

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.)
ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีเมีย (P388) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

ปริญญานิพนธ์
ของ
นันทรัตน์ รุ่งสกุล

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ตุลาคม 2547
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

615.34345

พ.ศ. 2547

13

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าสาบคา (*Hygrophila incana* Nees.)
ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีมีย (P388) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

บทคัดย่อ

ของ

นันทรัตน์ รุ่งสกุล

31 ธ.ค. 2548

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ตุลาคม 2547

13/10/2547

นันทรรัตน์ รุ่งสกุล. (2547). การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.) ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีเมีย (P388) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล, อาจารย์ ดร. จินดา แทมมบรรจง, อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชชา.

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol จากหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.) พบว่าสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 15.42 µg/mL ในขณะที่สารสกัด hexane และ methanol มีค่า ED₅₀ มากกว่า 30 µg/mL จึงนำสารสกัดหยาบ ethyl acetate มาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ betulinic acid มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 11.50 µg/mL และสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 10 กลุ่ม มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 5.81 4.00 2.50 2.50 3.00 16.82 10.49 5.71 23.37 และ 4.67 µg/mL เมื่อนำ betulinic acid และสารกลุ่มที่มีปริมาณมากพอและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่าสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ค่า ED₅₀ เท่ากับ 2.17 µg/mL และ betulinic acid มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 4.50 และ 20.60 µg/mL ตามลำดับ

IN VITRO CYTOTOXICITY STUDY OF SUBSTANCES ISOLATED FROM
HYGROPHILA INCANA NEES. ON LEUKEMIC (P388) AND
BREAST (MCF-7) CARCINOMA CELLS

AN ABSTRACT
BY
NANTARUT RUNGSAKUL

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in chemistry
at Srinakharinwirot University
October 2004

Nantarut Rungsakul. (2004). *In Vitro Cytotoxicity Study of Substances Isolated From Hygrophila incana* Nees. on Leukemic (P388) and Breast (MCF-7) Carcinoma Cells. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Asst. Prof. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

The hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *Hygrophila incana* Nees. were tested for cytotoxicity against P388. The ethyl acetate extract showed cytotoxicity against P388 with ED₅₀ 15.42 µg/mL while the hexane and methanol extracts had ED₅₀ greater than 30 µg/mL. The ethyl acetate extract was separated by column chromatography technique, to afford a pure compound, betulinic acid with ED₅₀ 11.50 µg/mL against P388 and other 10 minor toxic components with ED₅₀ 5.81 4.00 2.50 2.50 3.00 16.82 10.49 5.71 23.37 and 4.67 µg/mL. Then, betulinic acid and fractions had a lot of amount and high cytotoxicity against P388, which were tested for cytotoxicity against MCF-7. Fraction with ED₅₀ 2.17 µg/mL against P388 and betulinic acid showed cytotoxicity against MCF-7 with ED₅₀ 4.50 and 20.60 µg/mL respectively

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.)

ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีมีย (P388) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

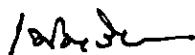
ของ

นางสาวนันทรัตน์ รุ่งสกุล

ได้อนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

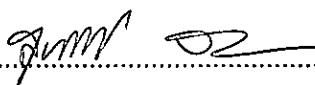


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญศิริ จีระเดชากุล)

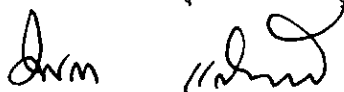
วันที่ 11 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์



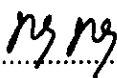
.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)



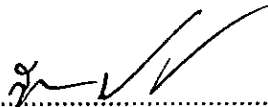
.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. จินดา แท้มบรรจง)



.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พรทิพา พินา)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรังษณาสีทิกุล)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดีจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง และอาจารย์ ดร. พรทิพา พิชชา กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำปริญญานิพนธ์ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ระหว่างการทำปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสัทธิตกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร ที่ได้ให้ความกรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ตลอดจนให้คำแนะนำแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษาและคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุนและให้สมุนไพรมานำในการวิจัย ขอขอบพระคุณกลุ่มงานพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบพระคุณคุณสุชานุช อ่อนดี งานวิจัยสารบำบัดมะเร็งสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี ขอขอบพระคุณสถาบันจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูลทาง mass spectroscopy และเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ นิสิตปริญญโทภาควิชาเคมี และผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวทุกท่านที่ช่วยอุปการะค่าใช้จ่ายระหว่างเรียนและให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาที่ผู้วิจัยทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

คุณค่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์และผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน

นันทรัตน์ รุ่งสกุล

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล Hygrophila.....	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ...	7
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรต้านเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7.....	10
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
พืชที่ใช้ในการวิจัย.....	17
เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย.....	17
สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าสาบกาและทำ	17
สารให้บริสุทธิ์.....	17
สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	
มะเร็ง.....	18
การสกัดสารจากหญ้าสาบกา การแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์.....	19
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388	20
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7	23
การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	25
4 ผลการวิจัย.....	31
ผลการสกัดสารจากหญ้าสาบกา.....	31
ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate และทำสารให้บริสุทธิ์.....	31
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4(ต่อ) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	56
การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	62
การวิเคราะห์โครงสร้างสารกลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388...	66
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	67
Betulinic acid.....	67
ข้อเสนอแนะ.....	68
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	74
อภิธานศัพท์.....	93
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	96

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างการแสดงผลปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษ ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	22
2 ตัวอย่างการแสดงผลปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษ ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
3 การผสมสารเพื่อหาปริมาณโปรตีนของ NC-0 NC-4 PC-4 และ TS-4...	25
4 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
5 ผลการแยกสารกลุ่ม E1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	32
6 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
7 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
8 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.7 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	34
9 ผลการแยกสารกลุ่ม E3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	34
10 ผลการแยกสารกลุ่ม E3.9 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	35
11 ผลการแยกสารกลุ่ม E4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	36
12 ผลการแยกสารกลุ่ม E5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	37
13 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	38
14 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	38
15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	40
16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	40
17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1 ถึง E6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	41
18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.1 ถึง E1.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	42
19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	42
20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จาก กลุ่ม E1.6 และ E1.7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	44

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.6.6.1 ถึง E1.6.6.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	44
22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 และ E1.6.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.7.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.1 ถึง E3.10 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	47
25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	48
26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.8 ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ	49
27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.9.1 ถึง E3.9.8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	50
28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	50
29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E4.1 ถึง E4.15 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	52
30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E4.11 ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ	52
31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.1 ถึง E5.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	53
32 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.4 ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ	54
33 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.5.1 ถึง E5.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	55
34 สรุปผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	55

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
35 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E1 E3 E5 และ E3.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	56
36 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E3.6 E3.7 และ สารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	57
37 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	57
38 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสาร E3.7 ที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ	58
39 สรุปค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED ₅₀ ของสารที่แยกได้จาก หญ้าสาบกาต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7.....	60
40 ข้อมูล FT IR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1.....	63
41 ข้อมูล ¹ H NMR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1.....	64
42 ข้อมูล ¹ H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 1.....	64
43 ข้อมูล ¹³ C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ betulinic acid และ สารประกอบ 1.....	65
44 ข้อมูล FT IR ของกลุ่มสารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388	66

