characterisation of Antitumor Principle, α -Hederin, from the Seeds of *Nigella sativa*,"
Planta. Med. 67 : 29-32.
- Thisoda, P. (1995). Immunostimulatory Effect of a Thai Folkloric Remedy in Breast Cancer Patiens. Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.
- Tsai, I.-L., et al. (2001) "Cytotoxic Butanolides from the Stem Bark of Formosan *Lindera communis*," *Plant. Med.* 67 : 865-867.
- Wang, C.-C., Chen, L.-G. & Yang, L.-L. (2002). "Cytotoxic Activity of Sesquiterpenoids From *Atractylodes ovata* on Leukemia Cell Lines," *Plant. Med.* 68 : 204-208.
- Wiwatwittaya, S. (1992). The Study of Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Know Thai Folkloric Remedy. Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.



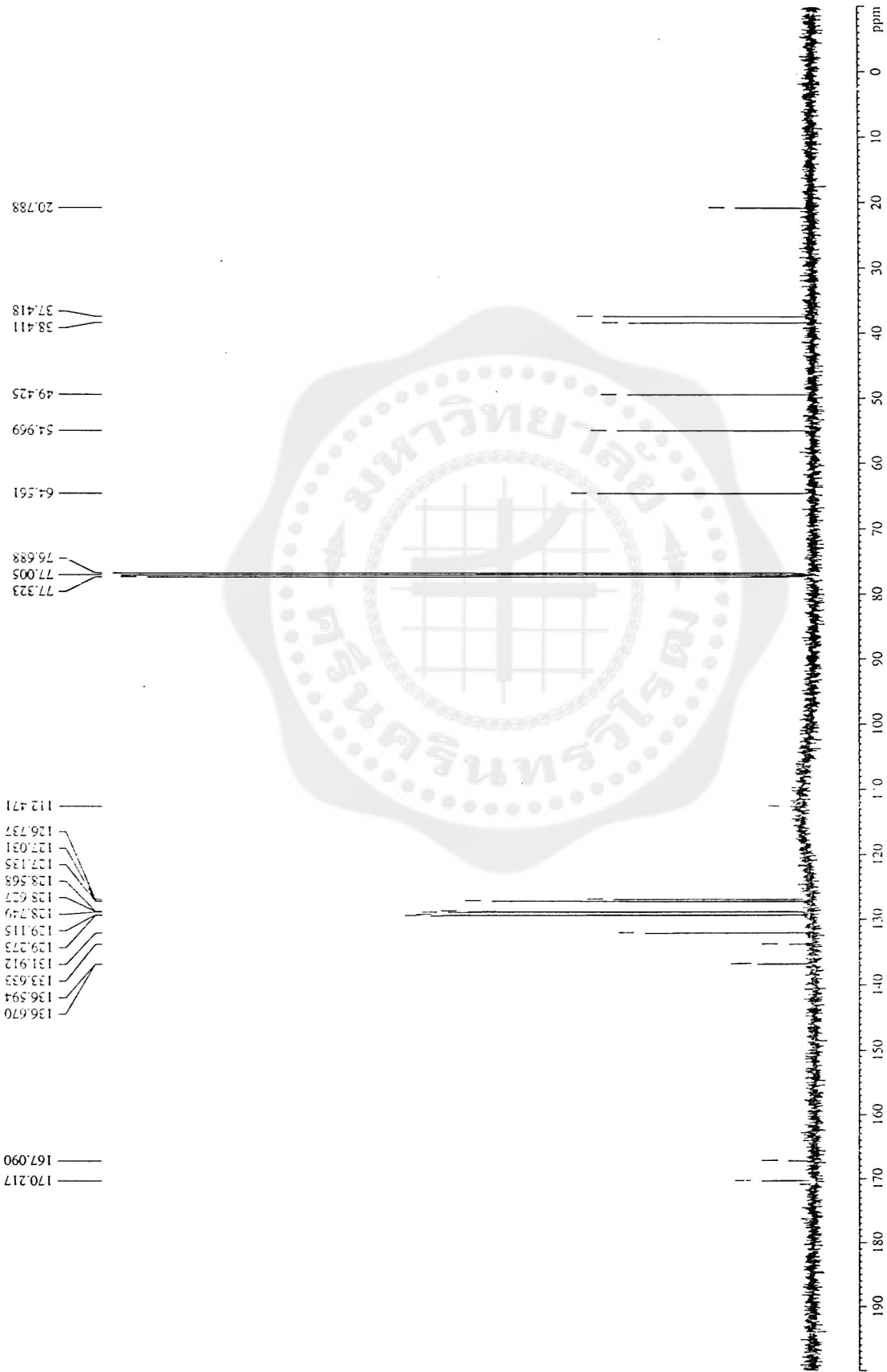
ภาคผนวก



ภาพประกอบ 15 FTIR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr)

