

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จาก
ลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.)

ปริญญานิพนธ์

ของ

อนันต์ คงชุม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

กันยายน 2544

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จาก
ลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.)

บทคัดย่อ
ของ
อนันต์ คงชุม

18 ต.ค. 2544

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
กันยายน 2544

18/10/2544

อนันต์ คงชุม. (2544), การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จาก
ลำต้นหลอดเถื่อน.(*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.) ปริญญานิพนธ์ กศ.ม.(เคมี).
กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
อาจารย์ ดร.จินดา แต่มบรรจง , ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล ,
ดร.พรทิพา พิชา.

หลอดเถื่อนเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในตำรายารักษาโรคมะเร็ง จากการนำลำต้น
หลอดเถื่อนที่แห้งและบดละเอียดมาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ พบว่า สารสกัด
hexane แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 64 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่
ที่สารสกัด ethanol มีค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อนำสารสกัด hexane มาแยกด้วยวิธีทาง
โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 3-acetylaleuritolic acid และสารผสม 3 กลุ่ม สารผสม
ที่ทราบองค์ประกอบ 2 กลุ่ม มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวต่ำ (ED_{50} มากกว่า 100
 $\mu\text{g/mL}$) คือ สารผสมของ stigmasterol กับ β -sitosterol และสารผสมของ stigmast-4-en-3-
one กับ stigmasta-4,22-dien-3-one และสารผสมที่ไม่ทราบองค์ประกอบอีก 1 กลุ่มที่แสดง
ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งโดยมีค่า ED_{50} 17 $\mu\text{g/mL}$ การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ใช้วิธี
การทางสเปกโตรสโกปี.

A STUDY OF CYTOTOXICITY ON LEUKEMIC CELLS OF THE COMPOUNDS
EXTRACTED FROM STEM OF *Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.

AN ABSTRACT
BY
ANAN KHONGCHUM

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
September 2001

Anan Khongchum. (2001). *A Study of Cytotoxicity on Leukemic Cells of the Compounds Extracted from Stem of Mallotus oblongifolius Muell.Arg.* Master Thesis, M.Ed (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr.Chinda Tambunchong , Asst. Prof.Dr.Sunan Chainakul, Dr.Porntipa Picha.

Mallotus oblongifolius Muell.Arg. is one of the plants that have been used as anticancer remedy in a Thai folklore medicine. The stem of *Mallotus oblongifolius* Muell.Arg. was minced and extracted exhaustively with hexane and ethanol respectively. The hexane extract showed cytotoxicity against P-388 cell line with ED₅₀ at 64 µg/mL while the ethanol extract had ED₅₀ greater than 100 µg/mL. Isolation of the hexane extract by chromatographic method yielded 3-acetylaleuritolic acid and three mixtures. They were a mixture of stigmasterol and β -sitosterol , a mixture of stigmast-4-en-3-one and stigmasta-4,22-dien-3-one and a mixture of unidentified compounds. The two mixtures of known components showed weak cytotoxicity (ED₅₀ > 100 µg/mL) against P-388 cell line, where as the mixture of unknown composition showed cytotoxicity against P-388 cell line with ED₅₀ at 17 µg/mL. Structures of compounds were elucidated based on the spectroscopic data.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน

(*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.)

ของ

นายอนันต์ คงชุม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คนบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2544

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร.จินดา แต่มบรรจง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการ

(ดร.พรทิพา พินา)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชญาลิทธิกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสาธิต)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.จินดา แต่มบรรจง ประธานคณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล และ ดร.พรทิพา พิชชา คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้ ชี้แนะและช่วยเหลือในการทำวิจัยและเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชญาลิทธิกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสถาพรที่ได้กรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ เกษร พะลัง อาจารย์ที่ปรึกษาและคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ นายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ผู้ให้คำแนะนำด้านการใช้สมุนไพรรและให้การสนับสนุนการวิจัยโดยจัดหาสมุนไพรรในปริมาณมากจนเพียงพอต่อการวิจัย ขอขอบคุณ คุณณรงค์ นันทเสน นักพฤกษศาสตร์ หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ ที่กรุณาตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ คุณจรัญญา งามช้าและคุณสุชานุช อ่อนดี นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ช่วยเหลือแนะนำเทคนิค วิธีการทดลองและเตรียมวัสดุอุปกรณ์ในส่วนของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ขอขอบคุณสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ช่วยในการวัดนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมและแมสสเปกตรัม ขอขอบคุณเพื่อนๆ นิสิตบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเคมี ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ

คุณความดีที่เกิดขึ้นจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่บิดา มารดา ผู้ให้กำเนิด บุรพจารย์ผู้ให้ความรู้ ภรรยาและลูกผู้เป็นกำลังใจ จนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จลงได้ อย่างสมบูรณ์.

อนันต์ คงชุม

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	6
ความสำคัญของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	7
นิยามศัพท์เฉพาะ	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
3 วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	17
อุปกรณ์และเครื่องมือ	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
4 ผลการศึกษาค้นคว้า.....	31
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	47
การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	47
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	57
ข้อเสนอแนะ	59
บรรณานุกรม	60
ภาคผนวก.....	66
อภิธานศัพท์.....	88
ประวัติย่อผู้วิจัย	90

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	วิธีการที่แพทย์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งของผู้ป่วยที่เข้ารับ การรักษาในโรงพยาบาลลามาธิบดินี ปี 1999	3
2	ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388	23
3	ตัวอย่างของการผสมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ cell suspension.....	26
4	ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane	31
5	ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-4	32
6	ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5	33
7	ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5-3	34
8	ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5-4	34
9	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กับกลุ่มควบคุม	35
10	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด hexane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กับกลุ่มควบคุม	36
11	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กับกลุ่มควบคุม	38
12	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5-4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กับกลุ่มควบคุม	39
13	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5-4-2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กับกลุ่มควบคุม	41
14	จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารผสม X สารประกอบ Y และสารผสม Z ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL และ 30 µg/mL และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับ กลุ่มควบคุม	42

บัญชีตาราง(ต่อ)

ตาราง		หน้า
15	^{13}C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	50
16	^{13}C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารผสม Z	55
17	ค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane และสารที่ได้จากการแยกบางส่วน ..	58

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	โครงสร้างของแอลคาลอยด์ vinblastine และ vincristine	4
2	ลักษณะของใบและผลของหลอดเถียนและลักษณะของลำต้น หลอดเถียนที่นำมาใช้ในการวิจัย	5
3	โครงสร้างของ 3-(3,3-dimethylallyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone	10
4	โครงสร้างของ mallotophenone	11
5	โครงสร้างของ mallotochromene	11
6	โครงสร้างของ mallotolerin	12
7	โครงสร้างของ mallotochromanol	12
8	โครงสร้างของ butyrylmallotochromene	13
9	โครงสร้างของ iso butyrylmallotochromene	13
10	โครงสร้างของ mallotojaponin	13
11	โครงสร้างของ bergennin	14
12	โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-13 α -ursan-28,12 β -olide-3-benzoate.	15
13	โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-28 β -methoxy-13 α -ursan- 28,12 β -epoxide -3-benzoate	15
14	โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-13 α -ursan-28-oic acid	15
15	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388	23
16	แผนภูมิแสดงการสกัดสารจากลำต้นหลอดเถียน	27
17	แผนภูมิแสดงการแยกสารสกัด hexane	28
18	แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-4	28
19	แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5	29
20	แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5-3	30
21	แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5-4	30
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด hexane กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์	37

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์	38
24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5-4 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์	40
25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5-4-2 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์	41
26 การแตกพันธะของสารประกอบ Y	52
27 FT IR สเปกตรัมของสารผสม X	67
28 ¹ H NMR สเปกตรัมของสารผสม X	68
29 ¹³ C NMR สเปกตรัมของสารผสม X	69
30 ¹ H NMR และ ¹³ C NMR สเปกตรัมของ β -sitosterol และ stigmasterol	70
31 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	71
32 ¹ H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	72
33 ขยาย ¹ H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	73
34 ¹³ C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	74
35 ขยาย ¹³ C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	75
36 DEPT-135 และ DEPT-90 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y ..	76
37 COSY NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y	77
38 Mass Spectrum ของสารประกอบ Y	78
39 FT IR สเปกตรัมของสารผสม Z	79
40 ¹ H NMR สเปกตรัมของสารผสม Z	80
41 ¹³ C NMR สเปกตรัมของสารผสม Z	81
42 DEPT-135 และ DEPT-90 NMR สเปกตรัมของสารผสม Z	82
43 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม A-5-4-2	83
44 ลักษณะของเซลล์มะเร็งกลุ่มควบคุมและเซลล์มะเร็งกลุ่มที่ ทดสอบด้วยสารกลุ่ม A-5-4-2	84

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

มะเร็งเป็นโรคร้ายที่คุกคามชีวิตมนุษย์มากขึ้นทุกวัน จากรายงานของกองสถิติ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าเมื่อไม่รวมอุบัติเหตุมะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับสองรองจากโรคหัวใจ (สาธารณสุข. 2541) มะเร็งเกิดกับคนทุกเพศทุกวัย ช่วงอายุที่เป็นมะเร็งมากที่สุดในเพศหญิงคือช่วงอายุ 45 ปี ในเพศชายคือช่วงอายุ 65 ปี มะเร็งสามารถเกิดได้กับอวัยวะเกือบทุกส่วน ในเพศหญิงพบว่ามะเร็งที่เป็นมากที่สุด 4 ลำดับแรกได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งระบบเลือดและมะเร็งรังไข่ ในเพศชายพบว่ามะเร็งที่เป็นมากที่สุด 4 ลำดับแรกได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งระบบเลือด มะเร็งตับและมะเร็งลำไส้ และในเด็กมะเร็งที่พบมากที่สุดคือมะเร็งระบบเลือดและมะเร็งสมอง (Ramathibodi Registry.1999 : 7-12)

เอมอร์ โสมนะพันธุ์ (2534 : 330-331) ได้กล่าวถึงประวัติการค้นพบและสมมติฐานของการเกิดมะเร็งไว้ว่า มะเร็งเป็นโรคที่มีมาตั้งแต่ดึกดำบรรพ์ โดยมีรายงานการ ค้นพบมะเร็งที่กระดูกต้นขาของมัมมี่ที่พบในประเทศอียิปต์และมีหลักฐานเกี่ยวกับมะเร็งเต้านมในตำราปาปิรัส ซึ่งเชื่อกันว่าเขียนโดยแพทย์ชาวอียิปต์โบราณเมื่อประมาณ 8,000 ปี ก่อนคริสตกาล มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่มีการเจริญของเซลล์หรือเนื้อเยื่ออย่างผิดปกติ ไม่อยู่ภายใต้การบังคับของร่างกาย ซึ่งอาจปรากฏเป็นตุ่ม โต ก้อน หรืออาจแพร่กระจายไปทั่วร่างกายแล้วทำให้เกิดมะเร็งที่อวัยวะอื่น ๆ โดยผ่านระบบน้ำเหลืองหรือระบบโลหิตซึ่งอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตลงในที่สุดหากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที มะเร็งเกิดได้กับอวัยวะแทบทุกอวัยวะและทุกส่วนของร่างกาย ปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งนั้นมีมากมาย มีทั้งปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกในร่างกาย สาเหตุส่วนใหญ่เน้นมาจากปัจจัยภายนอกมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่เกิดจากพันธุกรรม ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็ง ได้แก่ พฤติกรรมการสูบบุหรี่ พฤติกรรมในการกินอาหาร การได้รับสารเคมีจากสิ่งแวดล้อม เช่น สารไนโตรซามีนในอาหารบางประเภท 3,4 benzopyrene ในควันบุหรี่ สีสังเคราะห์โดยเฉพาะ azo dye ตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ยาฆ่าแมลงบางชนิด เช่น DDT aldrin สารพิษจากเชื้อรา เช่น aflatoxin สารพิษจากพืช เช่น cycasin จากลูกปรง แอลคาลอยด์ arecoline ในหมาก ไวรัสบางชนิดเช่น ไวรัสในกลุ่ม retrovirus , Hepatitis virus , Human Papilloma virus หรือแม้แต่ยาบางชนิด เช่น phenacetin chloramphenicol ก็ทำให้เกิดมะเร็งได้ สารเหล่านี้ เรียกว่าสารก่อมะเร็ง (carcinogen) เชื่อกันว่าสารก่อมะเร็งก่อให้เกิดมะเร็งโดยการทำ

ปฏิกิริยากับ DNA หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ DNA สารบางชนิดอาจทำปฏิกิริยากับ RNA หรือกับโปรตีนโดยเฉพาะกับเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบต่อยีน ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) หรือกระตุ้นยีนมะเร็งให้แสดงออก การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด

โรคมะเร็งอาจรักษาให้หายขาดได้ถ้าค้นพบตั้งแต่ระยะเริ่มแรกและยังไม่มีมีการกระจายการบำบัดรักษาโรคมะเร็งโดยทั่วไป ใช้ 4 วิธีต่อไปนี้

1. การผ่าตัด (surgery) (Lerritt, et.al. 1983 : 35-39) วิธีการรักษาโดยการผ่าตัดเป็นวิธีที่ใช้ในการรักษามะเร็งมาก่อนวิธีอื่น เป้าหมายสำคัญคือ การผ่าตัดเอาเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นมะเร็งออกให้หมด โดยให้เนื้อเยื่อปกติถูกตัดออกไปน้อยที่สุด ผลสัมฤทธิ์ของการรักษาอยู่ที่สามารถเอาเซลล์มะเร็งออกไปได้หมดหรือไม่ ข้อจำกัดของการรักษาโดยการผ่าตัดคือ ไม่สามารถรักษาโรคมะเร็งในระยะที่มีการแพร่กระจายและไม่สามารถรักษามะเร็งที่เป็นกับอวัยวะสำคัญ เช่น มะเร็งปอดที่ลุกลามเข้าใกล้หัวใจ เพราะถ้าเนื้อเยื่อของหัวใจถูกตัดออกไปแม้เพียงบางส่วน ผู้ป่วยอาจเสียชีวิต

2. การรักษาด้วยรังสี (radiotherapy) (Lerritt, et.al. 1983 : 39-45) หลักการสำคัญของการรักษาด้วยรังสีคือ การใช้รังสีเอกซ์หรือรังสีแกมมาที่มีพลังงานสูงจากภายนอกเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็ง การรักษาด้วยรังสีเหมาะกับมะเร็งบางชนิดที่เนื้อเยื่อมะเร็งตอบสนองต่อรังสีมากกว่าเนื้อเยื่อปกติ เช่น มะเร็งของอวัยวะที่ทราบตำแหน่งแน่นอน มะเร็งของต่อมน้ำเหลือง มะเร็งในเด็กเกือบทุกชนิด นอกจากนี้การรักษาด้วยรังสีเหมาะกับมะเร็งที่รักษาด้วยวิธีการผ่าตัดไม่ได้ เนื่องจากเป็นกับอวัยวะสำคัญเช่น มะเร็งปากมดลูก มะเร็งที่ลิ้น มะเร็งของเส้นเสียง ในขณะที่มะเร็งที่โต มะเร็งของกระดูก มะเร็งที่ผิวหนัง ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยรังสี

3. การรักษาด้วยยา (chemotherapy) (Lerritt, et.al. 1983 : 45-51) ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งมีสมบัติสำคัญ คือ เข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนของเซลล์ หรือเข้าไปขัดขวางกระบวนการแบ่งเซลล์ ยาที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งย่อมสามารถทำลายเซลล์ปกติได้ด้วย ดังนั้นยาที่มีสมบัติในการขัดขวางการแบ่งเซลล์จึงให้ผลต่อการรักษาที่ดี เนื่องจากเซลล์มะเร็งมีการแบ่งตัวอยู่ตลอดเวลาด้วยอัตราที่สูงกว่าเซลล์ปกติมาก การรักษาด้วยยาเหมาะกับมะเร็งในระยะเริ่มแรก เพราะเซลล์กำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็วตลอดเวลา และก้อนมะเร็งที่โตแล้วอาจไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา การรักษาด้วยยา แพทย์อาจใช้ยาร่วมกันหลาย ๆ ชนิด ซึ่งให้ผลในการรักษาดีกว่าการใช้ยาชนิดเดียวและอาจลดการดื้อยาได้ด้วย

4. การรักษาด้วยระบบภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) (Rosenberg.1993 : 301-332) เป็นการกระตุ้นให้เซลล์ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันช่วยในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง มักใช้ร่วมกันกับวิธีเคมีบำบัดเพื่อช่วยประสิทธิภาพของยาให้สูงขึ้น

การรักษามะเร็งด้วยวิธีการต่างๆ ข้างต้นนั้น แพทย์จะใช้วิธีการผสมผสาน เช่น การใช้รังสีบำบัดเสริมด้วยการให้ยาหรือให้ยาก่อนแล้วทำการผ่าตัดและเสริมด้วยการให้ยาเป็นต้น จากรายงานของโรงพยาบาลรามธิบดี พบว่า วิธีการที่แพทย์ใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งที่เข้ารับการบำบัดรักษาในปี 1999 ดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 วิธีการที่แพทย์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคมะเร็งของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลรามธิบดี ปี 1999

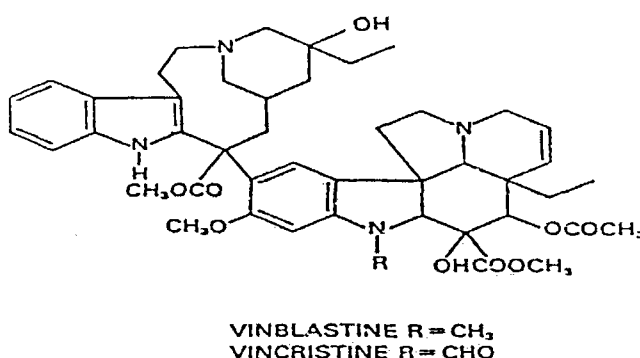
วิธีการรักษา	ร้อยละของผู้ป่วย
การผ่าตัด	24.80
รังสีบำบัด	11.39
เคมีบำบัด	10.30
การผ่าตัดร่วมกับรังสีบำบัด	8.79
การผ่าตัดร่วมกับเคมีบำบัด	8.76
รังสีบำบัดร่วมกับเคมีบำบัด	5.39
การผ่าตัดร่วมกับรังสีบำบัดและเคมีบำบัด	5.35

ที่มา : Ramathibodi Cancer Registry . 1999

แม้ว่าการรักษาโรคมะเร็ง แพทย์ใช้วิธีการต่าง ๆ กัน แต่การบำบัดด้วยยายังคงจำเป็นอยู่ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าหาตัวยาใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงยังคงเป็นเรื่องที่จำเป็นต้องศึกษากันต่อไป

ยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งนั้นมีทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น cisplatin (cis (II) platinum diamminedichloride, cis DPP) (Mutschler,et.al.1995 : 602-603) และที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น taxol จากต้น yew (Wall, Wani & Tayler . 1976 : 1011-1030)

แอลคาลอยด์ vinblastine และ vincristine ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* G.Don) (Mutschler, et.al.1995 : 599) โครงสร้างของ vinblastine และ vincristine แสดงในภาพประกอบ 1 สารจากธรรมชาติดังกล่าวนี้ได้นำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในวงการแพทย์แผนปัจจุบันอย่างกว้างขวาง ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามสกัดหาสารสำคัญ (active principle) ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (cancer inhibitor) จากพืชสมุนไพรอื่นจำนวนมาก และในการค้นหาพืชสมุนไพรเหล่านั้น ส่วนใหญ่อาศัยประสบการณ์จากคำบอกเล่าสืบต่อกันมา (empirical) หรือจากยาพื้นบ้าน (folklore medicine) ซึ่งบันทึกไว้ในตำรับยาแพทย์แผนโบราณ (ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ . 2526 : 60)

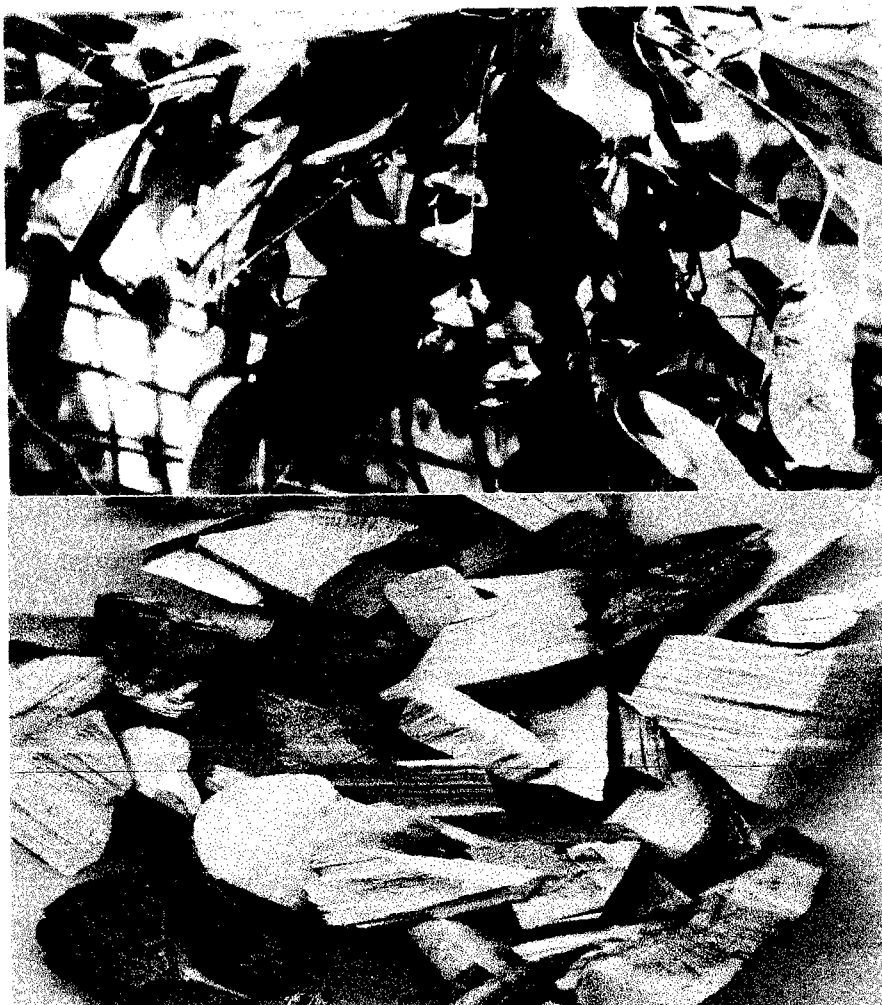


ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของแอลคาลอยด์ vinblastine และ vincristine

ในประเทศไทยมีพันธุ์พืชมากมายหลายชนิดที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น ชันทองพยาบาท (*Gelonium multiflorum*.A.Juss) คำแสด (*Mallotus philippensis*) แพงพวยฝรั่ง (*Mallotus rependus*) เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*.Roxb) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ดอกดิ้ง (*Gloriosa superba* Linn.) วงศ์ Lileaceae ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasatus* Kruz.) วงศ์ Acanthaceae (วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540 : 129-180) แกแล (*Maclura cochinchinnensis*(Lour)Corn.) วงศ์ Maraceae (ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ 2533 : 70) พืชที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้นี้บางชนิดมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น สารสกัดด้วย chloroform จากแก่นแกแล พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB (พริทธิพา พิศา . 2528 : 129-130) และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง P-388 ในหนูทดลองได้ (Sun,Chang & Cassady. 1988 : 951-952) เป็นต้น แต่ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งโดยที่ยังไม่มีการศึกษา

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและองค์ประกอบทางเคมีและมีพืชบางชนิดที่ใช้เป็นยาต้านมะเร็งโดยไม่มีกำบังเป็นหลักฐานยังคงเป็นเพียงคำบอกเล่าสืบต่อกันมา

หloedเถื่อน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mallotus oblongifolius* Muell.Arg. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น ชำหloed ผักหวานช้างโขลง เตื่อชื้ออื่น (เต็ม สมิตินันท์.2523 : 218) เป็นไม้พุ่มกึ่งยืนต้นขนาดเล็ก สูง 5-15 เมตร กิ่งก้านมีขนสีน้ำตาล ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปวงรีหรือรูปไข่กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ ผลแห้งแตกได้มี 3 พู ลักษณะของใบและผลของหloedเถื่อนและลักษณะของลำต้นหloedเถื่อนที่นำมาใช้ในการวิจัยแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของใบและผลของหloedเถื่อนและลักษณะของลำต้นหloedเถื่อนที่นำมาใช้ในการวิจัย