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 หน้้าสาบกา (<i>Hygrophila incana</i> Nees.).....	5
2 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากราก <i>Hygrophila spinosa</i>	6
3 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากผลบวบขม (<i>Trichosanthes cucumeria</i> L.)...	7
4 สูตรโครงสร้างของ 1,8-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthracenedione.....	8
5 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเหง้าพลับพลึง (<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>japonicum</i>).....	8
6 สูตรโครงสร้างของ solavetivone.....	9
7 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบปลาไหลเผือก (<i>Eurycoma longifolia</i> Jack.).....	9
8 สูตรโครงสร้างของ yadanzolid S.....	10
9 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากหน้้าลิ้นจ้ฐ (<i>Hedyotis corymbosa</i> Lamk.)....	11
10 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักขา (<i>Canna indica</i> Linn.).....	12
11 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน (<i>Mallotus oblongifolius</i> Mull.Arg.).....	13
12 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเปลือกราก <i>Artocarpus champeden</i>	14
13 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบ <i>Aglaiia elliptifolia</i> Merr.....	14
14 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเห็ดหลินจ้ฐ (<i>Ganoderma lucidum</i>).....	15
15 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากทุกส่วนของ <i>Justicia procumbens</i>	15
16 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากกิ่งอ่อนของ <i>Bucida buceras</i> L.....	16
17 ขั้นตอนการสกัดสารจากหน้้าสาบกาและคำร้้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร้ฐ P388.....	26
18 ขั้นตอนการแยกสาร ethyl acetate และคำร้้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร้ฐ P388.....	26
19 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1 และคำร้้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร้ฐ P388.....	27
20 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1.6 และคำร้้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร้ฐ P388.....	27

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
21 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1.7 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	28
22 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E3 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	28
23 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E3.9 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	29
24 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E4 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	29
25 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E5 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	30
26 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	39
27 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารสกัด ethyl acetate ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	40
28 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E1.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	43
29 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 และ E1.6.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	46
30 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E1.7.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	46
31 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ 1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	48
32 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E3.8 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	49
33 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388...	51
34 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E4.11 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	53
35 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E5.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	54
36 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ 1 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	58
37 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E3.7 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	59
38 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 1.....	63
39 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ 1.....	78
40 ¹ H NMR spectrum (300 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) ของสารประกอบ 1.....	79
41 ¹³ C NMR และ DEPT spectrum (75 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) ของสารประกอบ 1.....	80

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
42 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.4	81
43 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.2	82
44 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.3.....	83
45 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.4	84
46 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.7.5	85
47 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.8	86
48 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.9.3	87
49 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.9.4	88
50 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E4.11	89
51 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E5.4	90
52 เซลล์มะเร็ง P388 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4.....	91
53 เซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ในวันที่ 4.....	91
54 เซลล์มะเร็ง MCF-7 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4.....	92
55 เซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ในวันที่ 4...	92

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบันโรคมะเร็งถือเป็นปัญหาหนึ่งที่ทั้งโลกกำลังแสวงหาทางเลือกในการดูแลรักษา มีการใช้หลายวิธี และมีการรักษาโดยการแพทย์แผนปัจจุบันและการแพทย์แผนไทยควบคู่กัน การใช้สมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทในการรักษาโรคมะเร็งนอกเหนือจากการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) ซึ่งมีข้อจำกัดของการรักษาอยู่ ทั้งนี้เพราะยาโรคมะเร็งส่วนใหญ่มีฤทธิ์แรงและออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งที่กำลังแบ่งตัว และยังมีผลต่อเนื้อเยื่อปกติที่มีการแบ่งตัวเร็วเช่นกัน นอกจากนี้ยาเคมีบำบัดส่วนใหญ่มีราคาแพงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ จึงทำให้บทบาทของสมุนไพรที่มีมานานมีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการรักษามะเร็งมากขึ้น

การนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งมีอยู่ด้วยกันหลายตำรับ ได้มีการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์อันจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งต่อไป อาทิเช่น สารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) แสดงศักยภาพที่ดีในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูพันธุ์วิสตา (wistar mouse) เพศผู้โดยการป้อนทางปากเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนให้สารก่อมะเร็ง azoxymethane (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข และรวีวรรณ พัวธนาโชคชัย. 2545 : บทคัดย่อ) สารสกัดจากผลบวบขม (*Trichosanthes cucumeria* L.) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (SK-BR-3) (Jiratchariyakul, et al. 1999 : 1-9) สารสกัดจากว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งปากมดลูก (Pecere, et al. 2000 : 2800-2804) น้ำสกัดจากผลสดของมะขามป้อม (*Embllica officinalis*) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และช่วยยืดอายุของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็ง (Jose, Kuttan & Kuttan. 2001 : 65-69) สารสกัดจากเหง้าพลับพลึง (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด (Min, et al. 2001 : 1217-1219) สารสกัดจากรากมะแว้ง (*Solanum indicum*) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ของคน (OVCAR-3) (Syu, et al. 2001 : 1232-1233) สารสกัดจากใบปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack) มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกในหลอดทดลองและกระตุ้นให้เกิดการต้านพยาธิใบไม้ตับและปรสิตในเม็ดเลือดของสัตว์ที่ทำให้เกิดมาเลเรียในคน (Jiwajinda, et al. 2002 : 55-58) สารสกัดจากเมล็ดของราชดัด (*Brucea javanica* (L) Merr.) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดในคน (HL-60) (Su, et al. 2002 : 730-733) และสารสกัดจากรากเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* Linn.) มีฤทธิ์

ต้านเซลล์มะเร็งปอดของคน (Calu-1) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคน (Lin, Yang & Chou. 2003 : 619-622) เป็นต้น

จากตำรับยารักษามะเร็งของแพทย์แผนโบราณตำรับหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell) หนุ้าปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) ต้นลิ้นงูเห่า (*Climacanthus siamensis* Brem) และเหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Similax corburia* Kunth) จากการศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรตำรับนี้ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED₅₀ มากกว่า 30 µg/mL และยังเพิ่มอัตราการอยู่รอดและยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมได้ (Pornsiriprasert. 1986 : abstract) ผู้วิจัยจึงได้สนใจนำต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell) จากตำรับยานี้มาศึกษา เมื่อนำต้นไฟเดือนห้าที่ได้มาตรวจสอบเอกลักษณ์ พบว่าเป็นพืชที่มีชื่อว่าหญ้านาบกาก (*Hygrophila incana* Nees.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่ออื่นว่าไฟเดือนห้า (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 287) เช่นเดียวกัน การที่มีชื่อเรียกเหมือนกันนี้จึงทำให้มีหญ้านาบกาก เดิมเข้าไปในสมุนไพรตำรับนี้

หญ้านาบกากมีสรรพคุณรักษาโรคอื่น ๆ เช่น รักษาบาดแผลสด บาดแผลอักเสบที่มีหนอง ฝี อาการปวดศีรษะ อาการปวดฟัน จากการค้นคว้าข้อมูลยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และเภสัชวิทยาของหญ้านาบกากมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้สนใจนำหญ้านาบกากมาศึกษาหาสารสำคัญและสารที่ออกฤทธิ์ ต่อเซลล์มะเร็ง P388 และเซลล์มะเร็ง MCF-7 เพื่อที่จะได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์อ้างอิงเกี่ยวกับศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็งของหญ้านาบกากและเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคต

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและการทำสารให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด (P388 และ MCF-7) ของสารสกัดที่แยกได้จากหญ้านาบกาก