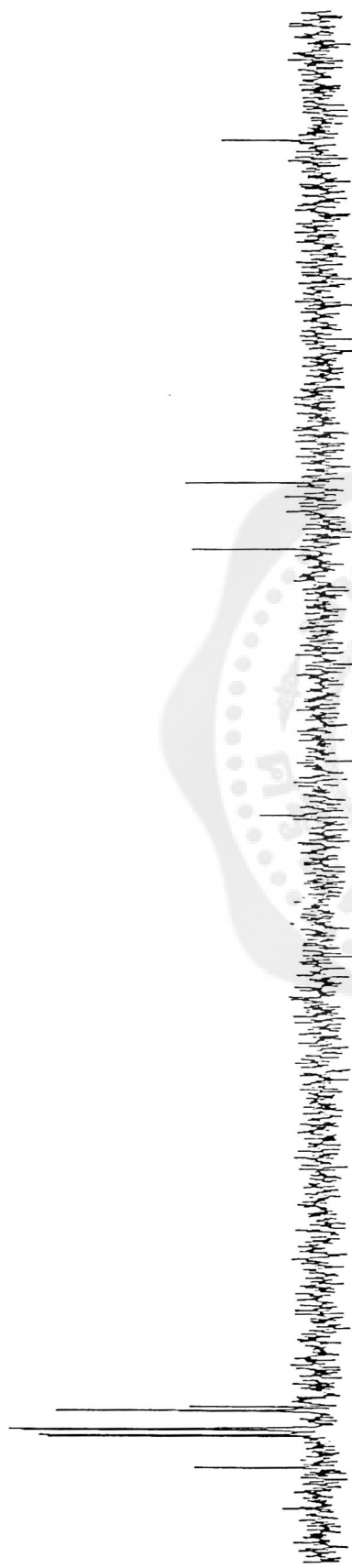


ภาพประกอบ 16 ^1H NMRสเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl_3 , 300MHz)

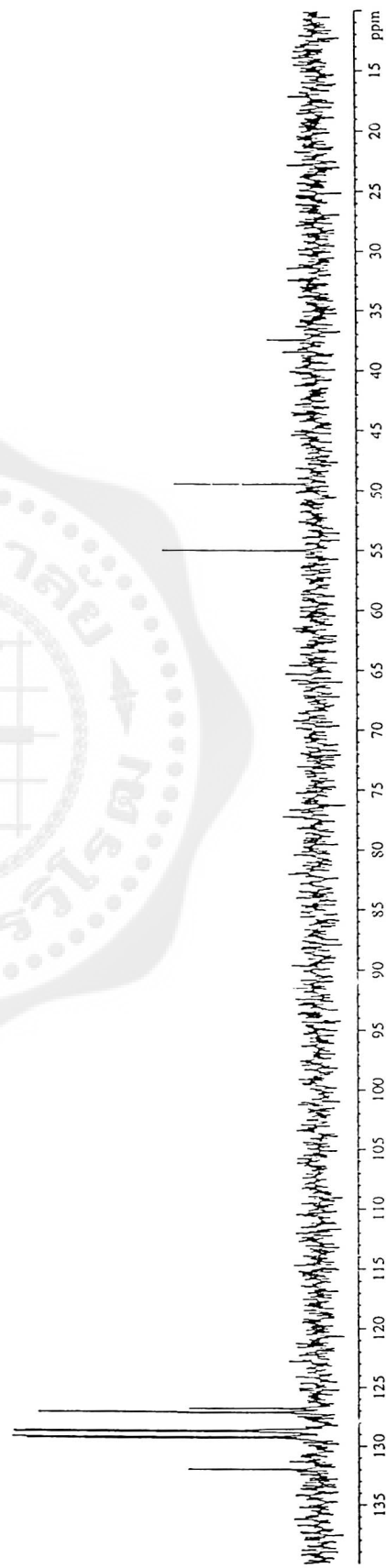


ภาพประกอบ 17 ¹³C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl₃, 75MHz)

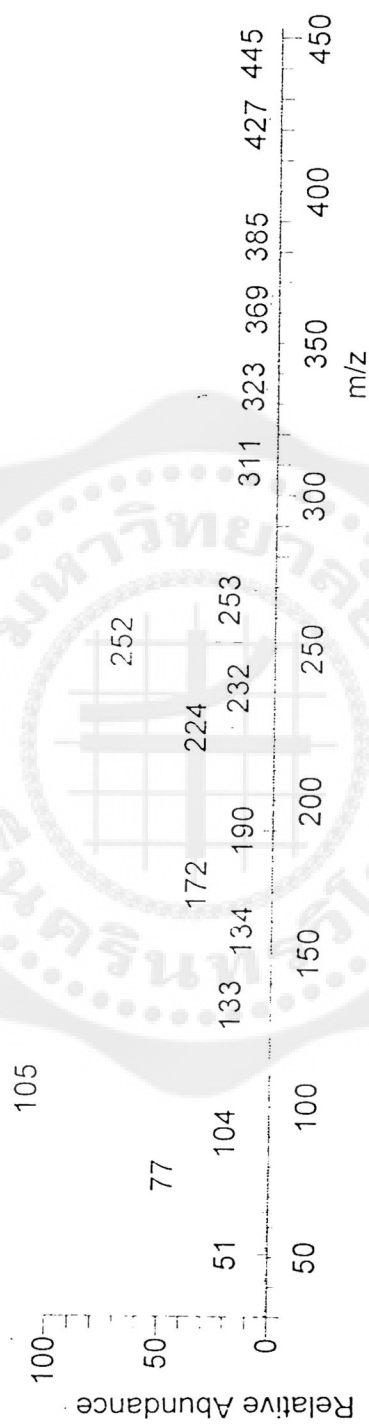
DEPT135



DEPT90



ภาพประกอบ 18 DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ A



ภาพประกอบ 19 Mass Spectrum ของสารประกอบ A