หลอดเดือนเป็นพืชที่เดิมเข้าไปในตำรับยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งตำรับหนึ่ง สมุนไพรตำรับนี้เดิมประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ หัวข้าวเย็นเหนือ (*Smilax carbularia* Kunth) ฟ้าเดือยน้ำ (*Ludwigia hyssopifolia* G.Don) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ต้นปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) ลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) สัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เกลิ็ดนิ่ม (*Manis javanica*) ขนเม่น (*Hystrix brachyura* Linn.) เฝี้ยงกระเบน (*Dasyatis spp.*) กระดองเต่า (*Domonia subtrijuga* Boulenger) และอกตะพานน้ำ (*Trionyx catalagneus* Boulenger) ปัจจุบันสมุนไพรตำรับนี้ใช้เฉพาะส่วนพืชเท่านั้นจากการศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าค่ามาตรฐานสากล โดยค่า ED_{50} ของสารสกัดต่อเซลล์ KB ที่เลี้ยงในหลอดทดลองสูงกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ แต่เมื่อทดลองกับหนูทดลองพบว่าสามารถยืดอายุของหนูทดลองกลุ่มที่เป็นมะเร็งได้ (Kesara Na Bangchang, 1987) ต่อมาพบว่าสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกรน (nude mice) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีผลตอบสนองต่อระบบทางภูมิคุ้มกัน (Suchitra Wiwatwittaya, 1992)

เนื่องจากหลอดเดือนเป็นพืชที่เพิ่มเข้าไปในตำรับนี้ภายหลัง จึงยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของพืชชนิดนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่าการวิจัยเกี่ยวกับหลอดเดือนนี้จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง การสกัด การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ และโครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้จากสารสกัด ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญยิ่งต่อการศึกษาในด้านอื่น ๆ เช่น ด้านพิษวิทยา ด้านเภสัชวิทยา อันจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด (crude extract) จากหลอดเดือนที่สกัดด้วย hexane และ ethanol
2. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารที่เป็นองค์ประกอบหลักจากสารสกัด
3. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากสารสกัด

ความสำคัญของการวิจัย

ผลของการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดหรือสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
2. ข้อมูลเกี่ยวกับสูตรโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบหลักหรือสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
3. ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งอันจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คือ ส่วนของลำต้นแห้ง
2. การสกัดสารจากพืช ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane และ ethanol ตามลำดับ การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีเป็นหลัก
3. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารใช้วิธีการทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Infrared Spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometry)
4. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิด P-388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P-388 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine lymphocytic leukemia cells) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์
2. ED_{50} หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองที่มีผลทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและนำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. เอกสารที่เกี่ยวข้องกับวิธีการวิจัยเพื่อหาสารต้านมะเร็งจากสมุนไพร
2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชในสกุล *Mallotus*
3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ *Mallotus oblongifolius*

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับวิธีการวิจัยเพื่อหาสารต้านมะเร็งจากสมุนไพร

เอมอร์ โสมนะพันธุ์ (2534 : 330-334) กล่าวถึงบทบาทของยาต้านมะเร็งในการรักษาโรคมะเร็งและแนวทางในการหาสารต้านมะเร็งจากสารสกัดจากธรรมชาติไว้ว่า ปัจจุบันยาด้านมะเร็งที่ได้จากสารสกัดจากธรรมชาติมีความสำคัญเพิ่มขึ้น เนื่องจากมะเร็งเป็นโรคที่เกิดได้จากหลายสาเหตุและเป็นได้กับทุกส่วนของร่างกาย อีกทั้งมีได้หลายรูปแบบ เช่น มะเร็งที่มีลักษณะเป็นก้อน (solid tumor หรือ sarcoma) มะเร็งของเยื่อเมือกต่าง ๆ (carcinoma) หรืออาจจะเป็นมะเร็งของเม็ดเลือดขาว (leukemia) มะเร็งของต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) ซึ่งอาจมีการแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย มะเร็งแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญและตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกัน ทำให้การรักษาโรคมะเร็งเป็นไปด้วยความลำบาก ในอดีตการรักษาโรคมะเร็งมักใช้วิธีการผ่าตัดและการฉายรังสีเป็นหลัก จะนำยาด้านมะเร็งมาใช้ก็ต่อเมื่อการรักษาด้วยการผ่าตัดหรือการฉายรังสีไม่ได้ผลเท่านั้น แต่ปัจจุบันได้มีการนำยาด้านมะเร็งมาใช้มากขึ้น อาจใช้ตั้งแต่ระยะแรกของการรักษา โดยเฉพาะรายที่มีการกระจายของโรค ได้มีการนำยาด้านมะเร็งมาใช้ในการรักษาเสริม (adjuvant therapy) โดยอาจให้ยาก่อน ระหว่าง หรือหลังการผ่าตัด และ/หรือการรักษาด้วยรังสี จะเห็นว่าการใช้ยาด้านมะเร็งเป็นวิธีที่มีความสำคัญมากขึ้น ในบางกรณียาด้านมะเร็งอาจยืดชีวิตผู้ป่วยให้ยืนยาวและสามารถดำรงชีวิตได้ดังเช่นคนปกติ วิธีการในการตรวจสอบสารสกัดจากพืชและสัตว์เพื่อหาสารต้านมะเร็งนิยมใช้วิธีการทดสอบเบื้องต้นโดยผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งทำให้เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P-388 และใช้กระบวนการในหลอดทดลองเป็นแนวทางในการแยกสารออกฤทธิ์ หลังจากที่สามารถยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปคือวิธีการแยกสารด้วยวิธี Bioassay Directed Fractionation เนื่องจากพบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการ

ด้านมะเร็งนั้นมักมีปริมาณน้อยในพืช คือ มีปริมาณ 1 – 100 mg ต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 kg ดังนั้น ในกระบวนการแยกสารด้วยวิธีการทางเคมีควรจะต้องการทดสอบสารแต่ละส่วนที่แยกได้ด้วยวิธีการทางชีวภาพควบคู่กันไปด้วยเพื่อหาส่วนที่มีฤทธิ์วิธีการทดสอบทางชีวภาพที่นิยมใช้คือ ทดสอบในหลอดทดลอง เนื่องจากใช้สารตัวอย่างน้อยมีความไวสูงและรวดเร็วกว่าทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยใช้เกณฑ์ว่าสารนั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเมื่อนำสารนั้นทดสอบกับเซลล์ KB ในหลอดทดลองมีค่า ED_{50} ต่ำกว่า 4 $\mu\text{g/mL}$ และหรือเมื่อทดสอบกับสัตว์ทดลอง มีอัตราส่วนสัตว์ที่รอดชีวิตในกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับหรือมากกว่า 1.2 เท่า การแยกสารจากสารสกัดชั้นต้นอาจใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อช่วยขจัดสารที่ปนเปื้อนออกไป จากนั้นอาจใช้กรดอ่อนในการแยกสารที่เป็นเบสเช่น แอลคาลอยด์และใช้เบสอ่อนในการแยกสารที่เป็นกรด เช่น กรดอินทรีย์ต่าง ๆ ขั้นตอนต่อไปคือ การแยกสารด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี นำส่วนที่ออกฤทธิ์มาแยกต่อจนกระทั่งได้สารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์ การพิสูจน์โครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ทำได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลองที่ถูกทำให้เป็นมะเร็งชนิดต่าง ๆ เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านมและมะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนู ตลอดจนมะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด และมะเร็งเต้านมของคนที่ถูกนำไปปลูกถ่ายลงในหนูที่ถูกตัดต่อมไทมัสออก หากสารดังกล่าวให้ผลการต้านมะเร็งเป็นที่น่าพอใจ จึงจะนำไปศึกษาขั้นคลินิก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งในคน ถ้าผลการศึกษาในขั้นนี้เป็นที่น่าพอใจ ก็จะนำสารชนิดนั้นมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

อรุณพร อธิรัตน์ (2542 : 63) ได้เปรียบเทียบแนวทางการวิจัยสมุนไพรในระยะเวลาที่ผ่านมา กับปัจจุบันว่า ก่อนหน้านี้นักพฤกษเคมีจะแยกสารประกอบจากพืชมากมายโดยไม่คำนึงถึงฤทธิ์เบื้องต้นก่อนเมื่อได้สารบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่แนวโน้มในปัจจุบันการวิจัยทางด้านพฤกษเคมี (Phytochemistry) และด้านเภสัชวิทยา (Pharmacognosy) จะต้องทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเสียก่อนเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาในขั้นต่อไป

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชในสกุล *Mallotus*

Mallotus philippinensis

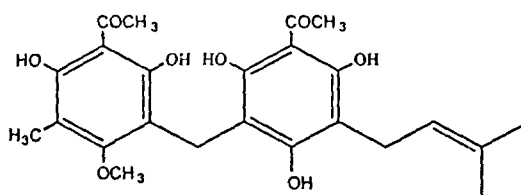
เฟอริกนีและคณะ (Ferrigny, et.al. 1981 : 679-686) ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเมล็ดของ *Mallotus philippinensis* ต่อเซลล์ PS และเซลล์ KB พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P-388 และเซลล์ KB ($ED_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$)

แนร์และราว (Nair & Rao. 1993 : 407-409) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ สารสกัดจากเปลือกของ *Mallotus philippinensis* ด้วย petroleum ether พบว่ามีสารที่สำคัญคือ Friedelin และ 3 β -acetoxy-22 β -hydroxyolean-18-ene

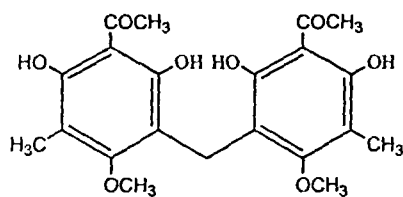
สมิธและคณะ (Smith, et.al. 1995 : 75-84) พบว่าสารสกัดจากส่วน glandula ของ *Mallotus philippinensis* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ COLO320 (ED₅₀ เท่ากับ 16.7 μ g/mL และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 100% ที่ความเข้มข้น 100 μ g/mL)

Mallotus japonicus

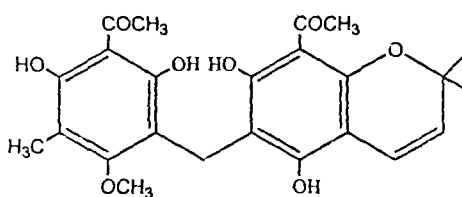
อริซาวาและคณะ (Arisawa, et.al. 1985 : 455-459) ได้ศึกษาองค์ประกอบที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* โดยนำสารสกัดหนาบที่ได้อจากการสกัดด้วย methanol มาสกัดด้วย petroleum ether และ 90%methanol แล้วนำขึ้น methanol มาสกัดด้วย chloroform และ 10%methanol นำขึ้น chloroform ไประเหยและแยกด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย chloroform 1% methanol / chloroform 2% methanol / chloroform 5% methanol / chloroform 10% methanol / chloroform และ methanol ได้สารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 3 ชนิดคือ 3-(3,3-dimethylallyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone , 5-methylene-bis-2,6-dihydroxy-3-methyl-4-methoxyacetophenone หรือ mallotophenone และ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-2,2-dimethylchromene หรือ mallotochromene โครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิด ดังภาพประกอบ 3 – 5



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ 3-(3,3-dimethylallyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone



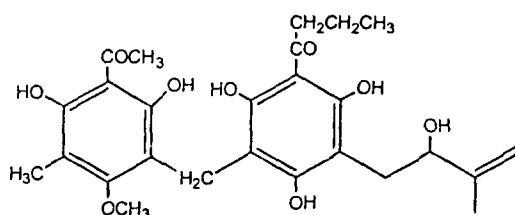
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของ mallotophenone



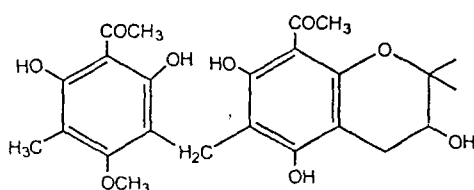
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ mallotochromene

ต่อมา อริซาวาและคณะ (Arisawa, et.al. 1986:298-302) สามารถแยกสาร 3-(3-methyl-2-hydroxy-but-3-enyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phlorbutyrophenone หรือ mallotolerin และ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)2,2-dimethyl-3-hydroxychroman หรือ mallotochromanol จากสารสกัดจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* ด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและใช้ 15% ethyl acetate/hexane เป็นตัวชะสารประกอบทั้งสองชนิดนี้เป็นสารประกอบใหม่ มีโครงสร้างดังแสดงในภาพประกอบ 6 และภาพประกอบ 7 ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่า สารประกอบ mallotolerin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L-5178Y เท่ากับ 0.95 $\mu\text{g/mL}$ และ 0.82 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่สารประกอบ mallotochromanol ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y ($ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) และพบว่า อนุพันธ์ acetate ของ mallotolerin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำลง โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L-5178Y เท่ากับ 3.50 $\mu\text{g/mL}$ และ 10.35 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่อนุพันธ์ acetate ของ mallotochromanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้น โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L-5178Y

เท่ากับ 8.6 $\mu\text{g/mL}$ และ 4.50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับและเมื่อทดสอบในหนูทดลอง ปรากฏว่าสารทั้งสองมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ Ehrlich carcinoma ในหนูทดลองได้ปานกลาง

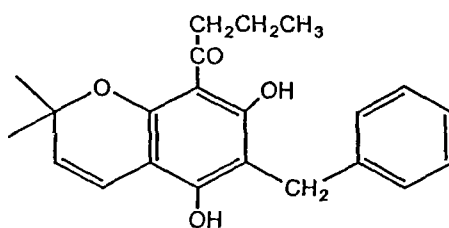


ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของ mallotolerin

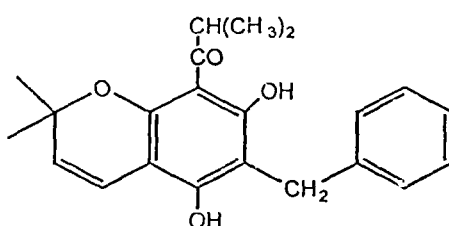


ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของ mallotochromanol

ฟูจิตะและคณะ (Fujita, et.al 1988 : 708 – 712) พบสารประกอบชนิดใหม่ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดจากส่วนเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* อีก 2 ชนิด คือ 5,7- dihydroxy-6-(2',4'-dihydroxy-3'-acetyl -5'-methyl-6'-methoxybenzyl)- 8-butyryl -2,2-dimethylchromene หรือ butyrylmallotochromene และ 5,7- dihydroxy-6-(2',4'-dihydroxy-3'-acetyl-5'-methyl-6'-methoxybenzyl)-8-isobutyryl-2,2-dimethylchromene หรือ isobutyrylmallotochromene เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ KB พบว่า butyrylmallotochromene มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.3 $\mu\text{g/mL}$ ส่วน isobutyrylmallotochromene มีความเป็นพิษต่อเซลล์ KB โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.4 $\mu\text{g/mL}$ โครงสร้างสารทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงในภาพประกอบ 8 และภาพประกอบ 9

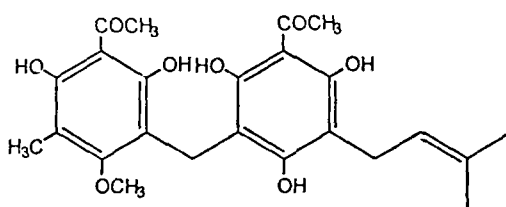


ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ butyrylmallotochromene



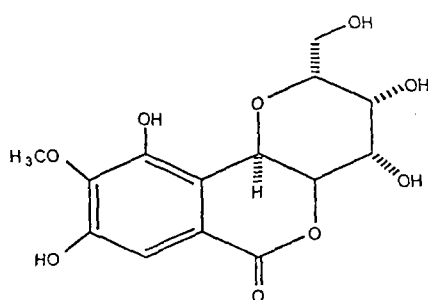
ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของ isobutyrylmallotochromene

ต่อมา อริซาวาและคณะ (Arisawa, *et.al.* 1991 : 1409 – 1412) สามารถแยกสาร mallotojaponin ได้จากสารสกัดจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* โครงสร้างของ mallotojaponin ดังแสดงในภาพประกอบ 10 จากการศึกษาฤทธิ์ด้านสารเสริมการเกิดมะเร็ง (antitumor promotor activity) พบว่า สาร mallotojaponin สามารถยับยั้งการทำงานของ ^3H -choline กับ phospholipid ของ C3H101/2 cells ที่สร้างขึ้นโดย 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารเสริมการเกิดมะเร็งได้



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของ mallotojaponin

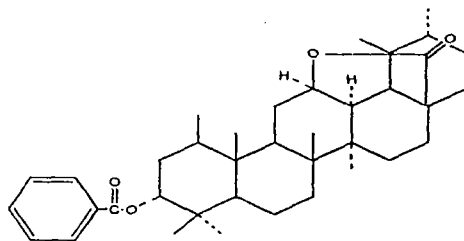
คิมและคณะ (Kim.*et.al.* 2000 : 79- 83) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูของสารประกอบ bergenin (ภาพประกอบ 11) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ *Mallotus japonicus* โดยนำเอาเซลล์ตับหนูมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใส่ CCl_4 ลงไปด้วย เมทาบอลไลต์ของเซลล์ตับจะเปลี่ยน CCl_4 ให้เป็น อนุมูลอิสระ $\cdot\text{CCl}_3$ อนุมูลอิสระนี้ รวมกับไลปิดและโปรตีนของเซลล์ เป็นเหตุให้เซลล์ตับถูกทำลาย เซลล์ตับที่ถูกทำลายจะปล่อย เอนไซม์ glutamic pyruvic transaminase (GTP) และ sorbitol dehydrogenase (SDH) ออกมา ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การติดตามปริมาณเซลล์ตับที่ถูกทำลายทำได้โดยวัดปริมาณของเอนไซม์ GTP และ SDH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยถือหลักว่าถ้าเซลล์ตับถูกทำลายมาก ปริมาณของเอนไซม์ GTP และ SDH ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะสูง จากผลการทดลอง คิมและคณะพบว่า กลุ่มทดลองซึ่งเลี้ยงเซลล์ตับหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใส่ CCl_4 และ bergenin อยู่ด้วยวัดปริมาณของเอนไซม์ GTP และ SDH ได้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงเซลล์ตับหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใส่ CCl_4 แต่ไม่มี bergenin คิมและคณะสรุปว่าสาร bergenin สามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูของสาร CCl_4 ได้



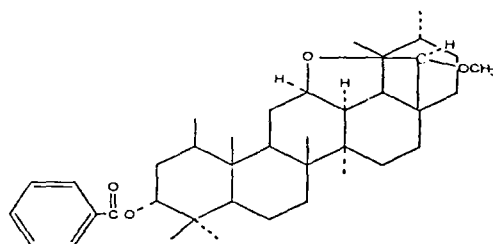
ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของ bergennin

Mallotus rependus

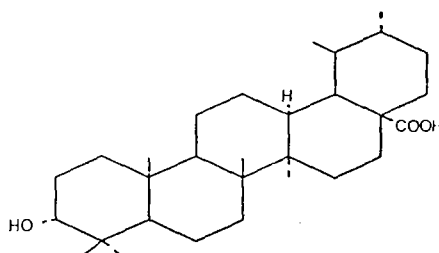
ฮวง วาง และลิน (Huang , Pao-Lin , Wang , Li-Wen & Lin ,Chun-Nan.1999 : 891 - 892) ได้สกัดสารจากเปลือกลำต้นและรากของ *Mallotus rependus* ด้วย acetone เมื่อนำมา แยกและทำให้บริสุทธิ์ได้สารประกอบ triterpenoid ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ 3α -hydroxy- 13α -ursan-28, 12β -olide-3-benzoate , 3α -hydroxy- 28β -methoxy- 13α -ursan-28, 12β -epoxide-3-benzoate และ 3α -hydroxy- 13α -u san-28-oic acid โครงสร้างของสารทั้งสามชนิดแสดงดัง ภาพประกอบ 12 – 14



ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-13 α -ursan-28,12 β -olide-3-benzoate



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-28 β -methoxy-13 α -ursan-28,12 β -epoxide-3-benzoate



ภาพประกอบ 14 โครงสร้างของ 3 α -hydroxy-13 α -ursan-28-oic acid

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นหลอดเดือน

แคนนอนและคณะ (Cannon, *et.al.* 1980 : 46-53) ได้สำรวจพืชในภาคใต้ของไทยพบพันธุ์ไม้ 185 ชนิด จัดอยู่ใน 161 สกุล และ 74 ตระกูล ในจำนวน 185 ชนิดที่สำรวจพบว่ามีพืช 27 ชนิดที่มีสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับในหลอดเดือนซึ่งเป็นพืช 1 ใน 185 ชนิดที่สำรวจ เมื่อนำใบสดมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและทดสอบด้วย Mayer's reagent

(สารละลาย mercuric chloride 1.36 g และ potassium iodide 5.0 g ในน้ำ 100 mL) พบว่าให้ผลเป็น negative แสดงว่าไม่มีแอลคาลอยด์ในสารสกัดจากใบพืชชนิดนี้ ต่อมาอาร์เบนและคณะ (Arbain, et.al. 1989 :73-78) ได้สำรวจพืชที่ขึ้นอยู่บนเกาะสุมาตรา พบพันธุ์ไม้ 293 ชนิด จัดอยู่ใน 203 สกุล และ 77 ตระกูล ในจำนวน 293 ชนิดนี้พบว่ามีพืช 58 ชนิดที่มี สารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับในหลอดเห็อนซึ่งเป็นพืช 1 ใน 293 ชนิดที่สำรวจ เมื่อทดสอบหาสารประกอบแอลคาลอยด์ พบว่าในใบพืชชนิดนี้มีสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์อยู่ด้วย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

ในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การสกัดสารจากลำต้นแห้งบดละเอียด การแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัด และสารแต่ละส่วนที่ได้จากการแยกและสารบริสุทธิ์
3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย คือ ส่วนลำต้นของหลอดเถื่อนได้จากคลินิกของนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่จังหวัดสิงห์บุรี ซึ่งซื้อมาจาก อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก เมื่อ พ.ศ. 2541 และได้ผ่านการตรวจเอกลักษณ์โดยนายณรงค์ นันทเสน นักพฤกษศาสตร์ หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู ชนิด P-388 ซึ่งเลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการของงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัย และศึกษาค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้ silica gel หรือ alumina เป็นตัวดูดซับ อัตราส่วนของตัวดูดซับ : สารเป็น 25 : 1 การบรรจุตัวดูดซับลงในคอลัมน์ใช้การบรรจุแบบเปียก

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้

ใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี การวัดสเปกตรัมอินฟราเรด (FT IR) ใช้เครื่องมือที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ การวัดสเปกตรัม นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR) ใช้เครื่องมือที่มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒและที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และแมสสเปกตรัม (EI-MS) ใช้เครื่องมือที่สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสาร การแยกสาร การทำสารให้บริสุทธิ์และการศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วัสดุและสารเคมี

1. ลำต้นหลอดเดือนที่แห้งและบดละเอียด
2. Acetone (*commercial grade)
3. Chloroform (*commercial grade)
4. Ethanol (*commercial grade)
5. Ethyl acetate (*commercial grade)
6. Hexane (*commercial grade)
7. Methanol (*commercial grade)
8. Precoated TLC plate (aluminia 60 F₂₅₄ ,Merck 1.05550)
9. Precoated TLC plate (silica gel GF₂₅₄ ,Merck 1.05554)
10. Alumina for column chromatography (neutral 0.063 –0.200 mm , Merck 1077.1000)
11. Silica gel for column chromatography (0.063 – 0.200 mm,Merck, 1.07729.500)
12. Anisaldehyde - sulfuric acid spray reagent (anisaldehyde 0.5 mL , conc.H₂SO₄ 8 mL , glacial acetic acid 10 mL, methanol 85 mL)(Jork,*et.al.*1990 : 195 – 198)

*ตัวทำละลายอินทรีย์ commercial grade ก่อนนำมาใช้ได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วสามัญ
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
3. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Electrothermal 9100)
4. เครื่องบดสมุนไพร

5. Freeze drier (FTS system FD-3-55D-MP)
6. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin-Elmer FT-IR Spectrum BX)
7. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
8. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AM 400, 400MHz)
9. Rotary evaporator (Buchi Ratavapor R-114)