ความสำคัญของงานวิจัย

ผลของการวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลเกี่ยวกับสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากหญ้าสาบกา
2. เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งอันนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งในอนาคต
3. เพื่อเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์และสารอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์มากขึ้น

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คือ ทั้งต้นของหญ้าสาบกาอบแห้ง
2. การสกัดสารจากพืช ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ
3. การแยกและทำสารให้บริสุทธิ์ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (chromatography techniques) และการตกผลึก (crystallization)
4. การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์จะดำเนินการเฉพาะสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 เมื่อมีค่าร้อยละการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 30 µg/mL น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 และมีปริมาณสารตัวอย่างมากกว่า 100 mg หรือมีลักษณะเป็นของแข็งเท่านั้น
5. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy techniques) ได้แก่ อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโกปี (Ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) และแมสสเปกโตรเมตรี (Mass spectrometry)
6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (mouse lymphocytic leukemia cells, P388) ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*)
7. นำเฉพาะสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และเป็นสารกลุ่มที่มีปริมาณมากพอ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (Human mammary carcinoma cells, MCF-7) ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P388 หมายถึงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (mouse lymphocytic leukemia cells) เป็นเซลล์ที่ไม่ติดแก้ว (suspension cell) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์
2. MCF-7 หมายถึงเซลล์มะเร็งเต้านมในมนุษย์ (human mammary carcinoma cells) เป็นเซลล์ที่ติดแก้ว (monolayer cell) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่เป็นแผ่นชั้นเดียวบนภาชนะที่ใช้เลี้ยงและต้องอาศัยที่เกาะจึงจะสามารถเจริญแบ่งเซลล์ไปชนกับเซลล์ข้าง ๆ ได้ เมื่อชนแล้วจะไม่มีการแบ่งตัวต่อไปอีก
3. ED_{50} หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองที่ทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่ง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$)
4. สารที่มีความเป็นพิษ หมายถึงสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 มีค่า $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ และ $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ สำหรับสารบริสุทธิ์ ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกาที่กำหนดค่าความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB) (Geran, et al. 1972 : 7-17)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าสาบกา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hygrophila incana* Nees. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีชื่ออื่นว่า ไฟเดือนห้า (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 287) เป็นไม้ล้มลุก ตามลำต้นจะมีขน กิ่งก้านตรงหรือทอดเลื้อย รูปใบเป็นขอบขนานแกมรูปใบห่อยาว 1-10 cm กว้าง 0.2-1.5 cm ดอกออกตามซอกใบ 2-5 ดอก กลีบเลี้ยงเชื่อมกัน ดอกสีขาวหรือสีเหลืองยาว 1.2-2.2 cm ผลแห้งเมื่อถูกน้ำจะแตก ภายในมีเมล็ดอยู่ (Benoist. 1935 : 642-643)

หญ้าสาบกา มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ คือ ใบ ใช้พอกบาดแผลสด บาดแผลอักเสบที่เป็นหนอง ฝี อาการบวม และอาการปวดศีรษะ ส่วนของเมล็ด ใช้แช่น้ำพอกแผล โดยเฉพาะแผลที่เป็นหนอง เป็นยาสำหรับกัดผ้าหนอง มีสรรพคุณสามารถดูดหนองได้ด้วย ในประเทศมาเลเซียนิยมใช้ใบตำปัดหรืออุดฟันเพื่อบรรเทาอาการปวด (บุศบรรณ ณ สงขลา. 2525 : 24)



ภาพประกอบ 1 หญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.)

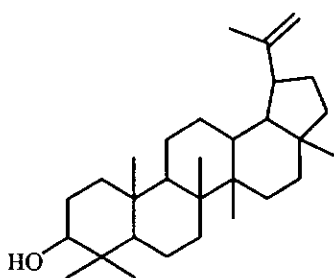
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสกุล *Hygrophila*

บอยลีและพายเวลด์ (Boily & Puyvelde. 1986 : 1-13) ศึกษาสารสกัด methanol ที่แยกได้จากใบ *Hygrophila auriculata* (Schum.) Heine. พบว่ามีฤทธิ์ต่อการรักษาผู้ป่วย โรคเรื้อน โรคแอนแทรกซ์ โรคหนองใน การอักเสบของกล่องเสียง และการต้านเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis* และ *Staphylococcus aureus*

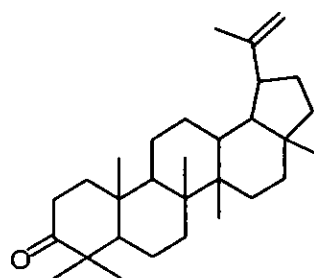
ซิงและแฮนดา (Singh & Handa. 1995 : 119-126) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด methanol ที่แยกได้จากเมล็ด *Hygrophila auriculata* (Schum.) Heine. พบว่าสามารถป้องกัน ความเป็นพิษต่อตับของหนูขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้ตับเป็นพิษโดย paracetamol และ thioacetamine

เวลย์ทินค์และคณะ (Vlietinck, et al. 1995 : 31-47) ได้ศึกษาสารสกัดจากพืช 267 ชนิดพบว่าสารสกัด ethanol จากส่วนต่าง ๆ ของ *Hygrophila auriculata* (Schum.) Heine. มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในคนและต้านเชื้อไวรัส

มาซุมดา กุปตาและไมทิ (Mazumdar, Gupta & Maiti. 1999 : abstract) ได้ศึกษา สารสกัด petroleum ether. จากราก *Hygrophila spinosa* พบ lupeol และ lupenone (สูตรโครงสร้างสารแสดงดังภาพประกอบ 2) และเมื่อป้อนสารสกัด petroleum ether ให้หนูขาว ทางปากพบว่า มีศักยภาพในการเป็นยาระงับประสาทเหมือนกับสารจำพวก chlorpromazine diazepam pentobarbitone และ chlordiazepoxide และสามารถป้องกันอาการกระตุกได้ด้วย



lupeol



lupenone

ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากราก *Hygrophila spinosa*

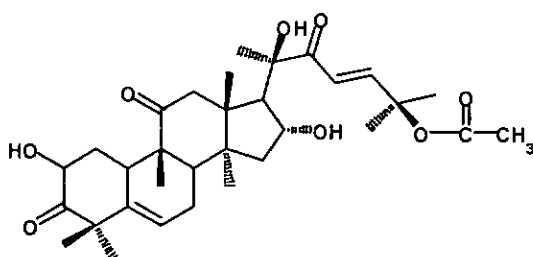
คามและโอโมโลโซ (Kham & Omoloso. 2002.) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของ สารสกัด methanol จากส่วนที่อยู่เหนือดินของ *Hygrophila stricta* (Lind) และ *Peperomia pellucida* (L.) Kunth และนำสารสกัดไปแบ่งส่วนการละลายด้วย petroleum ether dichloromethane ethyl acetate และ butanol พบว่าส่วน petroleum ether ของ *Hygrophila stricta* (Lind) และส่วน butanol ของ *Peperomia pellucida* (L.) Kunth มีระดับการต้านแบคทีเรียได้ดี

วีนิเจอร์และคณะ (Weniger, et al. 2002 : 193-200) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด methylene chloride จากส่วนที่อยู่เหนือดินของ *Hygrophila guianensis* Nees. พบว่ามีฤทธิ์ต้านปรสิตโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคจากการติดเชื้อที่ผิวหนัง โพรงจมูก และคอหอย

