การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทิลแอซิเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

ปริญญานิพนธ์
ของ
กมลวรรณ อนันต์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
พฤษภาคม 2547
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

545.55293
ก 1891
ค.3

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทิลแอซิเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

บทคัดย่อ

ของ

กมลวรรณ อนันต์

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

พฤษภาคม 2547

กมลวรรณ อนันต์. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดเอทิลแอซิเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.). ปริญญานิพนธ์ กศ. ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล, อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง, อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา.

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดเอทิลแอซิเตต และเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) พบว่ามีค่า ED_{50} > 30 µg/mL เมื่อนำสารสกัดหยาบเอทิลแอซิเตตมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ salicylic acid 3-*O*-acetyl aleuritolic acid และ 1,5-anhydroglucitol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 66.50 29.80 และ มากกว่า 30 µg/mL ตามลำดับ สารผสม 1 ชนิดคือ 22,23-dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 21.50 µg/mL และสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 5 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 5.50 11.50 12.00 และ 8.50 µg/mL ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอล พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol มีค่า ED_{50} > 30 µg/mL การศึกษาโครงสร้างของสารเหล่านี้ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

STUDY OF CHEMICAL CONSTITUENTS AND CYTOTOXICITY ON CANCER CELLS OF CRUDE ETHYL ACETATE AND METHANOL EXTRACTS FROM *HEDYOTIS CORYMBOSA* LAMK.

AN ABSTRACT

BY

KAMONWAN ANAN

Presented in partial fulfillment of the requirements

for the Master of Education degree in Chemistry

at Srinakharinrwirot University

May 2004

Kamonwan Anan. (2004). *Study of Chemical Constituents and Cytotoxicity on Cancer Cells of Crude Ethyl Acetate and Methanol Extracts from Hedyotis corymbosa Lamk.* Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Asst. Prof. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

The crude ethyl acetate and methanol extracts of *Hedyotis corymbosa* Lamk were tested for cytotoxicity against P-388 with ED_{50} greater than 30 μg/mL. Three pure compounds, salicylic acid, 3-*O*-acetyl aleuritolic acid, 1,5-anhydroglucitol and a mixture of 22,23-dihydrochondrillasterol and chondrillasterol were separated by column chromatography from the crude ethyl acetate extract. The ED_{50} of the three pure compounds were 66.50, 29.80 and greater than 30 respectively where ED_{50} of the mixture was 21.50 μg/mL. There were five minor and high toxic fractions with ED_{50} 9.00, 5.50, 11.50, 12.00 and 8.50 μg/mL. From crude methanol extract, a pure compound, 1,5-anhydroglucitol with ED_{50} greater than 30 μg/mL was isolated. Their structures were elucidated by spectroscopic techniques.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด
เอทิลแอซิเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

ของ

นางสาวกมลวรรณ อนันต์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาภรณ์ หะวานนท์)
วันที่ 10 พฤษภาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนันต์ พู่พิทยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีเนื่องจากได้รับความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง และ อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา แนะนำ แนวทางการทำปริญญานิพนธ์ รวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆในระหว่างการทำปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พู่พิทยาสถาพร ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และให้ความรู้ทางเคมีแก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีที่ให้บริการเป็นอย่างดี ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมงานวิจัยฉบับนี้ และขอขอบคุณนายธวัช นิยะโต ผู้อำนวยการโรงเรียนวิทยาราษฎร์รังสรรค์ นายจำรัส อินทลาภาพร เพื่อนๆ และน้องๆ นิสิตปริญญาโท ที่ให้กำลังใจเป็นอย่างดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุนและให้สมุนไพรในการวิจัย ขอขอบพระคุณกลุ่มงานพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบพระคุณคุณสุชานุช อ่อนดี งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในการทำวิจัยและขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูลทาง Mass spectroscopy

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวทุกท่านที่ช่วยอุปการะค่าใช้จ่ายระหว่างเรียนและให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ผู้วิจัยทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน

กมลวรรณ อนันต์

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3	วิธีดำเนินการวิจัย	16
	พืชที่ใช้ในการวิจัย	16
	เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย	16
	อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู และการทำสารให้บริสุทธิ์	16
	การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู การแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์	17
	อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388	20
	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้	21
	การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์	23
4	ผลการวิจัย	28
	ผลการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู	28
	ผลการแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์	28
	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5	สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	55
	การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์	55
	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388	64
	ข้อเสนอแนะ	67
	บรรณานุกรม	68
	ภาคผนวก	74
	อภิธานศัพท์	81
	ประวัติย่อผู้วิจัย	84

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตัวอย่างการเตรียมสารเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	22
2	ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	28
3	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	29
4	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	30
5	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	30
6	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
7	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
8	ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	32
9	ผลการแยกสารสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
10	ผลการแยกสารกลุ่ม M 3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
11	ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388	34
12	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	35
13	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 1 ถึง E 7 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	36
14	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 2.1 และ E 2.2 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	36
15	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 3.1 และ E 3.2 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	37
16	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.1 ถึง E 4.6 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	38
17	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.1.1 ถึง E 4.1.3 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	38
18	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.2.1 ถึง E 4.2.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	39
19	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.2.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	39
20	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.3.1 ถึง E 4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	40

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
21	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
22	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.4.1 ถึง E 4.4.3 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	42
23	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.5.1 ถึง E 4.5.3 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	43
24	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.4.1 และ E 4.5.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	44
25	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	45
26	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ B และ C ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	46
27	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ D ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
28	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม M 1 ถึง M 5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	48
29	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม M 3.1 ถึง M 3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	48
30	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 และค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	49
31	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 และค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL.....	50
32	แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A	56
33	แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	59
34	แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C	62
35	แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ D	64

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk).....	5
2	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis corymbosa* Lamk.....	7
3	สูตรโครงสร้างของ chrysotricine.....	9
4	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis dichotoma*.....	9
5	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa* และ *H. corymbosa*	10
6	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa*, *H. corymbosa* และ *Mollugo pentaphylla*.....	10
7	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis nudicaulis*.....	11
8	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis hedyotidea*.....	12
9	สูตรโครงสร้างของ Kaempferol-3-*O*-rutinoside.....	13
10	สูตรโครงสร้างของ 2-hydroxymethyl-10-hydroxy-1,4-anthaguinone.....	13
11	สูตรโครงสร้างของ Kaempferol 3-*O*-[2"-*O*-(E-6"-*O*-caffeoyl)-β-D-glucopyranosyl]- β-D-galatopyranoside.....	14
12	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa*.....	15
13	สูตรโครงสร้างของ lucidin-3-*O*-β-glucoside.....	15
14	แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู.....	24
15	แสดงขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบ ethyl acetate และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	25
16	แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 4 และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	26
17	แสดงขั้นตอนการแยกสารจากสารสกัดหยาบ methanol และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	27
18	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	34
19	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.2.1.....	40
20	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4.....	42
21	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.4.1 และ E 4.5.2.....	44
22	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ A.....	45
23	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ B และ C.....	47

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
24	แสดงร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388	50
25	แสดง negative control ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ในวันที่ 4 (x 100).....	51
26	แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.2.1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	51
27	แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	51
28	แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	52
29	แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.4.1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	52
30	แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.5.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	52
31	แสดงสูตรโครงสร้างของสารประกอบ A.....	57
32	แสดงสูตรโครงสร้างของสารประกอบ B.....	60
33	แสดงการแตกพันธะของสารประกอบ B.....	61
34	แสดงสูตรโครงสร้างของสารประกอบ C	63
35	แสดงสูตรโครงสร้างของสารประกอบ D	64
36	แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.2.1.....	76
37	แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.3.3.....	77
38	แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.3.4.....	78
39	แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.4.1.....	79
40	แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.5.2.....	80

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในบริเวณศูนย์สูตร มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นอุดมไปด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะพันธุ์พืชสมุนไพรนานาชนิด ซึ่งบรรพชนในสมัยโบราณได้นำพืชชนิดต่างๆ มาใช้รักษาโรค พืชชนิดใดใช้ได้ผลดีก็จดจำถ่ายทอดกันมา ต่อมาเมื่อเทคโนโลยีทางการแพทย์ได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้น ยาแผนปัจจุบันได้รับความสนใจ เนื่องจากสะดวก ให้ผลการรักษาได้เร็ว ทำให้ความนิยมยาสมุนไพรลดลง แต่ระยะหลังพบว่า เมื่อร่างกายได้รับยาแผนปัจจุบันในปริมาณมาก จะมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงปรารถนาเกิดขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงให้ความสนใจกับการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคมากขึ้น เช่น โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง มาลาเรีย และโรคมะเร็ง เป็นต้น การนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยารักษาโรคดังกล่าว ถือว่าเป็นทางเลือกหนึ่งในการพึ่งพาตนเองของคนไทย เป็นการลดการสั่งซื้อยาจากต่างประเทศ ซึ่งช่วยประหยัดและป้องกันการขาดแคลนยาในอนาคต

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีมาเป็นเวลานาน จากการศึกษาเอกสารต่างๆ พบว่ามีพืชที่ใช้ในการรักษามะเร็งมากกว่า 1,400 สกุล (เอมอร โสมนะพันธุ์. 2534 : 331) โดยการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในระยะเริ่มแรก สารที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้พยายามดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นแต่พบว่าไม่ได้ผลเท่าที่ควร ต่อมานักวิทยาศาสตร์จึงให้ความสนใจศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชสมุนไพร ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา เช่น แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* G. Don.) พบว่ามีสารพวกแอลคาลอยด์ชื่อ Vincristine และ Vinblastine คุณสมบัติเป็นยารักษามะเร็งเม็ดเลือดขาว (เอมอร โสมนะพันธุ์. 2534 : 332)

การศึกษาสารสกัดจากหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.)) พบสารกลุ่ม glycosides มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมและลำไส้ใหญ่ของคนในหลอดทดลอง (วีณา จิรัจฉริยากูล. 2542 : 10-13) และในเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) พบสารกลุ่ม triterpenoid มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่เนื้อเยื่อและปอดของหนูในหลอดทดลอง (Min, et al. 2000 : 1026) เมื่อศึกษาสาร polysaccharide ที่สกัดได้จากยอ (*Morinda citrifolia* L.) พบว่ามีฤทธิ์ต้านเนื้องอกในหนูถีบจักร (Hirazumi & Furusawa. 1999 : 380)

การศึกษาสารประกอบที่แยกได้จากทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) พบสาร Rhinacanthone มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกในต่อมน้ำเหลืองและช่วยยืดอายุของหนูขาว (Thirumurugan, et al. 2000 :1438-1440) และเมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งตับและช่วยยืดอายุของหนูขาว (Rajeshkumar & Kuttan. 2000 : 215-219)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารกลุ่ม saponins ที่สกัดจากใบของต้นราตรี (*Cestrum nocturnum* L.) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากของคนในหลอดทดลอง (Mimaki, et al. 2001 : 17-22)

การศึกษาสมุนไพรตำรับหนึ่งที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในระยะเริ่มแรก ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell.) หญ้าปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) และลิ้นงูเห่า (*Climacanthus siamensis* Brem.) ซึ่งในแต่ละปีมีผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งจำนวนมากมารับการรักษาด้วยสมุนไพรตำรับนี้ และมีแนวโน้มได้รับการยอมรับมากขึ้น นอกจากนี้ได้มีนักวิจัยนำสมุนไพรตำรับนี้มาศึกษาพบว่า น้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} > 30 µg/mL และการทดลองในหนูขาว พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดและช่วยยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Pornsiriprasert. 1986) และผลการวิจัยต่อมา พบว่าสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในหนูโกร๋นที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ NK cells ในการทำลายเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (Lymphoma) ในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Wiwatwithaya. 1992) และมีผู้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดจากเหง้าพุทธรักษา พบว่าในสารสกัดหยาบ hexane พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 19.00 และ 21.50 µg/mL (วินัย สุขราช. 2544) ในระยะเวลาต่อมาสมุนไพรตำรับนี้ได้เพิ่มสมุนไพรอีก 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) หลอดเถื่อน (*Mallutus oblongifolius* Muell. Arg.) และเหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Wall.) ซึ่งได้มีผู้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดจากหลอดเถื่อน พบว่าในสารสกัดหยาบ hexane พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 µg/mL (อนันต์ คงชุม. 2544) นอกจากนี้มีผู้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดจากหญ้าลิ้นงู พบว่า ในสารสกัดหยาบ hexane พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 µg/mL และในสารสกัดหยาบ ethanol พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 µg/mL (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 จากหญ้าลิ้นงูดังกล่าวพบว่า ยังไม่มีการแยกสารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และจากข้อมูลสมุนไพรพื้นบ้าน หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) มีสรรพคุณรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ แก้ไข้มาลาเรีย ลำไส้อักเสบ รักษาแผลฝีบวม แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531 : 811) แก้ไข้ ฝี หนอง (ดรุณ เพ็ชรพลายและคณะ.2538 : 96) นอกจากนี้ยังนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งและเนื้องอก (สวนสมุนไพร วัดอุโมงค์ สวนพุทธธรรม. 2530 : 96) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหญ้าลิ้นงู เพื่อวิเคราะห์หาสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาในสัตว์ทดลองและคน รวมทั้งเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ ethyl acetate และ methanol
2. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด และการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลักบางชนิด จากสารสกัดหยาบ ethyl acetate และ methanol
3. เพื่อวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักจากหญ้าลิ้นงู
2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร มาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาทางเภสัชวิทยาและทางพิษวิทยาต่อไป
3. ทำให้ทราบสูตรโครงสร้าง ซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ และสารอนุพันธ์เพื่อเป็นแนวทางพัฒนายาต้านมะเร็งในอนาคต
4. เป็นการนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้หญ้าลิ้นงูที่ตากแห้ง ซึ่งได้รับจากคลีนิกนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี
2. การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงูทั้งต้น ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ
3. นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate และ methanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี (chromatography) และวิธีการตกผลึก (crystallization)
4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells, P-388) ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง
5. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ โดยใช้วิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopic technique) ได้แก่ อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy) แมสสเปกโทรเมตรี (Mass spectrometry) นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P-388 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell suspension)

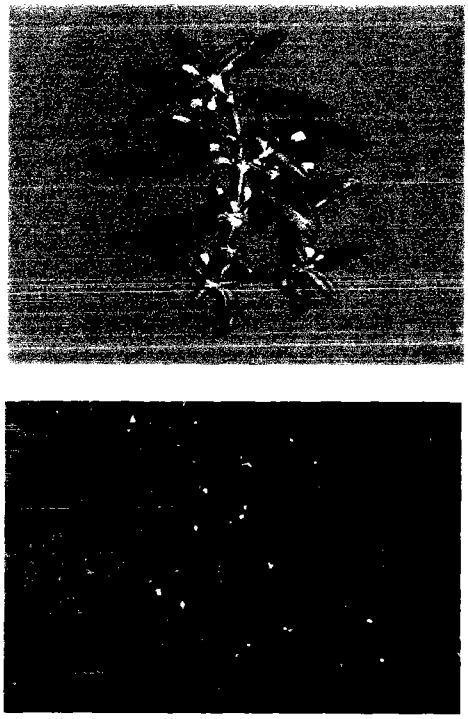
2. ED_{50} (median effective dose) คือค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

3. สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง คือ สารที่ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีค่า $ED_{50} \leq 30$ µg/mL

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าลิ้นงูมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hedyotis corymbosa* Lamk. (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 172) จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae มีชื่ออื่นๆ ว่า สุ่ยเฉียบฉ่าว จุ่ยจี้เช่า (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531 : 811) หญ้าลิ้นงู เป็นพรรณไม้ล้มลุกขนาดเล็กคลุมดิน ลำต้นเลื้อยไปตามผิวดิน ยาวประมาณ 6 - 20 นิ้ว ผิวเกลี้ยง มักแตกกิ่งก้านตามโคนใบ ใบรูปร่างยาวรี กว้าง 2 - 4 มิลลิเมตร ยาว 20 - 30 มิลลิเมตร ปลายใบแหลม มีขนอ่อนๆ ตามริมใบ (ดรุณ เพ็ชรพลายและคณะ. 2538 : 96) ดอกเล็กสีขาวลักษณะเป็นกรวยแยก 4 กลีบ ออกดอกตามซอกใบเป็นช่อ 2 - 4 ดอก ผลรูปกลมรี ภายในมีเมล็ดมาก เกิดตามที่ลุ่มชื้นแฉะทั่วไป ขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ด (วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540 : 469) (ภาพประกอบ 1)

หญ้าลิ้นงูมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น ลำต้นสดของหญ้าลิ้นงู นำมาต้มรับประทานแก้ไข้มาลาเรีย ลำไส้อักเสบ และนำน้ำต้มมาพอกบาดแผล รักษาแผลฝีบวม แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531 : 811) นอกจากนี้ยังนำมาต้มผสมกับน้ำผึ้ง รับประทานแก้ไข้ ฝี หนอง และมะเร็งตับ (ดรุณ เพ็ชรพลายและคณะ. 2538 : 96) และนำมาต้มกับหญ้าพระจันทร์ครึ่งซีก รับประทานแก้โรคมะเร็งและเนื้องอก (สวนสมุนไพร วัดอุโมงค์ สวนพุทธธรรม. 2530 : 96)



ภาพประกอบ 1 หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พรศิริประเสริฐ (Pornsiriprasert. 1986.) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งมะเร็งเต้านมของพืชสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell.) หญ้าปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) และลิ้นงูเห่า (*Climacanthus siamensis* Brem.) เมื่อนำสารสกัดด้วยน้ำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็งในหลอดทดลองและหนูขาว พบว่าความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง KB มีค่า ED_{50} สูงกว่า 30 µg/mL ส่วนในหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านม เมื่อได้รับสารก่อมะเร็งชนิด 7,12 – dimethylbenzanthracene (7,12 –DMBA) จำนวน 130 mg / kg ครั้งเดียว พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพรสามารถชลอการเติบโตของก้อนมะเร็งได้ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพร

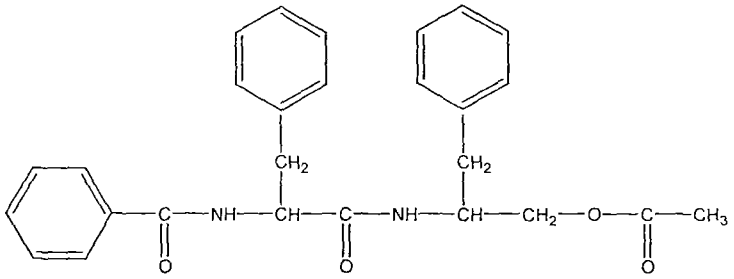
ณ บางช้าง (Na Bangchang. 1987.) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งมะเร็งเต้านมของพืชสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยส่วนที่ได้จากพืช 5 ชนิด และส่วนที่ได้จากสัตว์ 5 ชนิด ส่วนที่ได้จากพืช ได้แก่ ไฟเดือนห้า หญ้าปีกไก่ดำ พุทธรักษา ข้าวเย็นเหนือ และลิ้นงูเห่า ส่วนที่ได้จากสัตว์ ได้แก่ เกล็ดนิ่ม (*Manis javanica* Desmarest.) ขนเม่น (*Hystrix blachyura* Linn.) กระดองเต่า (*Damonia subtrijuka* Boulnger.) เงี่ยงปลากระเบน (*Dasyatis spp.*) และอกตะพาบน้ำ (*Trionix cartilaginous* Boulenger.) เมื่อนำสารสกัดจากสมุนไพรทั้งตำรับไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ KB ในหลอดทดลองและหนูทดลอง พบว่า ในหลอดทดลองสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ KB ค่า ED_{50} สูงกว่า 100 µg/ml ซึ่งอยู่ในระดับต่ำกว่ามาตรฐานสากล ส่วนในการทดลองกับหนูที่เป็นมะเร็งเต้านมจากสารก่อมะเร็งชนิด 7,12-DMBA พบว่า เมื่อให้หนูทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพร ขนาด 1,500 mg/kg ของน้ำหนักตัว ทุกวัน สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 4 สัปดาห์แรก ช่วยยืดอายุ และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับน้ำสกัดสมุนไพร

วิวัฒน์วิทยา (Wiwatwithaya. 1992) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับเดียวกัน พบว่า สมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการปลูกถ่ายในหนูโกร่น และเมื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ Natural Killer cells (NK cells) พบว่ามีการเพิ่มความสามารถของ NK cells ต่อการทำลาย Yac-1 cell (lymphoma cells) ในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ธิโสดา (Thisoda. 1995) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับนี้เพิ่มเติมโดยศึกษาภาวะการทำงานของ NK cells และ monocyte ของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม พบว่า เมื่อผู้ป่วยได้รับน้ำสกัดสมุนไพรตำรับนี้วันละ 500 มิลลิลิตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ความสามารถในการทำงานของ NK cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

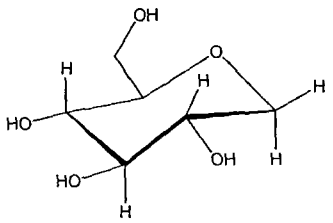
($p < 0.05$) และสามารถเพิ่มการหลั่ง TNF - α จาก monocyte ของผู้ป่วย และเมื่อเพิ่มการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดลดลง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดกดระบบภูมิคุ้มกัน ส่วนสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดหยาบจากหญ้าลิ้นงูในชั้น hexane และ ethanol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 30 และมากกว่า 100 µg/mL ตามลำดับ จากการนำสารสกัดหยาบ hexane และ ethanol มาแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ จากสารสกัดหยาบ hexane แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ aurantiamide acetate (1) มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ด้วยค่า ED_{50} > 100 µg/mL และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 µg/mL ตามลำดับ ในสารสกัดหยาบ ethanol แยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol (2) และ β-sitosteryl-3-*O*-β-D-glucopyranoside (3) และสารผสมของ 22,23–dihydrochondrillasterol (4) และ chondrillasterol (5) ค่า ED_{50} ของสารบริสุทธิ์ทั้งสองมีค่ามากกว่า 100 µg/mL ส่วนสารผสมมีค่า ED_{50} เท่ากับ 21.50 µg/mL นอกจากนี้ยังสามารถแยกกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 µg/mL สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 2



(1)

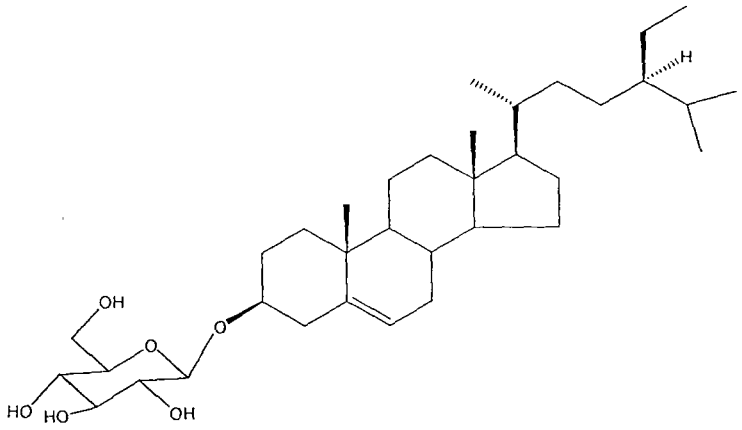
aurantiamide acetate



(2)

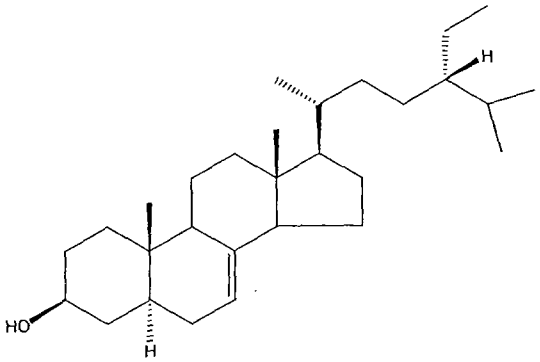
1,5-anhydroglucitol

ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis corymbosa* Lamk.