สารเคมี/อุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารเคมี

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (E.Merck AR.grade)
2. Newborn Calf Serum (Biowittaker , AR grade)
3. RPMI 1640 medium (Gibco laboratories , AR grade)
4. Trypan blue dye (BDH.Chemical , AR grade)

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus , Tokyo)
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm² (Aseptic flask) (Costar , UK)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
4. ปิเปตขนาดต่าง ๆ
5. Incubator (ShellLab)
6. Haematocytometer (Boeco)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วิธีการสกัดสารจากลำต้นหลอดเถื่อน
 - 1.1 การสกัดด้วย hexane

นำลำต้นหลอดเดือนที่อบแห้งแล้วและบดละเอียดหนัก 32 kg แช่วด้วย hexane ปริมาตรประมาณ 8 -10 L เป็นเวลา 3 วัน กรอง เก็บสารละลายที่กรองได้ แช่วกากซ้ำด้วย hexane อีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองทุกครั้งมารวมกัน ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C นำสารละลายที่ได้มากำจัดน้ำออกโดยใช้ freeze drier สารที่ได้คือสารสกัด hexane หนัก 35.5 g แบ่งเก็บไว้สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 0.5 g ส่วนที่เหลือเก็บไว้สำหรับการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

1.1 การสกัดด้วย ethanol

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย hexane นำมาวางผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แช่วด้วย ethanol ปริมาตรประมาณ 8 - 10 L เป็นเวลา 3 วัน กรอง เก็บสารละลายที่กรองได้ แช่วกากซ้ำด้วย ethanol อีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองทุกครั้งมารวมกัน ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 °C นำสารละลายที่ได้มากำจัดน้ำออกโดยใช้ freeze drier สารที่ได้คือสารสกัด ethanol หนัก 242 g เก็บไว้สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่อไป

2. การแยกสารสกัด hexane และการทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่า จึงนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ในการแยกสารในแต่ละส่วนและการทำให้บริสุทธิ์นั้น จะดำเนินการเฉพาะสารที่มีแนวโน้มหรือมีค่าว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือมีปริมาณมาก โดยดำเนินการดังนี้

2.1 นำสารสกัด hexane หนัก 35 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ใช้ตัวทำละลายผสมของ chloroform กับ hexane ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตร เป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์เป็นส่วน ส่วนละ 120 mL นำสารละลายแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 6 ส่วน คือ A-1 , A-2 , A-3 , A-4 , A-5 และ A-6 นำแต่ละส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2.2 การแยกสารส่วน A-4 สารส่วน A-4 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่มีปริมาณมากและเกือบเป็นสารบริสุทธิ์ จึงนำมาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยนำสารส่วน A-4 หนัก 3.8 g มาบรรจุในคอลัมน์ ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ

ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตรเป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์เป็น ส่วน ๆ ละประมาณ 20 mL นำสารละลายแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกบางส่วนด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 2 ส่วน คือ A-4-1 ซึ่งมีปริมาณน้อย เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเป็นของผสมและไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงไม่นำมาแยกต่อ และสารส่วน A-4-2 ซึ่งพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแต่มีปริมาณมากและเกือบบริสุทธิ์ จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol นำผลึกที่ได้มาทำให้แห้ง ซึ่งน้ำหนัก หาจุดหลอมเหลวและตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2.3 การแยกสารส่วน A-5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ A-5 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าส่วนอื่น จึงนำมาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ คอลัมน์ โดยนำสารส่วน A-5 น้หนัก 24.5 g บรรจุในคอลัมน์ ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate อัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตรเป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์เป็น ส่วน ๆ ละประมาณ 20 mL นำสารละลายแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกบางส่วนด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 5 ส่วน คือ A-5-1 , A-5-2 , A-5-3 , A-5-4 และ A-5-5 นำแต่ละส่วนไป ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เฉพาะสารส่วน A-5-1 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวปนอยู่ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol นำผลึกที่ได้มาทำให้แห้ง ซึ่ง น้ำหนัก หาจุดหลอมเหลวและตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี

2.4 การแยกสารส่วน A-5-3 เมื่อนำสารส่วน A-5-3 มาแยกด้วย TLC โดยใช้ แผ่น precoated TLC (alumina) แล้วพ่นด้วย Dragendorff's spray reagent พบว่ามีบางจุดบน แผ่น TLC ให้ผลเป็นสีส้ม จึงนำมาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้ alumina เป็นตัว ดูดซับ โดยนำสารส่วน A-5-3 น้หนัก 0.307 g มาบรรจุในคอลัมน์ ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 9 : 1 โดยปริมาตรเป็นตัวชะ เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ เป็นส่วน ๆ ละประมาณ 20 mL นำสารละลายแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกบางส่วนด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 2 ส่วน คือ A-5-3-1 และ A-5-3-2

สารส่วน A-5-3-1 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่า เกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol กับ acetone

อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร นำผลึกที่ได้มาทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก หาคจุดหลอมเหลวและตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

2.5 การแยกสารส่วน A-5-4 สารส่วน A-5-4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทาง TLC พบว่า ยังเป็นของผสม จึงนำมาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ นำสารส่วน A-5-4หนัก 0.200 g บรรจุในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์เป็นส่วน ๆ ละประมาณ 20 mL นำสารละลายแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 3 ส่วน คือ A-5-4-1 , A-5-4-2 และ A-5-4-3 นำสารแต่ละส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2.6 การศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารส่วน A-5-4-2 เนื่องจากสารที่แยกได้ส่วน A-5-4-2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงนำมาศึกษาลักษณะโครมาโทแกรม ด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น precoated TLC (silica gel GF₂₅₄) ใช้สารละลายผสมระหว่าง chloroform กับ acetone อัตราส่วน 92 : 8 เป็นตัวชะ บนที่กั้นลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้หลังจากพ่นด้วย anisaldehyde spray reagent

2.7 การทดสอบสารกลุ่ม A-5-4-2 นำสารส่วน A-5-4-2 มาทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard (วีณา จิรัจฉิยากุล , 2534 : 93-94)โดยนำสารตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยใส่ในหลอดทดลองแล้วหยด acetic anhydride ตามด้วยสารละลายกรด H₂SO₄ เข้มข้น สังเกตการเปลี่ยนสี

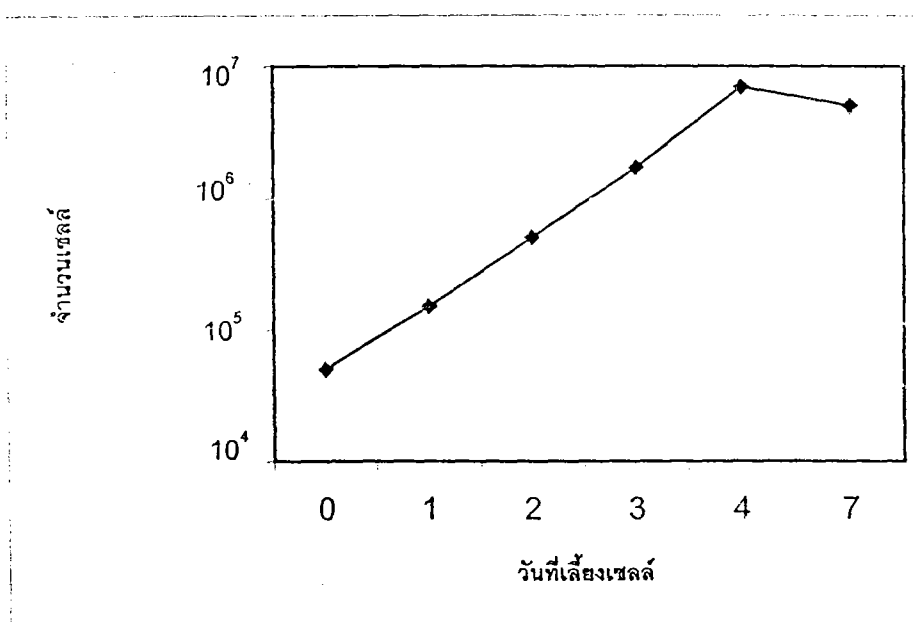
3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.1 การเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต (growth curve) ของเซลล์ P-388 ใช้วิธีสุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับบน haematocytometer โดยการย้อมด้วยสีย้อม trypan blue เซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน นับเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388

เวลา(วัน)	จำนวนเซลล์ P-388 ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย
0	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4
1	1.60×10^5	1.40×10^5	1.50×10^5
2	4.82×10^5	5.22×10^5	5.02×10^5
3	1.74×10^6	1.66×10^6	1.70×10^6
4	6.72×10^6	7.28×10^6	7.00×10^6
7	5.70×10^6	4.40×10^6	5.05×10^6

นำข้อมูลมาเขียนกราฟแบบ semilogarithm ระหว่างวันที่เลี้ยงเซลล์ (แกนนอน)
กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต(แกนตั้ง) ผลที่ได้ดังแสดงในภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388

จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต พบว่า เซลล์ P-388 เจริญเติบโตได้สม่ำเสมอในช่วง 4 วันแรกของการทดลอง ในวันที่ 4 เป็นวันที่มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ดังนั้นการคำนวณร้อยละของการเจริญเติบโต ถือว่า จำนวนเซลล์ในวันที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมและมีร้อยละการเจริญเติบโตเป็น 100

ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกากำหนดว่า สารสกัดจากธรรมชาติในรูปของสารสกัดหยาบ (crude extract) จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อมีค่า $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ (เอมอร์ โสมนะพันธุ์ . 2534 : 334) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกส่วนของสารสกัดที่มีค่า ED_{50} ใกล้เคียง $30 \mu\text{g/mL}$ มาศึกษาก่อน

3.2 การหาค่า ED_{50} ใช้วิธีการนับเซลล์ที่มีชีวิตในหลอดเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน แล้วคำนวณร้อยละการอยู่รอดโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยถือว่ากลุ่มควบคุมมีร้อยละการอยู่รอดเป็น 100 ดังนั้น ร้อยละการอยู่รอดของกลุ่มทดลองใด ๆ คำนวณได้จาก

$$\text{ร้อยละการอยู่รอด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ในกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การหาค่า ED_{50} ทำได้โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในหน่วย $\mu\text{g/mL}$ (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอด(แกนตั้ง) ค่า ED_{50} คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่มีร้อยละการอยู่รอดเท่ากับ 50 (จากกราฟ)

3.3 วิธีการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งสารตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 0.0040 กรัม ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO ลงไป 0.1 mL เขย่าให้ละลายให้หมดเติม 10 % NCS in RPMI ลงไป 3.9 mL สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น $1,000 \mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 4 mL

3.3.2 การเตรียมสารละลาย solvent control ละลาย DMSO 0.25 mL ใน RPMI 9.75 mL ได้สารละลาย solvent control 10 mL

3.3.3 การเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (stock cell suspension) ให้ได้ปริมาณเซลล์ $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ ใช้ปิเปตต์ดูด cell suspension จากขวดที่เลี้ยงเซลล์มา 0.2 mL ถ่ายลงในหลอดทดลอง เติม 0.4% trypan blue ลงไป 0.2 mL ใช้ Pasteur pipette ดูดของผสมระหว่างเซลล์กับ trypan blue มานับบน haematocytometer เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี เซลล์ที่ไม่มี

ชีวิตจะติดสีน้ำเงิน นำจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมาคำนวณ dilution number เพื่อเป็นข้อมูลในการเจือจาง ให้ได้ปริมาณเซลล์ 5×10^4 cell/ mL

ตัวอย่างการคำนวณ dilution number เช่น ถ้านับจำนวนเซลล์ได้ 250 cell
คำนวณ dilution number ได้ดังนี้

1 chamber = 5 ช่องเล็ก

$$\begin{aligned}\text{ปริมาตร 1 ช่องเล็ก} &= \text{พื้นที่} \times \text{ความลึก} \\ &= 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 \\ &= 10^{-4} \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ mL}\end{aligned}$$

เนื่องจากเซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue 2 เท่า

ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 1 chamber = 250×2 เซลล์

จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = $(250 \times 2)/5$ เซลล์

ปริมาตร 10^{-4} ml มีจำนวนเซลล์ = $(250 \times 2)/5$ เซลล์

ปริมาตร 1 ml มีจำนวนเซลล์ = $(250 \times 2 \times 10^4)/5$ เซลล์
 $= 1 \times 10^6$ เซลล์

dilution number = $(1 \times 10^6)/(5 \times 10^4) = 20$

จะต้องเจือจาง cell suspension 20 เท่า โดยการดูด cell suspension มา 1 mL
เติม RPMI ลงไป 19 mL

3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมสารละลายที่ต้องการทดสอบ กับ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ stock cell suspension ให้ได้ความเข้มข้นของสารเท่าที่จะทดสอบ ให้มีปริมาณเซลล์เป็น 5×10^4 cell/ mL และให้ความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 0.5 % โดยปริมาตร แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บ่ม (incubator) ที่มี 5% CO_2 ความชื้น 50 % อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน

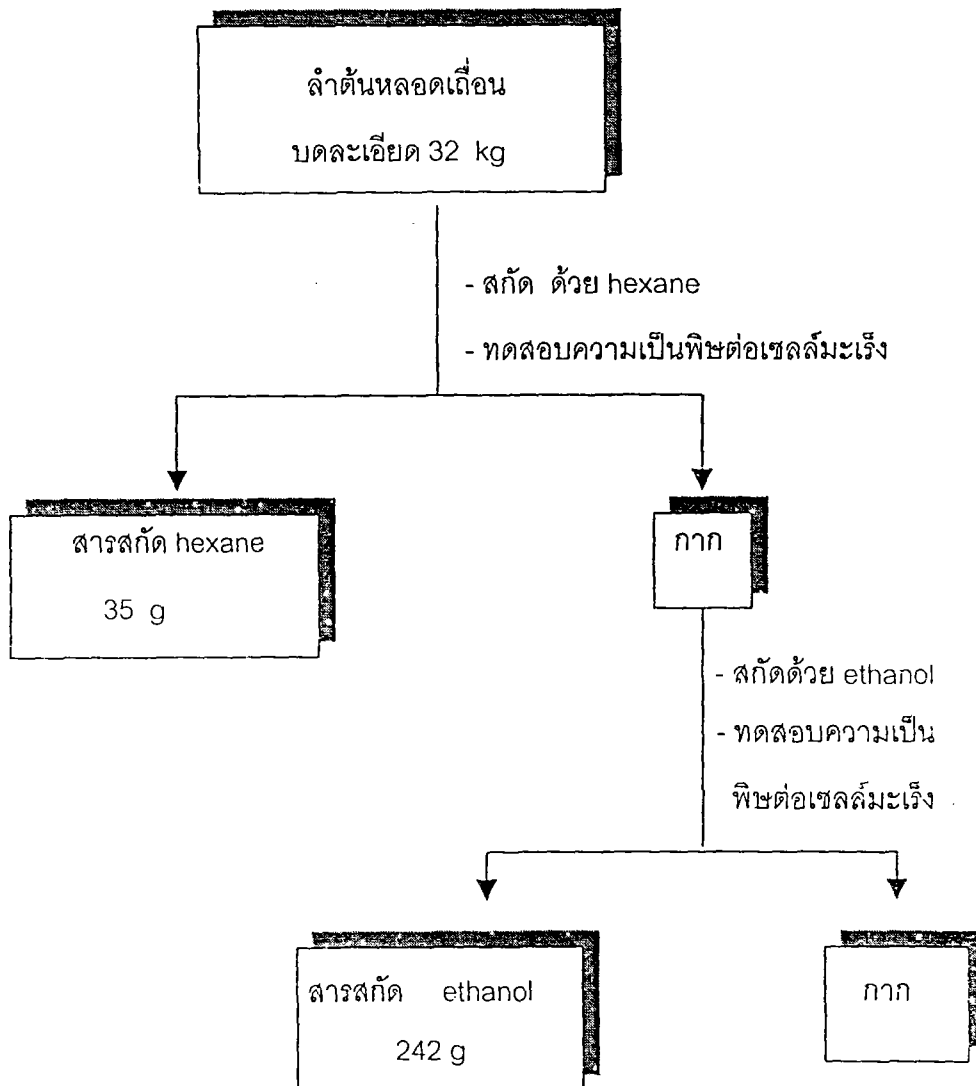
3.3.5 การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต นับจำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง โดยถือว่าเป็นวันที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ วิธีการนับจะสุ่มเซลล์มาจากหลอดเลี้ยงเซลล์มาหลอดละ 0.2 mL เติม trypan blue ลงไป 0.2 mL นำมานับบน haematocytometer บันทึกจำนวนเซลล์ที่นับได้

ตัวอย่างของการผสมสารละลายของสารที่จะทดสอบ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ cell suspension แสดงในตาราง 3

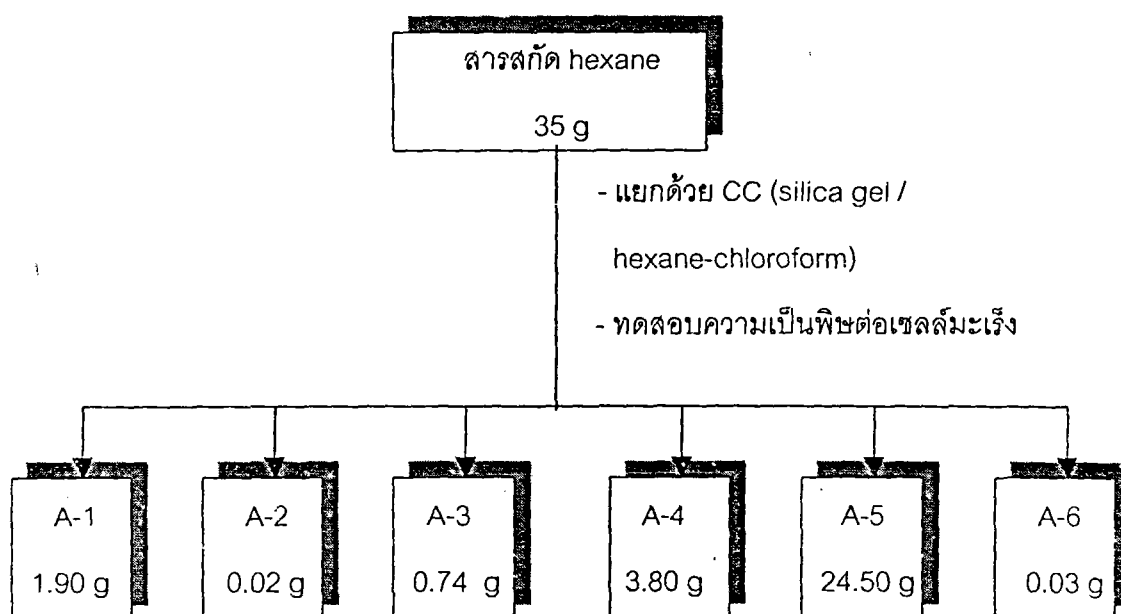
ตาราง 3 ตัวอย่างของการผสมสารละลายของสารที่ต้องการทดสอบ อาหารเลี้ยงเซลล์ solvent control และ cell suspension

drug conc. ($\mu\text{g/mL}$)	RPMI (mL)	drug (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volume (mL)
0	3.00	0.00	1.00	1.00	5.00
10	3.00	0.05	0.95	1.00	5.00
100	3.00	0.50	0.50	1.00	5.00

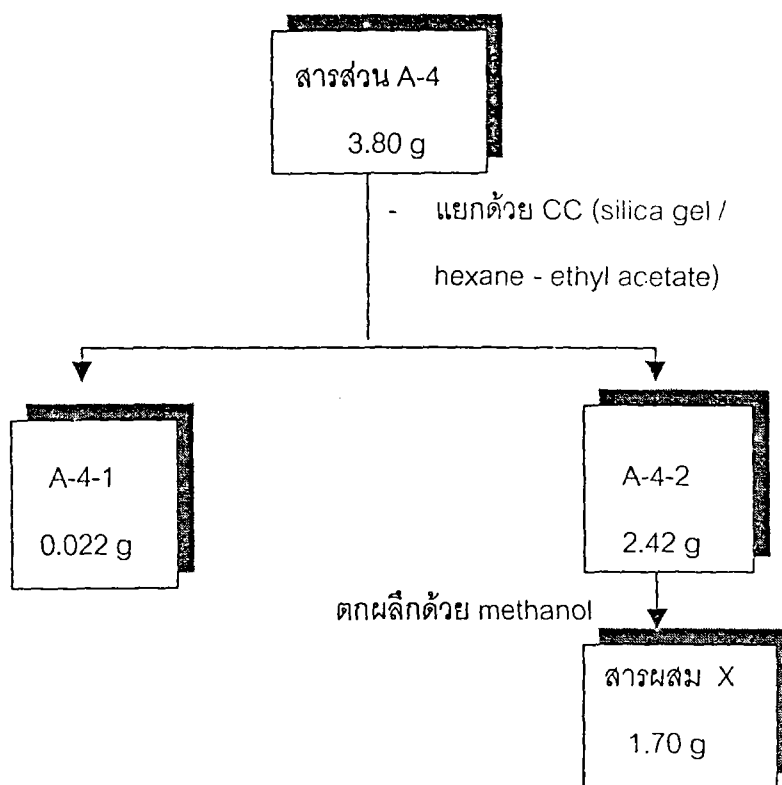
หมายเหตุ drug หมายถึง สารละลายของสารที่จะทดสอบใน 10% NCS in RPMI
เข้มข้น $1,000 \mu\text{g/mL}$



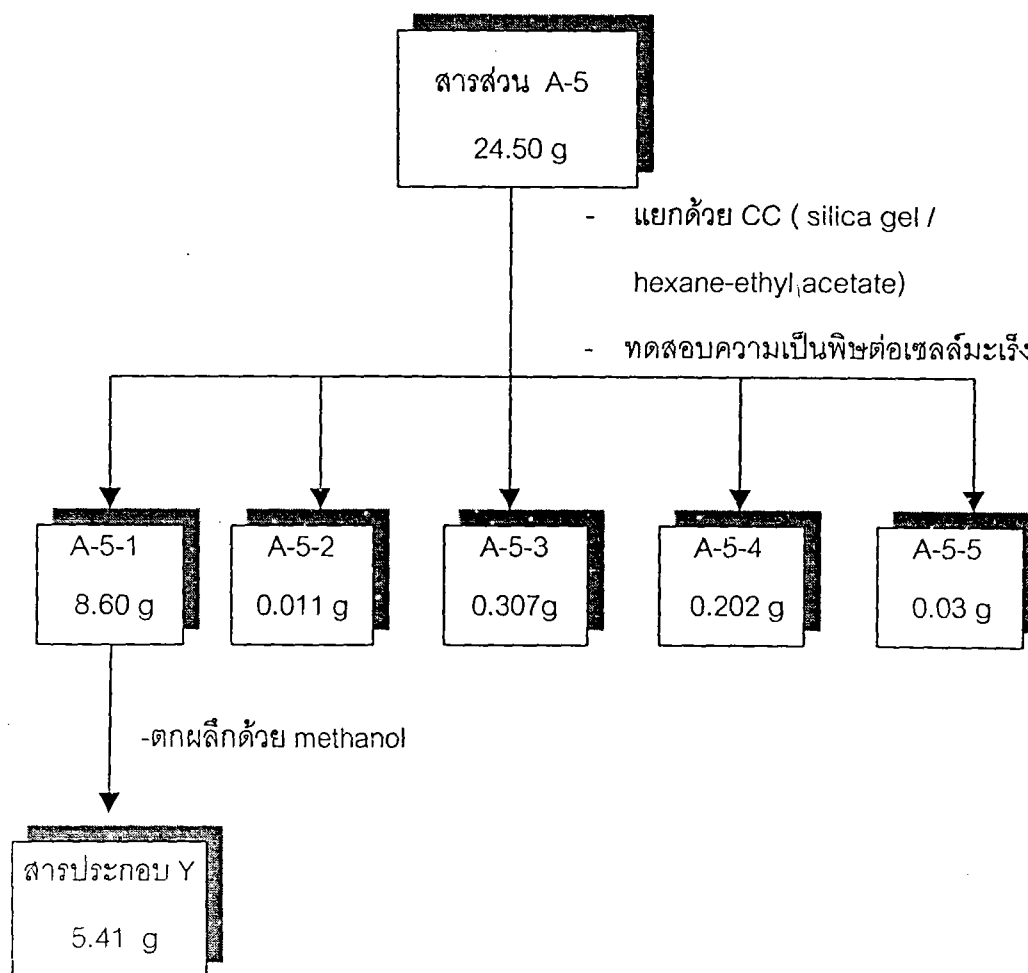
ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแสดงการสกัดสารจากลำต้นหอดเถียน