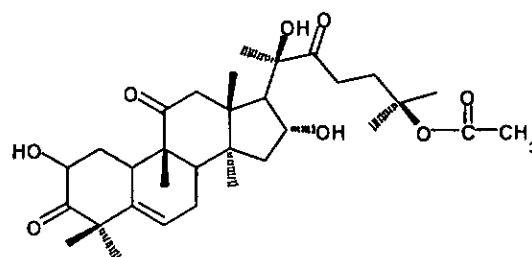
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน, นิรัชร์ เลิศประเสริฐ และ รวิวรรณ พัวธนาโชคชัย (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน, นิรัชร์ เลิศประเสริฐ และ รวิวรรณ พัวธนาโชคชัย. 2545 : บทคัดย่อ) ได้ศึกษาสารสกัดจากตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) โดยใช้ hexane ethyl acetate butanol และ ethanol พบว่าสารสกัดส่วนที่ละลายใน hexane แสดงศักยภาพที่ดีที่สุดใน การป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ของหนูพันธุ์วิสตาเรเพคผู้ โดยการป้อนทางปากเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนให้สารก่อมะเร็ง azoxymethane

จิรัชฌริยากุลและคณะ (Jiratchariyakul, et al. 1999 : 1-9) ได้ศึกษาสารสกัด ether จากผลบวบขม (*Trichosanthes cucumeria* L.) พบสารผสม cucurbitacin B และ dihydrocucurbitacin B ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (SK-BR-3) มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.05 และ 0.40 µg/mL ตามลำดับ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 3



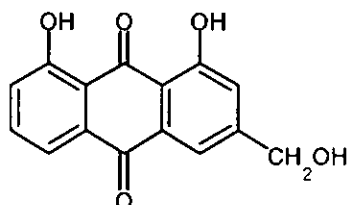
cucurbitacin B



dihydrocucurbitacin B

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากผลบวบขม (*Trichosanthes cucumeria* L.)

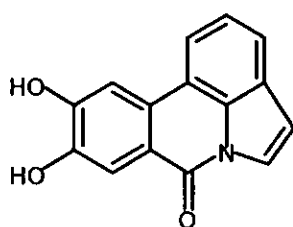
พีเซียและคณะ (Pecere, et al. 2000 : 2800-2804) ได้ศึกษาสารสกัดจาก ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) พบสารประเภท hydroxyanthraquinone ได้แก่ aloe-emodin (1,8-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthracenedione) แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 4



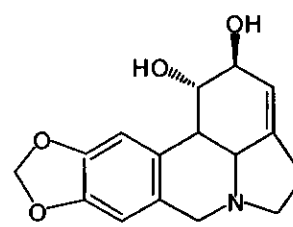
ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของ 1,8-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthracenedione

โจเซ คุตแทน และคุตแทน (Jose, Kuttan & Kuttan. 2001 : 65-69) ได้ศึกษา น้ำสกัดจากผลสดของมะขามป้อม (*Embllica officinalis*) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและช่วยยืดอายุของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งโดย Daltons lymphoma ascites cell (DLA)

มินและคณะ (Min, et al. 2001 : 1217-1219) ได้ศึกษาสารสกัด methanol จาก เหง้าพลับพลึง (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*) และนำสารสกัดไปแบ่งส่วนการละลายด้วย ethyl acetate กับ น้ำ แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ พบสารประกอบ crasiaticidine A และ lycorine ซึ่งเป็นสารประเภท alkaloid มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด มีค่า ED_{50} เท่ากับ 4.2 และ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 5



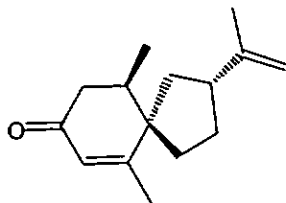
crasiaticidine A



lycorine

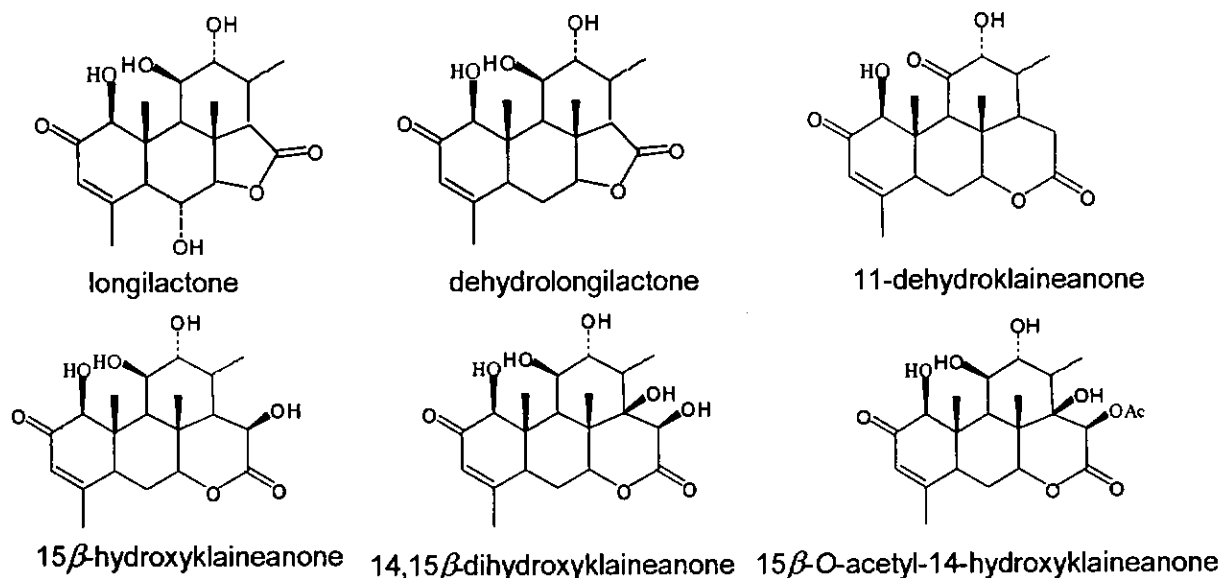
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเหง้าพลับพลึง (*Crinum asiaticum* var. *japonicum*)

ชูและคณะ (Syu, et al. 2001 : 1232-1233) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด ethanol จากรากมะแว้ง (*Solanum indicum*) พบสารประกอบ solavetivone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ของคน (OVCAR-3) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.1 nM สูตรโครงสร้างของสารดังภาพประกอบ 6



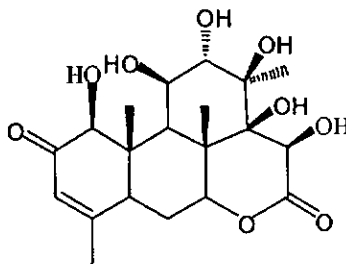
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของ solavetivone

จิวาจินดาและคณะ (Jiwajinda, et al. 2002 : 55-58) ได้ศึกษาสารสกัดจากใบปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack.) พบสารจำพวก quassinoid ได้แก่ longilactone dehydrolongilactone 11-dehydroklaineane 15 β -hydroxyklaineane 14,15 β -dihydroxyklaineane และ 15 β -O-acetyl-14-hydroxyklaineane ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเนื้องอกในหลอดทดลองมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.0 9.0 28.0 32.0 5.0 และ 51.0 μ M ตามลำดับ และการกระตุ้นให้เกิดการต้านพยาธิใบไม้ตับและปรสิตในเม็ดเลือดของสัตว์ที่ทำให้เกิดมาเลเรียในคน สูตรโครงสร้างของสารดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack.)