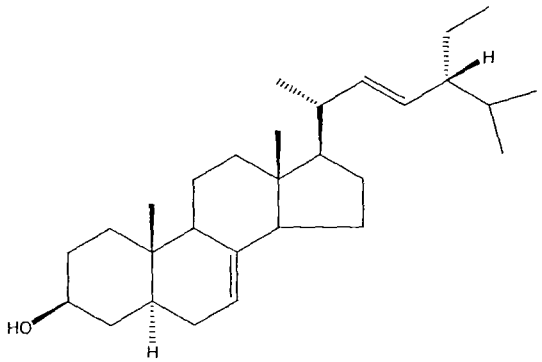
(3)

β-sitosteryl-3-*O*-*β*-D-glucopyranoside



(4)

22,23 - dihydrochondrillasterol

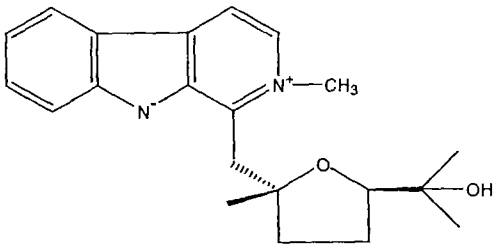


(5)

chondrillasterol

ภาพประกอบ 2 (ต่อ) สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis corymbosa* Lamk.

เป็งและคณะ (Peng, et al. 1997 : 1119-1121) ได้ศึกษาสารสกัดจากต้นแห้งของ *Hedyotis chrysotricha* โดยสกัดด้วย ethanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ alkaloid 1 ชนิด คือ chrysotricine (6) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HL-60) 63% ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 3

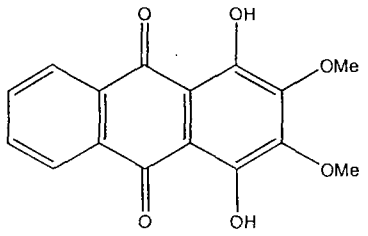


(6)

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของ chrysotricine

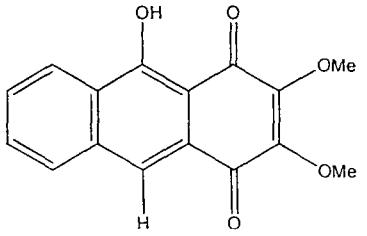
หยาง ลิน และซู (Yang, Lin & Hsu. 1997 : 6-10) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ *Hedyotis diffusa* , *Hedyotis corymbosa* และ *Mollugo pentaphylla* พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกในหนูสายพันธุ์ ICR ที่ได้รับการปลูกถ่ายด้วย sarcoma-180 และเมื่อฉายรังสีร่วมกับการใช้สารสกัดจากสมุนไพร 3 ชนิด ดังกล่าว พบว่ามีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวโดยสารสกัดจาก *Mollugo pentaphylla* มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวน้อยที่สุด (Yang, Lin & Hsu. 1997 : 428-432)

แฮมซาฮ์และคณะ (Hamzah, et al. 1997 : 36-37) ได้สกัดและแยกสารจากรากของ *Hedyotis dichotoma* โดยสกัดด้วย dichloromethaneเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์พบ anthraquinones ซึ่งเป็นสารใหม่ 2 ชนิด คือ 1,4-dihydroxy-2,3-dimethoxyanthraquinone (7) และ 2,3-dimethoxy-9-hydroxy-1,4-anthraquinone (8) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 4



(7)

1,4-dihydroxy-2,3-dimethoxyanthraquinone

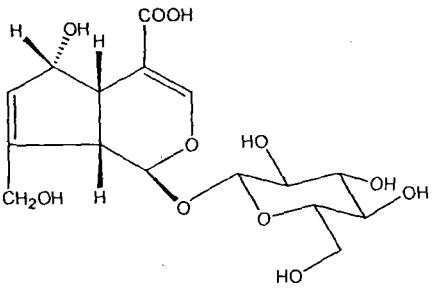


(8)

2,3-dimethoxy-9-hydroxy-1,4-anthraquinone

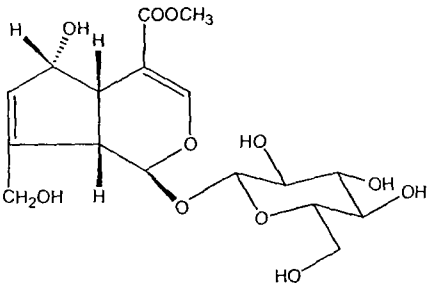
ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากรากของ *Hedyotis dichotoma*

ซูและคณะ (Hsu, et al. 1997 : 31-37) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ geniposidic acid (9) และ geniposide (10) ซึ่งสารทั้งสองชนิดสกัดได้จาก *Hedyotis diffusa* และ *Hedyotis corymbosa* พบว่า เมื่อศึกษาร่วมกับการฉายรังสี สามารถชลอการเจริญของเนื้องอกในหนูสายพันธ์ ICR ที่ได้รับการปลูกถ่าย sarcoma - 180 โดย geniposidic acid มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกมากกว่า geniposide และสารทั้งสองชนิดมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 5



(9)

geniposidic acid

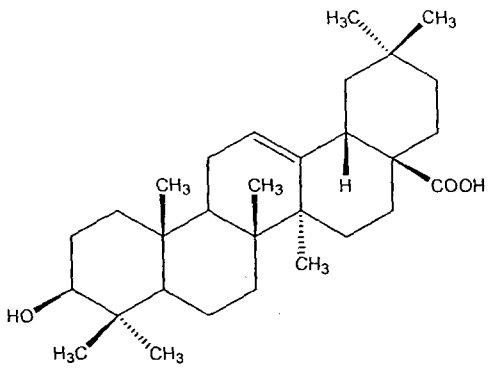


(10)

geniposide

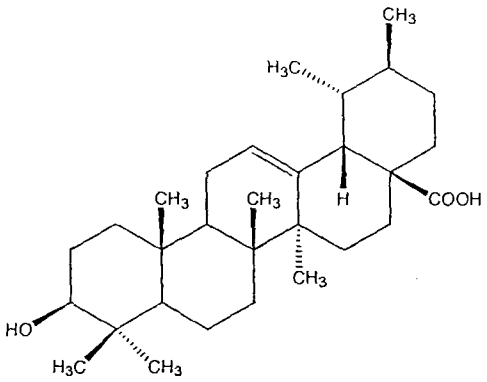
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa* และ *Hedyotis corymbosa*

ซูและคณะ (Hsu, et al. 1997 : 7-13) ได้ศึกษาฤทธิ์ของ oleanolic acid (11) และ ursolic acid (12) ซึ่งสารทั้งสองชนิดสกัดได้จาก *Hedyotis diffusa Hedyotis corymbosa* และ *Mollugo pentaphylla* พบว่าเมื่อศึกษาร่วมกับการฉายรังสี สามารถชลอการเจริญของเนื้องอกในหนูสายพันธ์ ICR ที่ได้รับการปลูกถ่าย sarcoma - 180 โดย ursolic acid มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกมากกว่า oleanolic acid และสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 6



(11)

oleanolic acid

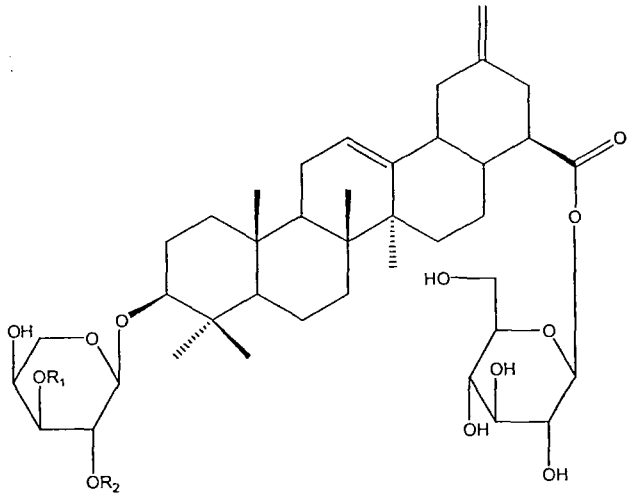


(12)

ursolic acid

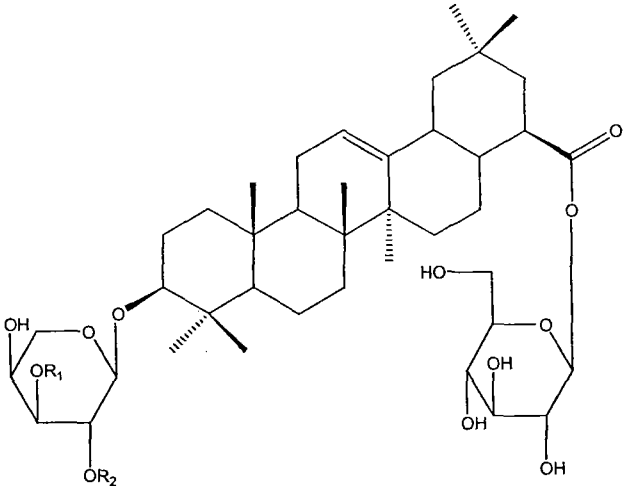
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa, Hedyotis corymbosa* และ *Mollugo pentaphylla*

โคนิชิและคณะ (Konishi, et al. 1998 : 525-528) ได้ศึกษาสารสกัดจากต้นแห้งของ *Hedyotis nudicaulis* โดยสกัดด้วย petroleum, dichloromethane, ethyl acetate และ buthanol ตามลำดับและนำสารสกัด buthanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ saponin 4 ชนิด คือ guaiacin D (13) และ saponin ชนิดใหม่ 3 ชนิดคือ nudicaucins A, B, C (14-16) เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ M45 และ H17 พบว่า nudicaucins A และ B มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสังเกตได้จากเกิดบริเวณใส ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-11 mm ส่วน nudicaucins C และ guaiacin D เกิดบริเวณใส ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 14-16 mm สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 7



(13) guaiacin D ; R_1 = glucose, R_2 = rhamnose

(14) nudicaucins A ; R_1 = galactose, R_2 = H

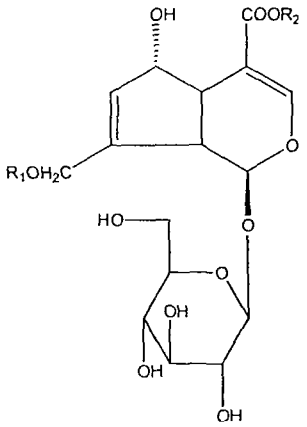


(15) nudicaucins B ; R_1 = galactose, R_2 = H

(16) nudicaucins C ; R_1 = glucose, R_2 = rhamnose

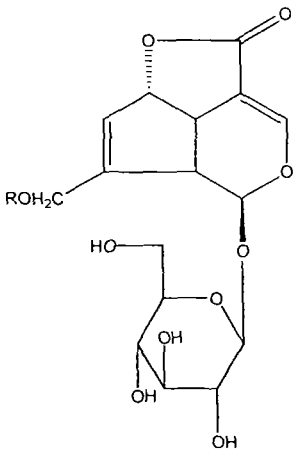
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis nudicaulis*

เป็งและคณะ (Peng, et al. 1998 : 1657-1659)ได้ศึกษาสารสกัดจากต้นแห้งของ *Hedyotis hedyotidea* โดยสกัดด้วย ethanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ iridoid 5 ชนิด คือ asperulosidic acid (17), asperuloside (18), deacetyl asperuloside (19) และ iridoid ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ deacetylasperulosidic acid ethyl ester (20) และ hedyotoside (21) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 8



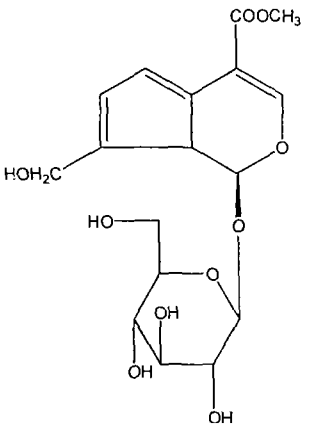
(17) asperulosidic acid ; R_1 = CH_3CO, R_2 = H

(20) deacetylasperulosidic acid ethyl ester ; R_1 = H, R_2 = CH_2CH_3



(18) asperuloside ; R = CH_3CO

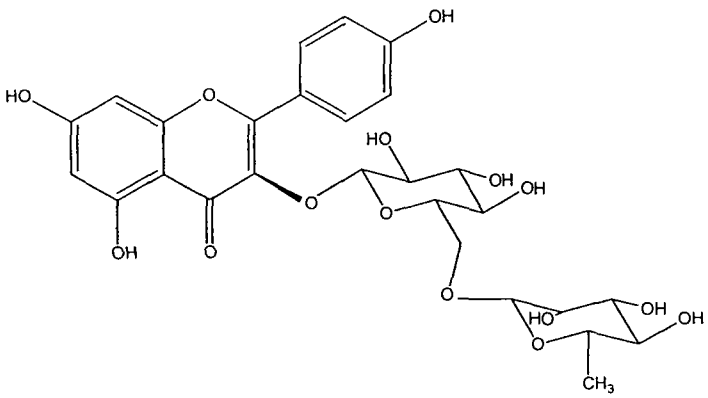
(19) deacetyl asperuloside ; R = H



(21) hedyotoside

ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis hedyotidea*

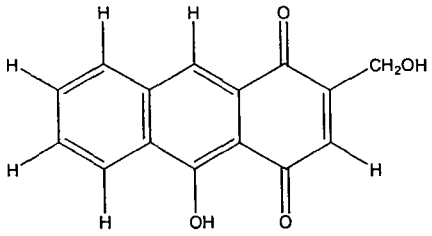
แฮมซาฮ์และลาจิส (Hamzah & Lajis. 1998) ได้สกัดและแยกสารจากใบและกิ่งก้านของ *Hedyotis herbacea* โดยสกัดด้วย methanol จากนั้นนำมาสกัดด้วย chloroform และน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย ethyl acetate และ butanol ได้สารสกัดหยาบ chloroform, ethyl acetate และ butanol นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ ursolic acid (12) และ kaempferol-3-*O*-rutinoside (22) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 9



(22)

ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของ kaempferol-3-*O*-rutinoside

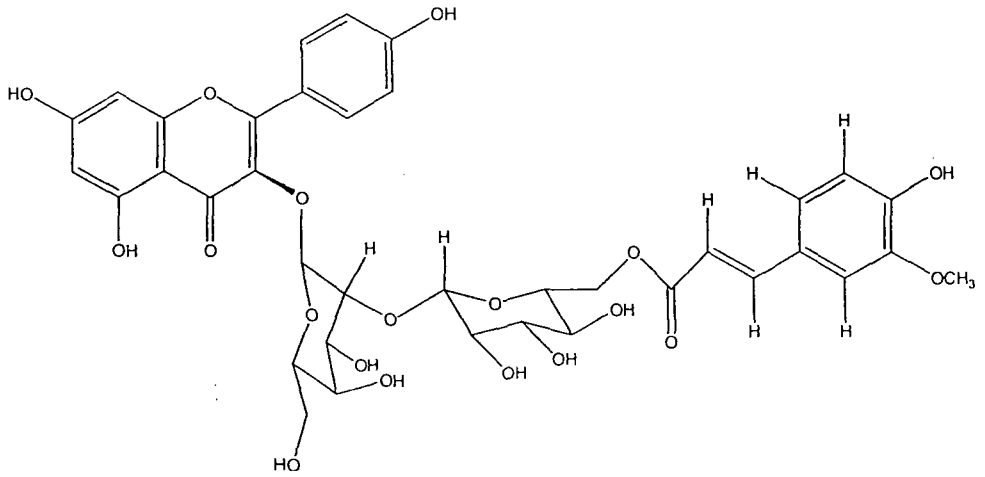
เพอมานาและคณะ (Permana, et al. 1999 : 1430-1431)ได้สกัดแยกสารจากต้นแห้งของ *Hedyotis herbacea* โดยสกัดด้วย methanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ anthraquinone ชนิดใหม่ คือ 2-hydroxymethyl-10-hydroxy-1,4-anthraquinone (23) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 10



(23)

ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของ 2-hydroxymethyl-10-hydroxy-1,4-anthraquinone

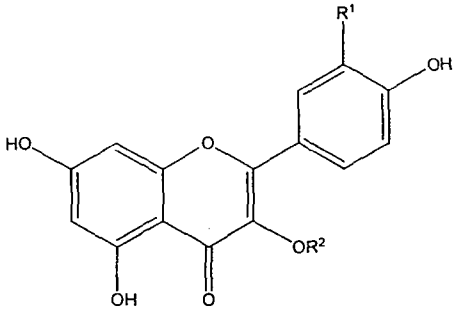
ลูและคณะ (Lu, et al. 2000 : 374-376) ได้สกัดแยกสารจากต้นแห้งของ *Hedyotis diffusa* โดยสกัดด้วย methanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ acyl flavonol glycoside ชนิดใหม่ คือ kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*E*-6-*O*-caffeoyl)-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-galactopyranoside (24) ซึ่งมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 11



(24)

ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของ kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(*E*-6-*O*-caffeoyl)-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-galactopyranoside

คิมและคณะ (Kim, et al. 2001 : 75-78) ได้สกัดแยกสารจากต้นแห้งของ *Hedyotis diffusa* โดยสกัดด้วย methanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ flavonol glycosides 5 ชนิด คือ kaempferol 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-galactopyranoside (25) quercetin 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-galactopyranoside (26) quercetin 3-*O*-[2-*O*-(6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl]-*β*-D-glucopyranoside (27) kaempferol 3-*O*-(2-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*β*-D-galactopyranoside (28) และ quercetin 3-*O*-(2-*O*-*β*-D-glucopyranosyl)-*β*-D-galactopyranoside (29) ซึ่งสารทั้ง 5 ชนิด มีสมบัติช่วยให้เซลล์ประสาททำงานได้ดีขึ้น สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 12



(25) R^1 = H R^2 = (6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl(2,1)-*β*-D-galactopyranoside

(26) R^1 = OH R^2 = (6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl(2,1)-*β*-D-galactopyranoside

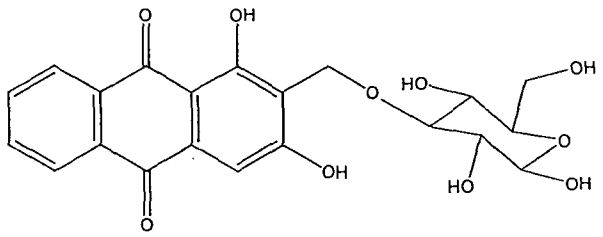
(27) R^1 = OH R^2 = (6-*O*-*E*-feruloyl)-*β*-D-glucopyranosyl(2,1)-*β*-D-glucopyranoside

(28) R^1 = H R^2 = *β*-D-glucopyranosyl(2,1)-*β*-D-galactopyranoside

(29) R^1 = OH R^2 = *β*-D-glucopyranosyl(2,1)-*β*-D-galactopyranoside

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Hedyotis diffusa*

ฮามาดและคณะ (Ahmad, et al. 2002 : 155) ได้สกัดแยกสารจาก *Hedyotis capitellata* โดยใช้ methanol เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ lucidin-3-*O*-*β*-glucoside (30) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 13



(30)

ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของ lucidin-3-*O*-*β*-glucoside

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู การแยกสาร และทำสารให้บริสุทธิ์
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้
3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

พืชที่ใช้ในการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ พืชที่ใช้ในการวิจัย คือ หญ้าลิ้นงูทั้งต้น (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) ได้มาจากคลีนิกนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี ผ่านการตรวจเอกลักษณ์โดยกลุ่มงานพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ คือเซลล์มะเร็ง P-388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู ซึ่งได้มาจากห้องปฏิบัติการของงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและศึกษาค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

อุปกรณ์/เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู และการทำสารให้บริสุทธิ์

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องบดสมุนไพร
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
3. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 cm 3 cm 5 cm 7 cm และ 10 cm
4. หลอดกำเนิดแสงยูวี (Spectroline ENF – 260 C/F)
5. Rotary Evaporator (Büchi Rotavapor R – 114)
6. Hot plate (Framo M 21/1)

สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ (กลั่นก่อนนำมาใช้) ได้แก่ hexane, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol และ methanol
2. Silica gel 60 GF_{254} สำหรับ TLC (E. Merck)
3. Silica gel 60 สำหรับโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (0.063 – 0.200 mm E. Merck)

4. Precoated Silica gel 60 GF_{254} TLC aluminium sheets (E. Merck)
5. Anisaldehyde - sulfuric acid spray reagent (anisaldehyde : conc. sulfuric acid : glacial acetic acid: methanol ในอัตราส่วน 0.50 : 8.00 : 10.00 : 85.00)

การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู การแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์

1. การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู (ภาพประกอบ 14)

1.1 การสกัดสารด้วย hexane

นำหญ้าลิ้นงูที่อบแห้ง และบดละเอียดหนัก 4 kg มาแช่ใน hexane 20 L นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °c เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำไปแช่ใน hexane อีก 3 ครั้งๆละ 20 L รวมสารสกัดทั้งหมด ระเหย hexane ออก โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ hexane หนัก 129 g

1.2 การสกัดสารด้วย ethyl acetate

นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วย hexane มาผึ่งให้แห้ง นำไปแช่ใน ethyl acetate แล้วทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัดหยาบ ethyl acetate หนัก 95 g นำบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1.3 การสกัดสารด้วย methanol

นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วย ethyl acetate มาผึ่งให้แห้ง นำไปแช่ใน methanol แล้วทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัดหยาบ methanol หนัก 104 g นำบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2. การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography, CC) โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาประมาณ 1 : 25 การบรรจุซิลิกาลงในคอลัมน์ ใช้การบรรจุแบบเปียก นำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และเลือกเฉพาะกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีค่า ED_{50} ใกล้เคียง 30 µg/mL และ/หรือมีปริมาณมากและมีลักษณะเป็นของแข็งมาแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งมีวิธีดำเนินการดังนี้

2.1 นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate หนัก 80 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโท-กราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 10 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 1.30 kg) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วนๆ ส่วนละ 100 mL นำแต่ละส่วนรวมให้เป็นกลุ่มๆ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโท-กราฟีแบบเยื่อบาง (thin layer chromatography, TLC) การหาตำแหน่งของสารบน TLC ใช้หลอดกำเนิดแสงยูวี (ความยาวคลื่น 254 nm และ/หรือ 365 nm) หรือใช้ spray reagent พ่นบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 80-120 °C นาน 5 นาที จะปรากฏสีแตกต่างกัน รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สาร

ทั้งหมด 7 กลุ่ม นำสารแต่ละกลุ่มไประเหยตัวทำละลายให้แห้ง และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 2 E 3 และ E 4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจึงนำมาแยกต่อ และสารกลุ่ม E 7 มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาตกผลึก (ภาพประกอบ 15)

2.2 สารกลุ่ม E 2 มีลักษณะเป็นของแข็งปนของเหลวสีเหลือง นำมาละลายด้วย hexane ได้สาร 2 กลุ่ม สารกลุ่ม E 2.1 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : chloroform อัตราส่วน 95 : 5 พบว่ามีลักษณะเป็นแถบคาดว่ามีสารหลายกลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 2.2 มีลักษณะเป็นของแข็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย chloroform พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่ม และสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ นำสารทั้งสองกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 15)

2.3 สารกลุ่ม E 3 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง นำมาละลายด้วย hexane ได้สาร 2 กลุ่ม สารกลุ่ม E 3.1 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเหลือง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : chloroform อัตราส่วน 95 : 5 พบว่ามีลักษณะเป็นแถบคาดว่ามีสารหลายกลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 3.2 มีลักษณะเป็นของแข็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : chloroform อัตราส่วน 20 : 80 พบสารอย่างน้อย 3 กลุ่ม และสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ นำสารทั้งสองกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 15)

2.4 สารกลุ่ม E 4 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 7 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 400 g) ชะด้วย chloroform เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 50 mL ได้สาร 6 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 4.1 E 4.2 E 4.3 E 4.4 และ E 4.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจึงนำมาแยกต่อ (ภาพประกอบ 16)

2.4.1 สารกลุ่ม E 4.1 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 30 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ ethyl acetate ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 20 mL ได้สาร 3 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 4.1.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารมีลักษณะคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : chloroform อัตราส่วน 70 : 30 พบสารอย่างน้อย 5 กลุ่ม และสารมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารกลุ่มที่แยกได้จาก E 4.1 จึงไม่นำมาแยกต่อ (ภาพประกอบ 16)

2.4.2 สารกลุ่ม E 4.2 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 35 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 20 mL ได้สาร 4 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 16)

- สารกลุ่ม E 4.2.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารมีลักษณะคล้ายขี้ผึ้งสีเขียว เมื่อทดสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : chloroform อัตราส่วน 80 : 20 พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่ม และสารมีปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ

- สารกลุ่ม E 4.2.2 มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ชะด้วย ethyl acetate : hexane อัตราส่วน 30 : 70 ได้**สารประกอบ A** นำไปหาจุดหลอมเหลว วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

2.4.3 สารกลุ่ม E 4.3 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063-0.200 mm จำนวน 55 g) ชะด้วย chloroform เพิ่มความเป็นขั้วด้วย ethyl acetate เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 20 mL ได้สาร 4 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 4.3.2 E 4.3.3 และ E 4.3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 16)

- สารกลุ่ม E 4.3.2 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้**สารประกอบ B** นำไปหาจุดหลอมเหลว วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

- สารกลุ่ม E 4.3.3 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเขียว เมื่อทดสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 50 : 50 พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปหาค่า ED_{50}

- สารกลุ่ม E 4.3.4 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเขียวเข้ม เมื่อทดสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 10 : 90 พบมีลักษณะเป็นแถบคาดว่ามีสารหลายกลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ แต่นำไปหาค่า ED_{50}

2.4.4 สารกลุ่ม E 4.4 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063-0.200 mm จำนวน 70 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 20 mL ได้สาร 3 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 4.4.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารมีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเหลือง เมื่อทดสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่ม และมีปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปหาค่า ED_{50} (ภาพประกอบ 16)

2.4.5 สารกลุ่ม E 4.5 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 5 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063-0.200 mm จำนวน 200 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 30 mL ได้สาร 3 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 4.5.1 และ E 4.5.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 16)

- สารกลุ่ม E 4.5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารสีเขียว จึงนำมาละลายด้วย hexane พบว่ามีส่วนที่ไม่ละลายนำมากรองได้ **สารประกอบ C** นำไปหาจุดหลอมเหลว วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

- สารกลุ่ม E 4.5.2 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีเขียว เมื่อตรวจสอบด้วย TLC ชะด้วย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 50 : 50 พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปหาค่า ED_{50}

2.5 สารกลุ่ม E 7 มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้**สารประกอบ D** นำไปหาจุดหลอมเหลว วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 15)

3. การแยกสารจากสารสกัดหยาบ methanol และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ methanol หนัก 70 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 10 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 1.00 kg) ชะด้วย chloroform เพิ่มความเป็นขั้วด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วนๆ ส่วนละ 100 mL นำแต่ละส่วนรวมให้เป็นกลุ่มๆ จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ไม่พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 17)

3.1 สารกลุ่ม M3 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 50 g) ชะด้วย dichloromethane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาครั้งละ 50 mL ได้สาร 4 กลุ่ม เมื่อนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ไม่พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงไม่นำไปแยกต่อ (ภาพประกอบ 17)

3.2 สารกลุ่ม M 5 มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้**สารประกอบ D** (ภาพประกอบ 17)

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ปิเปตขนาดต่างๆ
2. ตู้บ่ม (Shel-Lab. TC 2323)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
4. กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus)
5. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2 (Aseptic Flask, Costar)
6. Haemacytometer (Boeco)

สารเคมี

1. 0.4% Trypan blue dye
2. Newborn Calf Serum (NCS) (Biowhittaker)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (E. Merck , AR grade)
4. Roswell Park Memorial Institute medium number 1640 (RPMI 1640 medium) (Biowhittaker)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells, P-388) ซึ่งเป็น cell suspension เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ คือ RPMI 1640 ผสมกับ NCS 10% เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.2 ด้วย 1% HCl หรือ 7.5% $NaHCO_3$ นำไปเลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่มี CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C และ subculture 2 ครั้ง/สัปดาห์ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ อายุประมาณ 3 – 4 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) ดังนี้

1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบาๆ ให้เซลล์กระจาย แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์ 0.20 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 0.40% trypan blue dye ลงไป 0.20 mL ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

1.2 การนับเซลล์

นำเซลล์ที่ย้อมสีมาหยดลงบน Haemacytometer ซึ่งมี cover slide ปิดอยู่ ใช้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงินของ 0.40% trypan blue dye) และคำนวณจำนวนเซลล์ต่อปริมาตร

ตัวอย่างการคำนวณเซลล์

ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 chamber = 144 เซลล์

เนื่องจากเซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue dye เป็น 2 เท่า

ดังนั้น จำนวนเซลล์ใน 1 chamber = 144 x 2 เซลล์

(1 chamber = 5 ช่องเล็ก)

ปริมาตร 1 ช่องเล็ก = ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

= 0.10 cm x 0.10 cm x 0.01 cm

= 10^{-4} mL

ดังนั้นปริมาตรใน 5 ช่องเล็ก = 5 x 10^{-4} mL

251206 ธ.3

จำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก (5×10^{-4} mL) = 144 x 2 เซลล์

จำนวนเซลล์ใน 1 mL = 144 x 2 / 5×10^{-4} เซลล์

= 5.76×10^{5} เซลล์

ถ้าต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ปริมาณ = 5×10^{4} เซลล์/mL

Dilution number (D.N.) = $5.76 \times 10^{5} / 5 \times 10^{4}$

= 11.52 เท่า

นั่นคือ จะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 11.52 เท่า ดังนั้นจะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 10.52 mL จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้น 5×10^{4} เซลล์/mL

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบประมาณ 4 mg (ทราบน้ำหนักที่แน่นอน) ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติม DMSO 0.10 mL ละลายสารตัวอย่างให้หมด เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ในปริมาตร 4 mL

3. การเตรียมสารละลาย negative solvent control

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

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ

เติมสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 2 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี สารละลาย negative solvent control ให้ได้ความเข้มข้นของสารตามความต้องการ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 1 ตัวอย่างการเตรียมสารเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (µg/mL)	อาหารเลี้ยงเซลล์ (mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volume (mL)	DMSO %
0	3	0.00	1.00	1	5	0.50
30	3	0.15	0.85	1	5	0.50
50	3	0.25	0.75	1	5	0.50
100	3	0.50	0.50	1	5	0.50

5. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

นับจำนวนเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อและนำค่าที่ได้มาหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

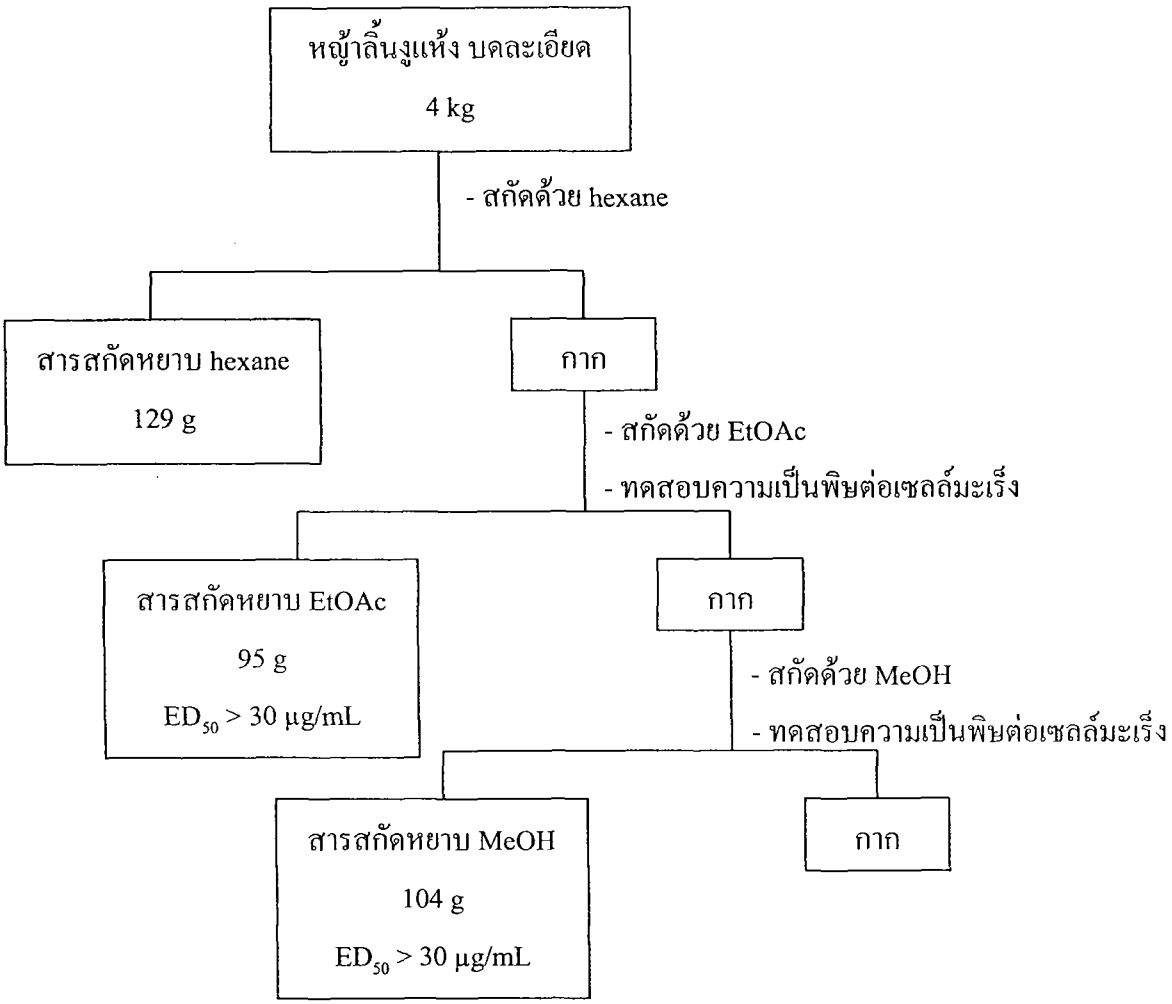
6. การหาค่า ED_{50} หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารตัวอย่าง (แกนนอน) บนกระดาษกราฟ จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่ง เป็นค่า ED_{50} มีหน่วยเป็น μg/mL

การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

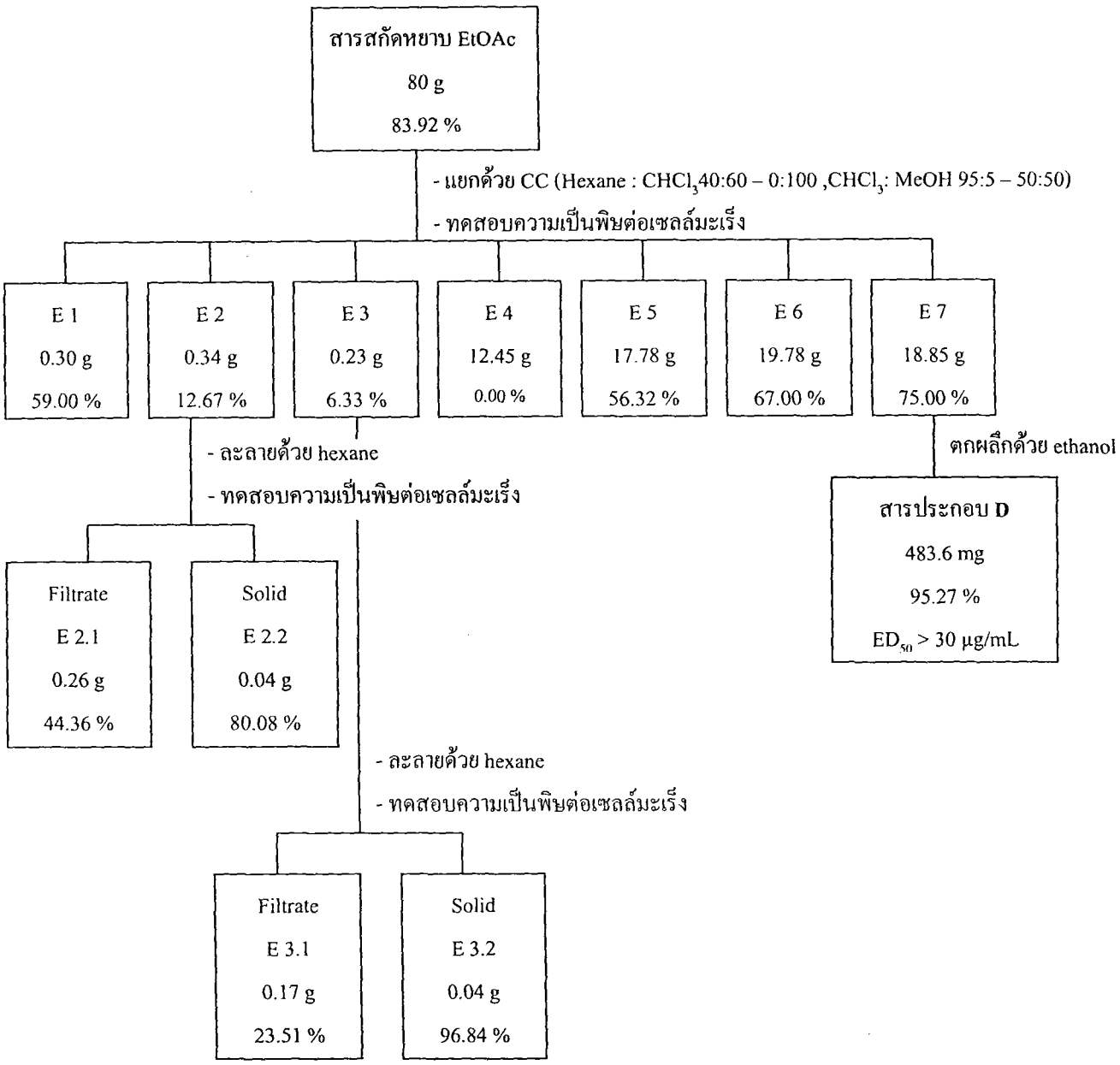
เครื่องมือ

1. Melting point Apparatus (Griffin)
2. Mass Spectrometer (Finnigan MAT 90)
3. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Advance 300, 300 MHz)
4. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT – IR Spectrum BX)

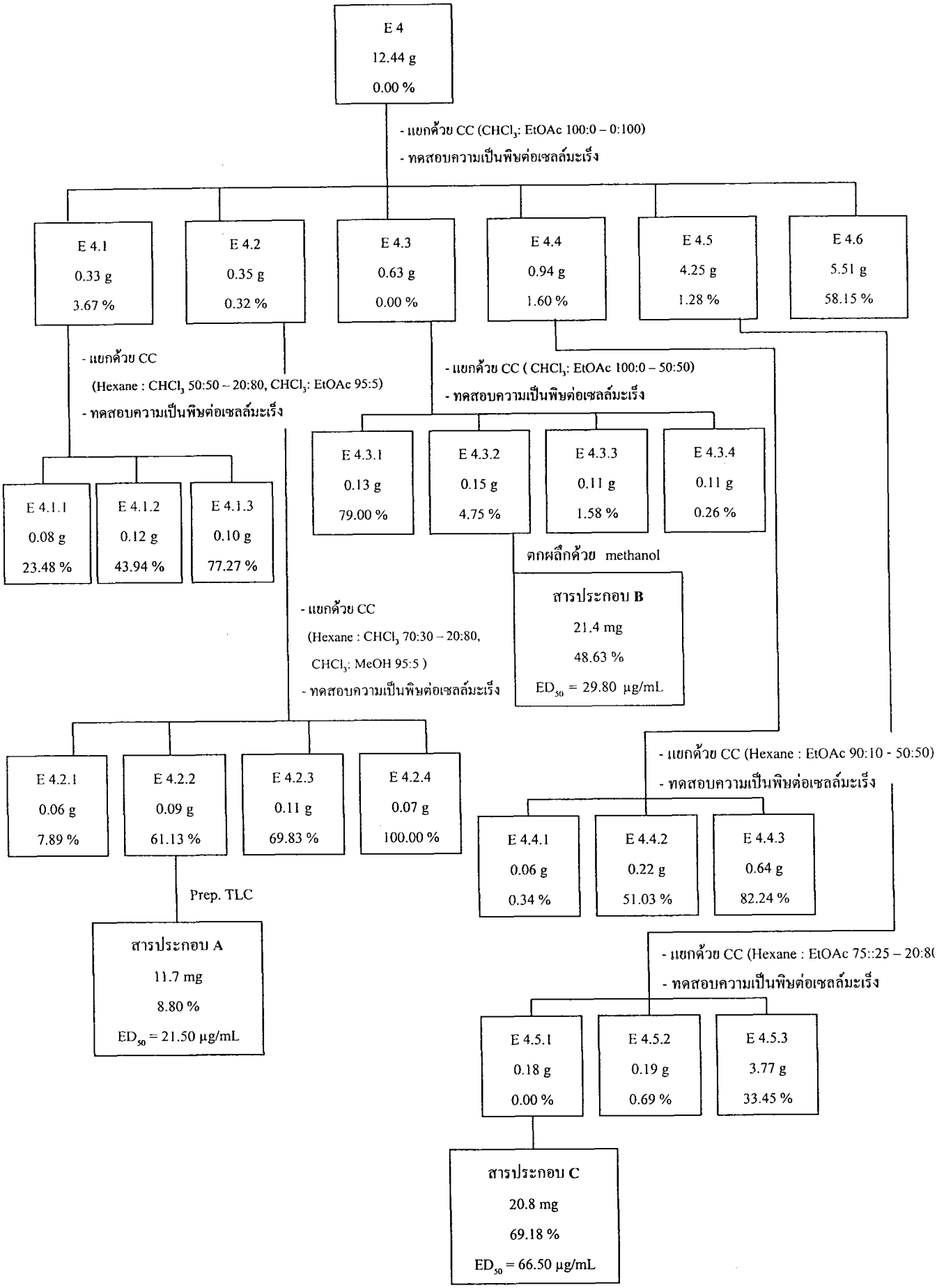
นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลว และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี โดย IR spectra แถบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (ν_{max}) รายงานในหน่วย reciprocal centimeter (cm^{-1}) NMR spectra รายงานค่า chemical shift ในหน่วย ppm ที่ down field จาก TMS ซึ่งใช้เป็น internal standard (δ 0.00) และ Mass spectra รายงานในหน่วย m/z