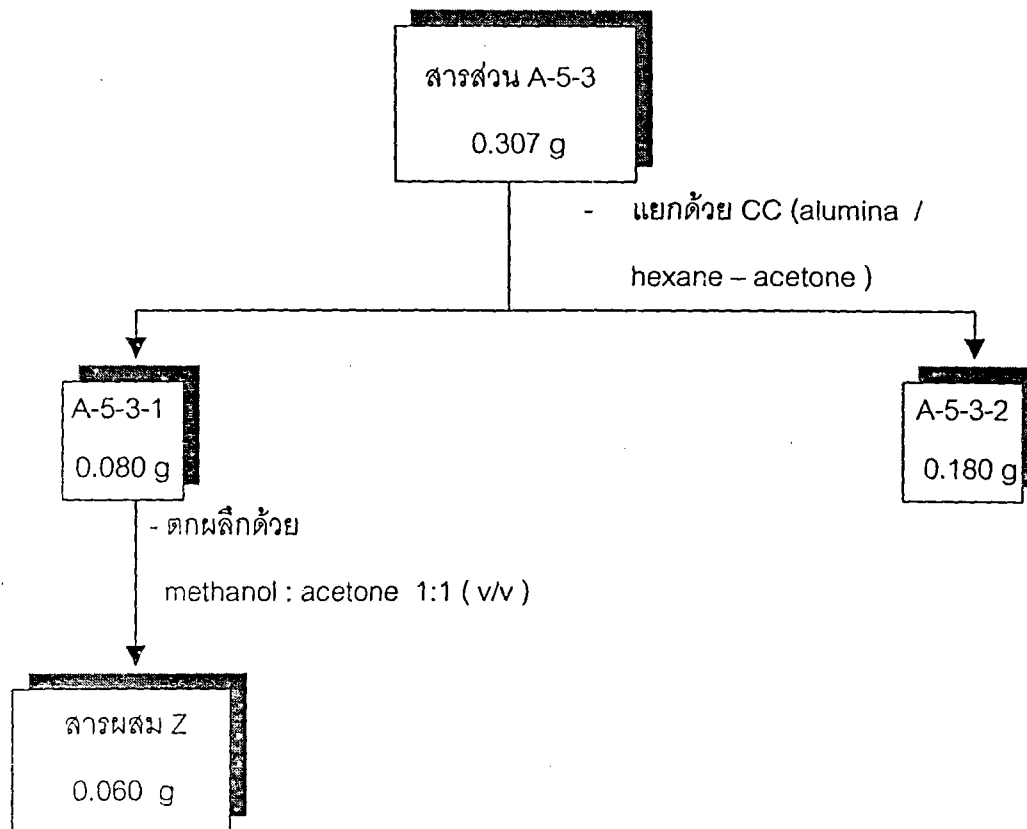
ภาพประกอบ 17 แผนภูมิแสดงการแยกสารสกัด hexane



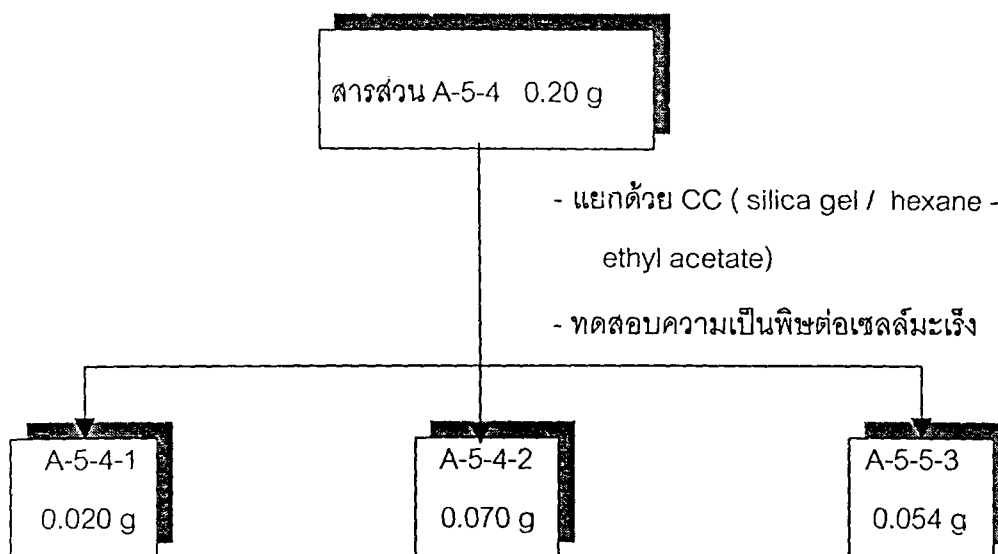
ภาพประกอบ 18 แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-4



ภาพประกอบ 19 แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5



ภาพประกอบ 20 แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5-3



ภาพประกอบ 21 แผนภูมิแสดงการแยกสารส่วน A-5-4

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

1. ผลการสกัดสาร

สารสกัด hexane มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม หนัก 35.5 g

สารสกัด ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงเข้ม หนัก 242 g

2. ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 ผลการแยกสารสกัดหยาบ hexane

ผลการแยกสารสกัดหยาบ hexane หนัก 35 g ด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel 1200 g เป็นตัวดูดซับชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ chloroform อัตราส่วน 1 : 4 โดยปริมาตร ตรวจสอบส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มี R_f ใกล้เคียงกันและมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงใน ตาราง 4

ตาราง 4 ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

สารส่วน	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ใช้ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
A-1	3,000	น้ำมันสีเหลือง	1.90
A-2	4,100	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.02
A-3	2,400	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.74
A-4	800	ของเหลวหนืดสีชมพู	3.80
A-5	2,400	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	24.50
A-6	1,600	ของเหลวหนืดสีเขียว	0.03

2.2 ผลการแยกสารส่วน A-4

ผลการแยกสารส่วน A-4 หนัก 3.80 g ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ตรวจสอบส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มี R_f ใกล้เคียงกัน และมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-4

สารส่วน	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ใช้ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
A-4-1	400	ของเหลวหนืดสีชมพู	0.022
A-4-2	1,200	ของแข็งสีขาว	2.42

สารส่วน A-4-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มาทดสอบด้วยเทคนิคทาง TLC พบว่าเกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol กรอง ทำผลึกให้แห้ง ได้ผลึกหนัก 1.70 g ให้ชื่อว่า สารผสม X

2.3 ผลการแยกสารส่วน A-5

ผลการแยกสารส่วน A-5 หนัก 24.50 g ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ตรวจสอบส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มี R_f ใกล้เคียงกัน และมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 6 ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5

สารส่วน	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ใช้ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
A-5-1	1,500	ของแข็งสีขาว	8.60
A-5-2	300	ของแข็งสีขาวปนเหลือง	0.011
A-5-3	1,000	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.307
A-5-4	1,200	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.202
A-5-5	2,000	ของเหลวหนืดสีดำ มีกลิ่นหอม	0.030

สารส่วน A-5-1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้ว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol กรอง ทำผลึกให้แห้ง ได้ผลึกหนัก 5.41 g ให้ชื่อว่า สารประกอบ Y

2.4 ผลการแยกสารส่วน A-5-3

สารส่วน A-5-3 ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น precoated silica gel GF₂₅₄ ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตรเป็นตัวชะ นำแผ่น TLC ที่ได้มาพ่นด้วย Dragendorff's spray reagent พบว่าจุดที่มีค่า R_f ประมาณ 0.6 ให้ผลเป็นสีส้ม จึงได้นำสารส่วน A-5-3 หนัก 0.307 g มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ alumina เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ตรวจสอบส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มี R_f ใกล้เคียงกันและมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5-3

สารส่วน	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ใช้ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
A-5-3-1	140	ของแข็งสีขาว	0.080
A-5-3-2	400	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.018

สารส่วน A-5-3 -1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol กับ acetone อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร กรอง ทำผลึกให้แห้ง ได้ผลึกหนัก 0.060 g ให้ชื่อว่า สารผสม Z

2.5 ผลการแยกสารส่วน A-5-4

นำสารส่วน A-5-4 ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้ม หนัก 0.200 g มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ตรวจสอบส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มี R_f ใกล้เคียงกันและมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ลักษณะและปริมาณสารที่แยกได้จากสารส่วน A-5-4

สารส่วน	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ใช้ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
A-5-4-1	100	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.020
A-5-4-2	160	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.070
A-5-4-3	400	ของเหลวหนืดสีส้มเข้ม	0.054

2.6 ผลการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารส่วน A-5-4-2

สารส่วน A-5-4-2 เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น precoated silicagel GF₂₅₄ เป็นตัวดูดซับ ะด้วย ตัวทำละลายผสมระหว่าง chloroform กับ acetone อัตราส่วน 92 : 8 โดยปริมาตร เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde – sulfuric acid spray reagent จุดที่ให้ค่า R_f ประมาณ 0.8 ให้ผลเป็นสีเหลือง

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethanol และสารสกัด hexane

3.1.1 สารสกัด ethanol นำสารสกัด ethanol มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 30 µg/mL ,60 µg/mL และ 100 µg/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับ ผลการนับจำนวนเซลล์ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 9

ตาราง 9 จำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด ethanol ที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ และ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.10×10^6	100.00
30	5.00×10^4	5.62×10^6	92.13
60	5.00×10^4	5.37×10^6	88.03
100	5.00×10^4	5.54×10^6	90.08

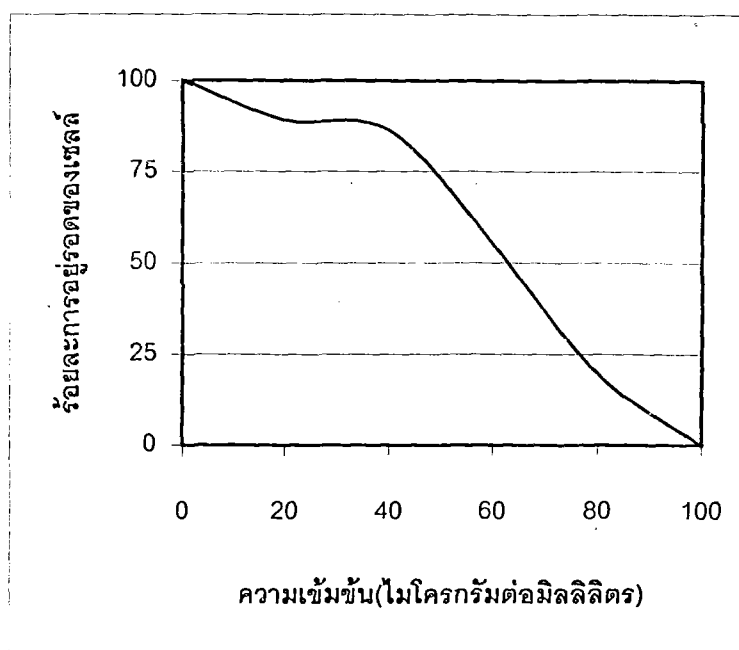
จากข้อมูลในตาราง แสดงว่าสารสกัด ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (ED₅₀ > 100 µg/mL)

3.1.2 สารสกัด hexane นำสารสกัด hexane มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็ง โดยนำมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 20 µg/mL , 40 µg/mL , 60 µg/mL , 80 µg/mL และ 100 µg/mL ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับ ผลการนับจำนวนเซลล์ และ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 10

ตาราง 10 จำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัด hexane ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.10×10^6	100.00
20	5.00×10^4	5.49×10^6	89.10
40	5.00×10^4	5.31×10^6	86.20
60	5.00×10^4	3.40×10^6	55.2
80	5.00×10^4	1.21×10^6	19.6
100	5.00×10^4	0	0

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) ได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด hexane กับ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์

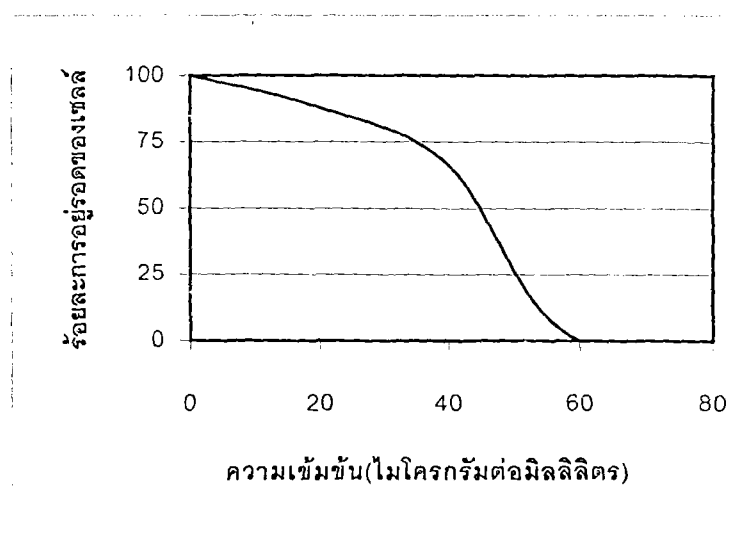
3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารส่วน A-5

นำสารสกัดส่วน A-5 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น $20 \mu\text{g/mL}$, $40 \mu\text{g/mL}$, $60 \mu\text{g/mL}$ และ $100 \mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับ ผลการนับจำนวนเซลล์ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 11

ตาราง 11 จำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.91×10^6	100.00
20	5.00×10^4	6.07×10^6	87.80
40	5.00×10^4	4.58×10^6	66.20
60	5.00×10^4	0	0
100	5.00×10^4	0	0

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น (แกนนอน) กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (แกนตั้ง) ได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์

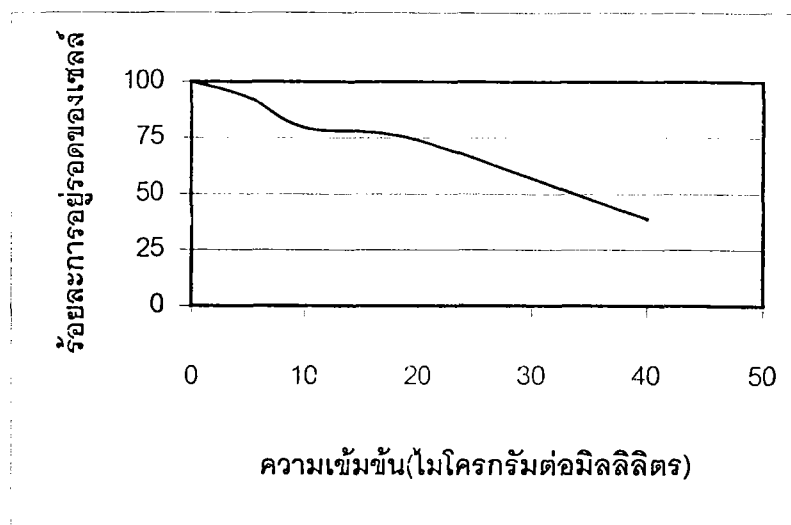
3.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารส่วน A-5-4

นำสารสกัดส่วน A-5-4 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$,10 $\mu\text{g/mL}$,20 $\mu\text{g/mL}$ และ 40 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ มานับ ผลการนับจำนวนเซลล์ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 12

ตาราง 12 จำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5-4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.66×10^6	100.00
5	5.00×10^4	6.20×10^6	93.10
10	5.00×10^4	5.30×10^6	79.57
20	5.00×10^4	4.92×10^6	73.87
40	5.00×10^4	2.57×10^6	38.73

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น(แกนนอน)กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์(แกนตั้ง)ได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5-4 กับ ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์

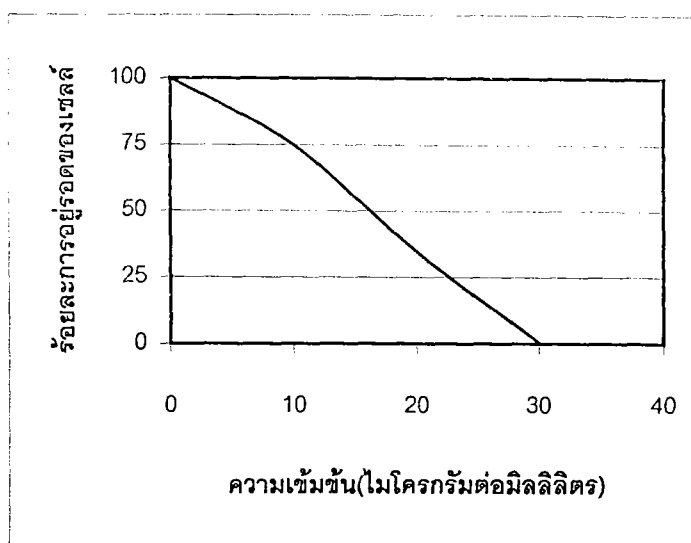
3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารส่วน A-5-4-2

นำสารสกัดส่วน A-5-4-2 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มานับ ผลการนับจำนวนเซลล์ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงในตาราง 13

ตาราง 13 จำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารส่วน A-5-4-2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
0	5.00×10^4	6.83×10^5	100.00
10	5.00×10^4	5.19×10^5	75.00
20	5.00×10^4	2.37×10^5	34.60
30	5.00×10^4	4.00×10^4	0.58
100	5.00×10^4	0	0

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น(แกนนอน)กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์(แกนตั้ง)ได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 25



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารส่วน A-5-4-2 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์

นำสารผสม X สารประกอบ Y และ สารผสม Z ที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL และ 30 µg/mL ผลการทดสอบเป็นดังตาราง 14

ตาราง 14 จำนวนเซลล์ในหลอดเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารผสม X สารประกอบ Y และสารผสม Z ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL และ 30 µg/mL และร้อยละการอยู่รอดของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

สาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ หลอดเลี้ยงเซลล์(5 mL)		ร้อยละการอยู่รอด
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
X	กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	7.20×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	6.32×10^6	87.77
	30	5.00×10^4	5.06×10^6	70.27
Y	กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.63×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	5.61×10^6	84.6
	30	5.00×10^4	2.86×10^6	43.14
Z	กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	7.39×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	6.96×10^6	94.18
	30	5.00×10^4	5.75×10^6	77.80

4. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ นำมาวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี ดังนี้

สารผสม X เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 1.70 g จุดหลอมเหลว 132 – 136°C ค่า R_f 0.35 (silica gel GF₂₅₄ / chloroform : ethyl acetate 95 : 5)

FT IR (cm⁻¹) (KBr)

(ภาพประกอบ 27)

3,422

OH

2,937

CH

1,466

CH₂

1,382

CH₃

¹H NMR (CDCl₃ , 300MHz)

δ (ppm) (ภาพประกอบ 28)

0.68 – 1.02 m

18H (6 x CH₃)

1.02 – 2.31 m

25H (9 x CH₂ , 7 x CH)

3.40 – 3.60 m

1H (H-3)

4.90 – 5.20 m

2H (บางส่วน ของ H-22 , H-23)

5.35 s

1H (H – 6)

¹³C NMR (CDCl₃ , 75 MHz)

(ภาพประกอบ 29)

สารประกอบ Y เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 5.41 g จุดหลอมเหลว 299– 300°C ค่า R_f 0.50 (silica gel GF₂₅₄ / hexane : ethyl acetate 85 : 15)

FT IR (cm^{-1}) (KBr)

(ภาพประกอบ 31)

3,350

OH

2,944

CH

1,734

C = O (ester)

1,689

C = O (carboxyl)

1,246

C – O

 ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz) $\delta(\text{ppm})$ (ภาพประกอบ 32 - 33)

0.85 – 0.95 m

21H (7 x CH_3)

1.00 – 2.00 m

20H (10 x CH_2)

2.04 s

3H (CH_3 ของหมู่ acetoxy ที่ C-3)

4.47 dd

1H (H-3 , J = 6 Hz และ 10 Hz)

5.52 dd

1H (H-15 , J = 3.30 และ 7.88 Hz)

 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz) $\delta(\text{ppm})$

(ภาพประกอบ 34-35)

15.64 (C - 25)

16.80 (C – 24)

17.30 (C – 11)

18.73 (C – 6)

21.27 (CH_3)

22.46 (C – 27)

23.45 (C - 2)

26.20 (C – 26)

27.95 (C – 23)

28.63 (C - 30)

29.30 (C – 20)

30.68 (C – 22)

31.28 (C - 29)

31.83 (C – 16)

33.31 (C – 21)

33.66 (C - 12)

35.32 (C – 19)

37.30 (C – 1)

37.37 (C - 13)

37.67 (C – 4)

37.92 (C – 10)

39.03 (C - 8)

40.73 (C – 7)

41.36 (C – 18)

49.06 (C - 9)

51.51 (C – 17)

55.58 (C – 5)

80.87 (C - 3)

116.87 (C – 15)

160.53 (C – 14)

170.99 (C = O)

184.47(C - 28)

EIMS (% Relative Intensity)

(ภาพประกอบ 38)

329(3)

269(7)

234(42)

189(100)

สารผสม Z เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 60 mg จุดหลอมเหลว 79 – 85 °C

R_f 0.56 (silica gel GF₂₅₄ / hexane : ethyl acetate 4 : 1)

FT IR (cm⁻¹) (KBr)

(ภาพประกอบ 39)

2,957

CH

1,680

C = O

1,618

C = C

¹H NMR (CDCl₃ , 400MHz)

δ (ppm) (ภาพประกอบ 40)

0.73 s

3H (CH₃ ที่ H- 18)

0.80-1.10 m

12 H (4 x CH₃ , H -21,26,27,29)

1.18 s

3H CH₃ ,H -19)

1.20-2.50 m

29H (11xCH₂ , 7x CH)

4.90 – 5.20 m

2H (บางส่วนของ H -22, H -23)

5.70 s

1H (H – 4)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100MHz)	$\delta(\text{ppm})$	(ภาพประกอบ 41)
12.75 (C – 29)	12.85 (C – 18)	18.00 (C – 19)
19.32 (C - 21)	19.65 (C – 27)	20.43 (C – 20)
21.64 (C - 11)	23.69 (C – 28)	24.80 (C – 15)
26.71 (C - 23)*	28.80 (C – 16)	29.78 (C – 25)
32.67 (C - 7)	33.57 (C – 6)	34.51 (C – 2)
34.59 (C - 22)*	36.25 (C – 1)	36.31 (C – 8)
36.73 (C - 20)	39.22 (C – 10)	40.25 (C – 12)
43.01 (C - 13)	46.46 (C – 24)	54.44 (C – 9)
56.50 (C - 14)	56.63 (C – 17)	124.35 (C – 4)
130.08 (C - 23)**	138.72 (C – 22)**	172.31 (C – 5)
200.26 (C – 3)		

หมายเหตุ * สำหรับพันธะ C-22 กับ C-23 เป็น $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

** สำหรับพันธะ C-22 กับ C-23 เป็น $-\text{CH}=\text{CH}-$

สารกลุ่ม A-5-4-2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเมื่อทดสอบด้วย

Liebermann – Burchads (acetic anhydride + H_2SO_4) ให้ผลการทดสอบเป็นสีเขียว แสดงว่าในสารกลุ่มนี้มีสารประกอบกลุ่ม steriod อยู่ด้วย สเปกตรัม FT IR ของสารกลุ่ม A-5-4-2 เป็นดังภาพประกอบ 43

บทที่ 5

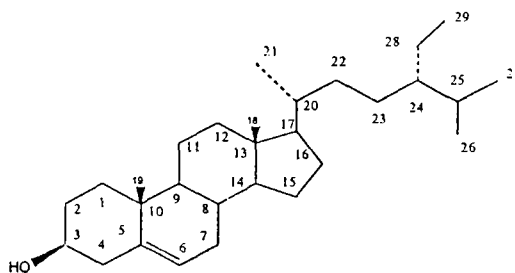
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

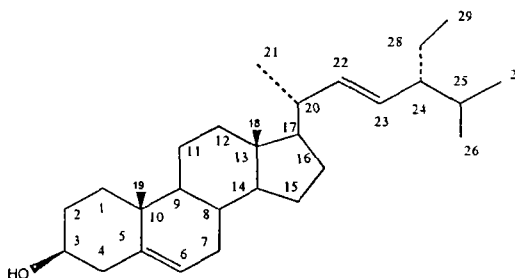
จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากลำต้นหลอดเถื่อน โดยนำลำต้นหลอดเถื่อนที่แห้งและบดละเอียดมาสกัดด้วย hexane จากนั้นสกัดต่อด้วย ethanol สารสกัดที่ได้นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์ P-388 ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ED_{50} เท่ากับ $64 \mu\text{g/mL}$) มากกว่า สารสกัด ethanol ($ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) จึงนำสารสกัด hexane มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel และ alumina เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากจุดหลอมเหลวของสารที่แยกได้และข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีพบว่า ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด สารผสม 2 กลุ่มที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน และสารผสมที่มีสารประกอบหลายชนิดอีก 1 กลุ่ม

สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดที่แยกได้ ให้ชื่อว่า สารประกอบ Y และสารผสมที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน ให้ชื่อว่า สารผสม X และสารผสม Z ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารผสม X สารประกอบ Y และ สารผสม Z เป็นดังนี้

สารผสม X



β -sitosterol



stigmasterol

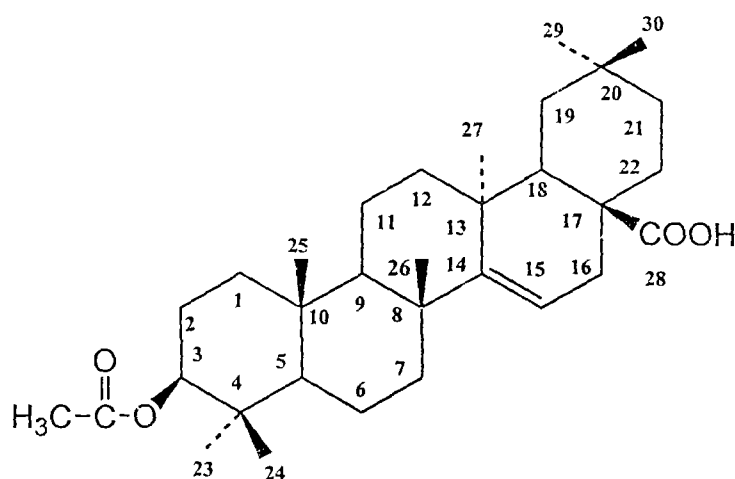
FT IR spectrum ของสารผสม X ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $3,422\text{ cm}^{-1}$ (OH) $2,937\text{ cm}^{-1}$ (CH) $1,466\text{ cm}^{-1}$ (CH_2) และ $1,382\text{ cm}^{-1}$ (CH_3) (ภาพประกอบ 27)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.68 – 1.02 หมู่ CH_2 และ CH ปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.02 – 2.31 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.40 – 3.60 เป็นของ H – 3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.90 – 5.20 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ olefinic proton H – 6 บางส่วนของ H-22 , H-23 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.35 มีลักษณะเป็น singlet เป็นของ olefinic proton ที่ H-6 (ภาพประกอบ 28)

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 29 พีค เป็นของคาร์บอน 29 อะตอมในโมเลกุล (ภาพประกอบ 29)

จากจุดหลอมเหลวที่กว้าง ($132\text{--}136\text{ }^\circ\text{C}$) และจากข้อมูล FT IR spectrum ^1H NMR spectrum และ ^{13}C NMR spectrum ของสาร X เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ stigmasterol และ β -sitosterol (Pouchert & Behke, 1993 : 569) (ภาพประกอบ 30) สรุปได้ว่าสารผสม X เป็นสารผสมของ stigmasterol และ β -sitosterol

สารประกอบ Y



3-acetylaleuritolic acid

สารประกอบ Y เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว $299\text{--}300\text{ }^\circ\text{C}$ FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ carbonyl ของ ester ที่ $1,734\text{ cm}^{-1}$ และ C - O ที่ $1,246\text{ cm}^{-1}$ หมู่ carboxyl ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $1,689\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$) และ $3,350\text{ cm}^{-1}$ (br , OH) (ภาพประกอบ 31)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 7 หมู่ที่ δ 0.85 – 0.95 ที่ δ 2.04 เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 ที่หมู่ acetoxy ส่วนสัญญาณที่ δ 4.47 มีลักษณะเป็น dd เป็นสัญญาณของ H-3 มีค่า J เท่ากับ 6 Hz และ 10 Hz สัญญาณเรโซแนนซ์ของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 15 ปรากฏเป็น dd ที่ δ 5.52 มีค่า J เท่ากับ 3.30 Hz และ 7.88 Hz (ภาพประกอบ 32 - 33)

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 32 พีค เป็นของคาร์บอน 32 อะตอมในโมเลกุล (ภาพประกอบ 34 -35) จาก DEPT-90 และ DEPT-135 (ภาพประกอบ 36) ให้สัญญาณของ CH 5 หมู่ที่ δ 41.36 (C -18) 49.06 (C - 9) 55.58 (C - 5) 80.87 (C -3) และ 116.87 (C - 15) ให้สัญญาณของ CH_2 10 หมู่ที่ δ 17.30 (C - 11) 18.73 (C - 6) 23.45 (C - 2) 30.68 (C - 22) 31.83 (C - 16) 33.31 (C - 21) 33.66 (C - 12) 35.32 (C - 19) 37.30 (C - 1) 40.73 (C - 7) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 8 หมู่ที่ δ 15.64 (C - 25) 16.58 (C - 24) 21.27 (CH_3COO) 22.46 (C - 27) 26.20 (C - 26) 27.95 (C - 23) 28.63 (C - 30) 31.28 (C - 29) สำหรับ quaternary carbon ให้สัญญาณที่ δ 29.30 (C - 20) 37.37 (C - 13) 37.67 (C - 4) 37.92 (C -10) 39.03 (C - 8) และ 51.51 (C - 17)

สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 160.53 เป็นของ C -14 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 170.99 เป็นของ $\text{C}=\text{O}$ ของหมู่ acetoxy และ สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 184.47 เป็นของ $\text{C}=\text{O}$ ที่ C-28 ดังตาราง 15

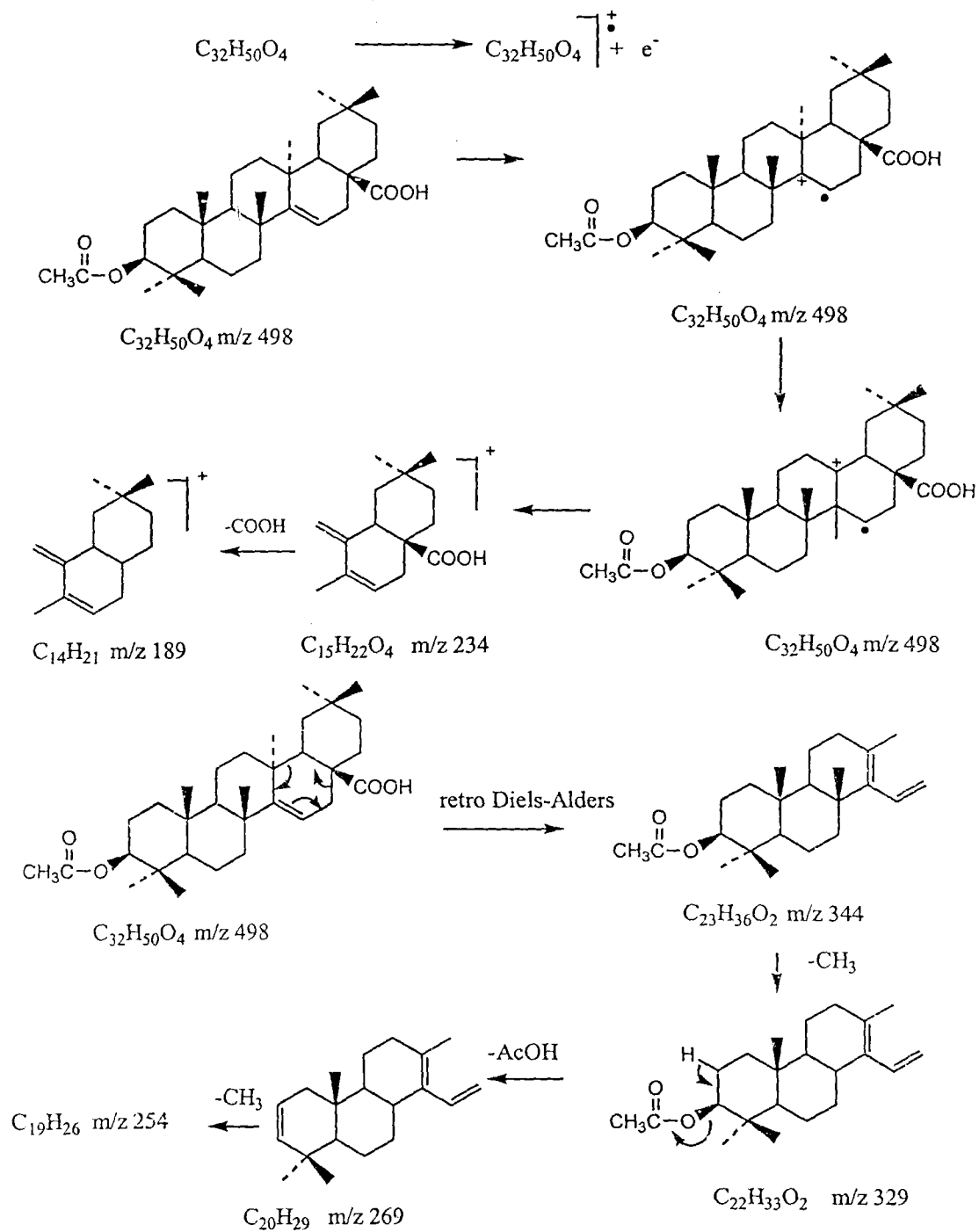
ตาราง 15 ^{13}C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{c} (ppm)	DEPT-90 δ_{c} (ppm)	DEPT-135 δ_{c} (ppm)
1	37.30(CH_2)		37.30
2	23.45(CH_2)		23.45
3	80.87(CH)	80.87	80.87
4	37.67(C)		
5	55.58(CH)	55.58	55.58
6	18.73(CH_2)		18.73
7	40.73(CH_2)		40.73
8	39.03(C)		
9	49.06(CH)	49.06	49.06
10	37.92(CH_2)		37.02
11	17.30(CH_2)		17.30
12	33.66(CH_2)		33.66
13	37.37(C)		
14	160.53(C)		
15	116.87(C)		
16	31.83(C)		
17	51.51(C)		
18	41.36(CH)	41.36	41.36
19	35.32(CH_2)		35.32
20	29.30(C)		
21	33.31(CH_2)		33.31

ตาราง 15 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{C} (ppm)	DEPT-90 δ_{C} (ppm)	DEPT-135 δ_{C} (ppm)
22	30.68(CH ₂)		30.68
23	27.95(CH ₃)		27.95
24	16.80(CH ₃)		16.80
25	15.64(CH ₃)		15.64
26	26.20(CH ₃)		26.20
27	22.46(CH ₃)		22.46
28	184.47(COOH)		
29	31.28(CH ₃)		31.28
30	28.63(CH ₃)		28.63
31	170.99(C=O)		
32	21.27(CH ₃)		21.27

EIMS ของสารประกอบ Y ให้ค่า m/z (% relative intensity) ที่ 329(3)
 $[\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2 - \text{CH}_3]$ 269(7) $[\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2 - \text{CH}_3 - \text{COOH}]$ 234(42) $[\text{M}^+ - \text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2]$
 189(100) $[\text{M}^+ - \text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2 - \text{COOH}]$ (ภาพประกอบที่ 38) จากพีคที่ m/z 189 และ 234 แสดงว่า
 มีการแตกของพันธะระหว่าง C-11 กับ C-12 และพันธะระหว่าง C-8 กับ C-9 การแตกแบบ
 retro Diels-Alders ทำให้ได้พีคที่ m/z 329 และ 269 (Woo & Wagner, 1977:1845-1846)
 ดังภาพประกอบ 26



ภาพประกอบ 26 การแตกพันธะของสารประกอบ Y

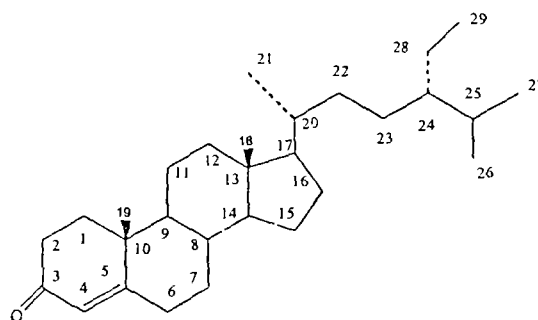
จากข้อมูลของสารประกอบ Y เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 3-acetylauritolic acid (Woo and Wagner, 1977 :1845 -1846) สรุปได้ว่าสารประกอบ Y คือ 3-acetylauritolic acid

มีรายงานการค้นพบสารประกอบ 3-acetylaleuritolic acid ในพืชบางชนิด เช่น ในเปลือกของ *Aleurites montana* วงศ์ Euphorbiaceae (Misra & Khastgir, 1970 : 3017 – 3021) ในเปลือกของ *Croton urucurana* Baillon วงศ์ Euphorbiaceae (Peres, et.al, 1997 : 223 – 226) ในเมล็ดของ *Phytolacca americana* (Woo & Wagner, 1997 : 1845 – 1846)

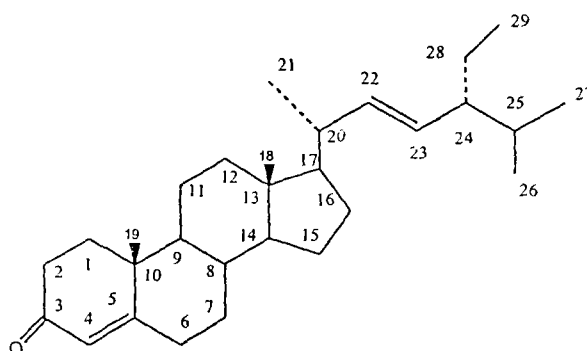
สารชนิดนี้ มีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhimurium* โดยมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เท่ากับ 0.1 mg/mL (Peres, et.al. 1997 : 223 – 226)แต่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase ต่ำ ($IC_{50} = 136.0 \mu M$) (Pengsuparp, T, et.al. 1994 : 415 - 418)

สารผสม Z

สารผสม Z ที่แยกได้ เป็นของผสมของสารประกอบ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ดังนี้



Stigmast-4-en-3-one



Stigmasta-4,22-dien-3-one

FT IR ของสารผสม Z ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ C = O ที่ $1,680\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งเป็นลักษณะของ α,β -unsaturated ketone (ภาพประกอบ 39)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300MHz) (ภาพประกอบ 40) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง 18 ที่ δ 0.73 ที่ δ 0.80 – 1.10 เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง 21, 26, 27 และ 29 ที่ δ 1.18 เป็นของหมู่ CH_3 ที่ตำแหน่ง 19 ที่ δ 1.20 – 2.50 เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 และ CH ที่ δ 5.70 มีลักษณะเป็น singlet เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 4 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.90 – 5.20 มีลักษณะเป็น multiplet ซึ่งมี integration ต่ำแสดงว่ามีบางส่วน of olefinic proton ที่ตำแหน่ง 22 และ 23

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 75 MHz) ให้สัญญาณ 31 พีค (ภาพประกอบ 41) เกิดจากคาร์บอน 29 อะตอม ภายในโมเลกุล ทั้งนี้เนื่องจาก สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-22 และ C-23 เมื่อเป็นพันธะคู่จะให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 138.72 (C-22) และ 130.08 (C-23) แต่ถ้าตำแหน่งดังกล่าวเป็นพันธะเดี่ยวจะให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 34.59 (C-22) และ 26.71 (C-23) ซึ่งจะเห็นได้ชัดใน DEPT-135 (ภาพประกอบ 42) ของหมู่ CH_2 สัญญาณเรโซแนนซ์ทั้ง 31 พีค มีดังนี้

หมู่ CH 10 หมู่ ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ ที่ δ 29.78 (C – 25) 36.31 (C – 8) 36.73 (C – 20) 46.46 (C – 24) 54.54 (C – 9) 56.50 (C – 14) 56.63 (C – 17) 124.35 (C – 4) 130.08 (C – 23) 138.72 (C – 22) หมู่ CH_2 11 หมู่ ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ ที่ δ 21.64 (C – 11) 23.69 (C – 28) 24.80 (C – 15) 26.71 (C – 23) 28.80 (C – 16) 32.67 (C – 7) 33.57 (C – 6) 34.51 (C – 2) 34.59 (C – 22) 36.25 (C – 1) 40.25 (C – 12) หมู่ CH_3 6 หมู่ ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ ที่ δ 12.76 (C – 29) 12.85 (C – 18) 18.00 (C – 19) 19.32 (C – 21) 19.65 (C – 27) 20.43 (C – 26) quaternary carbon ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 39.22 (C – 10) 43.01 (C – 13) 172.31 (C – 5) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ C = O ปรากฏที่ δ 200.6 ดังตาราง 16

ตาราง 16 ^{13}C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารผสม Z

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{c} (ppm)	DEPT-90 δ_{c} (ppm)	DEPT-135 δ_{c} (ppm)
1	36.25(CH ₂)		36.25
2	34.51(CH ₂)		34.51
3	200.6(C=O)		
4	124.35(CH)	124.35	124.35
5	172.31(C)		
6	33.57(CH ₂)		33.57
7	32.67(CH ₂)		32.67
8	36.31(CH)	36.31	36.31
9	54.44(CH)	54.44	54.44
10	39.22(C)		
11	21.64(CH ₂)		21.64
12	40.25(CH ₂)		40.25
13	43.01(C)		
14	56.50(CH)	56.50	56.50
15	24.80(CH ₂)		24.80
16	28.80(CH ₂)		28.80
17	56.63(CH)	56.63	56.63
18	12.85(CH ₃)		12.85
19	18.00(CH ₂)		18.00
20	36.73(CH)	36.73	36.73
21	19.32(CH ₃)		19.32

ตาราง 16 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_c (ppm)	DEPT-90 δ_c (ppm)	DEPT-135 δ_c (ppm)
22*	34.59(CH ₂)		34.59
22**	138.72(CH)	138.72	138.72
23*	26.71(CH ₃)		26.71
23**	130.08(CH)	130.08	130.08
24	46.46(CH)	46.46	46.46
25	29.78(CH)	29.78	29.78
26	20.43(CH ₃)		20.43
27	19.65(CH ₃)		19.65
28	23.69(CH ₃)		23.69
29	12.76(CH ₃)		12.76

หมายเหตุ * สำหรับพันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

** สำหรับพันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น $-\text{CH}=\text{CH}-$

จากข้อมูล ของสาร Z นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ stigmast-4-en-3-one และ stigmasta-4,22-dien-3-one จากรายงานของ Sheikh(Sheikh,*et.al.* 1974 : 4095 – 4103) Gaspar (Gaspar, *et.al.*1993 : 523-527) และ Greca (Greca, *et.al.* 1990 : 1430 – 1435) สรุปได้ว่า สาร Z คือ เป็นของผสมของ stigmast-4-en-3-one และ stigmasta-4,22-dien-3-one เหตุผลที่เชื่อว่า สาร Z เป็นของผสมมีดังนี้

1. จุดหลอมเหลวของสารผสม Z ค่อนข้างกว้าง (79-85°C) และต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของ stigmaster-4-en-3-one (m.p. 127-128°C, Hill, et.al. 1991 : 825) และ stigmaster-4,22-dien-3-one (m.p. 95-96°C, Hill, et.al. 1991 : 829)

2. integration ของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตอนกลุ่มอื่น ๆ

3. DEPT-135 NMR spectrum ของหมู่ CH_2 ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 11 พีค ซึ่งสอดคล้องกับ stigmaster-4-en-3-one แต่เมื่อพิจารณา DEPT-90 และ DEPT-135 NMR spectrum (ภาพประกอบ 42) ของหมู่ CH พบว่าปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-22 และ C-23 ที่ δ 138.72 และ 130.08 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ stigmaster-4,22-dien-3-one

steroid ทั้งสองชนิดพบได้ในพืชชั้นสูงหลายชนิด เช่นในถั่วเหลือง (*Glycine max*) วงศ์ Leguminosae (Webber, 1977 : 1849-1851) ในลำต้นของ *Phoenix dactylifera* วงศ์ Palmae (Fernandez, et.al. 1983 : 2087-2088) ในลำต้นและเปลือกของ *Harisania abyssinica* วงศ์ Simaroubaceae (Balde', et.al. 1999 : 67-69)

ฮิราโน (Hirano, et.al. 1993 : 30-33) รายงานว่า สารกลุ่ม steroid ที่แยกได้จากรากของ *Urtica dioica* วงศ์ Urticaceae ประกอบด้วย stigmaster-4-en-3-one stigmasterol และ campesterol สามารถยับยั้ง เอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase ของเนื้อเยื่อต่อมลูกหมากของคนไข้ที่เป็นโรค Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) ที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยวิธีใด ๆ พบว่า steroid กลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase ได้ เมื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase ของ steroid ข้างต้น ที่ละชนิดพบว่า stigmaster-4-en-3-one สามารถยับยั้งเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase ของเนื้อเยื่อ BPH ได้อย่างจำเพาะเจาะจง และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ Ouabain ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ Na^+, K^+ -ATPase ที่รู้จักกันดี (Lehninger, Nelson & Cox. 1993 : 289)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อนพบว่า สารสกัด ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำมาก ($\text{ED}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) สารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างต่ำ ($\text{ED}_{50} 64 \mu\text{g/mL}$) ตามเกณฑ์มาตรฐานของ National Cancer Institute (NCI) แห่งสหรัฐอเมริกา กำหนดว่า สารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งที่อยู่ใน

ระดับที่น่าสนใจถ้าเป็นสารสกัดควรมีค่า $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ควรมีค่า $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ (Geran, et.al.1972 :7-17) เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์นี้ เห็นได้ว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน แต่เมื่อนำสารสกัด hexane มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นพบว่า มีบางส่วนที่ได้จากการแยกมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้น โดยสารส่วน A-5 ที่ได้จากการแยกสารสกัด hexane ผ่านโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารสกัด hexane และเมื่อนำสารส่วน A-5 มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น พบว่าสารส่วน A-5-4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารส่วน A-5 และเมื่อนำสารส่วน A-5-4 มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นไปอีก พบว่าสาร ส่วน A-5-4-2 ที่ได้จากการแยกสารส่วน A-5-4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่าสารส่วน A-5-4 ค่า ED_{50} ของสารสกัดและสารที่ได้จากการแยกส่วนต่าง ๆ แสดงในตาราง 17

ตาราง 17 ค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane และสารที่ได้จากการแยกบางส่วน

สารส่วน	ค่า ED_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
สารสกัด hexane	64
สารส่วน A-5	45
สารส่วน A-5-4	34
สารส่วน A-5-4-2	17

เนื่องจากสารส่วน A-5-4-2 ที่แยกได้ มีปริมาณน้อยและยังประกอบด้วยสารอีกหลายชนิด จึงไม่สามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างได้ แต่จากการทดลองเพื่อทดสอบสมบัติเบื้องต้นของสารกลุ่มนี้ โดยทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ให้ผลการทดสอบเป็นสีเขียว แสดงว่าในสารกลุ่ม A-5-4-2 นี้มีสารกลุ่ม steroid เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane จากต้นหลอดเถื่อนพบว่า มีสารบางส่วนที่ได้จากการแยก คือสารส่วน A-5-4-2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอยู่ในระดับที่น่าสนใจ จึงนำที่จะนำสารส่วนนี้มาศึกษา เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่ทราบโครงสร้างและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 หรือเซลล์มะเร็งชนิดอื่น
2. ในการสกัดสารจากลำต้นหลอดเถื่อนด้วย hexane ได้สารสกัดออกมาปริมาณน้อย น่าจะมีการศึกษาวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น ที่มีสภาพขั้วของโมเลกุล (polarity) สูงกว่า hexane เช่น dichloromethane หรือ ethyl acetate
3. สารประกอบบางชนิดที่แยกได้ เช่น 3-acetylaleuritolic acid อาจนำมาเป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์สารใหม่เพื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหรือทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านไวรัส เป็นต้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- เต็ม สมิตินันท์. (2523). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย(ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง).
กรุงเทพฯ : พันธุ์พืชฯ.
- ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (2526,เมษายน-มิถุนายน). "ทองพันชั่ง," *วารสารโรคมะเร็ง*. 9(2) : 60.
- _____. (2533, เมษายน-มิถุนายน). "สมุนไพรแก้มะเร็ง," *วารสารโรคมะเร็ง*. 16(2) : 70.
- พรทิพา พินาและคณะ. (2528). "Biological Assay of Antitumour Agents from Natural Product
ใน รายงานการประชุมวิชาการเรื่องการพัฒนาจากสมุนไพร. ม.ป.พ. 129 – 130.
- วีณา จิรัจฉิยากุล. (2534). *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). *สารานุกรมสมุนไพรไทย-รวมหลักเภสัชกรรมไทย*. กรุงเทพฯ:โอเอสพรีนติ้ง.
- สาธารณสุข,กระทรวง. (2541). *สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2540*. กรุงเทพฯ : กองสถิติสาธารณสุข.
- อรุณพร อรุณรัตน์. (2542). "พัฒนาการทางเภสัชศาสตร์ในสาขาเภสัชเวทกับงานสมุนไพร,"
วารสารการแพทย์แผนไทย. 3(3) : 63.
- เอมอร โสมนะพันธุ์. (2534). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จาก
ธรรมชาติ วีณาจิรัจฉิยากุล*. หน้า 330-334. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย
มหิดล.
- Arbain,D.et.al. (1989). "Survey of some West Sumatran Plants for Alkaloids,". *Econ.Bot*.
43(1) : 73 – 78 .
- Arisawa,M. et.al. (1985,May-June). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of
Mallotus japonicus,Part I," *J. Nat. Prod*. 48(3) : 455 – 459.
- _____. (1986,March-April). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus
japonicus*,Part II," *J. Nat. Prod*. 49(2) : 298 – 302.