ซูและคณะ (Su, et al. 2002 : 730-733) ได้ศึกษาสารสกัด methanol จากเมล็ดของราชดัด (*Brucea javanica* (L.) Merr.) พบสารจำพวก quassinoid ได้แก่ yadanzolid S มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดในคน (HL-60) สูตรโครงสร้างของสารดังภาพประกอบ 8



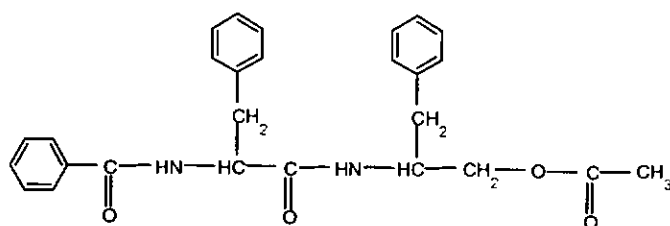
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของ yadanzolid S

ลิน ยั้งและเชาว์ (Lin, Yang & Chou. 2003 : 619-622) ได้ศึกษาสารสกัด ethanol จากรากเจตมูลเพลิงขาว (*Plumbago zeylanica* Linn.) พบสารจำพวก glucoside ของ plumbagic acid สารจำพวก naphthoquinone และ coumarin มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของคน (Calu-1) และเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

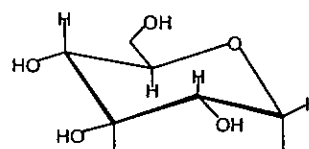
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรต้านเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane และ ethanol จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ 30 และ $> 100 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในสารสกัด hexane พบ aurantiamide acetate มีค่า $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 3 กลุ่มมีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ $21.00 \mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัด ethanol พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ 1,5-anhydroglucitol และ β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside สารทั้ง 2 ชนิด มีค่า $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ และสารผสมของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol มีค่า ED_{50} เท่ากับ $21.50 \mu\text{g/mL}$ นอกจากนี้ยังพบกลุ่มสารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 1 กลุ่มมีค่า ED_{50} เท่ากับ $17.50 \mu\text{g/mL}$ ต่อมากมลวรรณ อนันต์ (2547) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด ethyl acetate และ methanol พบว่ามีค่า $ED_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ ในสารสกัด ethyl acetate พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ salicylic acid 3-O-acetyl aleuritolic acid และ 1,5-anhydroglucitol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 66.50 29.80 และ $> 30 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับและสารผสม 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol เช่นเดียวกับที่พบในสารสกัด ethanol จากงานวิจัยของจันทร์ทิพย์ แซ่ตัน

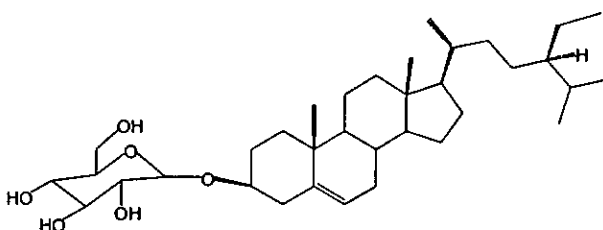
(2544) และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 5 กลุ่มมีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 5.50 11.50 12.00 และ 21.50 $\mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 9



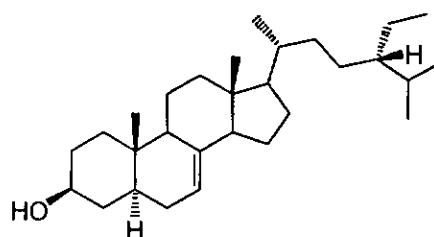
aurantiamide acetate



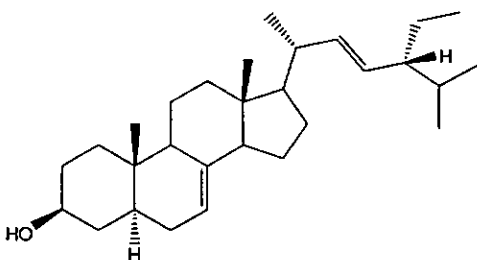
1,5-anhydroglucitol



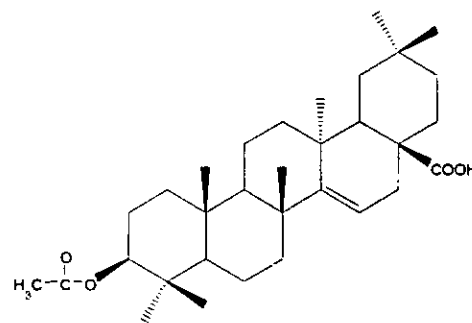
β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside



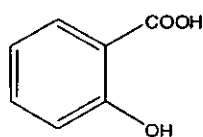
22,23-dihydrocholesterol



chondrillasterol



3-O-acetyl aleuritolic acid

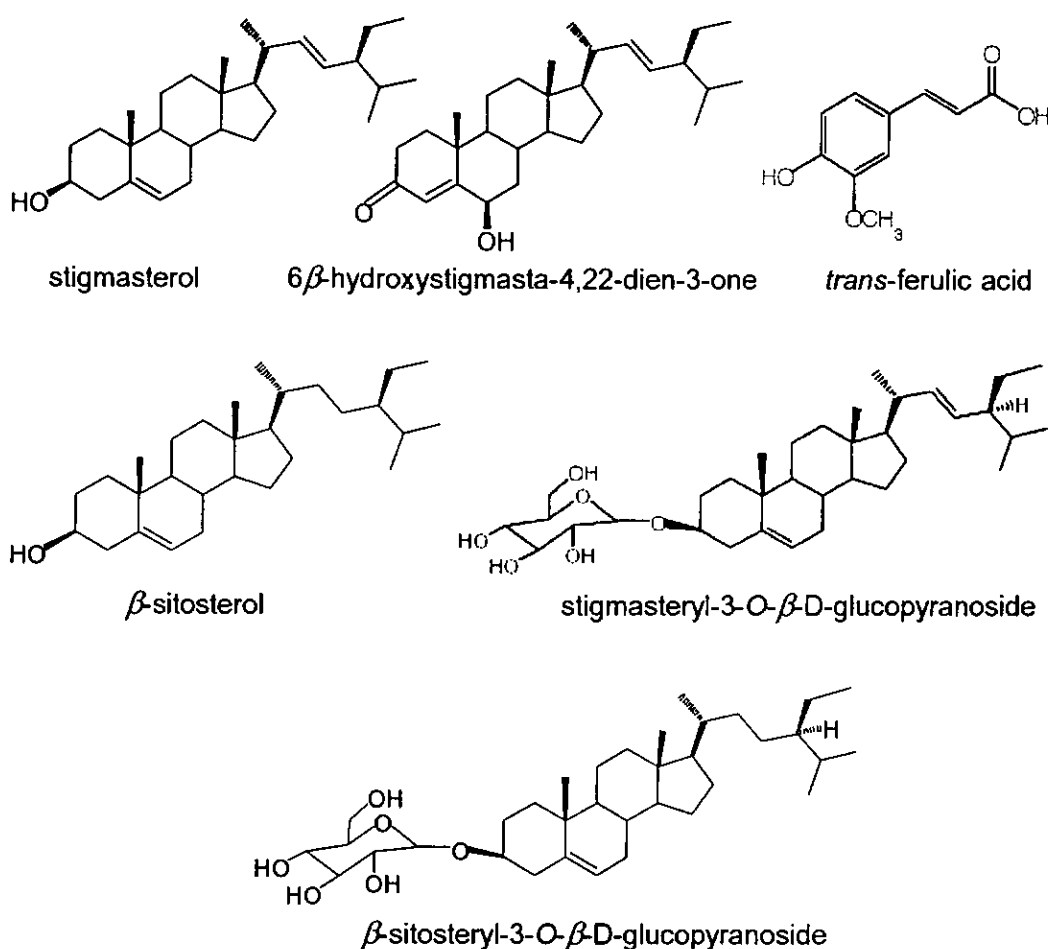


salicylic acid

ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากหญ้าลันงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