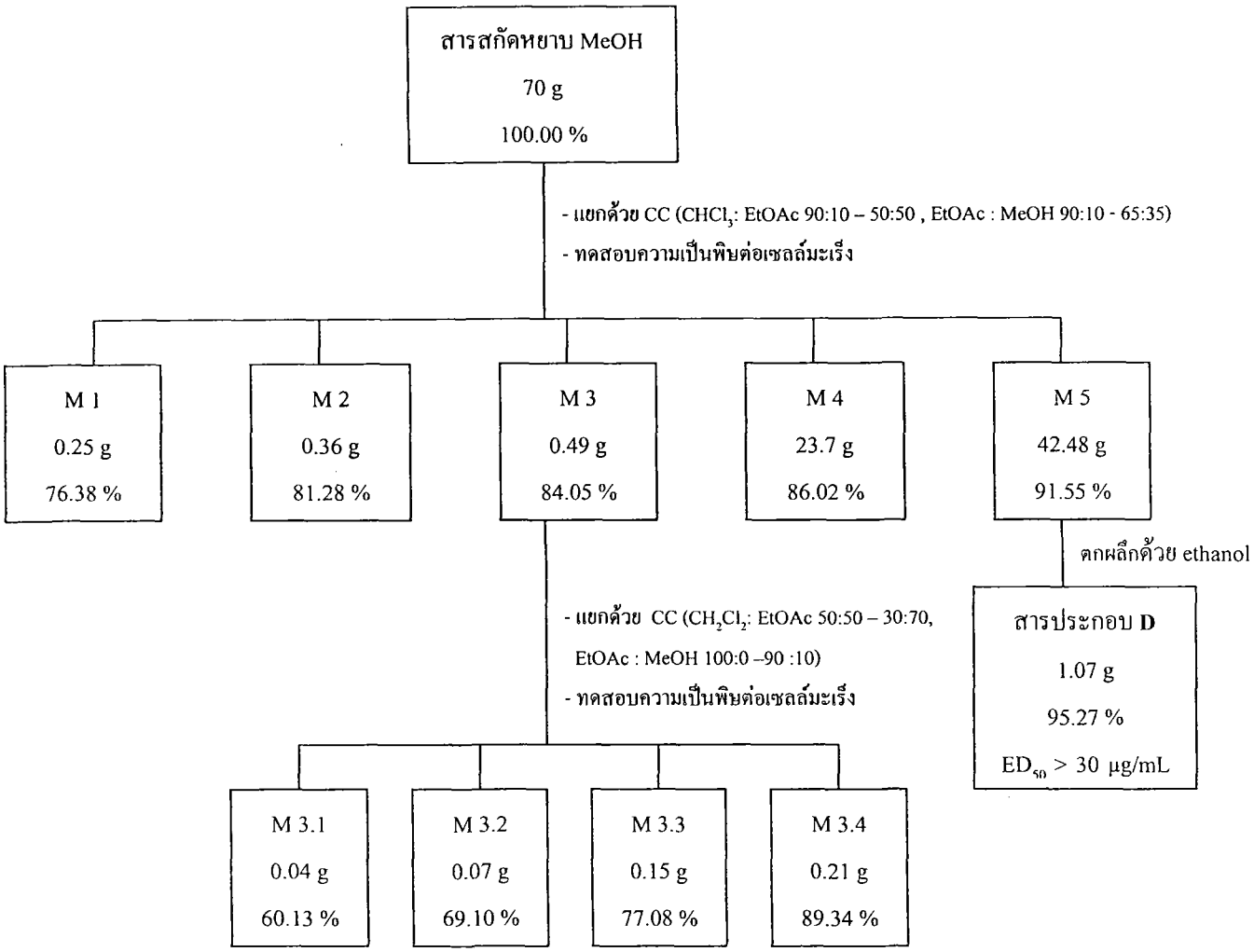
ภาพประกอบ 14 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู



ภาพประกอบ 15 แสดงขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบ EtOAc และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388



ภาพประกอบ 16 แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 4 และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388



ภาพประกอบ 17 แสดงขั้นตอนการแยกสารจากสารสกัดหยาบ MeOH และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู

สกัดหญ้าลิ้นงู 4 kg ได้สารสกัดหยาบ hexane หนัก 129 g สารสกัดหยาบ ethyl acetate หนัก 95 g และสารสกัดหยาบ methanol หนัก 104 g

2. ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate หนัก 80 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 10 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 1.30 kg) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ นำแต่ละส่วนรวมให้เป็นกลุ่มๆ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ได้สาร 7 กลุ่ม (ตาราง 2) นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารกลุ่ม E 2 E 3 และ E 4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 13) จึงนำมาแยกต่อ

ตาราง 2 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane : $CHCl_3$			
40 : 60	E 1	0.30	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
20 : 80	E 2	0.34	ของแข็งปนของเหลวสีเหลือง
0 : 100	E 3	0.23	ของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง
$CHCl_3$: MeOH			
95 : 5	E 4	12.45	สารเหนียวสีเขียว
90 : 10	E 5	17.78	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
80 : 20	E 6	19.78	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
50 : 50	E 7	18.85	ของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว

ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ได้ผลดังนี้

1) สารกลุ่ม E 2 มีลักษณะเป็นของแข็งปนของเหลวสีเหลือง นำมาละลายด้วย hexane ได้สาร

2 กลุ่ม นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 14) พบว่าสารกลุ่ม E 2.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างต่ำ เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 2.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำและสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ

2) สารกลุ่ม E 3 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง นำมาละลายด้วย hexane ได้สาร 2 กลุ่ม นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 15) พบว่าสารกลุ่ม E 3.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำและสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ

3) สารกลุ่ม E 4 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 7 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 400 g) ชะด้วย chloroform เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate ได้สาร 6 กลุ่ม (ตาราง 3) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 16

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม E 4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOAc			
100 : 0	E 4.1	0.33	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
95 : 5	E 4.2	0.35	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
90 : 10	E 4.3	0.63	สารเหนียวสีเขียว
80 : 20	E 4.4	0.94	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
40 : 60	E 4.5	4.25	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
0 : 100	E 4.6	5.51	สารเหนียวสีน้ำตาล

ผลการแยกสารกลุ่ม E 4 ได้ผลดังนี้

3.1 สารกลุ่ม E 4.1 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 30 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ ethyl acetate ตามลำดับ ได้สาร 3 กลุ่ม (ตาราง 4) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 17) สารกลุ่ม E 4.1.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 5 กลุ่มและสารมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารกลุ่มที่แยกได้จาก E 4.1 จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane : $CHCl_3$			
50 : 50	E 4.1.1	0.08	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
20 : 80	E 4.1.2	0.12	สารเหนียวสีเหลือง
$CHCl_3$: EtOAc			
95 : 5	E 4.1.3	0.10	สารเหนียวสีเหลือง

3.2 สารกลุ่ม E 4.2 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 2 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 35 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 5) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 18) พบสารกลุ่ม E 4.2.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่มและสารมีปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ ได้นำไปหาค่า ED_{50} ส่วนสารกลุ่ม E 4.2.2 มีลักษณะเป็นของแข็งปนของเหลวสีเหลือง จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง ได้ **สารประกอบ A** เป็นของแข็งสีขาว หนัก 11.70 mg

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane : $CHCl_3$			
70 : 30	E 4.2.1	0.06	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเขียว
40 : 60	E 4.2.2	0.09	ของแข็งปนของเหลวสีเหลือง
20 : 80	E 4.2.3	0.11	สารเหนียวสีเหลือง
$CHCl_3$: MeOH			
95 : 5	E 4.2.4	0.07	สารเหนียวสีน้ำตาล

3.3 สารกลุ่ม E 4.3 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 55 g) ชะด้วย chloroform เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 6) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 20) พบสารกลุ่ม E 4.3.2 E 4.3.3 และ E 4.3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารกลุ่ม E 4.3.3 เมื่อตรวจสอบด้วย

TLC พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ ได้นำไปหาค่า ED_{50} ส่วนสารกลุ่ม E 4.3.4 เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ ได้นำไปหาค่า ED_{50} ส่วนสารกลุ่ม E 4.3.2 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง นำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ **สารประกอบ B** เป็นของแข็งสีขาวหนัก 21.40 mg

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่มย่อย E 4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOAc			
100 : 0	E 4.3.1	0.13	สารเหนียวสีเหลือง
95 : 5	E 4.3.2	0.15	ของแข็งปนสารเหนียวสีเหลือง
80 : 20	E 4.3.3	0.11	สารเหนียวสีเขียว
50 : 50	E 4.3.4	0.11	สารเหนียวสีเขียวเข้ม

3.4 สารกลุ่ม E 4.4 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 70 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate ได้สาร 3 กลุ่ม (ตาราง 7) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 22) พบสารกลุ่ม E 4.4.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่มและสารมีปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ ได้นำไปหาค่า ED_{50}

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane : EtOAc			
90 : 10	E 4.4.1	0.06	สารเหนียวสีเหลือง
80 : 30	E 4.4.2	0.22	สารเหนียวสีเขียว
50 : 50	E 4.4.3	0.64	สารเหนียวสีเขียว

3.5 สารกลุ่ม E 4.5 นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 5 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 200 g) ชะด้วย hexane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate ได้สาร 3 กลุ่ม (ตาราง 8) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 23) พบสารกลุ่ม E 4.5.1

และ E 4.5.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น เนื่องจากสารกลุ่ม E 4.5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารสีเขียว นำมาล้างด้วย hexane ได้ **สารประกอบ C** เป็นผลึกรูปเข็ม หนัก 20.80 mg ส่วนสารกลุ่ม E 4.5.2 เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ ได้นำไปหาค่า ED_{50}

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม E 4.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มสาร	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
Hexane : EtOAc			
75 : 25	E 4.5.1	0.18	ของแข็งปนสารสีเขียว
50 : 50	E 4.5.2	0.19	สารเหนียวสีเขียว
20 : 80	E 4.5.3	3.77	สารเหนียวหนืดสีเขียว

4) สารกลุ่ม E 7 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว จึงนำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้ **สารประกอบ D** เป็นของแข็งไม่มีสี หนัก 483.60 mg

2.2 ผลการแยกสารสกัด methanol และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ methanol หนัก 70 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 10 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 1.00 kg) ชะด้วย chloroform เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ นำแต่ละส่วนรวมให้เป็นกลุ่มๆ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 9) นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารทั้ง 5 กลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 28)

ตาราง 9 ผลการแยกสารสกัด methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOAc			
90 : 10	M 1	0.25	สารเหนียวสีเหลือง
70 : 30	M 2	0.36	สารเหนียวสีเหลือง
50 : 50	M 3	0.49	ของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว
EtOAc : MeOH			
90 : 10	M 4	23.70	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
65 : 35	M 5	42.48	ของแข็งปนสารเหนียวสีน้ำตาล

สารกลุ่ม M3 และ M 5 มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาแยกต่อ

1) สารกลุ่ม M 3 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ขนาด 3 cm บรรจุซิลิกาเจล (ขนาด 0.063 – 0.200 mm จำนวน 50 g) ชะด้วย dichloromethane เพิ่มความมีขั้วด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 10) และนำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 29) จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม M 3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ระบบตัวชะ	กลุ่มย่อย	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH_2Cl_2 : EtOAc			
50 : 50	M 3.1	0.04	สารเหนียวสีเหลือง
30 : 70	M 3.2	0.07	สารเหนียวสีเขียว
EtOAc : MeOH			
100 : 0	M 3.3	0.15	สารเหนียวสีน้ำตาล
90 : 10	M 3.4	0.21	สารเหนียวสีน้ำตาล

2) สารกลุ่ม M 5 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีน้ำตาล นำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้ **สารประกอบ D** เป็นของแข็งสีขาว หนัก 1.07 g

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

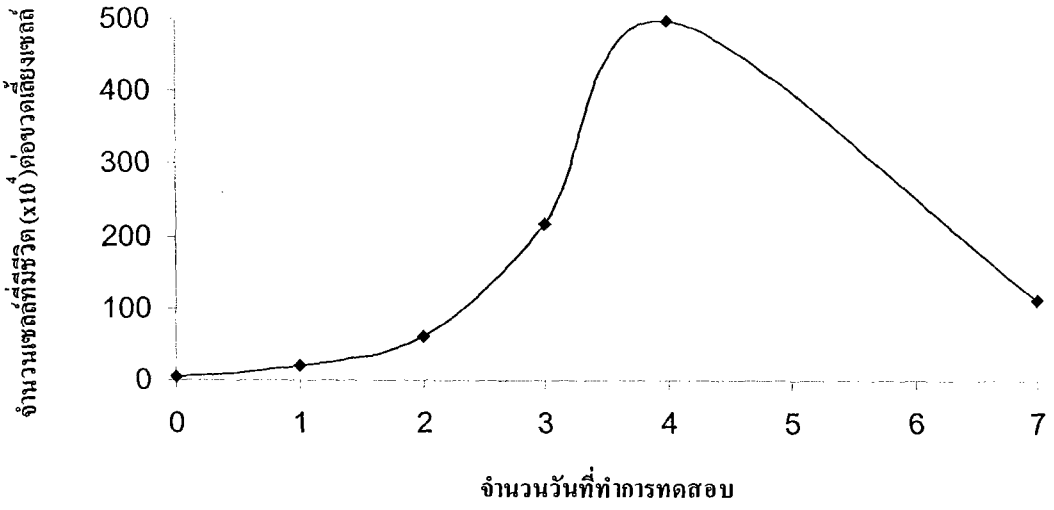
3.1 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์มานับบน haemacytometer โดยนับเซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์ที่ไม่ติดสีย้อม trypan blue) เมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ผลที่ได้ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	5.2×10^4	5.2×10^4	5.2×10^4
1	2.0×10^5	2.0×10^5	2.0×10^5
2	6.0×10^5	6.0×10^5	6.0×10^5
3	2.16×10^6	2.12×10^6	2.14×10^6
4	4.98×10^6	4.92×10^6	4.95×10^6
7	1.12×10^6	1.32×10^6	1.22×10^6

นำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกน y) กับวันที่ทำการทดสอบ (แกน x) ผลดังแสดงในภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

จากกราฟพบว่า เซลล์มะเร็ง P-388 เจริญเติบโตดีในช่วง 4 วันแรกที่ทำการทดลอง โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นวันที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด ดังนั้นการคำนวณหาร้อยละการเจริญเติบโต ถือว่าจำนวนเซลล์ในวันที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม

ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกากำหนดว่า สารสกัดหยาบจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB เมื่อค่า $ED_{50} \leq 30$ µg/mL และสารบริสุทธิ์ค่า $ED_{50} \leq 4$ µg/mL ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 จึงใช้ $ED_{50} = 30$ µg/mL (Geran, et al. 1972 : 17)

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethyl acetate และ methanol

นำสารสกัด ethyl acetate และ methanol มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL 60 µg/mL และ 100 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.12×10^6	100.00
สารสกัด EtOAc	30	5.00×10^4	9.40×10^5	83.92
	60	5.00×10^4	9.24×10^5	82.50
	100	5.00×10^4	7.68×10^5	68.57
สารสกัด MeOH	30	5.00×10^4	1.16×10^6	100.00
	60	5.00×10^4	1.13×10^6	99.07
	100	5.00×10^4	9.32×10^5	83.21

จากตารางแสดงว่าสารสกัด ethyl acetate และ methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ED_{50} มากกว่า 30 µg/mL)

3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate

3.3.1 นำสาร 7 กลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 1 ถึง E 7 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.20×10^6	100.00
E 1	5.00×10^4	7.12×10^5	59.00
E 2	5.00×10^4	1.52×10^5	12.67
E 3	5.00×10^4	7.60×10^4	6.33
E 4	5.00×10^4	0	0.00
E 5	5.00×10^4	6.76×10^5	56.32
E 6	5.00×10^4	8.04×10^5	67.00
E 7	5.00×10^4	9.00×10^5	75.00

3.3.2 จากตาราง 13 พบว่าสารกลุ่ม E 2 E 3 และ E 4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงนำมาแยกต่อ โดยนำสารกลุ่ม E 2 มาละลายด้วย hexane ได้สาร 2 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 2.1 และ E 2.2 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.10×10^6	100.00
E 2.1	5.00×10^4	4.88×10^5	44.36
E 2.2	5.00×10^4	8.92×10^5	80.80

จากตาราง 14 พบว่าสารกลุ่ม E 2.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างต่ำ เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 2.2 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ

3.3.3 สารกลุ่ม E 3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและมีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำมาละลายด้วย hexane ได้สาร 2 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 15

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 3.1 และ E 3.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.14×10^6	100.00
E 3.1	5.00×10^4	2.68×10^5	23.51
E 3.2	5.00×10^4	1.10×10^6	96.84

จากตาราง 15 พบว่าสารกลุ่ม E 3.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 3.2 ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารมีปริมาณน้อย (0.04 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ

3.3.4 นำสารกลุ่ม E 4 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 6 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 16

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.1 ถึง E 4.6 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.25×10^6	100.00
E 4.1	5.00×10^4	4.80×10^4	3.67
E 4.2	5.00×10^4	4.00×10^3	0.32
E 4.3	5.00×10^4	0	0.00
E 4.4	5.00×10^4	2×10^4	1.60
E 4.5	5.00×10^4	1.60×10^4	1.28
E 4.6	5.00×10^4	7.28×10^5	58.15

จากตาราง 16 สารกลุ่ม E 4.1 E 4.2 E 4.3 E 4.4 และ E 4.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงนำมาแยกต่อ

3.3.5 นำสารกลุ่ม E 4.1 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 3 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 17

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.1.1ถึง E 4.1.3 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.06×10^6	100.00
E 4.1.1	5.00×10^4	2.48×10^5	23.48
E 4.1.2	5.00×10^4	4.65×10^5	43.94
E 4.1.3	5.00×10^4	8.16×10^5	77.27

จากตาราง 17 พบว่า สารกลุ่ม E 4.1.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 5 กลุ่มและสารมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับสารกลุ่มที่แยกได้จาก E 4.1 จึงไม่นำมาแยกต่อ

3.3.6 นำสารกลุ่ม E 4.2 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 4 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.2.1 ถึง E 4.2.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

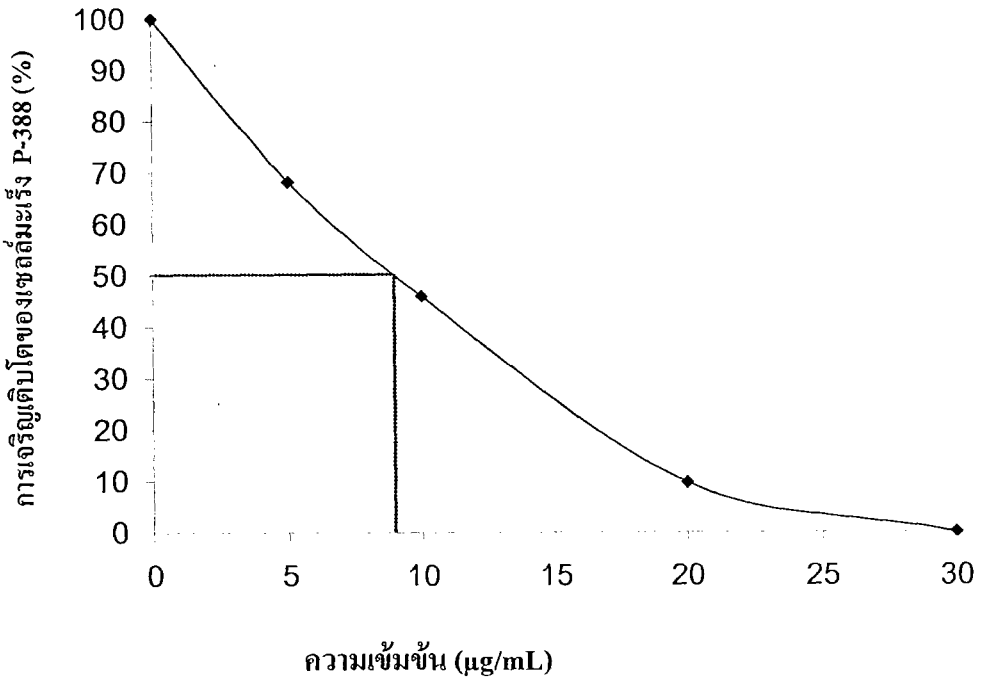
สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	9.88×10^5	100.00
E 4.2.1	5.00×10^4	8.00×10^4	7.89
E 4.2.2	5.00×10^4	6.04×10^5	61.13
E 4.2.3	5.00×10^4	6.88×10^5	69.83
E 4.2.4	5.00×10^4	1.02×10^6	100.00

จากตาราง 18 พบว่าพบสารกลุ่ม E 4.2.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่มและสารมีปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 μg/mL ดังแสดงในตาราง 19 และภาพประกอบ 19

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.2.1

ความเข้มข้น (μg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.17×10^6	100.00
5	5.00×10^4	7.96×10^5	67.98
10	5.00×10^4	5.36×10^5	45.89
20	5.00×10^4	1.12×10^5	9.59
30	5.00×10^4	4.00×10^3	0.17

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 จะได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.2.1

3.3.7 นำสารกลุ่ม E 4.3 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 4 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 20

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.3.1 ถึง E 4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