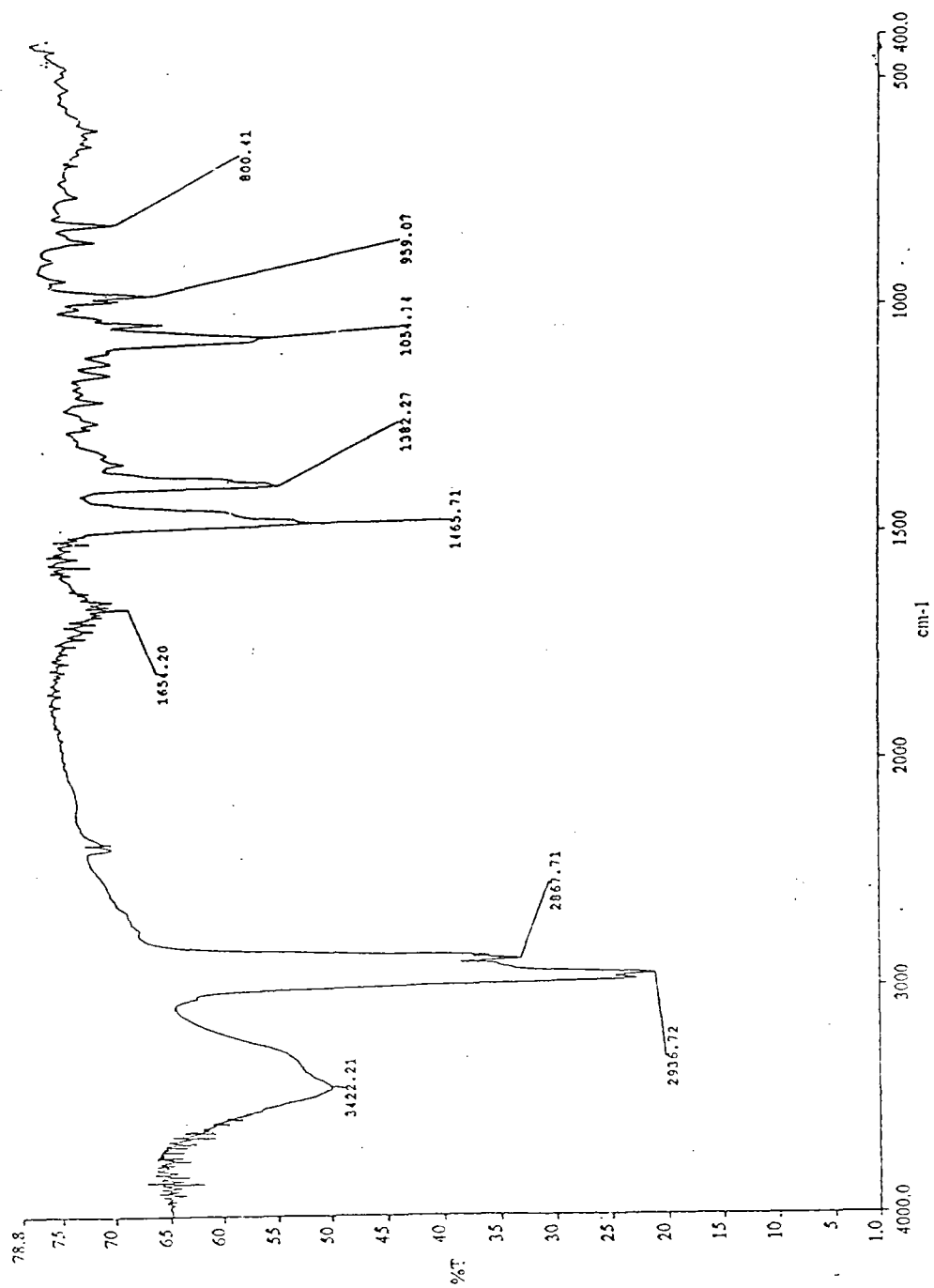
- Arisawa, M. *et.al.* (1991, September-October). "Inhibition of Tumor-Promotor – Enhanced by ^3H -Choline Incorporation into Cellular Phospholipids by Phloroglucinal Derivatives from *Mallotus japonicus*," *J. Nat. Prod.* 54(5) : 1409 – 1412.
- Balde', A.M. *et.al.* (2000, February). "Steroids from *Harrisonia abyssinica*," *Planta Med.* 66(1) : 67 - 69.
- Cannon, J.R. *et.al.* (1980). "A Contribution to the Thai Phytochemical Survey," *J. Sci. Soc. Thailand.* 6(2) : 46 – 53.
- Fernandez., M.I. *et.al.* (1983). " Constituent of a Hexane Extract of *Phoenix dactylifera* ," *Phytochemistry.* 22(9) : 2087 - 2088.
- Ferrigny, N.R. *et.al.* (1981). "Modification and Evaluation of the Potato Disc Assay and Antitumor Screening of Euphorbiaceae Seeds," *J.Nat. Prod.* 45(6) : 679 – 686.
- Fujita, A. *et.al.* (1988, July-August). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, Part III," *J.Nat. Prod.* 51(4) : 708 – 712.
- Gaspar, E.M. & Neves, H.J. (1993). "Steroidals Constituents from Mature Wheat Straw," *Phytochemistry.* 34(2) : 523 – 527.
- Geran, R.I. *et.al.* (1972). "Protocols for Screening Chemical Agent and Natural Products Against Animal Tumors and other Biological System," *Cancer Chemother. Rep.* 3 : 7 – 17.
- Greca, M.D., Monaco, P & Previtera, L. (1990, November-December). "Stigmasterol from *Typha latifolia*," *J.Nat.Prod.* 53(6) : 1430 – 1435.
- Huang, P.L. , Wang, L.W. & Lin, C.N. (1999). " New Triterpenoids of *Mallotus rependus*," *J.Nat.Prod.* 62(6) : 891 – 892.

- Hill, R.A. *et.al.* (1991). *Dictionary of Steroids* .UK : Chapman and Hall Ltd. London
- Hirano,T.,Homma,M. & Oka,K. (1994,February). "Effect of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Na^+K^+ -ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia," *Planta Med.* 60(1) : 30 - 33.
- Jork,H.*et.al.* (1990). *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Method* Vol.1a. Germany : VCH-Verlag , Weinheim.
- Kesara Na Bangchang. (1987). *Study on Anticancer Activity of a Well-Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis,M.Sc.(Pharmacology). Bangkok : Graduate School Mahidol University. Photocopied.
- Kim,H.S. *et.al.* (2000,January). "Antihepatotoxic Activity of Bergenin, the Major Constituent of *Mallotus japonicus* ,on Carbontetrachloride Intoxicated Hepatocytes," *J. Ethanopharmacol.* 69(1) : 79 - 83.
- Lehninger,A. ,Nelson, D.L. & Cox ,M.M (1993). *Principle of Biochemistry* 2nd ed. U.S.A.: Worth Publisher, New York.
- Leritt ,M.P. *et.al.* (1983). *The Cancer Reference Book*. U.S.A.: Fact on File ,Inc,New York.
- Misra,D.R. & Khastgir.,H.N. (1970). "Terpenoids and Related Compounds –XI Chemical Investigation of *Aleurites montana* and the Structure of Aleuritolic acid –a New Triterpene Acid ," *Tetrahedron* . 26 : 3017 - 3021.
- Mutschler,E.*et.al.*(1995). *Drug Actions*. Germany. : Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
- Nair,S.P. & Rao, J.M. (1993) . " Kamaladiol-3-acetate from the Stembark of *Malotus phillippensis*," *Phytochemistry*.32(2) : 407 – 409.

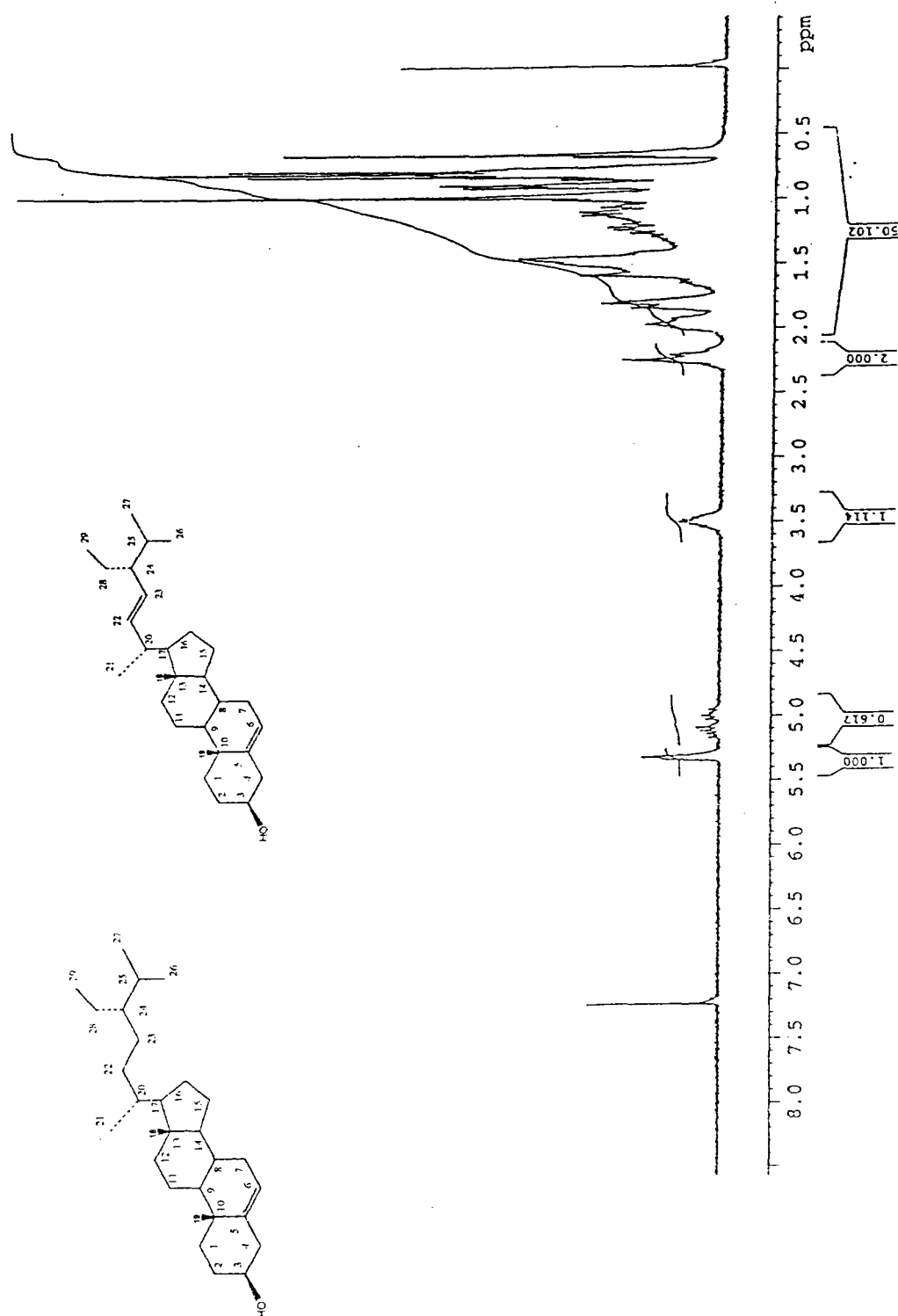
- Pengsuparp, T. *et.al.* (1994, March). "Pentacyclic Triterpenes Derived from *Maprounea africana* are Potent Inhibitors of HIV I Reverse Transcriptase," *J.Nat. Prod.* 57(3) : 415–418.
- Peres, M.T. *et.al.* (1997, May). "A Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae)," *J.Ethnopharmacol.* 56(3): 223-226.
- Pouchert, J.C. & Behke, J. (1993). *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra* Vol.3 Wisconsin : Aldrich Chemical.
- Ramathibodi Cancer Registry. (1999). *Annual Report 1999*. Puangtong Kaiphibul ed. Bangkok : Ramamthibodi.
- Rosenberg, S.A. (1993). *Cancer Principle and Practice of Oncology*. U.S.A.: Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia.
- Sheikh, Y.M. & Djerassi, C. (1974). "Steroids from Sponges," *Tetrahedron*. 30 : 4095 – 4103.
- Smith, H.F. *et.al.* (1995). "Ayurvedic Herbal Drug with Possible Cytostatic Activity," *J. Ethnopharmacol.* 47(1): 75 - 84.
- Suchitra Wiwatwittaya. (1992). *The Study on Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis, M.Sc.(Pharmacology). Bangkok : Graduate School Mahidol University. Photocopied.
- Sun, N.J., Chang, C.J. & Casady, J.M. (1988). "A Cytotoxic Flavone from *Cudrania cochinchinensis*," *Phytochemistry*. 27(3) : 1951– 952.
- Wall, E.M., Wani, M.C. & Tayler, H. (1976, August). "Isolation and Chemical Characterization of Antitumour Agent from Plants," *Cancer Treat. Rep.* 60(8) : 1011-1030.
- Webber, N. (1977). "3-Ketosteroids in Soja- Suspensionskulturen," *Phytochemistry*. 16 : 1849 – 1851.

Woo, W. S. & Wagner, H. (1977). " 3-Acetylaleuritolic acid from the Seed of *Phytolacca americana*," *Phytochemistry*. 16(10) : 1845 – 1846.

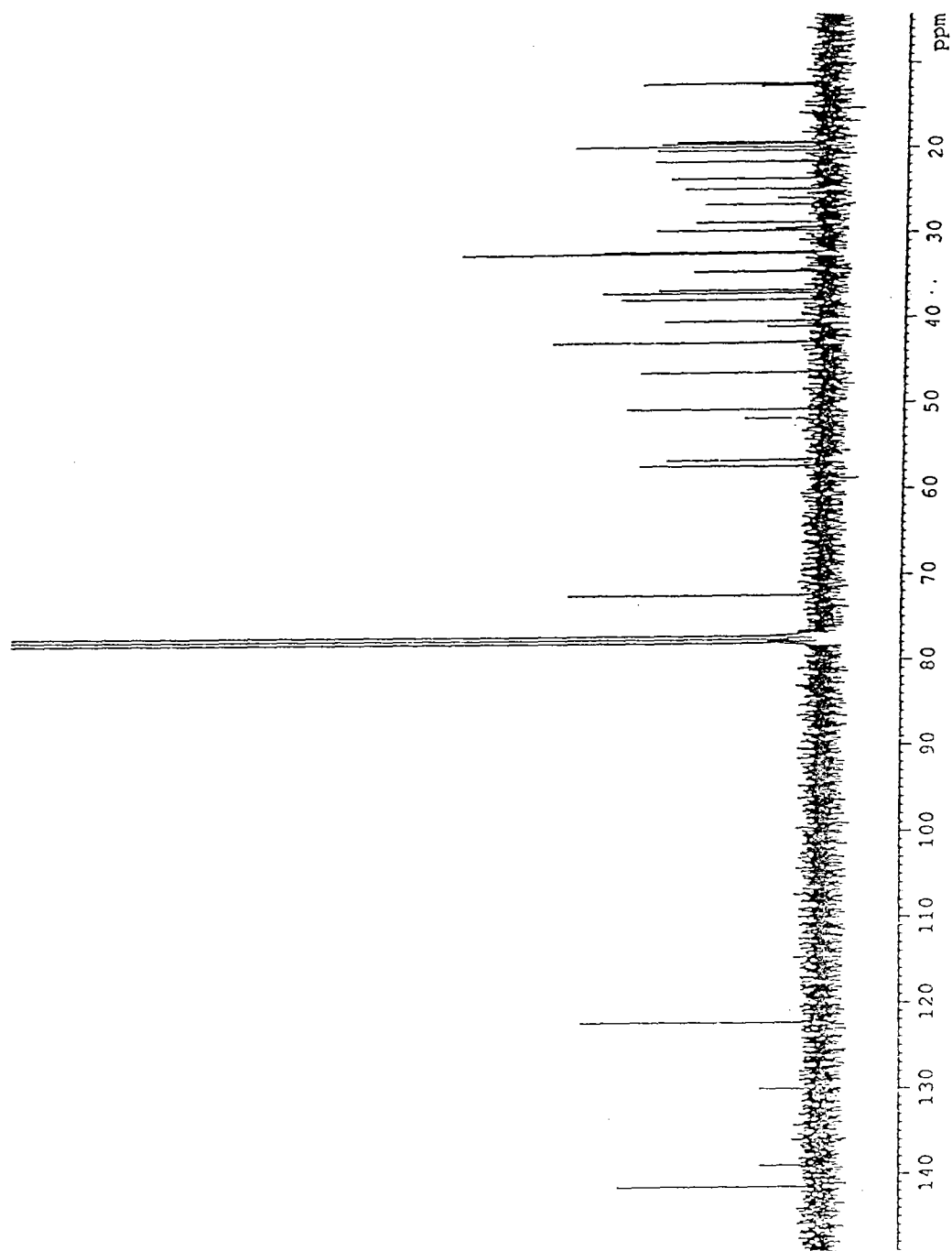
ภาคผนวก



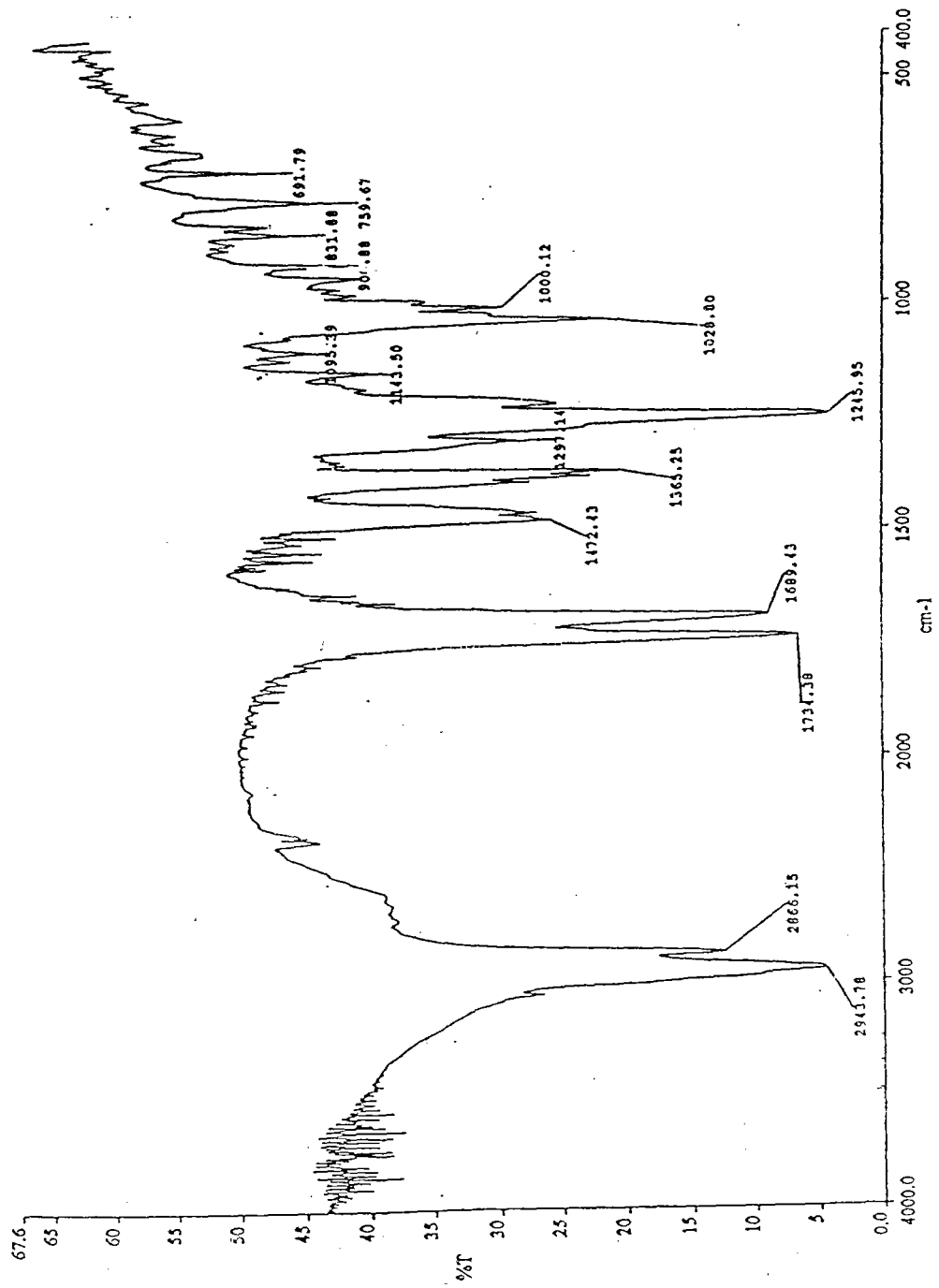
ภาพประกอบ 27 FT IR สเปกตรัมของสารผสม X



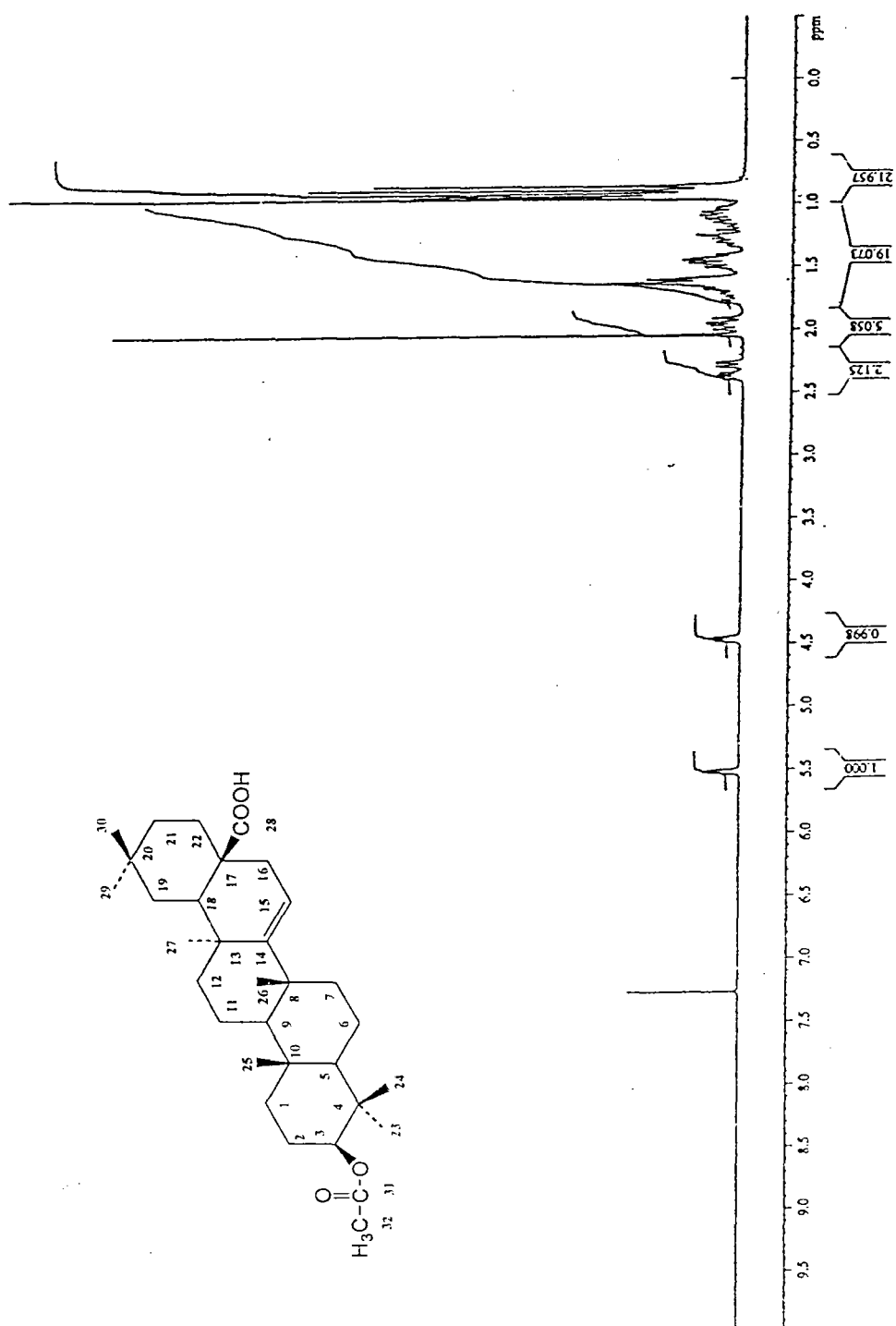
ภาพประกอบ 28 ^1H NMR สเปกตรัมของสารผสม X