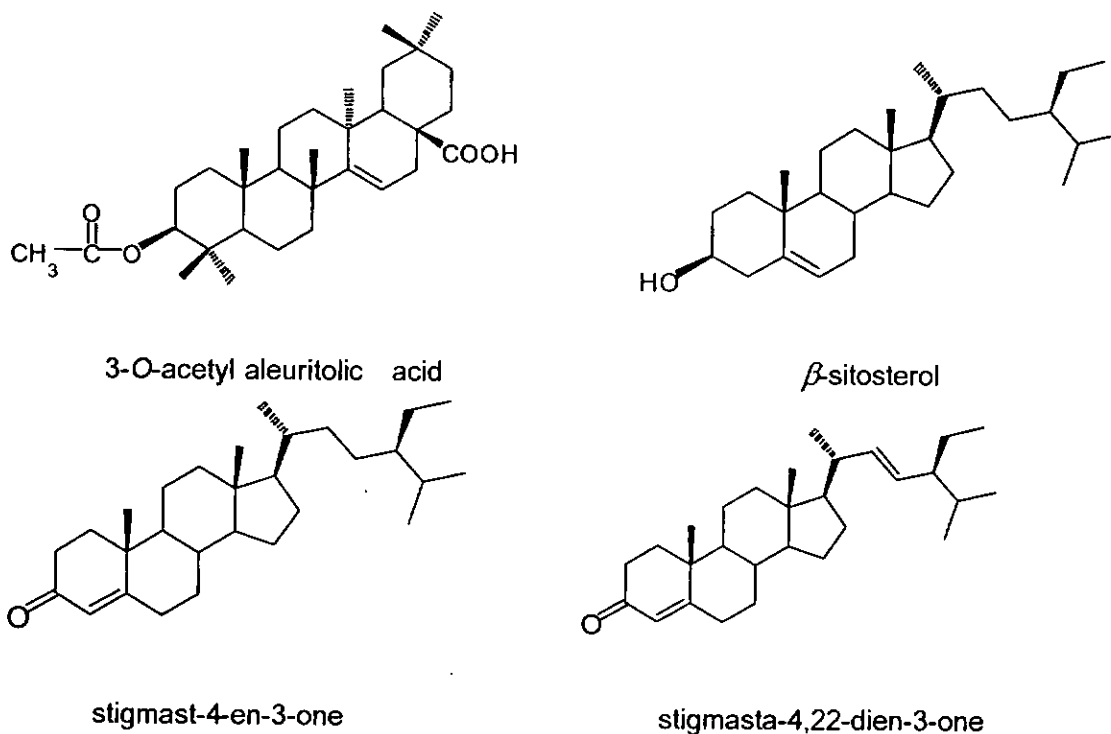
วินัย สุขราช (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane จากเหง้าพุทธรักษา (*Cannan indica* Linn.) พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ stigmasterol และ 6 β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one มีค่า ED_{50} เท่ากับ 55.50 และ 37.50 $\mu\text{g/mL}$

ตามลำดับ และกลุ่มสาร 2 กลุ่มมีค่า ED_{50} เท่ากับ 19.00 และ 21.50 $\mu\text{g/mL}$ ต่อมา
 ักัญญาณัฐ กกแก้ว (2547) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด
 chloroform และ methanol พบว่ามีค่า ED_{50} เท่ากับ 85 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ
 ในสารสกัด methanol พบ *trans-ferulic acid* และสารผสม 2 ชนิดคือ stigmasterol
 กับ β -sitosterol และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside กับ β -sitosteryl-3-O- β -D-
 glucopyranoside ทั้งในสารสกัด chloroform และ methanol นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มที่ไม่
 สามารถแยกและบ่งบอกชนิดสารได้ 1 กลุ่ม ในสารสกัด chloroform ที่มีความเป็นพิษต่อ
 เซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 12.50 $\mu\text{g/mL}$ และอีก 1 กลุ่ม ในสารสกัด methanol มีค่า
 ED_{50} เท่ากับ 19.00 $\mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 10



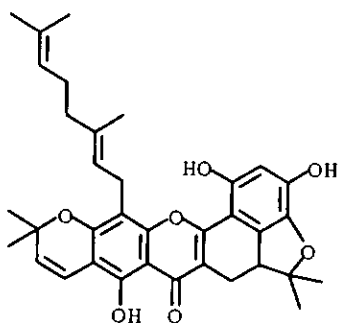
ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

อนันต์ คงชุม (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ในสารสกัด hexane ของลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.) พบ 3-O-acetyl aleuritolic acid สารผสมที่ทราบองค์ประกอบ 2 ชนิด คือ สารผสม stigmasterol กับ β -sitosterol และ สารผสม stigmaster-4-en-3-one กับ stigmaster-4,22-dien-3-one มีค่า $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ และ สารผสม 1 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ $17.00 \mu\text{g/mL}$ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 11

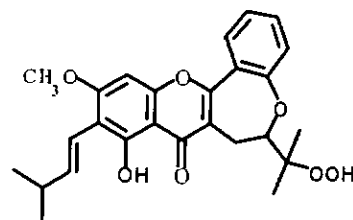


ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.)

ฮาติมและคณะ (Hakim, et al. 1999 : 613-615) ได้ศึกษาการแยกสารสกัด methanol จากเปลือกจาก *Artocarpus champeden* แล้วนำสารสกัดที่ได้แบ่งส่วนการละลาย ด้วย ethyl acetate จากนั้นแยกสารให้บริสุทธิ์ พบสารประกอบพวก flavone ชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ artoindonesianins A และ artoindonesianins B มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.0 และ $3.9 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 12



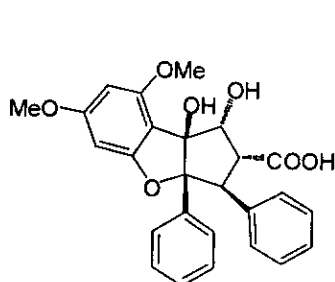
artindonesianins A



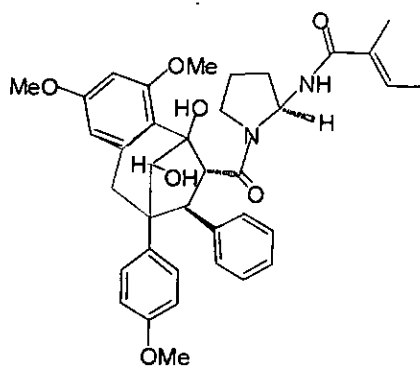
artindonesianins B

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากเปลือกกราก *Artocarpus champeden*