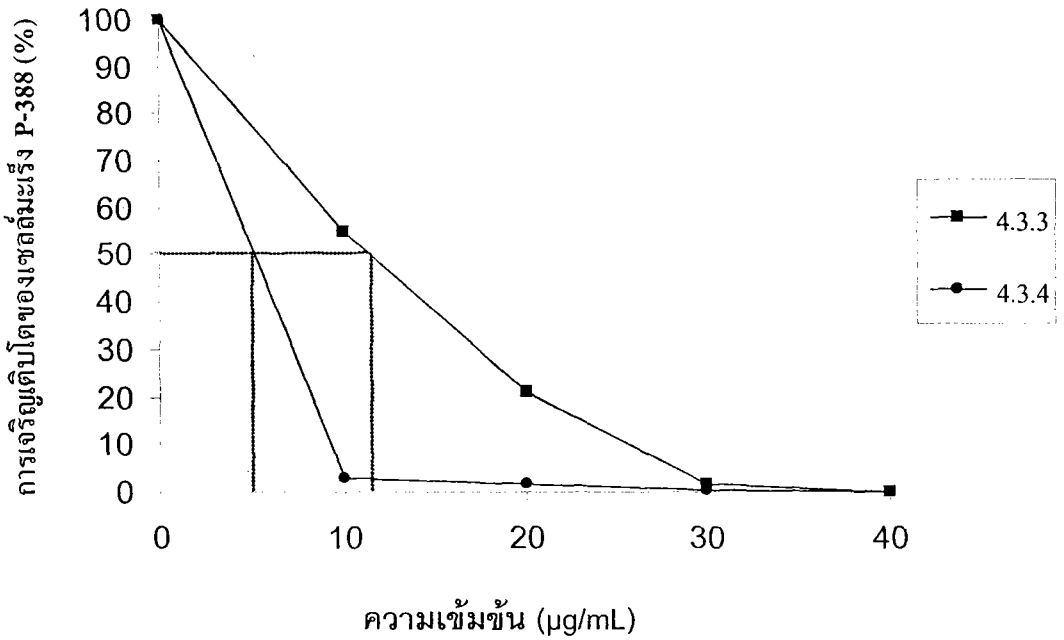
สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.52×10^6	100.00
E 4.3.1	5.00×10^4	1.02×10^6	79.00
E 4.3.2	5.00×10^4	8.00×10^5	52.63
E 4.3.3	5.00×10^4	2.40×10^4	1.58
E 4.3.4	5.00×10^4	4.00×10^3	0.26

จากตาราง 20 พบว่า พบสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารกลุ่ม E 4.3.3 เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E 4.3.4 เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารหลายกลุ่มจึงไม่นำมาแยกต่อ เมื่อนำสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 11.50 และ 5.50 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 21 และภาพประกอบ 20

ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.31×10^6	100.00
สารกลุ่ม E 4.3.3	10	5.00×10^4	7.16×10^5	54.74
	20	5.00×10^4	2.76×10^5	21.10
	30	5.00×10^4	2.40×10^4	1.58
	40	5.00×10^4	0.00	0.00
สารกลุ่ม E 4.3.4	10	5.00×10^4	4.00×10^4	3.06
	20	5.00×10^4	2.00×10^4	1.53
	30	5.00×10^4	4.00×10^3	0.26
	40	5.00×10^4	0.00	0.00

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นกับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 จะได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.3.3 และ E 4.3.4

3.3.8 นำสารกลุ่ม E 4.4 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 3 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 22

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.4.1 ถึง E 4.4.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.16×10^6	100.00
E 4.4.1	5.00×10^4	4.00×10^3	0.34
E 4.4.2	5.00×10^4	5.92×10^5	51.03
E 4.4.3	5.00×10^4	9.56×10^5	82.24

จากตาราง 22 พบว่า สารกลุ่ม E 4.4.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 4 กลุ่มและสารปริมาณน้อย (0.06 g) จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 12.00 µg/mL ดังแสดงในตาราง 24 และภาพประกอบ 21

3.3.9 นำสารกลุ่ม E 4.5 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 3 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 23

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.5.1 ถึง E 4.5.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

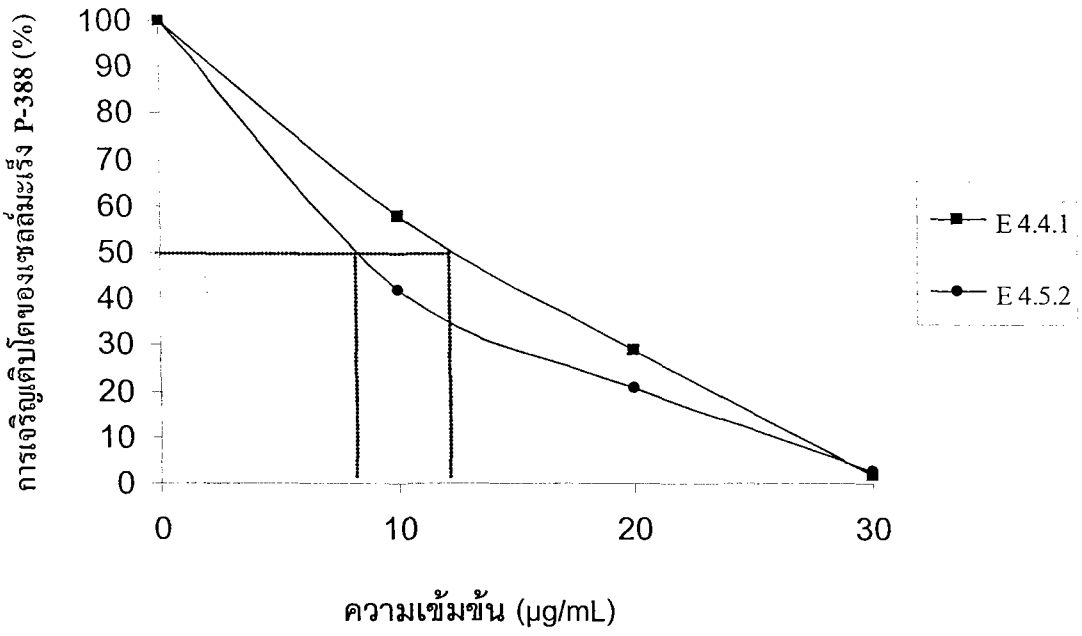
สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.16×10^6	100.00
E 4.5.1	5.00×10^4	0.00	0.00
E 4.5.2	5.00×10^4	8.00×10^3	0.69
E 4.5.3	5.00×10^4	3.88×10^5	33.45

จากตาราง 23 พบว่า สารกลุ่ม E 4.5.1 และ E 4.5.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยสารกลุ่ม E 4.5.1 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารสีเขียว จึงนำมาล้างด้วย hexane ได้ **สารประกอบ C** ส่วนสารกลุ่ม E 4.5.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อตรวจสอบด้วย TLC พบสารอย่างน้อย 6 กลุ่ม จึงไม่นำมาแยกต่อ นำไปทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 8.50 µg/mL ดังแสดงในตาราง 24 และภาพประกอบ 21

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม E 4.4.1 และ E 4.5.2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.47×10^6	100.00
สารกลุ่ม E 4.4.1	10	5.00×10^4	8.52×10^5	57.88
	20	5.00×10^4	4.28×10^5	29.07
	30	5.00×10^4	2.80×10^4	1.90
สารกลุ่ม E 4.5.2	10	5.00×10^4	6.16×10^5	41.84
	20	5.00×10^4	3.04×10^5	20.68
	30	5.00×10^4	4.00×10^4	2.72

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 จะได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 21



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 4.4.1 และ E 4.5.2

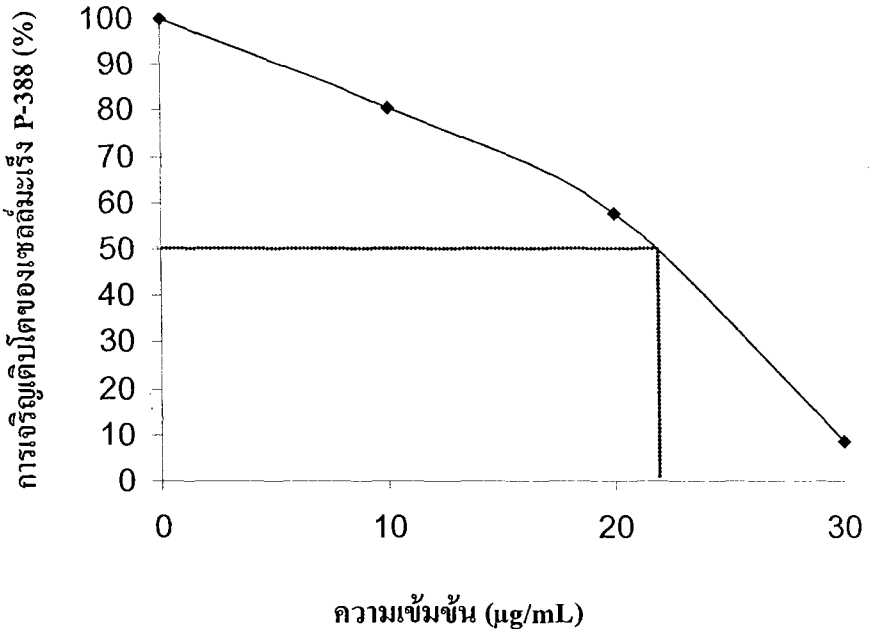
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

3.4.1 นำสารประกอบ Aไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 21.50 µg/mL ดังแสดงในตาราง 25 และภาพประกอบ 22

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.00×10^6	100.00
สารประกอบ A	10	5.00×10^4	7.92×10^5	80.80
	20	5.00×10^4	5.64×10^5	57.60
	30	5.00×10^4	8.80×10^4	8.80

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 จะได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 22



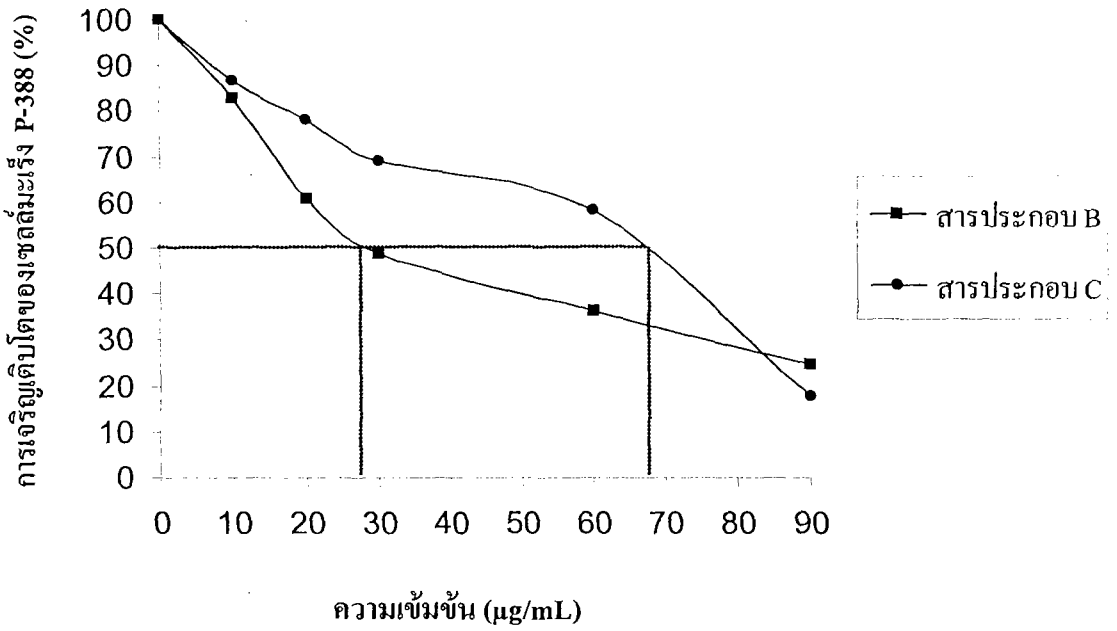
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ A

3.4.2 นำสารประกอบ B และ C ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} ของสารประกอบ B และ C เท่ากับ 29.80 และ 66.50 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 26 และภาพประกอบ 23

ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ B และ C ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.17×10^6	100.00
สารประกอบ B	10	5.00×10^4	9.68×10^5	82.88
	20	5.00×10^4	7.12×10^5	60.96
	30	5.00×10^4	5.68×10^5	48.63
	60	5.00×10^4	4.24×10^5	36.30
	90	5.00×10^4	2.88×10^5	24.66
สารประกอบ C	10	5.00×10^4	1.01×10^6	86.64
	20	5.00×10^4	9.12×10^5	78.08
	30	5.00×10^4	8.08×10^5	69.18
	60	5.00×10^4	6.80×10^5	58.22
	90	5.00×10^4	2.04×10^5	17.47

เมื่อเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 จะได้กราฟดังแสดงในภาพประกอบ 23



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ B และ C

3.4.3 นำสารประกอบ Dไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า ED_{50} ได้ค่า ED_{50} ของสารประกอบ D มีค่า มากกว่า 30 µg/mL ดังแสดงในตาราง 27

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ D ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	1.02×10^6	100.00
สารประกอบ D	30	5.00×10^4	9.68×10^5	95.27
	60	5.00×10^4	9.52×10^5	93.70
	90	5.00×10^4	9.08×10^5	89.37

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol

3.5.1 นำสาร 5 กลุ่มที่แยกได้จากสารสกัด methanol มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 28

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม M 1 ถึง M 5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.30×10^6	100.00
M 1	5.00×10^4	9.96×10^5	76.38
M 2	5.00×10^4	1.06×10^6	81.28
M 3	5.00×10^4	1.10×10^6	84.05
M 4	5.00×10^4	1.12×10^6	86.02
M 5	5.00×10^4	1.19×10^6	91.55

จากตาราง 28 พบว่า สารแต่ละกลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เนื่องจากสารกลุ่ม M 3 มีลักษณะเป็นของแข็งปนสารเหนียวสีเขียว จึงนำมาแยกต่อด้วยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 4 กลุ่ม นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 29

ตาราง 29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม M 3.1 ถึง M 3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	1.20×10^6	100.00
M 3.1	5.00×10^4	4.16×10^6	60.13
M 3.2	5.00×10^4	7.24×10^5	69.10
M 3.3	5.00×10^4	9.28×10^5	77.08
M 3.4	5.00×10^4	1.07×10^6	89.34

จากตาราง 29 พบว่า สารแต่ละกลุ่มไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงไม่นำมาแยกต่อ

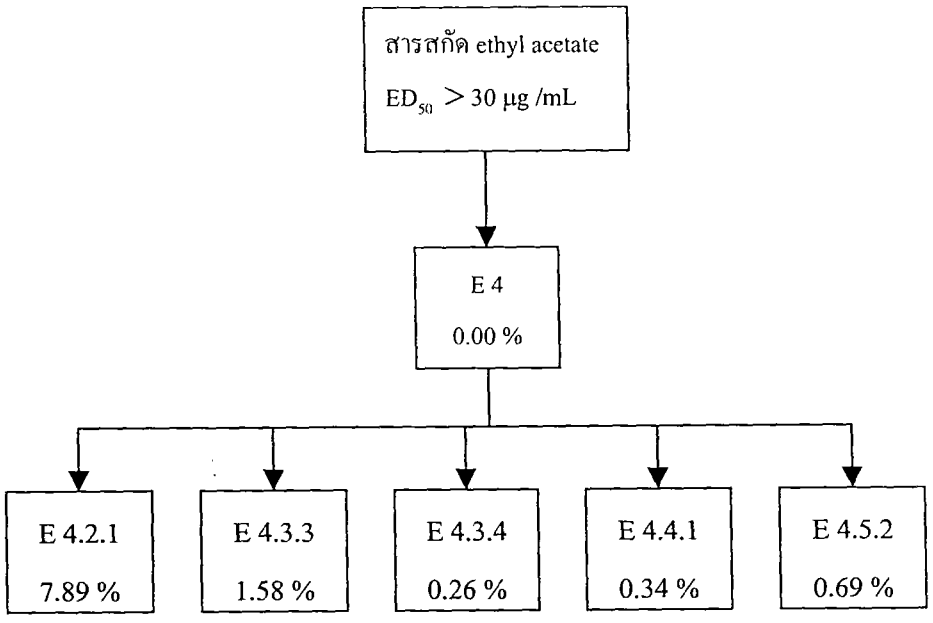
ตาราง 30 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 และค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)	ED_{50} (µg/mL)	สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)	ED_{50} (µg/mL)
สารสกัด EtOAc	83.92	> 30	E 4.1.3	77.27	> 30
E 1	59.00	> 30	E 4.2.1	7.89	9.00*
E 2	12.67	< 30	E 4.2.2	61.13	> 30
E 3	6.33	< 30	E 4.2.3	69.83	> 30
E 4	0.00	< 30	E 4.2.4	103.64	> 30
E 5	56.32	> 30	E 4.3.1	79.00	> 30
E 6	67.00	> 30	E 4.3.2	4.75	< 30
E 7	75.00	> 30	E 4.3.3	1.58	5.50*
E 2.1	44.36	> 30	E 4.3.4	0.26	11.50*
E 2.2	80.80	> 30	E 4.4.1	0.34	12.00*
E 3.1	23.51	< 30	E 4.4.2	51.03	> 30
E 3.2	96.84	> 30	E 4.4.3	82.24	> 30
E 4.1	3.67	< 30	E 4.5.1	0.00	< 30
E 4.2	0.32	< 30	E 4.5.2	0.69	8.50*
E 4.3	0.00	< 30	E 4.5.3	33.45	< 30
E 4.4	1.60	< 30	สาร A	8.80	21.50*
E 4.5	1.28	< 30	สาร B	48.63	29.80*
E 4.6	58.15	> 30	สาร C	69.18	66.50*
E 4.1.1	23.48	< 30	สาร D	95.27	> 30
E 4.1.2	43.94	< 30			

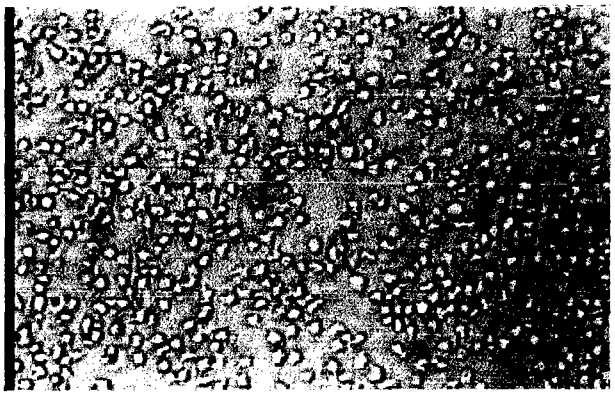
* หาค่า ED_{50} เฉพาะสารบริสุทธิ์และสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่ไม่สามารถนำมาแยกให้บริสุทธิ์

ตาราง 31 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 และค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

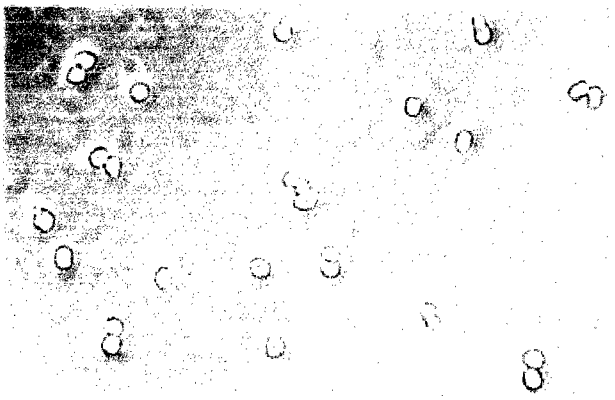
สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)	ED_{50} (µg/mL)	สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)	ED_{50} (µg/mL)
สารสกัด MeOH	103.57	> 30	M 3.1	60.13	> 30
M 1	76.38	> 30	M 3.2	69.10	> 30
M 2	81.28	> 30	M 3.3	77.08	> 30
M 3	84.05	> 30	M 3.4	89.34	> 30
M 4	86.02	> 30	สาร D	95.27	> 30
M 5	91.55	> 30			



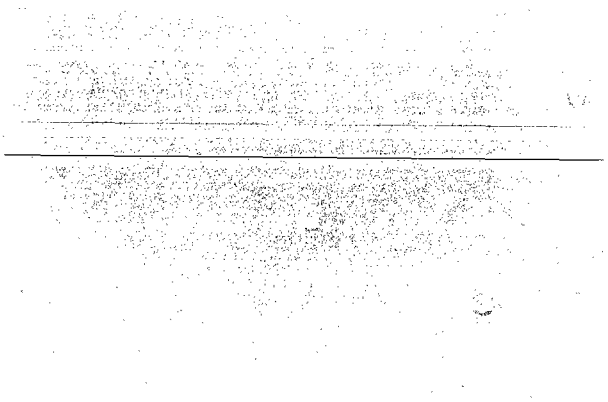
ภาพประกอบ 24 แสดงร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง



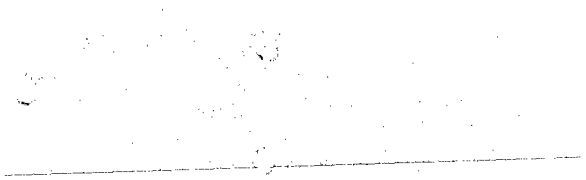
ภาพประกอบ 25 แสดง negative control ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ในวันที่ 4 (x100)



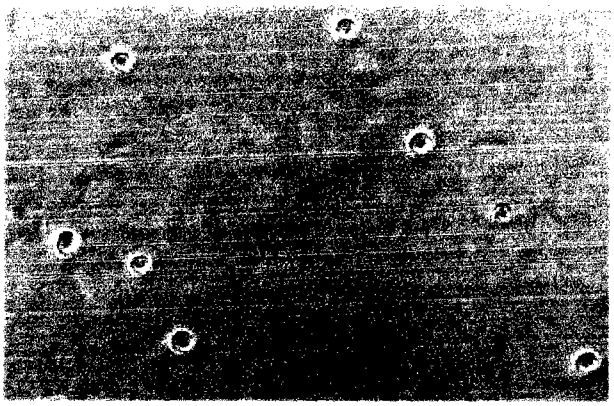
ภาพประกอบ 26 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.2.1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