ภาพประกอบ 29 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารผสม X

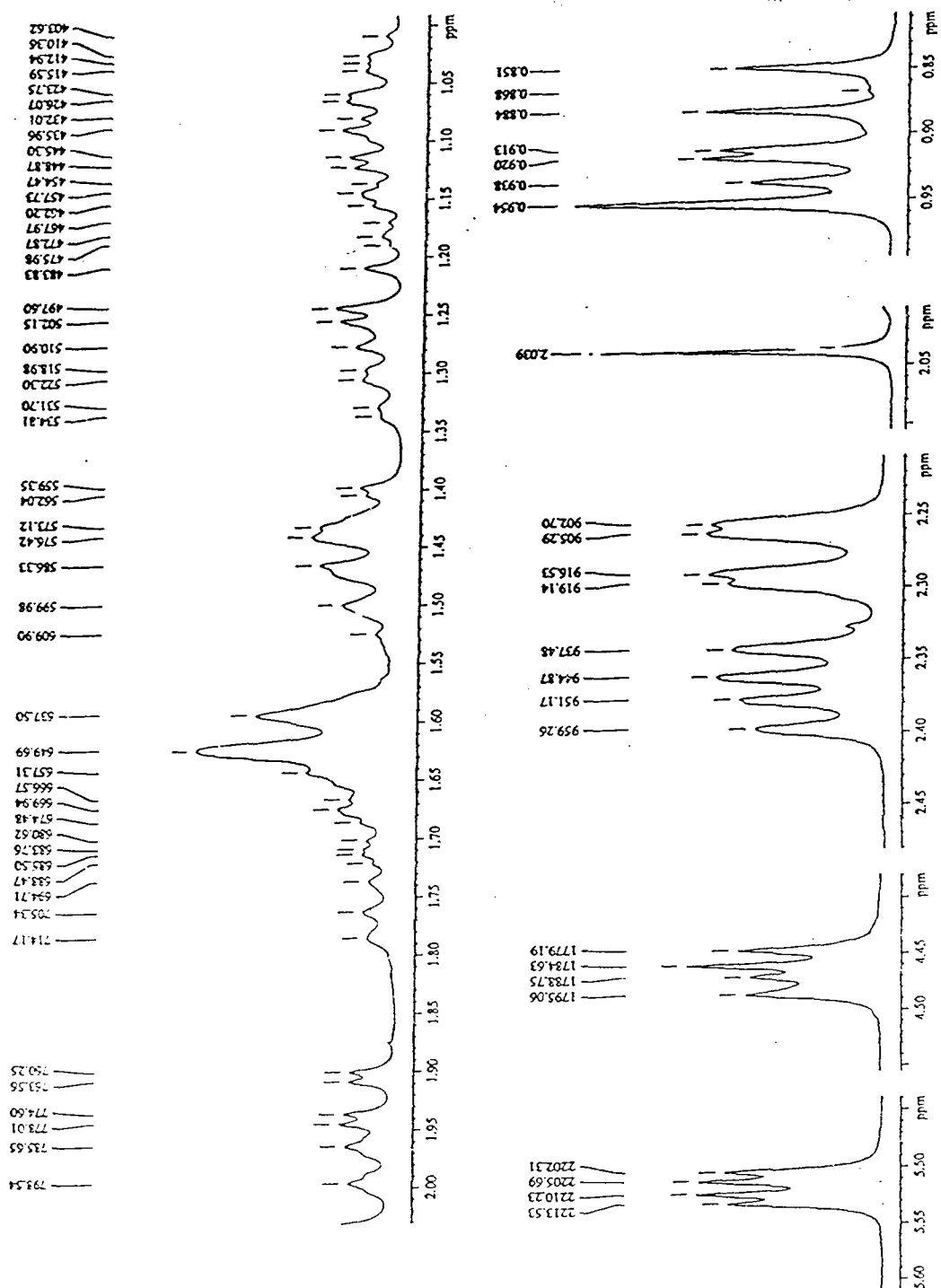


ภาพประกอบ 31 FTIR สเปกตรัมของสารประกอบ Y

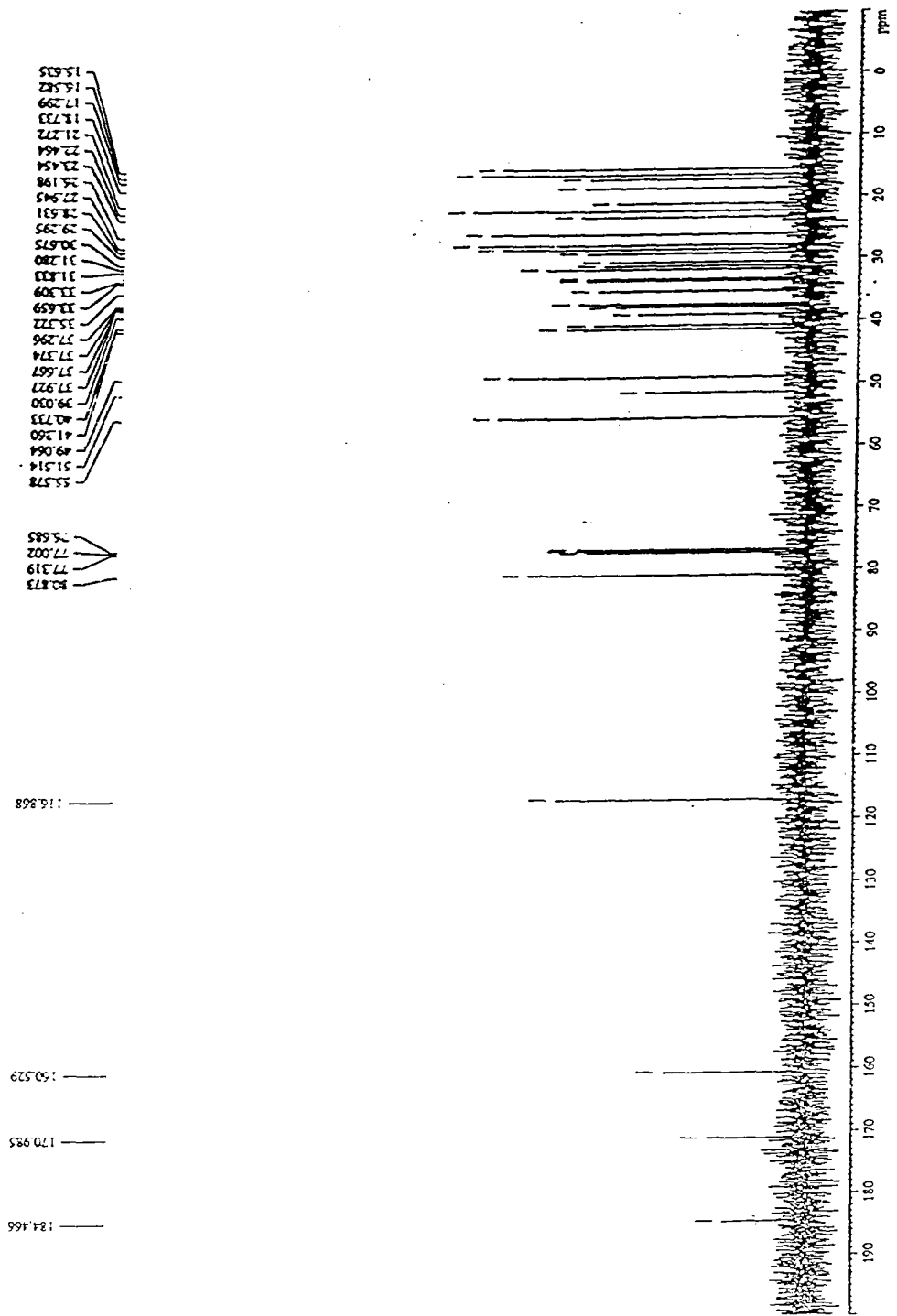


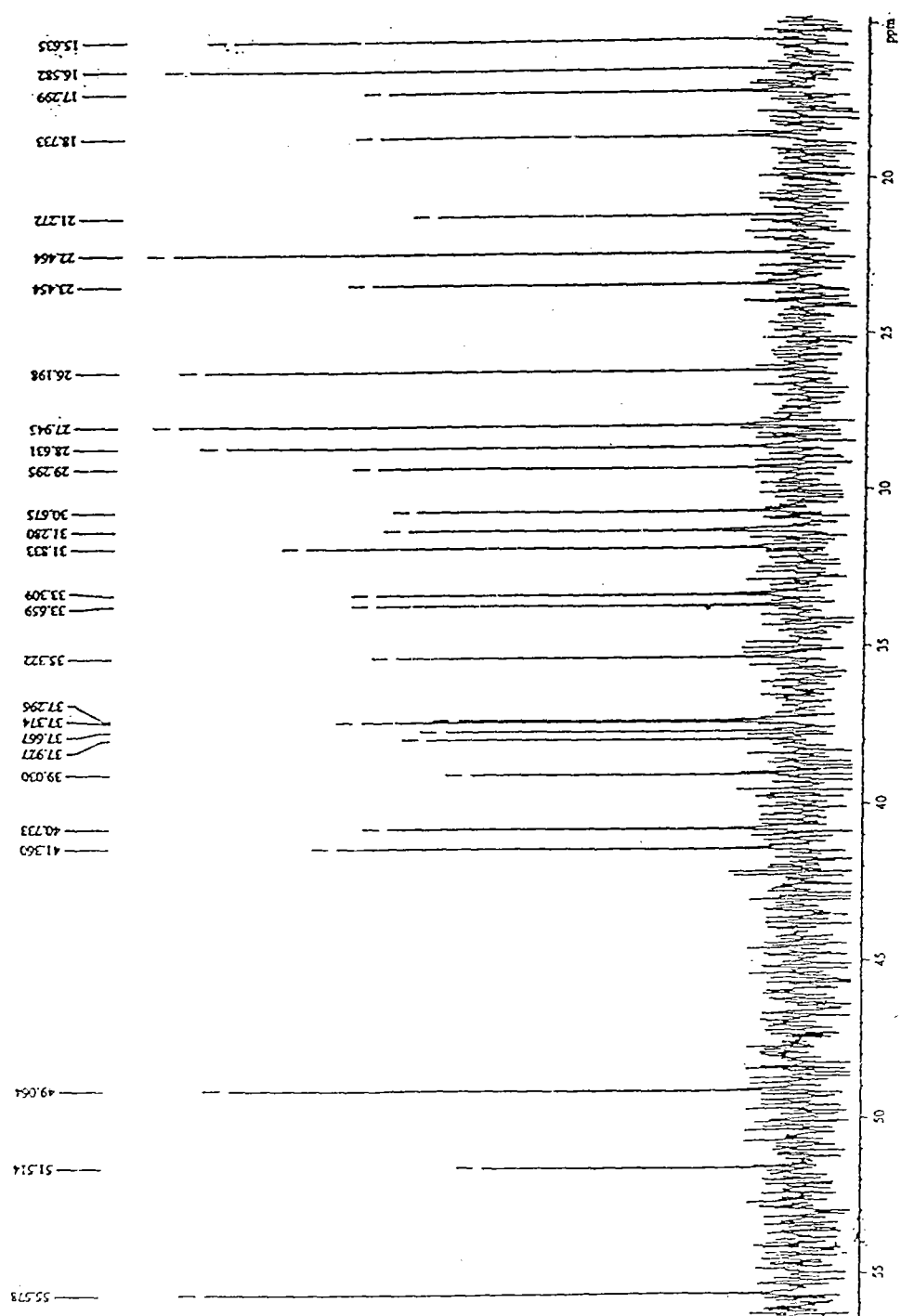
ภาพประกอบ 32 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y

ภาพประกอบ 33 ขยาย ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y

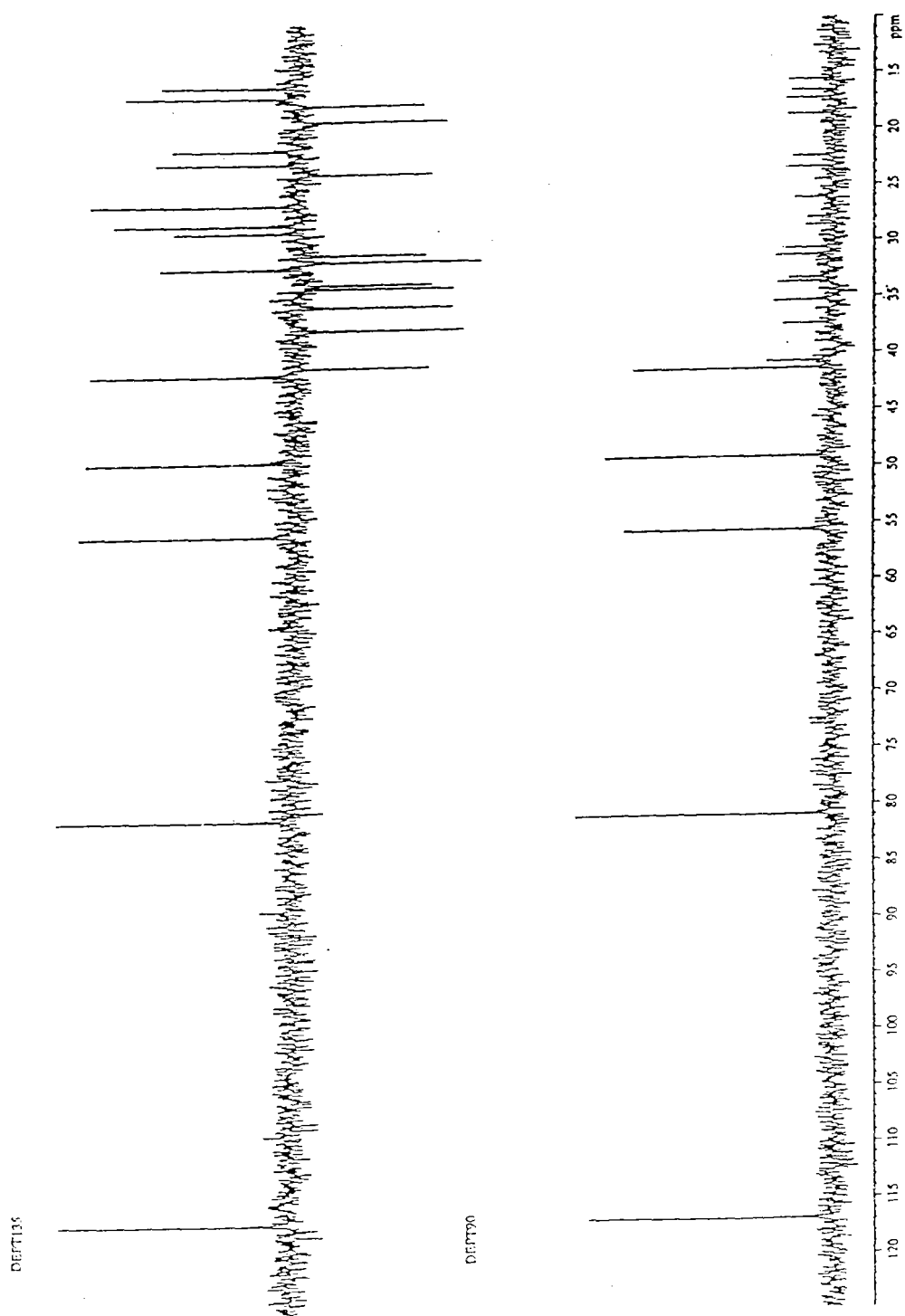


ภาพประกอบ 34 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y

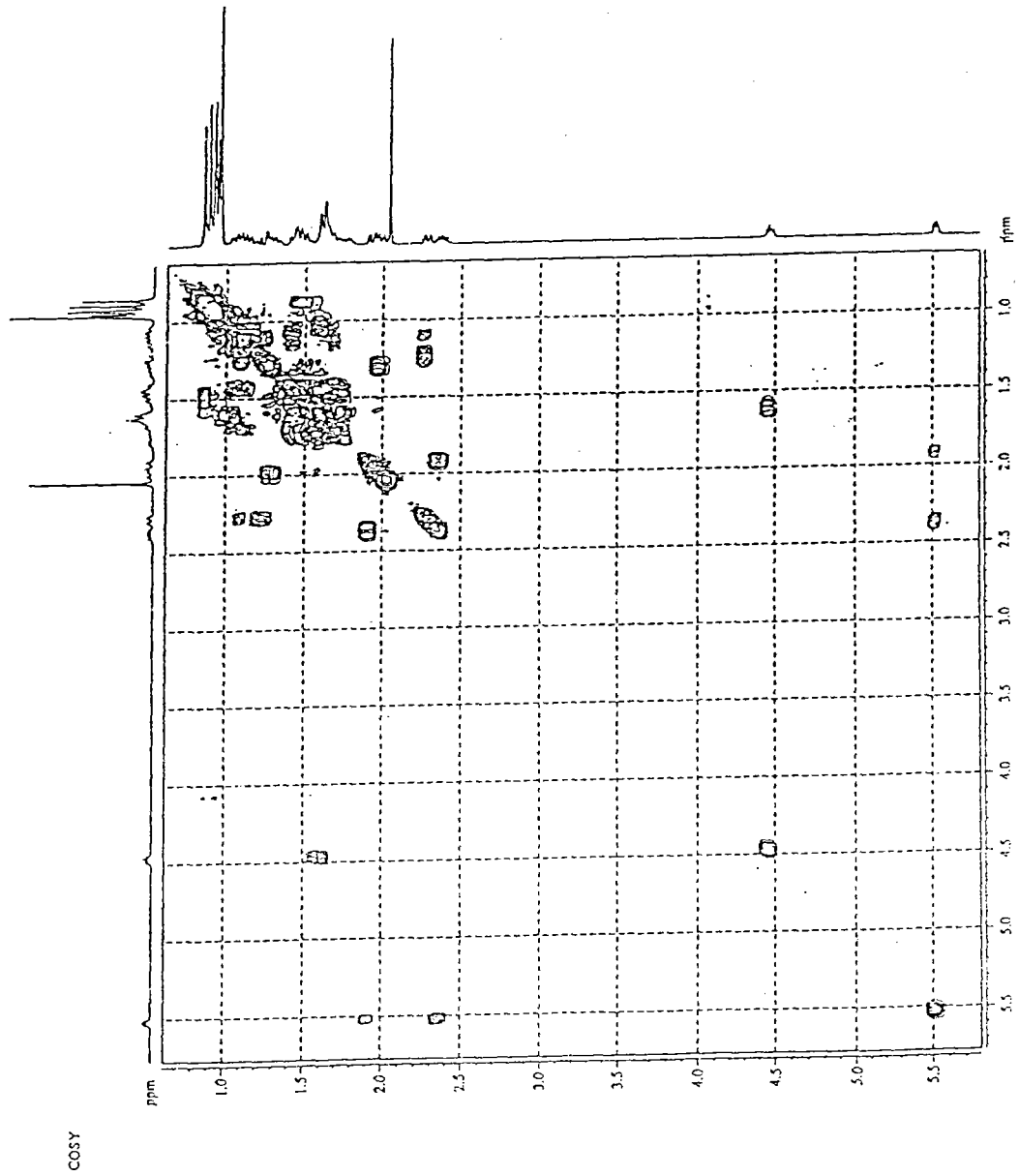




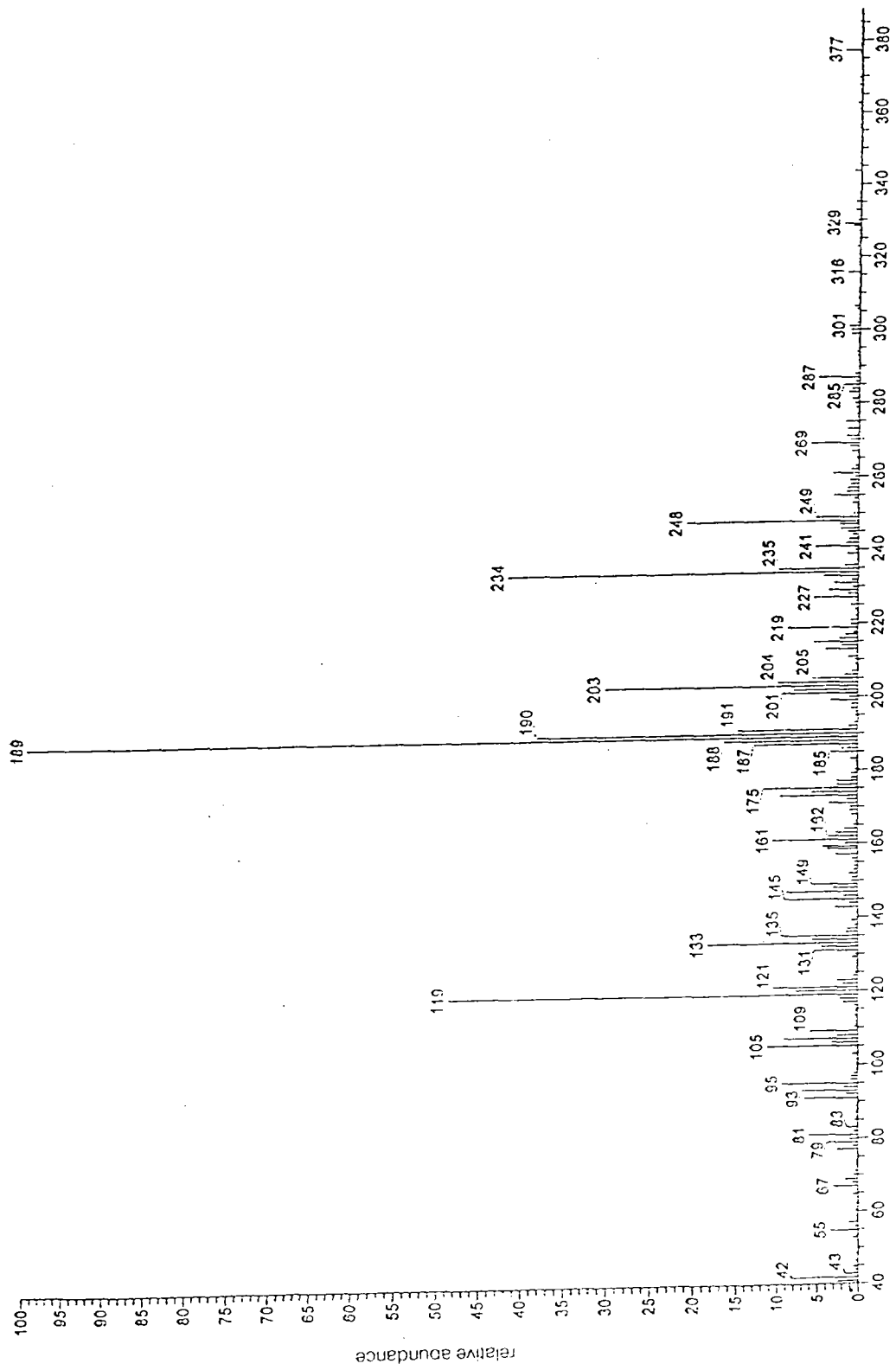
ภาพประกอบ 35 ขยาย ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y