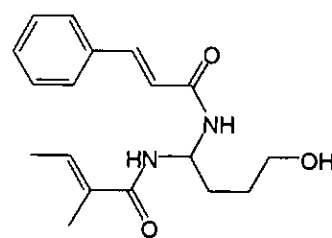
แวง เซงและดูช (Wang, Cheng & Duh. 2001 : 92-94) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด methanol จากใบ *Aglaia elliptifolia* Merr. และนำสารสกัดไปแบ่งส่วนการละลายด้วย chloroform และน้ำ พบสารประกอบที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 3 ชนิดได้แก่ rocagloic acid elliptifoline และ elliptinol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.0012 3.41 และ 3.62 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 13



rocagloic acid



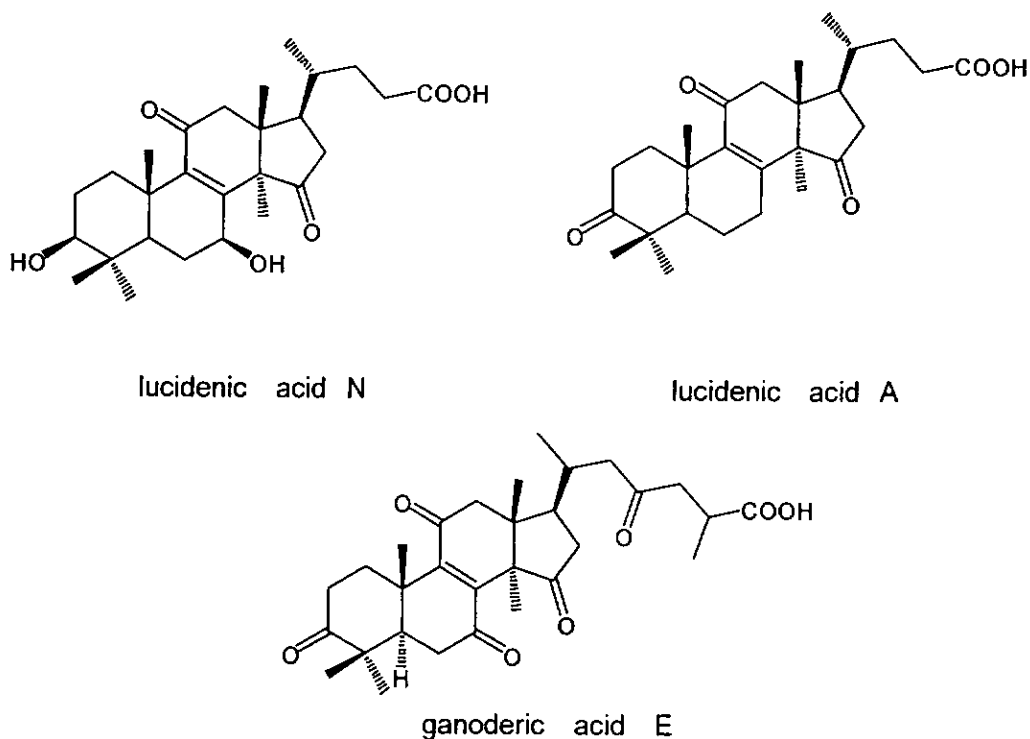
elliptifoline



elliptinol

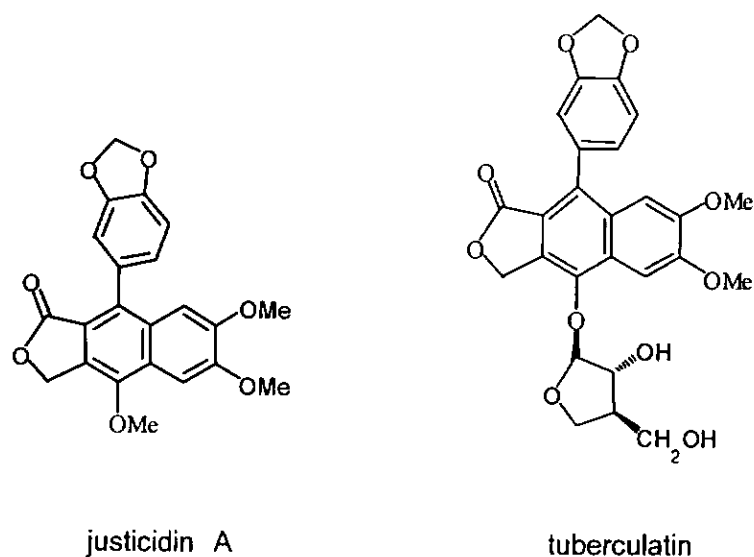
ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากใบ *Aglaia elliptifolia* Merr.

วู ชิและคู (Wu, Shi & Kuo. 2001 : 1121-1122) ได้ศึกษาสารสกัดน้ำของเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) นำสารสกัดไปแบ่งส่วนการละลายด้วย chloroform พบสารประกอบ triterpene 3 ชนิดคือ lucidenic acid N lucidenic acid A และ ganoderic acid E ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.012 0.017 และ 5.012 μM ตามลำดับ สูตรโครงสร้างสารดังภาพประกอบ 14



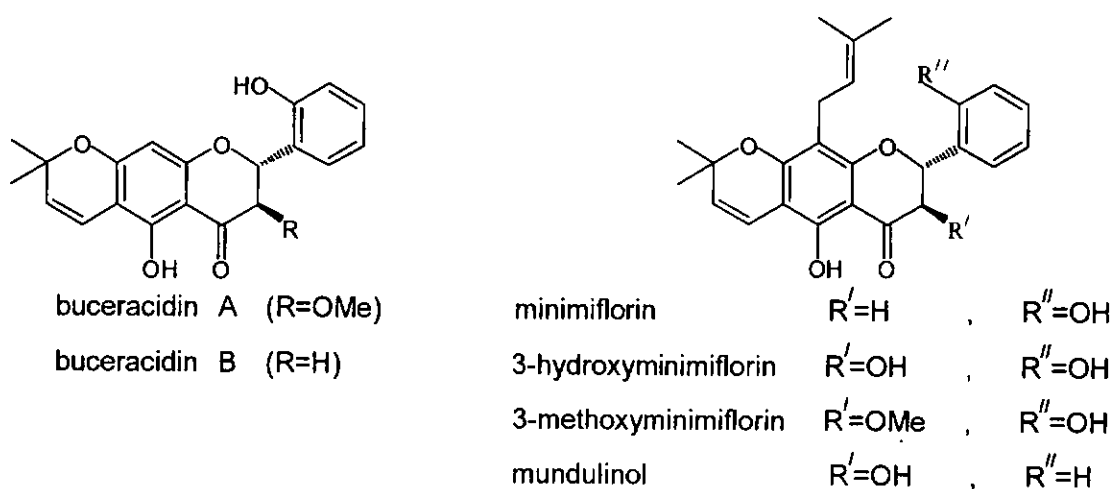
ภาพประกอบ 14 สูตรโครงสร้างสารประกอบที่แยกได้จากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)

เดย์และคณะ (Day, et al. 2002 : 379-381) ได้ศึกษาสารสกัด methanol จากทุกส่วนของ *Justicia procumbens* พบสารประกอบพวก lignan 2 ชนิดคือ justicidin A และ tuberculation ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.39 และ 0.97 µg/mL ตามลำดับสูตรโครงสร้างของสารดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากทุกส่วนของ *Justicia procumbens*

ฮายาชิและคณะ (Hayashi, et al. 2003 : 125-127) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารสกัด dichloromethane : methanol (1:1) จากกิ่งอ่อนของ *Bucida buceras* L. พบสารประกอบพวก flavanone 6 ชนิด ได้แก่ buceracidin A buceracidin B minimiflorin 3-hydroxyminimiflorin 3-methoxyminimiflorin และ mundulinol ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.6 9.3 7.5 12.8 7.0 และ 7.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สูตรโครงสร้างของสารดังกล่าวประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากกิ่งอ่อนของ *Bucida buceras* L.