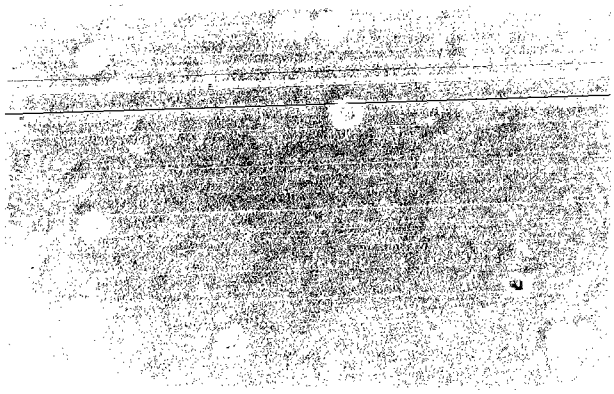
ภาพประกอบ 27 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



ภาพประกอบ 28 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL



ภาพประกอบ 29 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.4.1 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL



ภาพประกอบ 30 แสดงผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม E 4.5.2 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

ข้อมูลทางกายภาพและสเปกโทรสโกปีของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีได้ข้อมูลดังนี้

สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 11.70 mg

จุดหลอมเหลว 156-158 °C ค่า R_f = 0.64 (silica gel GF_{254} ; hexane : ethyl acetate 70 : 30)

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

3422 (OH) 2959 (CH) 1458 (CH_2) 1383 (CH_3)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ) :

5.15 (1H,br s, H-7) 4.95-5.15 (2H, m, H-22 และ H-23) 3.50-3.65 (1H, m, H-3) 1.03 (3H, d, H-21, J = 6.49 Hz) 0.82 (6H, d, H-26 และ H-27, J = 5.96 Hz) 0.80 (3H, t, H-29, J = 6.93 Hz) 0.78 (3H, s, H-19) 0.53 (3H, s, H-18)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, δ) : ตาราง 32

สารประกอบ B เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 21.40 mg

จุดหลอมเหลว 298-300 °C ค่า R_F = 0.53 (silica gel GF_{254} ; hexane : ethyl acetate 75 : 25)

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

3300-2600 (OH) 2861 (CH) 1734 (C=O ของ ester) 1687 (C=Oของ carboxyl) 1242 (C-O)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ) :

5.50 (1H, dd, H-15, J = 2.95, 7.58 Hz) 4.45 (1H, t, H-3, J = 7.82 Hz) 2.02 (3H, s, $COOCH_3$) 1.23 (3H, s, H-26) 0.93 (3H, s, H-27) 0.90 (3H, s, H-30) 0.86 (3H, s, H-24) 0.83 (3H, s, H-23)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, δ) : ตาราง 33

EIMS m/z (% relative intensit) : ภาพประกอบ 31

329 (10) 269(15) 234 (55) 189 (100)

สารประกอบ C เป็นผลึกรูปเข็ม น้ำหนัก 20.80 mg

จุดหลอมเหลว 154-156 °C ค่า R_F = 0.53 (silica gel GF_{254} ; chloroform : methanol 50 : 50)

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

3238-2596 (OH ของหมู่ carboxyl) 1654 (C=O) 1295 (C-O)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, δ) :

10.40 (1H, s, COOH) 7.92 (1H, d, H-6, J = 7.77 Hz) 7.53 (1H, t, H-4, J = 8.20, 7.44 Hz) 7.01 (1H, d, H-3, J = 8.20 Hz) 6.93 (1H, t, H-5, J = 7.77, 7.44 Hz)

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, δ) : ตาราง 34

174.27 (CO) 162.22 (C-2) 136.96 (C-4) 130.90 (C-6) 119.57 (C-5) 117.83 (C-3) 111.20 (C-1)

EI MS m/z (% relative intensity) :

138 (32) 120 (100) 92 (94) 63 (41)

สารประกอบ D เป็นผลึกไม่มีสี น้ำหนัก 1.55 g

จุดหลอมเหลว 139-141 °C ค่า R_F = 0.50 (silica gel GF_{254} ; chloroform : methanol 60 : 40)

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

3411-3241 (OH) 2935 2879 (CH) 1104 (C-O)

^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz, δ) :

4.85 (3H, br s, OH-2, OH-3 และ OH-4) 4.45 (1H, t, OH-6, J = 5.41 Hz) 3.68 (1H, dd, H-1b, J = 10.86, 5.26 Hz) 3.55-3.62 (1H, m, H-6b) 3.30-3.35 (1H, m, H-6a) 3.10-3.28 (1H, m, H-2) 3.00-3.09 (1H, m, H-3) 2.90-3.00 (3H, m, H-1a, H-4, H-5)

^{13}C-NMR (DMSO-d_6, 75 MHz, δ) : ตาราง 35

81.98 (C-5) 78.89 (C-3) 70.75 (C-4) 70.30 (C-2) 69.93 (C-1) 61.89 (C-6)

กลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารกลุ่ม E 4.2.1 เป็นสารคล้ายขี้ผึ้งสีเขียว จากข้อมูล FT IR มีหมู่ hydroxyl และ carbonyl ดังแสดงในภาพประกอบ 36

สารกลุ่ม E 4.3.3 เป็นสารเหนียวสีเขียว จากข้อมูล FT IR มีหมู่ hydroxyl และ carbonyl ดังแสดงในภาพประกอบ 37

สารกลุ่ม E 4.3.4 เป็นสารเหนียวสีเขียวเข้ม จากข้อมูล FT IR มีหมู่ hydroxyl และ carbonyl ดังแสดงในภาพประกอบ 38

สารกลุ่ม E 4.4.1 เป็นสารเหนียวสีเหลือง จากข้อมูล FT IR มีหมู่ hydroxyl และ carbonyl ดังแสดงในภาพประกอบ 39

สารกลุ่ม E 4.5.2 เป็นสารเหนียวสีเขียว จากข้อมูล FT IR มีหมู่ hydroxyl และ carbonyl ดังแสดงในภาพประกอบ 40

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

เมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู โดยนำมาสกัดด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ และนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารสกัด ethyl acetate แยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด สารผสม 1 ชนิด และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 กลุ่ม ส่วนสารสกัด methanol แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีได้ข้อมูลดังนี้

สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 11.70 mg จุดหลอมเหลว 156-158 °C ค่า R_f = 0.64 (silica gel GF_{254} ; hexane : ethyl acetate 70 : 30)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3422 cm^{-1} (OH สั่นแบบยืด) 2959 cm^{-1} (C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3) 1458 และ 1383 cm^{-1} (C-H สั่นแบบงอของ CH_2 และ CH_3 ตามลำดับ)

^{1}H-NMR spectrum แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.53 มีลักษณะเป็น singlet เป็นของ H-18 ที่ δ 0.80 มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 6.93 Hz เป็นของ H-29 ที่ δ 0.78 มีลักษณะเป็น singlet เป็นของ H-19 ที่ δ 0.82 มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 5.96 Hz เป็นของ H-26 และ H-27 ที่ δ 1.03 มีลักษณะเป็น doublet มีค่า J เท่ากับ 6.49 Hz เป็นของ H-21 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.03-2.00 เป็นของหมู่ CH_2 11 หมู่ และหมู่ CH 7 หมู่ สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.50-3.65 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.15 มีลักษณะเป็น broad singlet เป็นของ H-7 และสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.95-5.15 ลักษณะเป็น multiplet เป็นของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 ของ chondrillasterol

^{13}C-NMR spectrum พบ สัญญาณเรโซแนนซ์ 33 พีค เป็นของคาร์บอน 33 คาร์บอนในโมเลกุล จาก DEPT 135 และ DEPT 90 spectra ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ CH_2 11 หมู่ CH 13 หมู่ และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon 3 หมู่ ดังตาราง 32

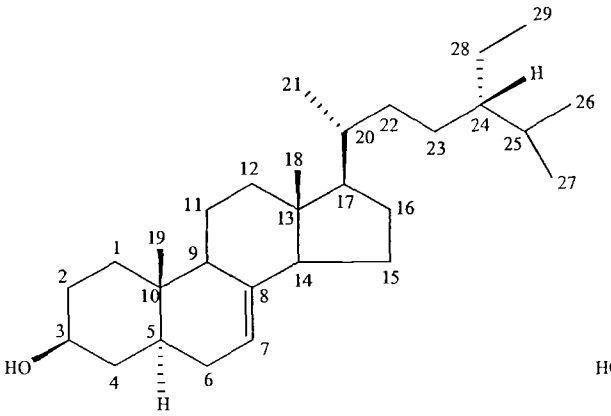
ตาราง 32 แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A

ตำแหน่ง	δ_c	DEPT 90	DEPT 135	ประเภทของคาร์บอน
1	37.14		37.14	CH_2
2	27.96		27.96	CH_2
3	71.06	71.06	71.06	CH
4	33.89		33.89	CH_2
5	40.26	40.26	40.26	CH
6	29.64		29.64	CH_2
7	117.45	117.45	117.45	CH
8	139.56			C
9	49.45	49.45	49.45	CH
10	34.21			C
11	21.54		21.54	CH_2
12	39.56		39.56	CH_2
13	43.38			C
14	55.04	55.04	55.04	CH
15	23.01		23.01	CH_2
16	28.49		28.49	CH_2
17	56.09	56.09	56.09	CH
18	12.04		12.04	CH_3
19	13.03		13.03	CH_3
20	36.58	36.58	36.58	CH
21	21.07		21.07	CH_3
22*	33.89		33.89	CH_2
22**	138.16	138.16	138.16	CH
23*	26.20		26.20	CH_2
23**	129.44	129.44	129.44	CH
24*	45.84	45.84	45.84	CH
24**	51.24	51.24	51.24	CH
25*	29.16	29.16	29.16	CH
25**	31.86	31.86	31.86	CH
26	18.98		18.98	CH_3
27	21.36		21.36	CH_3
28	23.06		23.06	CH_2
29	12.23		12.23	CH_3

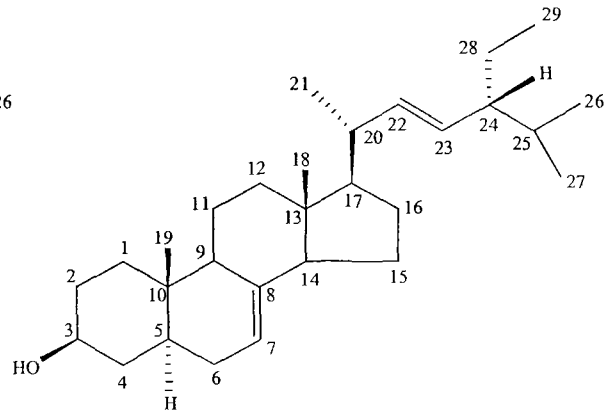
หมายเหตุ * พันธะระหว่าง C-C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น $-CH_2-CH_2-$

** พันธะระหว่าง C-C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น -CH = CH-

จากการเปรียบเทียบข้อมูล IR, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสารประกอบ A กับ 22,23-dihydrochondrillasterol (Itoh, et al. 1981 : 761-764; Uomori, et al. 1992 : 3861-3864) และ chondrillasterol (Gard& Nes. 1984 : 2919-2923; Wright. 1981 : 2403-2405) สรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ สารผสมระหว่าง 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol โดยดูจาก intregration ของสัญญาณ olefinic proton ที่ δ 5.15 ซึ่งเป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-7 ของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol และที่ δ 4.95-5.15 ซึ่งเป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 ของ chondrillasterol และที่ δ 0.53 ซึ่งเป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ตำแหน่ง 18 ของ chondrillasterol และ 22,23-dihydrochondrillasterol จาก ^{13}C-NMR spectrum สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ 138.16 และ 129.44 เป็นสัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-22 และ C-23 ของ chondrillasterol สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 31



22,23 - dihydrochondrillasterol



chondrillasterol

ภาพประกอบ 31 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A

จากการรายงานพบสาร 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol จากเมล็ดของ *Benincasa cerifera, Cucumis salivus, Cucurbita maxima* (Toshihiro, et al. 1986 : 39-47) และ จากรากของ *Trichosanthes japonica* (Itoh, et al. 1982 : 727-730)

สารประกอบ B เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 21.40 mg จุดหลอมเหลว 298-300 °C (3-*O*-acetyl aleuritolic acid mp. 298-300°C Torrance, Wiedhopf & Cole. 1992 :1348); (3-*O*-acetyl aleuritolic acid mp. 302-303 °C Maciel, et al. 1998 : 827) R_F = 0.53 (silica gel GF_{254} ; hexane : ethyl acetate 75 : 25)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ 3400-2500 cm^{-1} เป็น (หมู่ OH ของหมู่ -COOH) 2936 และ 2861 cm^{-1} (C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3) 1734 cm^{-1} (C=O ของ ester) 1687 cm^{-1} (C=O ของ carboxyl) และที่ 1242 cm^{-1} (C-O สั่นแบบยืด)

^{1}H-NMR spectrum แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.50 มีลักษณะเป็น doublet of doublet มีค่า J เท่ากับ 2.95 และ 7.58 Hz เป็นของ olefinic proton ที่ตำแหน่ง 15 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.45 มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J เท่ากับ 7.82 Hz เป็นของ H-3 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.02 มีลักษณะเป็น singlet ของหมู่ acetate methyl (-$COOCH_3$) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์มีลักษณะเป็น singlet ของหมู่ CH_3 5 หมู่ ที่ δ 1.23 0.93 0.90 0.86 และ 0.83 เป็นของตำแหน่ง 26 27 30 24 และ 23 ตามลำดับ

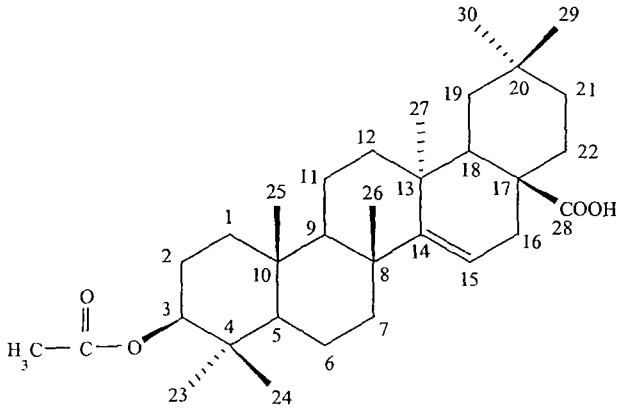
^{13}C-NMR spectrum แสดง สัญญาณเรโซแนนซ์ 32 พีค เป็นของคาร์บอน 32 คาร์บอนในโมเลกุล จาก DEPT 135 และ DEPT 90 spectra ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 8 หมู่ CH_2 10 หมู่ CH 5 หมู่ ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon มี 9 หมู่ เป็นของหมู่ carboxyl 2 หมู่ ดังตาราง 33

ตาราง 33 แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัม ของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	δ_C	DEPT 90	DEPT 135	ประเภทของคาร์บอน
1	37.31		37.31	CH_2
2	23.45		23.45	CH_2
3	80.88	80.88	80.88	CH
4	37.66			C
5	55.56	55.56	55.56	CH
6	18.70		18.70	CH_2
7	40.75		40.75	CH_2
8	39.02			C
9	49.05	49.05	49.05	CH
10	37.91			C
11	17.29		17.29	CH_2
12	33.65		33.65	CH_2
13	37.37			C
14	160.54		116.82	C
15	116.82	116.82	31.30	CH
16	31.30			CH_2
17	51.45		41.39	C
18	41.39	41.39	35.32	CH
19	35.32			CH_2
20	29.29			C
21	33.31		33.31	CH_2
22	30.70		30.70	CH_2
23	27.94		27.94	CH_3
24	16.57		16.57	CH_3
25	15.62		15.62	CH_3
26	26.15		26.15	CH_3
27	22.46		22.46	CH_3
28	184.11			C=O
29	31.86		31.86	CH_3
30	28.63		28.63	CH_3
C=O(ของ -$COOCH_3$)	171.01			C=O
CH_3(ของ -$COOCH_3$)	21.29		21.29	CH_3

EI MS spectrum ของสารประกอบ B แสดงสัญญาณ m/z (% relative intensity) 329 (10) $[M^+-C_9H_{14}O_2-CH_3]$ 269 (15) $[M^+-C_9H_{14}O_2-CH_3-COOH]$ 234 (55) $[M^+-C_{17}H_{28}O_2]$ 189 (100) $[M^+-C_{17}H_{28}O_2-COOH]$ จากพีคที่ m/z 189 และ 234 แสดงว่ามีการแตกพันธะระหว่าง $C_{11} - C_{12}$ และพันธะระหว่าง $C_8 - C_{14}$ นอกจากนี้ยังมีการแตกแบบ retro Diels-Alders ที่ ring D สังเกตที่ m/z 344 มีการแตกพันธะแสดงว่าที่ C_{14} และ C_{15} เป็นพันธะคู่ ทำให้ได้พีคที่ m/z 329 และ 269 (Woo and Wagner, 1977 : 1845-1846) (ภาพประกอบ 33)

จากข้อมูลของสารประกอบ B เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 3-*O*-acetyl aleuritolic acid (Addae-Mensah, et al. 1992 : 2057); (Torrance, Wiedhopf & Cole, 1992 : 1348); (Maciel, et al. 1998 : 827) สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ 3-*O*-acetyl aleuritolic acid ซึ่งเป็นครั้งแรกที่แยกได้จาก *Hedyotis corymbosa* Lamk. สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 32

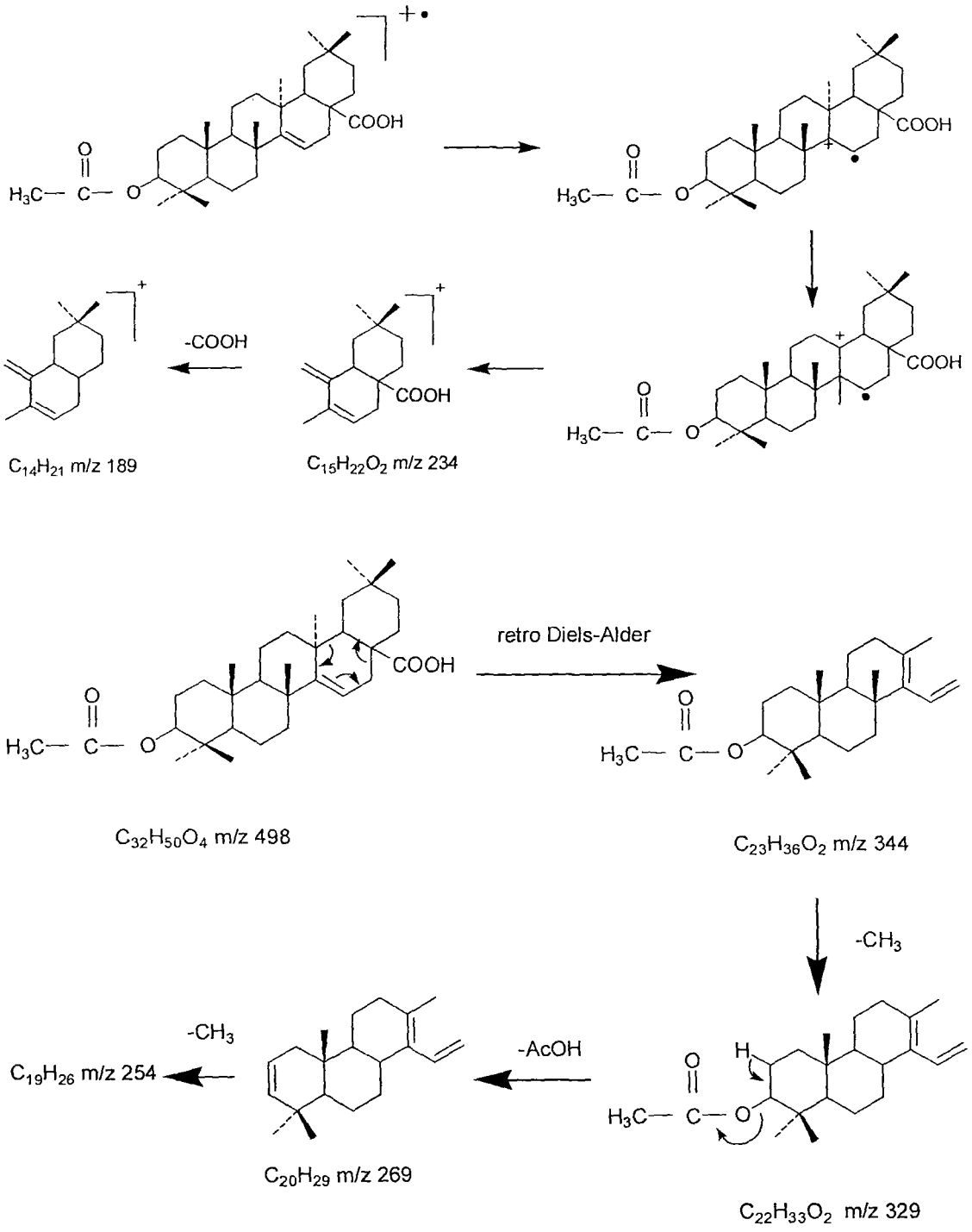


3-*O*-acetyl aleuritolic acid

ภาพประกอบ 32 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B

3-*O*-acetyl aleuritolic acid เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของ *Maprounea quianensis* (Mclean, et al. 1987 : 2519-2524) *Croton megalocarpus* (Addae-Mensah, et al. 1992 : 2055-2058) *Croton Cajucara* (Maciel, et al. 1998 : 823-828) และจากรากของ *Jatropha macrorhiza* (Torrance, Wiedhopf & Cole, 1992 : 1348)

นอกจากนี้ยังพบว่า 3- *O*-acetyl aleuritolic acid เป็นสารที่แยกได้จากเปลือกของ *Croton urucurana* Baillon ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhimurium* พบว่ามีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.1 mg/mL (Peres, et al. 1997 : 223-226) และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในกระเพาะอาหารของหนูพบว่า มีฤทธิ์ที่ความเข้มข้น 50 µg/kg. (Maciel, et al. 2000 : 41-55)



ภาพประกอบ 33 การแตกพันธะของสารประกอบ B

สารประกอบ C เป็นผลึกรูปเข็ม น้ำหนัก 20.80 mg จุดหลอมเหลว 154-156 °C (salicylic acid mp. 158-160 °C, Aldrich, 2003-2004 : 185) ค่า R_F = 0.53 (silica gel GF_{254} ; chloroform : methanol 50 : 50)