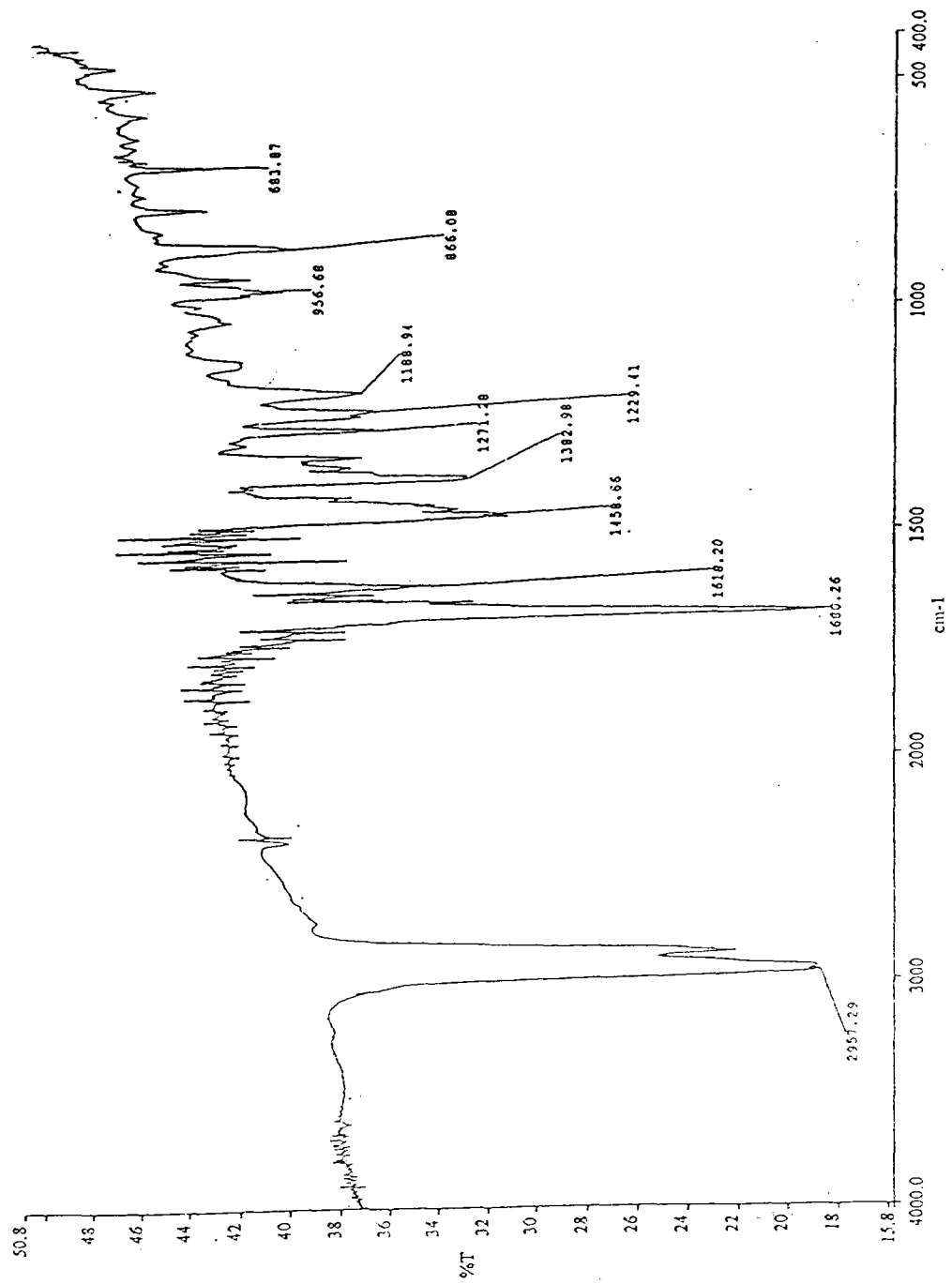
ภาพประกอบ 36 DEPT-135 และ DEPT-90 NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y



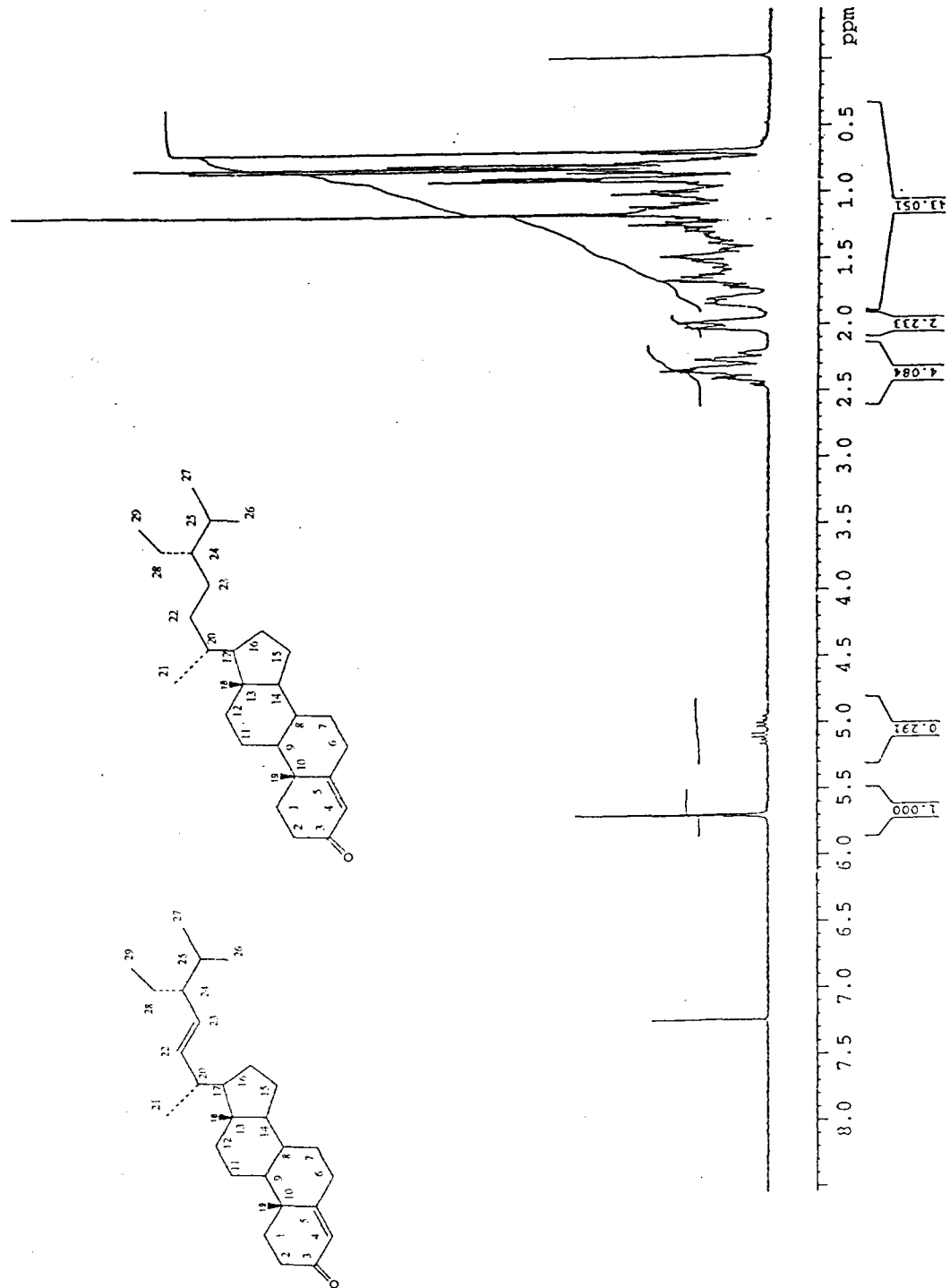
ภาพประกอบ 37 COSY NMR สเปกตรัมของสารประกอบ Y



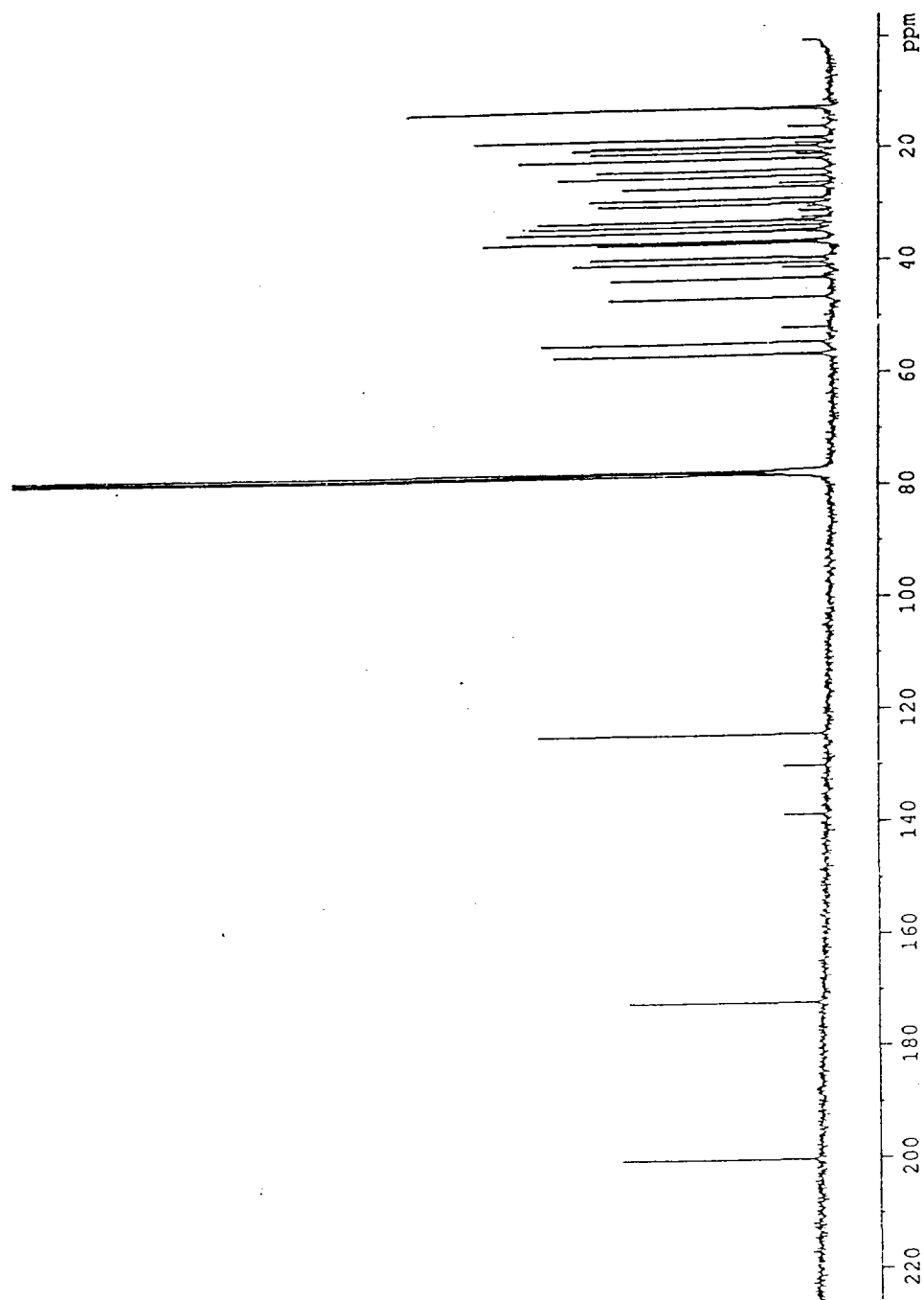
ภาพประกอบ 38 Mass Spectrum ของสารประกอบ Y



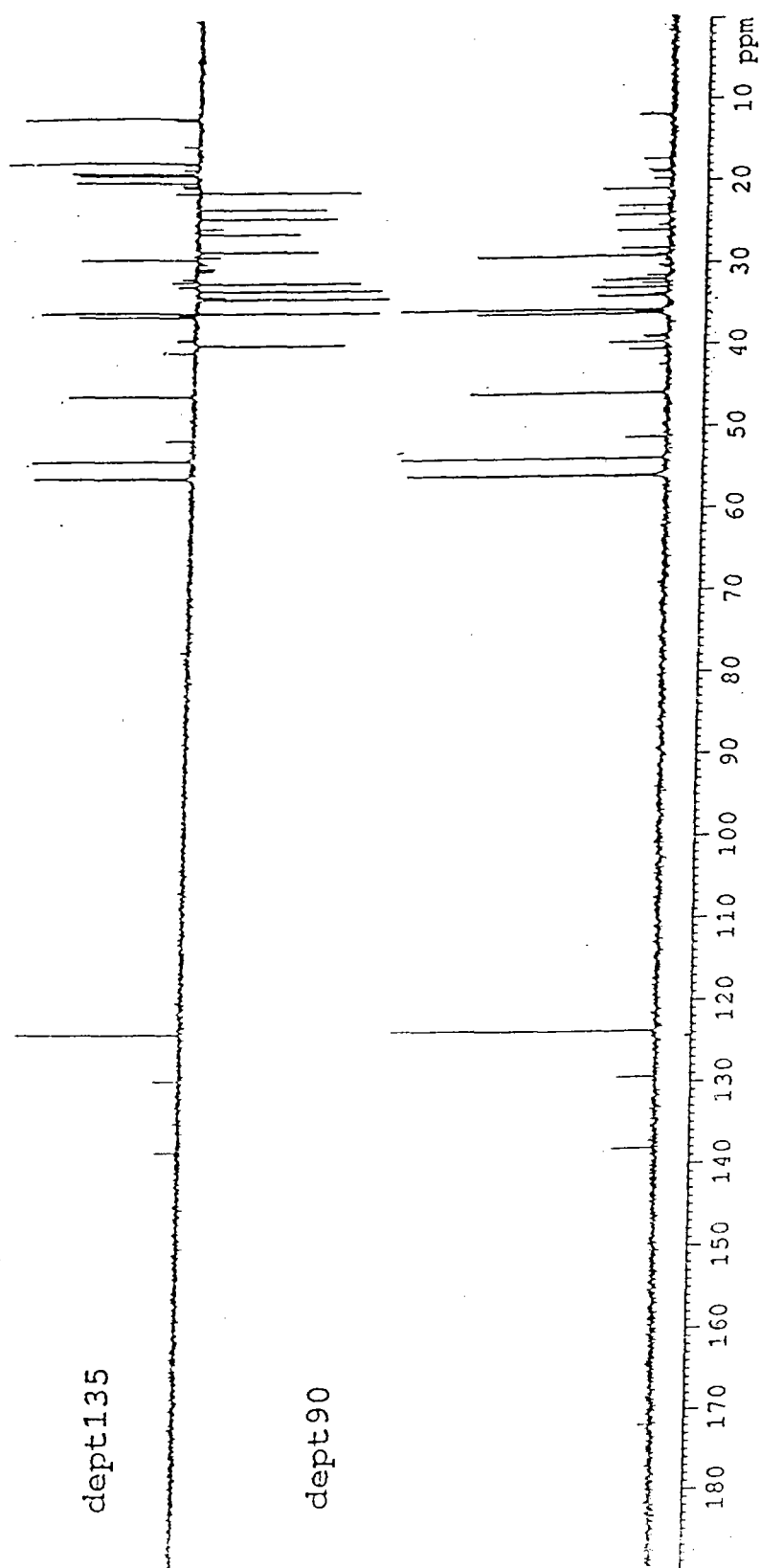
ภาพประกอบ 39 FT IR สเปกตรัมของสารผสม Z



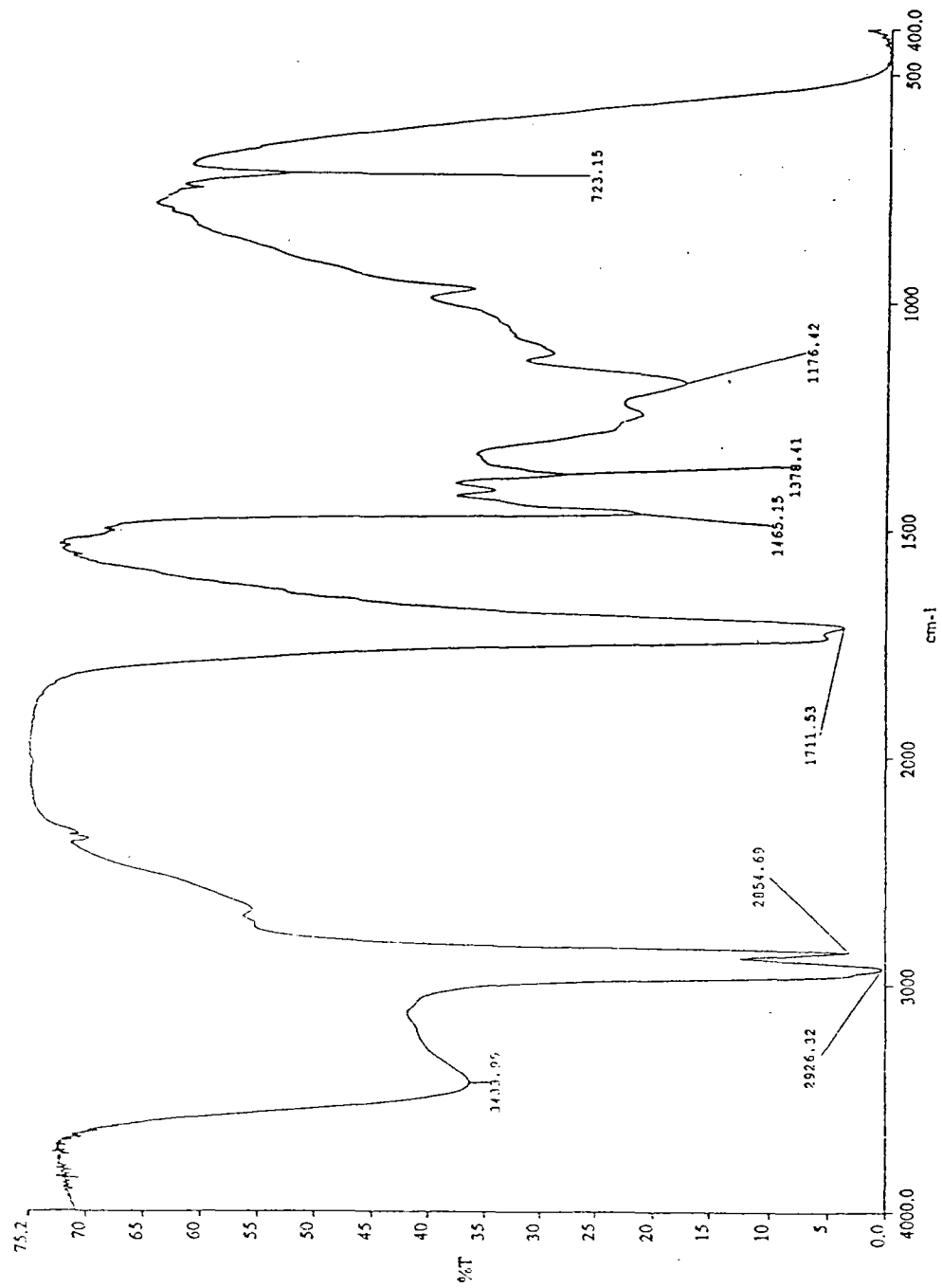
ภาพประกอบ 40 ^1H NMR สเปกตรัมของสารผสม Z



ภาพประกอบ 41 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารผสม Z



ภาพประกอบ 42 DEPT-135 และ DEPT-90 NMR สเปกตรัมของสารผสม Z



ภาพประกอบ 43 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม A-5-4-2



ภาพประกอบ 44 ลักษณะของเซลล์มะเร็งกลุ่มควบคุม(บน)และเซลล์มะเร็งกลุ่มที่ทดสอบด้วย
สารกลุ่ม A-5-4-2 (ล่าง)

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแยกสารและการตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของสารที่แยกได้

1. การเตรียม anisaldehyde – sulfuric acid spray reagent

นำสารต่าง ๆ ต่อไปนี้

conc.sulfuric acid	8.00 mL
anisaldehyde	0.50 mL
methanol	85.00 mL
glacial acetic acid	10.00 mL

นำสารทั้งหมดผสมกันในอ่างน้ำแข็ง เก็บสารที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น

2. การเตรียม Dragendorff's spray reagent

stock solution A : ละลาย 0.85 g bismuthsubnitrate ในส่วนผสมของ acetic acid : น้ำ อัตราส่วน 10 : 40 ปริมาตร 20 mL

stock solution B : ละลาย 8 g KI ในน้ำกลั่น 20 mL

เมื่อจะใช้ผสม A 1 mL กับ B 1 mL เติมลงในของผสมระหว่าง acetic acid 4 mL กับน้ำ 20 mL เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในขวดสีชา

3. การเตรียมสารสำหรับทดสอบปฏิกิริยา Liebermann – Burchard

ปฏิกิริยา Liebermann-Burchard จะให้สีเขียวกับสารประเภท steriods ภายในเวลา 1 ชั่วโมง โดยจะเปลี่ยนสีจาก ชมพู – แดง – ม่วง- น้ำเงิน – เขียว การเปลี่ยนสีอาจแตกต่างกันบ้างตามชนิดของสาร วิธีการทดสอบ นำสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก หยด acetic anhydride ลงไป 3 หยด ค่อย ๆ เขย่าจนสารละลายหมด แล้วหยด conc.sulfuric acid ลงไป 1 หยด สังเกตสีที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 1 ชั่วโมง

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 media

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมีดังนี้

RPMI Medium 1640 powder	20.90 g
sodium hydrogencarbonate	2.00 g
HEPES	3.00 g
sodium penicillin G	0.4 mL
streptomycin	1.00 mL
NaOH 1 M	
HCl 1 M	

ละลาย RPMI Medium 1640 powder ในน้ำกลั่น คนตลอดเวลาจนสารละลายได้ เติม sodium hydrogencarbonate และ HEPES คนต่อจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย HCl 1 M หรือ NaOH 1 M จนกระทั่ง pH อยู่ในช่วง 7.2 – 7.4 ปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น นำไปกรองด้วย millipore filter เติม sodium penicillin G และ streptomycin เก็บสารละลายที่เตรียมไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้ให้เติม Newborn Calf Serum (NCS) โดยใช้ Newborn Calf Serum (NCS) : สารละลายในอัตราส่วน 1 : 9 โดยปริมาตร

2. การเตรียม Trypan Blue Dye 4%

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ มีดังนี้

trypan blue	0.40 g
sodium chloride	0.81 g
potassium phosphate	0.06 g
methyl-p-hydroxybenzoate	0.05 g
NaOH 1 M	

ละลาย trypan blue , sodium chloride , potassium phosphate และ methyl-p-hydroxybenzoate ในน้ำกลั่น 90 mL นำไปต้มให้เดือด คนด้วยแท่งคนแม่เหล็กตลอดเวลา เมื่อละลายดีแล้ว ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 – 7.4 ด้วย NaOH 1 M และปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

br	broad
CDCl ₃	Deuterated Chloroform
¹³ C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
cm ⁻¹	wave number
d	doublet
dd	doublet of doublet
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EI MS	Electron Impact Mass Spectra
ED ₅₀	a concentration of substance which show 50% Killing effect on cell when compared to that of a control
FT IR	Fourier Transform Infrared Spectra
¹ H- ¹ H COSY	H- relay correlated spectroscopy
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
J	Coupling Constant
m	multiplet
M ⁺	Molecular ion
m/z	mass to charge ratio
μg/mL	microgram per millilitre
ppm	part per million
s	singlet
TLC	Thin layer Chromatography
UV	Ultraviolet

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นายอนันต์ คงชุม
วันเดือนปีเกิด	29 มิถุนายน 2509
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	11/19 ซอยวัดคลองใหม่ ถนนพระราม 3 แขวงช่องนนทรี เขตยานนาวา กรุงเทพมหานคร 10120
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์ 2 ระดับ 6
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนนนทรีวิทยา กรมสามัญศึกษา 139 ถนนพระราม 3 แขวงช่องนนทรี เขตยานนาวา กรุงเทพมหานคร 10120 โทร.0-22862105 ต่อ 114
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2527	ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส
พ.ศ. 2531	วท.บ.(ศึกษาศาสตร์) วิชาเอกเคมี คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
พ.ศ. 2544	กศ.ม.(เคมี) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