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ที่ 3238 –2596 cm^{-1} (OH สั่นแบบยืดของ OH ของหมู่ carboxyl) ที่ 1654 cm^{-1} (C=O) และที่ 1295 cm^{-1} (C-O สั่นแบบยืด)

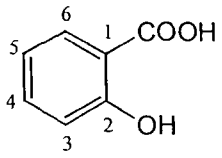
^{1}H-NMR spectrum แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 10.40 มีลักษณะเป็น singlet เป็นของหมู่ OH ของหมู่ carboxyl และมี 4โปรตอนที่แสดงการแทนที่แบบ ortho ของวงเบนซีนที่ δ 7.92 ลักษณะเป็น doublet มีค่า J = 7.77 Hz เป็นของ H-6 ที่ δ 7.53 ลักษณะเป็น triplet มีค่า J = 8.20 และ 7.44 Hz เป็นของ H-4 ที่ δ 7.01 ลักษณะเป็น doublet มีค่า J = 8.20 Hz เป็นของ H-3 และที่ δ 6.93 ลักษณะเป็น triplet มีค่า J = 7.77 และ 7.44 Hz เป็นของ H-5

^{13}C-NMR spectrum แสดง สัญญาณเรโซแนนซ์ 7 พีค เป็นของคาร์บอน 7 คาร์บอนในโมเลกุล จาก DEPT 135 และ DEPT 90 spectra ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH 4 หมู่ ที่ δ 136.96 (C-4) 130.90 (C-6) 119.57 (C-5) 117.83 (C-3) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon 3 หมู่ ที่ δ 174.27 (CO) 162.22 (C-2) และ 111.20 (C-1) ดังตาราง 34

ตาราง 34 แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัม ของสารประกอบ C

ตำแหน่ง	δ_C	DEPT 90	DEPT 135	ประเภทของคาร์บอน
1	111.20			C
2	162.22			C
3	117.83	117.83	117.83	CH
4	136.96	136.96	136.96	CH
5	119.57	119.57	119.57	CH
6	130.90	130.90	130.90	CH
C=O	174.27			COOH

จากข้อมูล FTIR, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสารประกอบ C เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ *O*- hydroxybenzoic acid (salicylic acid) (chem.esustan.edu, 2003 : online) สรุปได้ว่าสารประกอบ C คือ *O*- hydroxybenzoic acid (salicylic acid) สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 34



salicylic acid

ภาพประกอบ 34 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ C

จากการรายงานพบสาร salicylic acid แยกได้จาก *Sauromatum guttatum* และ*Gaultheria procumbens* ซึ่งสารนี้จะปล่อยออกมาในช่วงผสมเกสรของพืช (Harborne J.B., 1995 :462) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรียที่อยู่ใต้ผิวหนัง รักษาสิว ช่วยชลอการเหี่ยวย่นของผิวหนัง และ salicylic acid ยังนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ aspirin ซึ่งนำมาใช้เป็นยาระงับอาการปวดศีรษะ (chem.esustan.edu, 2003 : online)

สารประกอบ D เป็นผลึกไม่มีสี น้ำหนัก 1.55 g จุดหลอมเหลวเท่ากับ 139-141 °C (1,5-anhydroglucitol mp. 142-143 °C, Ham, Cooper & Ohtake, 1992 : 31) ค่า R_F = 0.50 (silica gel GF_{254} ; chloroform : methanol 60 : 40)

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3411-3241 cm^{-1} (OH สั่นแบบยืด) ที่ 2935 และ 2879 cm^{-1} (C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3) และ 1104 cm^{-1} (C-O สั่นแบบยืด)

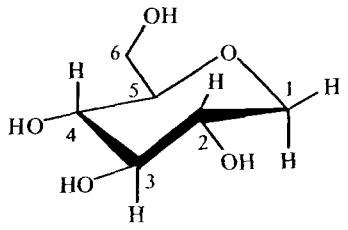
^{1}H-NMR spectrum แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.85 มีลักษณะเป็น broad triplet เป็นของหมู่ OH 3 หมู่ที่ตำแหน่ง 2 3 และ 4 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 4.45 มีลักษณะเป็น triplet มีค่า J = 5.41 Hz เป็นของหมู่ OH ที่ตำแหน่ง 6 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.90-3.00 เป็นของ H-1a, H-4, H-5 ที่ δ 3.68 มีลักษณะเป็น doublet of doublet มีค่า J = 10.86 และ 5.26 Hz เป็นของ H-1b สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.55-3.62 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ H-6b ที่ δ 3.30-3.35 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ H-6a ที่ δ 3.10-3.28 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ H-2 และที่ 3.00-3.09 มีลักษณะเป็น multiplet เป็นของ H-3

^{13}C-NMR spectrum แสดง สัญญาณเรโซแนนซ์ 6 พีค เป็นของคาร์บอน 6 คาร์บอนในโมเลกุล จาก DEPT 135 และ DEPT 90 spectra ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH 4 หมู่ ที่ δ 70.30 (C-2) 78.89 (C-3) 70.75 (C-4) 81.98 (C-5) และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 2 หมู่ ที่ δ 69.93 (C-1) และ 61.89 (C-6) ดังตาราง 35

ตาราง 35 แสดงข้อมูล ^{13}C-NMR และ DEPT NMR สเปกตรัม ของสารประกอบ D

ตำแหน่ง	δ_C	DEPT 90	DEPT 135	ประเภทของคาร์บอน
1	69.93		69.93	CH_2
2	70.30	70.30	70.30	CH
3	78.89	78.89	78.89	CH
4	70.75	70.75	70.75	CH
5	81.98	81.98	81.98	CH
6	61.89		61.89	CH_2

จากการเปรียบเทียบข้อมูล IR, ^{1}H NMR, ^{13}C-NMR ของสารประกอบ D กับ 1,5-anhydroglucitol (Shiga, et al. 1996 : 173-179); (Kametani, et al. 1996 : 180-185) สรุปได้ว่า สารประกอบ D คือ 1,5-anhydroglucitol สูตรโครงสร้างของสารแสดงในภาพประกอบ 35



1,5-anhydroglucitol

ภาพประกอบ 35 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ D

จากการรายงานพบสาร 1,5-anhydroglucitol แยกได้จากใบของ *Acerginnala Maxim.* (Bock, et al. 1980 : 2033) และจากวงศ์ *polygara* (Shiga, et al. 1996 : 173-179) นอกจากนี้สาร 1,5-anhydroglucitol ใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการควบคุมน้ำตาลในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน (Suzuki, et al. 1996 : 23-29)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

เมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดลองเป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์และนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้

กล้องจุลทรรศน์ นำผลการนับเซลล์ที่มีชีวิตมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แล้วนำมาหาค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ผลการทดลองเป็นดังนี้

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethyl acetate และ methanol

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ethyl acetate และ methanol พบว่า ED_{50} ของสารสกัด ethyl acetate และ methanol มีค่า มากกว่า 30 μg / mL (ตาราง 30 และ 31) แสดงว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกาซึ่งกำหนดว่าสารสกัดหยาบจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เมื่อค่า $ED_{50} \leq 30$ μg / mL

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate

เมื่อนำสารสกัด ethyl acetate มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ สามารถแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 5 กลุ่มคือ E4.2.1 E4.3.3 E4.3.4 E4.4.1 และ E4.5.2 หนัก 0.06 0.11 0.11 0.06 และ 0.19 g ตามลำดับ สารผสม 1 ชนิด คือ 22,23 – dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol หนัก 11.70 mg และสารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ salicylic acid 3-*O*-acetyl aleuritolic acid และ 1,5-anhydroglucitol มีน้ำหนัก 20.80 21.40 และ 483.60 mg ตามลำดับ

เมื่อนำสารกลุ่ม E4.2.1 E4.3.3 E4.3.4 E4.4.1 และ E4.5.2 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 5.50 11.50 12.00 และ 8.50 μg / mL ตามลำดับ (ตาราง 19 21 และ 24 ภาพประกอบ 19-21) แสดงว่าสารที่แยกได้ทั้ง 5 กลุ่มดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา เมื่อนำสารดังกล่าวมาตรวจสอบด้วย TLC พบว่าประกอบด้วยสารหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ

สารผสม 22,23 - dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol และสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ salicylic acid 3-*O*-acetylaleuritolic acid และ 1,5- anhydroglucitol เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ 21.50 66.50 29.80 และมากกว่า 30 μg / mL ตามลำดับ (ตาราง 25-27 ภาพประกอบ 22-23) แสดงว่าสารทั้ง 4 กลุ่มดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา และจากการศึกษาค้นคว้าพบว่า salicylic acid มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ phenolsulphotransferase ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง (Harris, et al. 1998 : 272) นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาลดไข้ บรรเทาอาการปวด ต้านการอักเสบและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อราใต้ผิวหนัง (chem.esustan.edu, 2003 : online) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวสามารถช่วยลดอาการแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งได้ ส่วน 3-*O*-acetylaleuritolic acid สามารถใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ซึ่งก่อให้เกิดโรคผิวหนัง โรคติดเชื้อในกระแสเลือด การอักเสบเป็นหนอง และเกิดการติดเชื้อในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง นอกจากนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ซึ่งก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด (Peres, et al. 1997 : 223-226) ดังนั้นจึงสามารถนำสารดังกล่าวมาใช้ในการป้องกันอาการแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคติดเชื้อและช่วยยืดอายุของคนไข้

ที่เป็นโรคมะเร็ง นอกจากนี้ 1,5- anhydroglucitol สามารถกระตุ้นการทำงานของ β-cell ให้หลั่งฮอร์โมนอินซูลินทำให้คนที่เป็นโรคมะเร็งตับอ่อน มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งเป็นการลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวาน (Yamanouchi, et al. 2003 : 82) ดังนั้น 1,5- anhydroglucitol สามารถช่วยป้องกันไม่ให้คนที่เป็นโรคมะเร็งตับอ่อนมีภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานในอนาคต

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol

เมื่อนำสารสกัด methanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol มีน้ำหนัก 1.07 g เป็นสารที่พบแล้วในสารสกัด ethyl acetate

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดหยาบ ethyl acetate และ methanol พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (มากกว่า 30 $\mu g/mL$) แสดงว่าสารสกัดหยาบประกอบด้วยกลุ่มสารหลายกลุ่มทั้งความเป็นพิษและไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ได้แก่ E4.2.1 E4.3.3 E4.3.4 E4.4.1 และ E4.5.2 ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา แสดงว่าเมื่อแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น เนื่องจากได้มีการกำจัดสารที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งออกไป ส่วนสารกลุ่ม E 2 และ E 3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา เมื่อแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้น พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา ดังนั้นการแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารอาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารหลายชนิด

จากการศึกษาตำรับยาสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งซึ่งมีหญ้าลิ้นงูเป็นส่วนประกอบ พบว่าสามารถใช้รักษาโรคมะเร็งได้หลายชนิด อาทิเช่น มะเร็งปอด มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเต้านม เป็นต้น และจากผลการวิจัยที่ผ่านมาได้สกัดและแยกสารจากหญ้าลิ้นงู พบว่าสามารถแยกกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ 3 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 $\mu g/mL$ ตามลำดับ (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544) ส่วนผลการวิจัยในครั้งนี้ พบว่าสามารถแยกกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากหญ้าลิ้นงูได้ 5 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 5.50 11.50 12.00 และ 8.50 $\mu g/mL$ ตามลำดับ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ได้แก่ 3-*O*-acetyl aleuritolic acid salicylic acid และ 1,5-anhydroglucitol มีคุณสมบัติช่วยลดอาการแทรกซ้อนซึ่งเกิดจากโรคมะเร็ง ดังนั้นสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้สนับสนุนการรักษาโรคมะเร็งในระดับคลินิก เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้เครื่องมือและเทคนิคในการแยกสารที่มีประสิทธิภาพ เช่น HPLC เพื่อให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

2. จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด ethyl acetate พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 5 กลุ่ม ซึ่งควรนำมาศึกษาเพื่อแยกสารบริสุทธิ์และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ

3. ควรนำสารที่แยกได้มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น เช่น เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งเต้านม เป็นต้น

4. ควรนำสารที่แยกได้มาศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น ๆ เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ความสามารถในการต้านเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). "การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)" ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.

ดรุณ เพ็ชรพลาย, ณ ฉัตรา จันทร์สุวาณิชย์ และ ชาตรี ชาญประเสริฐ. (2538). *พืชสมุนไพรในประเทศไทย ตอนที่ 1.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพืชพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ – ชื่อพื้นเมือง).* กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับลิชชิ่ง.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2531). *พจนานุกรมสมุนไพรไทย.* กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

วินัย สุขราช. (2544). "การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)" ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.

วีณา จิรัจฉริยากูล. (2542, เมษายน). "สารต้านมะเร็งจากหญ้าปักกิ่ง," *จุลสารข้อมูลสมุนไพร.* 16(3) : 10.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). *ร่วมอนุรักษ์มรดกไทย สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย.* กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

สวนสมุนไพร วัดอุโมงค์ สวนพุทธธรรม. (2530). *สมุนไพรฉบับแนะนำ ป้องกัน รักษาโรคต่างๆ.* กรุงเทพฯ : จักรกาญจน์.

อนันต์ คงชุม. (2544). "การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell. Arg.)" ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อัดสำเนา.

เอมอร โสมนะพันธุ์. (2534). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ.* วีณา จิรัจฉริยากูล. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Addae-Mensah, I. et al. (1992, October). "Epoxychiromdine and other Constituents of *Croton megalocanous*," *Phytochemistry.* 31(6) : 2055-2058.

Ahmad, R. et al. (2002). "An Anthraquinone Glycoside from *Hedyotis capitellata*," in International Conference & Exhibition on Pure and Applied Chemistry. p. 155. Bangkok : Thailand.

Bock, K. et al. (1980, January). "The Structure of Acertannin," *Phytochemistry.* 19 : 2033.

Charles J. Pouchert. (2003-2004). "*The Aldrich Library of NMR spectra. (Vol. 2).* Wisconsin : Aldrich Chemical Co.

Ham, J.B. Cooper, C.M. & Ohtake, Y. (1992). "Dictionary of Organic Compound 4th ed." Great Britain : University Press, Cambridge.

Hamzah, A. S. et al. (1997, August). "New Anthraquinones from the Roots of *Hedyotis dichotoma*," *J. Nat. Prod.* 60 (1) : 36-37.

Hamzah, A. S., and Lajis, N.H. (1998). (online) "Chemical Constituents of *Hedyotis herbacea*," http:// www. arbec. com. mylpdf/may-2. pdf.

Harborne, J.B. (1995). "*Phytochemical Dictionary (A Handbook of Bioactive Compounds from Plants).*" Washington : Taylor & Francis.

Harris, R.M. et al. (1998, February). "Inhibition of Phenolsulphotransferase by Salicylic acid : a Possible Mechanism by Which Aspirin may Reduce Carcinogenesis," *Gut.* 42(2) : 272.

Hirazumi A & Furusawa E. (1999). "An Immunomodulatory Polysaccharide-rich Substance from the Juice of *Morinda citrifolia* (noni) Antitumor Activity," *Phytother Res.* 13(5) :380.

Hsu, H.Y. et al. (1997, October). "Comparisons of Geniposidic Acid and Geniposide on Antitumor and Radioprotection after Sublethal Irradiation," *Cancer Lett.* 113 : 31-37.

----------. (1997, August). " Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid on Inhibiting Tumor Growth and Enhancing the Recovery of Hematopoietic System Postirradiation in Mice," *Cancer Lett.* 111 : 7-13.

Garg, V.K. & Nes, W.R. (1984, May). "Studies on the C-24 Configuration of Δ^7-Sterols in the Seeds of *Cucurbita Maxima*," *Phytochemistry.* 23(12) : 2919-2923.

Geran, I. et al. (1972, May). "Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems," *Cancer Chemother. Res.* 3 : 7-17.

Henry, K. (2003). (online). "Acetylation of Salicylic acid Preparation of Aspirin," http : // www. chem. esustan. edu.

Itoh, T. et al. (1981, June). "Co-Occurrence of Chondrillasterol and Spinasterol in Two Cucurbitaceae seeds as shown by ^{13}C NMR," *Phytochemistry.* 20(4) : 761-764.

----------. (1982). " Sterols from *Trichosanthes japonica*," *Phytochemistry.* 15 : 727-730.

Jork, H. et al. (1990). "*Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*," Germany : Voh-Verlag.

Kametani, S. et al. (1996). "NMR of all-carbon-13 sugar : An application in Development of an Analytical method for a Novel natural sugar 1,5-anhydrofructose," *J. Biochem.* 119 : 180-185.

Kim, Y. et al. (2001, June). "Neuroprotective Constituents from *Hedyotis diffusa*," *J. Nat. Prod.* 64(1) : 75-78.

Konishi, M. et al. (1998, November). "Triterpenoid saponins from *Hedyotis nudicaulis*," *Phytochemistry.* 48(3) : 525-528.

Long, L.Q. et al. (2001). "Chemical components of roots of *Hedyotis capitellata* Wall," (9) : 9-11.

Lu, C. M. et al. (1999, July). "A New Acylated Flavonol Glycoside and Antioxidant Effects of *Hedyotis diffusa*," *Planta Med.* 66 : 374-376.

Maciel, M.A. (1998, December). "Terpenoids from *Croton cajucara*," *Phytochemistry.* 49(3) : 823-828.

Maciel, M.A.M. et al. (2000, December). "Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology : a Successful Combination in the Study of *Croton cajucara*," *Phytochemistry.* 70 : 41-55.

Mclean, S. et al. (1987, March). "Unambiguous structural and Nuclear magnetic resonance Spectral characterization of Two Triterpenoids of *Maprounea guianensis* by Two-Dimensional Nuclear magnetic resonance Spectroscopy," *Can. J. chem.* 65 : 2519-2524.

Mimaki, Y. et al. (2001, July). "Flavonol Glycosides and Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum nocturnum* L. and Their Cytotoxicity ," *J. Nat. Prod.* 64(1) : 17-22.

Min, B.S. et al. (2000). "Triterpenes from the Spores of *Ganoderma lucidum* and Their Cytotoxicity Against Meth-A and LLC Tumor Cell," *Chem. Pharm. Bull.* 48(17) : 1026.

Na Bangchang, K. (1987). "Study on Anticancer Activity of A Well-Known Thai Remedy," Master thesis. M.Sc. (Phamacology). Bangkok : Graduate School, Mahidol University. Photocopied.

Peng, J.N. (1997, March). "A β-Carboline Alkaloid from *Hedyotis chrysotricha*," *Phytochemistry.* 46(6) : 1119-1121.

----------. (1998, July). "Iridoids from *Hedyotis hedyotidea*," *Phytochemistry.* 47 (8) : 1657-1659.

Peres, M. et al. (1997, March). "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae)," *Phytochemistry.* 56 : 223-226.

Permana, D. et al. (1999, October). "Anthraquinones from *Hedyotis herbacea*." *J. Nat. Prod.* 62(10) : 1430-1431.

Pornsiriprasert, D. (1986). "Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of a Well-Known Thai Folkloric Remedy." Master thesis. M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate School, Mahidol University. Photocopied.

Rajeshkumar, N.V. & Kuttan R. (2000, March). "*Phyllanthus amarus* Extract Administration Increases the Life Span of Rats with Hepatocellular Carcinoma," *J. Ethnopharm.* 73 : 215-219.

Shiga, Y. et al. (1996, September). "*Escherichia coli* Phosphorylates 1,5-Anhydroglucitol and Releases 1,5-Anhydroglucitol 6-Phosphate When Glucose Is Absent in the Medium." *J.Biochem.* 119 : 173-179.

Suzuki, M. et al. (1996, March). "Production of 1,5-anhydroglucitol 1,5-anhydrofructose in erythroleukemia cells," *Eur. J. Biochem.* 240 : 23-29.

Thirumurugan, R.S. et al. (2000, April). "Antitumor Activity of Rhinacanthone Against Dalton's Ascitic Lymphoma," *Biol. Pharm. Bull.* 23(12) : 1438-1440.

Thisoda, P. (1995). "Study on Immunostimulating Effect of A Well-Known Thai Folkloric Remedy in Breast Cancer Patiens." Master thesis. M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate School, Mahidol University. Photocopied.

Torrance, S. J. Wiedhopf, R.M. & Cole, J. R. (1992). " Antitumor Agents from *Jatropha macrorhiza* (Euphorbiaceae) : Acetylaleuritolic acid," *J. Pharm. Sci.* 1348.

Toshihiro, S.J. et al. (1986, September). "Sterols and Triterpenes from *Cucurbita maxima*," *Phytochemistry.* 31(5) : 39-47.

Umori, A. et al. (1992, April). "24β-Ethylsterol Biosynthesis : Incorporation of Methionine in Tissue Cultures of *Trichosanthes kirilowii*," *Phytochemistry.* 31(11) : 3861-3864.

Wiwatwithaya, S. (1992). "The Study of Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Known Thai Folkloric Remedy." Master thesis. M.Sc. (Phamacology). Bangkok : Graduate School, Mahidol University. Photocopied.

Woo, W.S. & Wagner H. (1977, May). "3-Acetylaleuritolic acid from the Seeds of *Phytolacca Americana,*" *Phytochemistry.* 16(16) : 1845-1846.

Wright, J.L.C. (1981, March). "Minor and Trace sterols of *Dunaliella tertiolecta*," *Phytochemistry.* 20(10) : 2403-2405.

Yamanouchi, T. et al. (2003, October). "1,5 Anhydroglucitol Stimulates Insulin Release in Insulinoma cell Lines," *Biochim. Biophys. Acta.* 1623 : 82.

Yang, J.J., Lin, C.C. & Hsu, H.Y. (1997, February). "Comparative Study on the Immunocompetent Activity of Three Different Kinds of Peh – Hue – Juwa – Chi – Cao, *Hedyotis corymbosa*, *H. diffusa*, and *Mollugo pentaphylla* after Sublethal Whole Body X-Irradiation," *Phytothera. Res.* 11(12) : 428-432.

----------. (1997, May). "The Possible Use of Peh – Hue – Juwa – Chi - Cao as an Antitumour Agent and Radioprotector after Therapeutic Irradiation," *Phytothera. Res.* 11 : 6-10.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent (Jork, et al. 1990 : 195-198)

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

ผสมสารดังกล่าวเข้าด้วยกันในอ่างน้ำแข็ง โดยคนตลอดเวลา และเก็บ reagent ที่เตรียมได้ในตู้เย็น

2. การเตรียม RPMI 1640 media

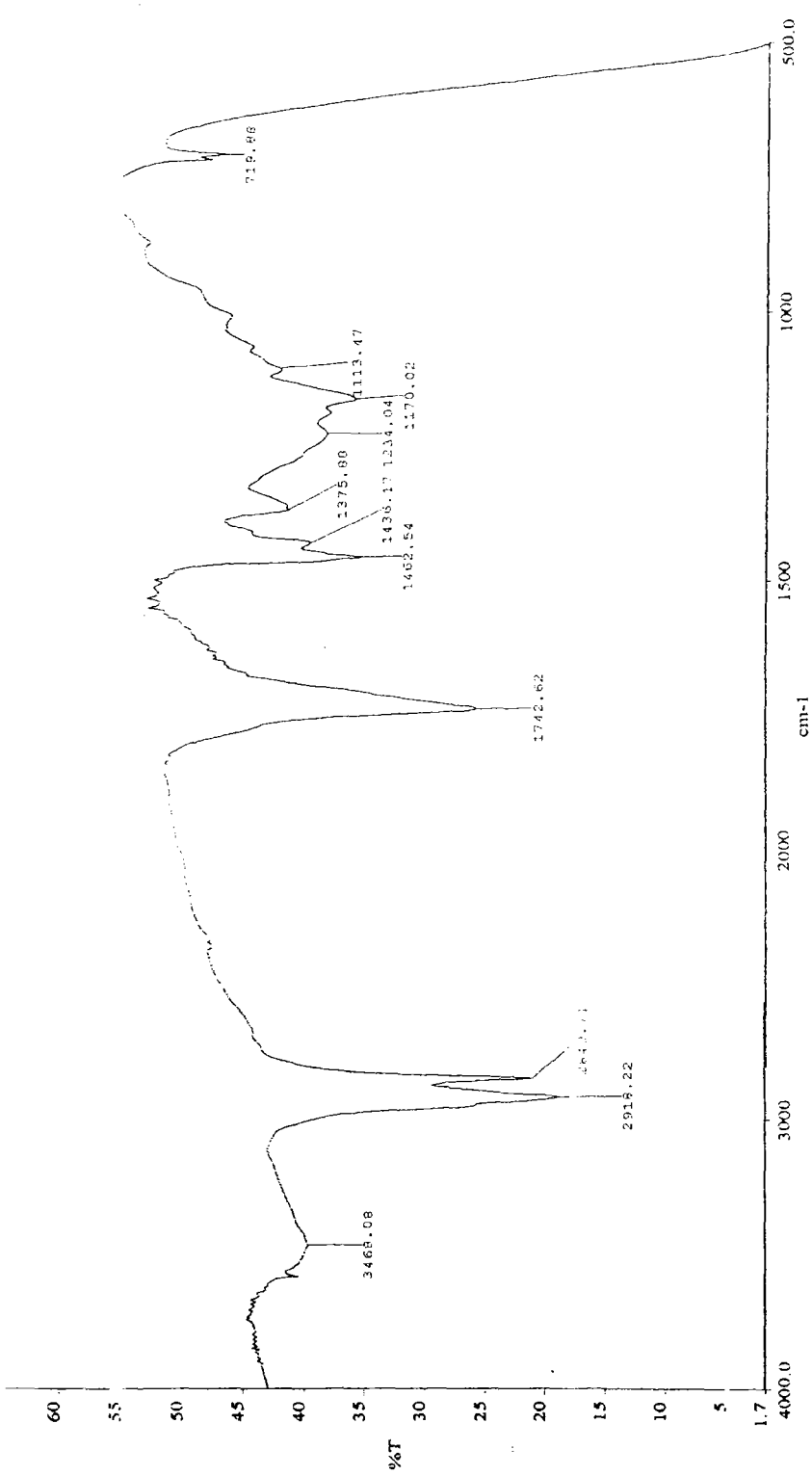
RPMI 1640 medium powder	20.90	g
Sodium bicarbonate	2.00	g
HEPES	3.00	g
Sodium penicillin G	0.40	mL
Streptomycin	1.00	mL
น้ำกลั่น	2.00	L

ละลาย RPMI 1640 medium powder ในน้ำกลั่น โดยคนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม sodium bicarbonate และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.2 ด้วยสารละลาย 7.5 % $NaHCO_3$ หรือ 1 % HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 2 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore filter และเติม Sodium penicillin G และ Streptomycin เพื่อให้ปราศจากเชื้อเก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น และก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้เสร็จแล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น

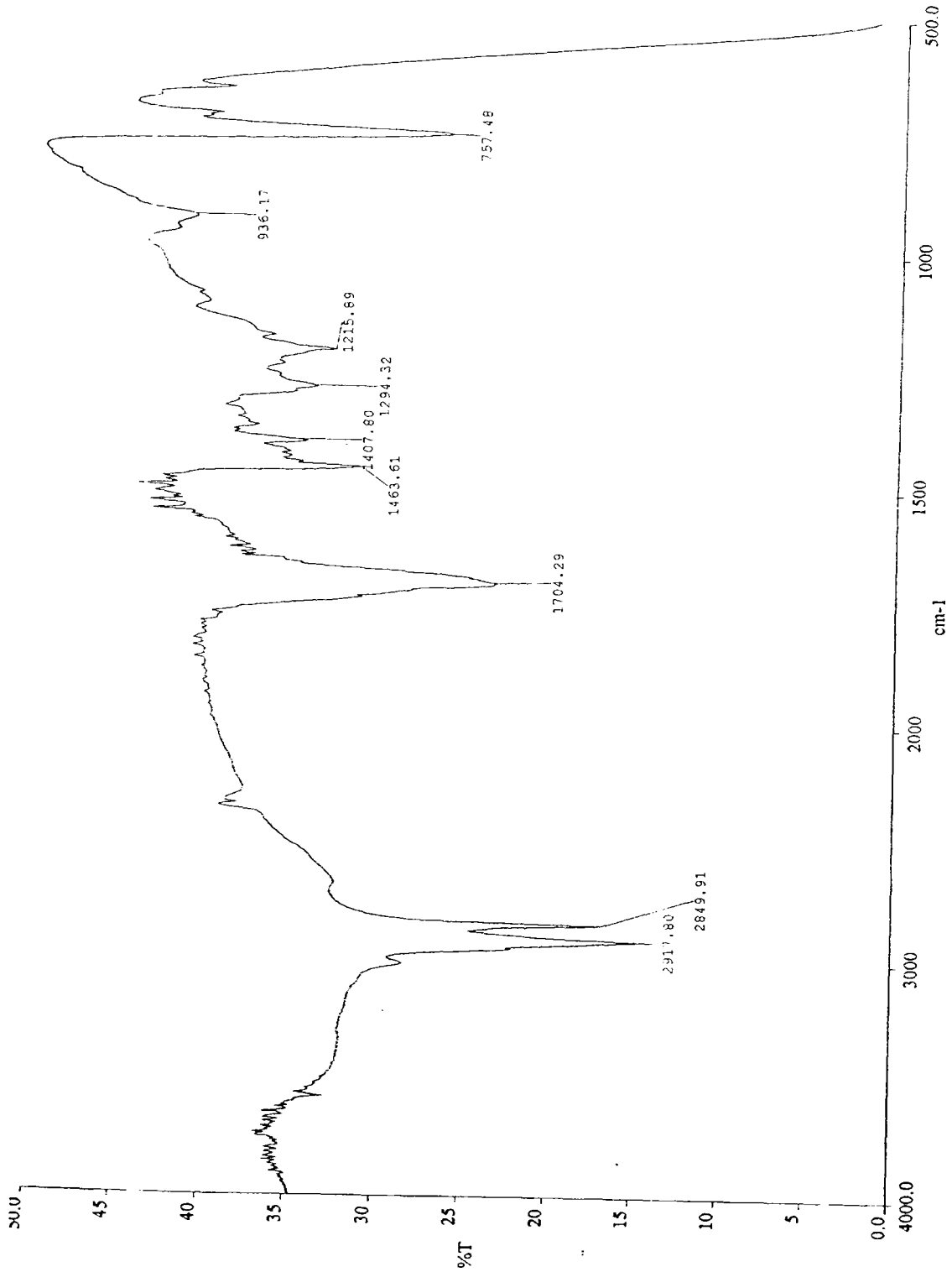
3. การเตรียม 0.4% trypan blue dye

trypan blue	0.40	g
sodium chloride	0.81	g
potassium phosphate	0.06	g
methyl-ρ-hydroxybenzoate	0.05	g

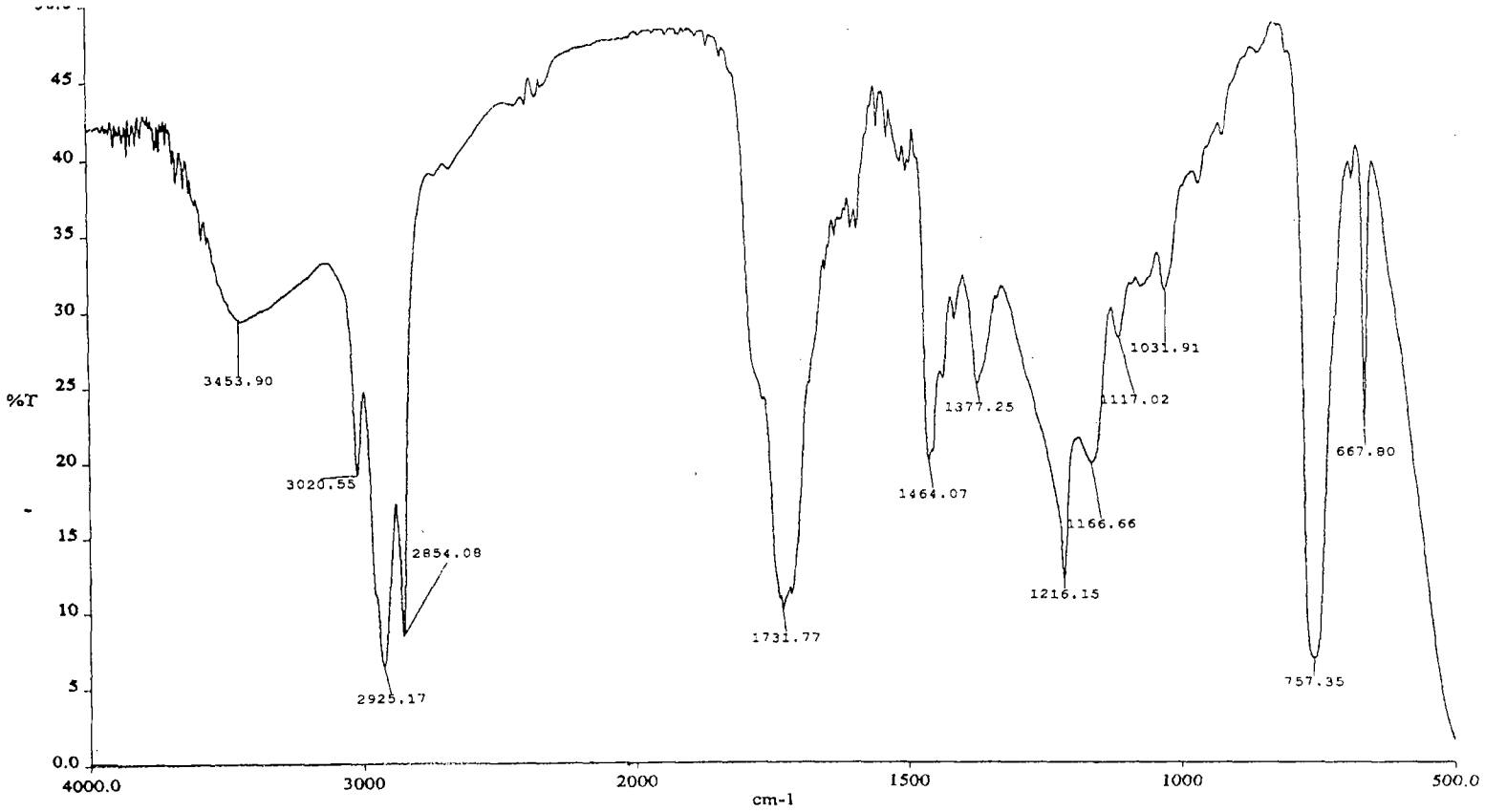
ละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น 90 mL ต้มให้เดือดและคนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.0-7.2 ด้วยสารลาย 1M NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น



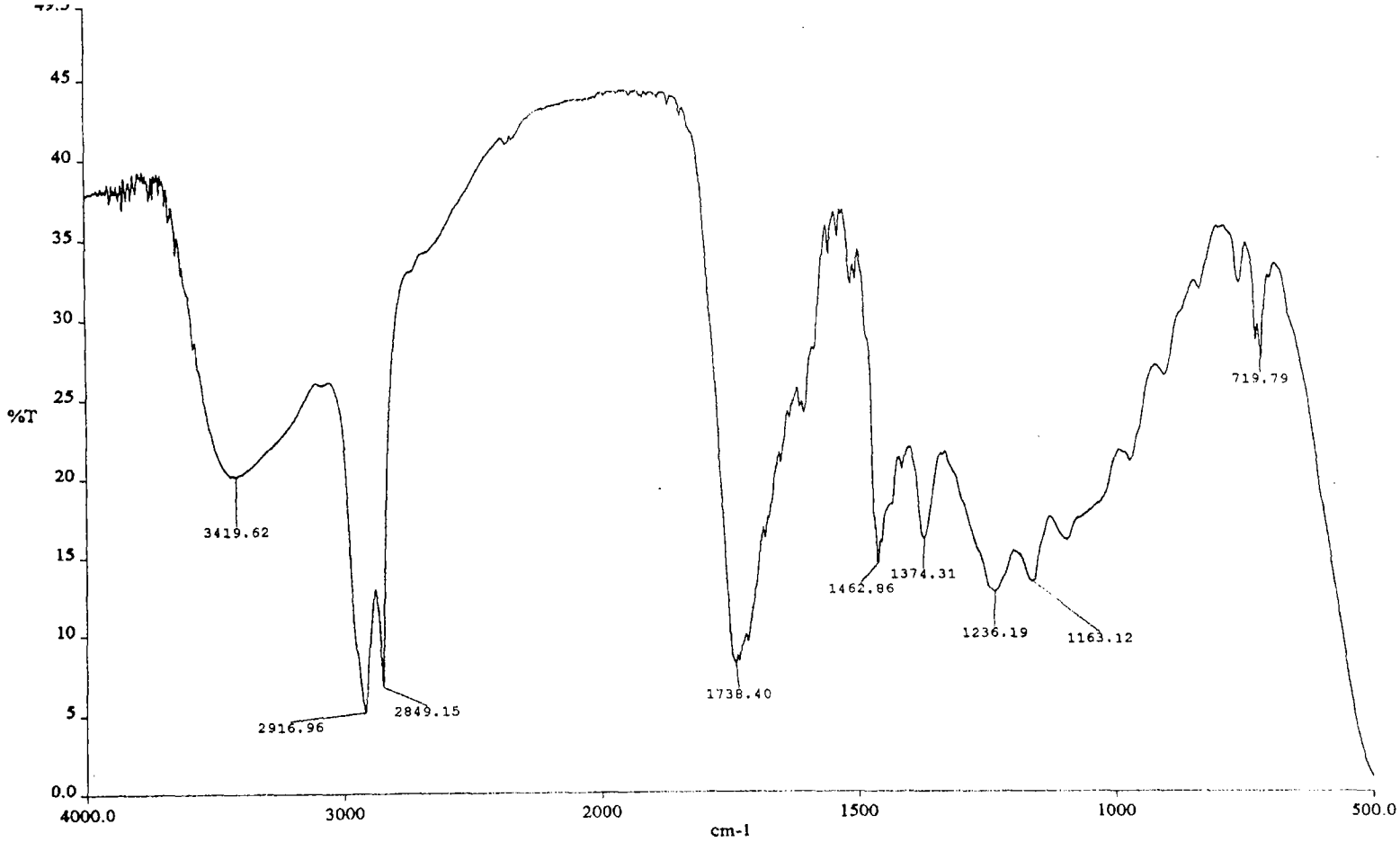
ภาพโรยกอย 36 แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.2.1



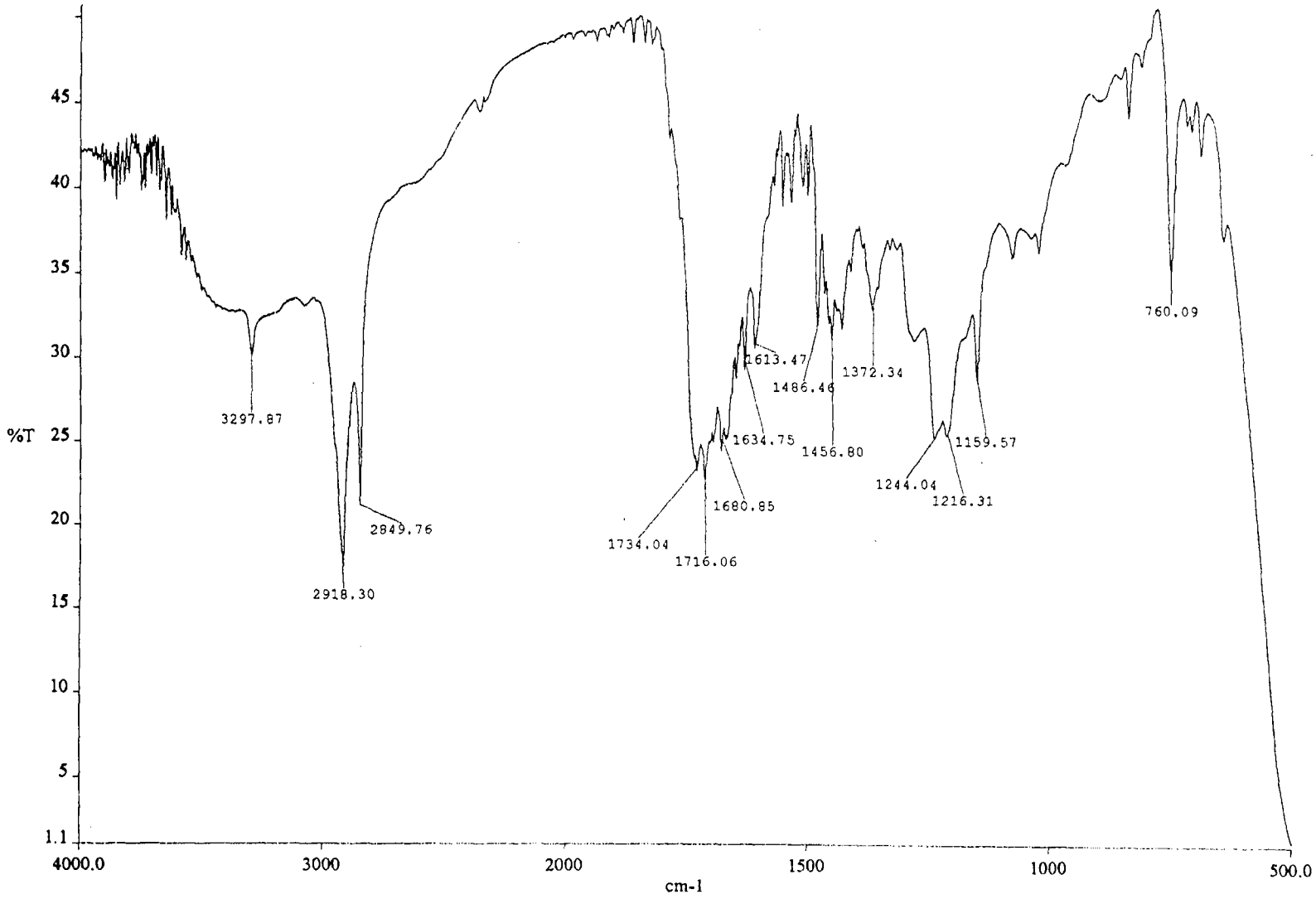
ภาพประกอบ 37 แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.3.3



ภาพประกอบ 38 แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.3.4



ภาพประกอบ 39 แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.4.1



ภาพประกอบ 40 แสดงข้อมูล FT IR spectrum (KBr) ของสารกลุ่ม E 4.5.2

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

s	singlet
d	doublet
dd	doublet of doublet
t	triplet
m	multiplet
br s	broad singlet
J	coupling constant
ppm	parts per million
cm^{-1}	wave number
^{o}C	degree celcius
mL	milliliter
µg	microgram
g	gram
mg	milligram
$CDCI_3$	deuterochloroform
DMSO-d_6	dimethyl sulfoxide- d_6
UV	Ultra Violet
FT IR	Fourier Transform Infrared Spectra
^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
EI MS	Electron Impact Mass Spectra
M^{+}	molecular ion
m/z	mass to charge ratio
MHz	Mega Hertz
^{1}H- ^{1}H COSY	H-relayed correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	^{1}H- deteced Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Conectivity
TLC	Thin Layer Chromatography

Prep TLC	Prepretative Thin Layer Chromatography
EtOAC	ethyl acetate
EtOH	ethanol
MeOH	methanol

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-ชื่อสกุล	นางสาวกมลวรรณ อนันต์
วันเดือนปีเกิด	31 มีนาคม 2518
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดตราด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	46 /2 หมู่ 5 ตำบลวังกระแจะ อำเภอเมือง จังหวัดตราด 23000
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 4
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนสะตอวิทยาคม รัชมังคลาภิเษก จังหวัดตราด
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2533	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนสตรีประเสริฐศิลป์
พ.ศ. 2536	มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนตราษตระการคุณ
พ.ศ. 2540	กศ. บ. เคมี มหาวิทยาลัยบูรพา
พ.ศ. 2547	กศ. ม. เคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