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานวิจัยมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การสกัดสารจากหญ้าสาบกา การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์
2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 (Geran, et al. 1972)
3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือ ทั้งต้นของหญ้าสาบกาที่ได้จาก คลินิกนายแพทย์สมหมายทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี ได้ผ่านการตรวจสอบเอกลักษณ์โดยกลุ่มงานพฤกษศาสตร์ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์คือเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ซึ่งเลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้าสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือ

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าสาบกาและทำสารให้บริสุทธิ์

สารเคมี

1. ดินหญ้าสาบกาแห้งและบดละเอียด
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
3. Precoated TLC plate (E.Merck)

4. Silica gel สำหรับ column chromatography (0.063 – 0.200 mm, E.Merck, AR grade)
5. Silica gel สำหรับ thin-layer chromatography (silica gel GF₂₅₄ , Merck 1.05554)
6. Spray reagent (anisaldehyde 0.5 mL conc.H₂SO₄ 8 mL glacial acetic acid 10 mL methanol 85 mL)

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
2. เครื่องบดสมุนไพร
3. คอลัมน์ขนาด 1 2 3 3.5 4 5 และ 10 cm
4. หลอดกำเนิดแสงยูวี (Spectroline ENF-260 C/F)
5. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
6. Glass Drying Oven
7. Hot plate (Framo M21/1)
8. Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT – IR Spectrum BX)
9. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
10. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR ; Bruker, Advance 300)
11. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R – 114)

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารเคมี

1. Bovine Serum Albumin (BSA)
2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (E.Merck, AR grade)
3. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM ; Biowhittaker, AR grade, การเตรียมดูภาคผนวก)
4. Folin-Ciocalteau reagent (F-C)
5. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS ; การเตรียมดูภาคผนวก)
6. Newborn Calf Serum (NCS) (Biowhittaker, AR grade)
7. Phosphate Buffer Saline Solution (PBS ; การเตรียมดูภาคผนวก)
8. RPMI 1640 medium (Biowhittaker, AR grade ; การเตรียมดูภาคผนวก)
9. Trypan blue dye (AR grade ; การเตรียมดูภาคผนวก)

10. 0.25% Trypsin solution ใน HEPES buffer solution (การเตรียมดูภาคผนวก)
11. Solution A (Na_2CO_3 40.0 g NaOH 8.0 g Sodium potassium tartrate 0.4 g น้ำกลั่น 2,000 ml)
12. Solution B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g น้ำกลั่น 100 ml)
13. Solution C (ส่วนผสมระหว่าง solution A และ solution B ในอัตราส่วน 50:1 โดยปริมาตร)

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. ขวดเลี้ยงเซลล์ (aseptic flask) ขนาด 40 ml
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE240)
3. ตู้บ่ม (Shel-Lab. TC2323)
4. กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus)
5. ปิเปตขนาดต่าง ๆ
6. ขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบมีฝาปิด
7. หลอดทดลองขนาดเล็ก
8. เครื่อง centrifuge (Kubota-KC-70)
9. Hemocytometer (Boeco)
10. Pasteur pipette (Boeco)
11. Spectrophotometer (Spectronic Genesys 5, Milton Roy)
12. Vortex mixer (Genie Model K.550-GE)

ขั้นตอนการวิจัย

การสกัดสารจากหญ้าสาบกา การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์

1. การสกัดสารจากหญ้าสาบกา

1.1. การสกัดสารด้วย hexane

นำหญ้าสาบกาที่แห้งและบดละเอียด 3.90 kg มาแช่ใน hexane 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บสารละลายที่ได้มากรองกากที่เหลือไปแช่ hexane อีก 3 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัด hexane 66.00 g (ภาพประกอบ 17)

1.2. การสกัดสารด้วย ethyl acetate

กากที่เหลือจากข้อ 1.1 นำไปผึ่งให้แห้งแล้วแช่ต่อด้วย ethyl acetate 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือไปแช่ ethyl acetate อีก 3 ครั้ง ระเหยสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งหมดด้วย rotary evaporator ได้สารสกัด ethyl acetate 96.82 g

1.3. การสกัดสารด้วย methanol

นำกากที่เหลือจากข้อ 1.2 ผึ่งให้แห้งแล้วแช่ต่อด้วย methanol 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เก็บสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือไปแช่ methanol อีก 3 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการสกัดทั้งหมด มาระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ได้สารสกัด methanol 537.01 g

1.4. นำสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

2. การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์

เนื่องจากสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารสกัด hexane และ methanol จึงนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจล ประมาณ 1 : 25 โดยน้ำหนัก (Pavia, et al. 1995 : 732) ใช้วิธีบรรจุซิลิกาเจลแบบเปียกชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) การหาตำแหน่งสารบนแผ่น TLC ใช้แสง UV ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และ/หรือใช้ anisaldehyde-sulfuric acid พ่นบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 80–100 °C เป็นเวลา 5 นาที รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน สารแต่ละกลุ่มที่มีขั้วใกล้เคียงกัน แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL (ภาพประกอบ 18-25)

3. นำกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น และเป็นกลุ่มสารที่มีปริมาณมากพอมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 เนื่องจากสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีหลายกลุ่ม จึงเลือกกลุ่มสารในช่วงแรกของการแยกมาศึกษา

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

1. การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างน้ำหนัก 4.0 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม DMSO 0.1 mL เพื่อให้สารตัวอย่างละลายดีขึ้น อีกทั้ง DMSO ความเข้มข้นนี้ (0.5% v/v)

ไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง เขย่าให้ละลายเต็ม NCS 10% in RPMI 3.90 mL สารละลายที่ได้มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ปริมาตร 4 mL

2. การเตรียมสารละลาย Solvent Control

ละลาย DMSO 0.25 mL ใน NCS 10% in RPMI 9.75 mL ได้สารละลาย solvent control 10 mL

3. การเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (stock cell suspension)

เตรียม cell suspension ให้ได้เซลล์จำนวน 5×10^4 cell/mL โดยการนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้อายุประมาณ 3-4 วัน มาดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

3.1. การย้อมสีเซลล์ (dye exclusion)

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายไปทั่วขวดใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มา 0.20 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 0.40% trypan blue ลงไป 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3.2. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count)

นำเซลล์ที่ย้อมสีแล้วไปหยดลงบน Haemocytometer ซึ่งมี cover slide ปิดอยู่แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue)

นำจำนวนเซลล์ที่นับได้คำนวณค่า dilution number เพื่อเป็นข้อมูลการเจือจาง cell suspension ให้ได้ stock cell suspension จำนวน 5×10^4 cell/mL

ตัวอย่างการคำนวณค่า dilution number

ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 chamber = 245 เซลล์

(1 chamber = 5 ช่องเล็ก)

ปริมาตร 1 ช่องเล็ก = ความยาว x ความกว้าง x ความลึก
 = $0.10 \text{ cm} \times 0.10 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm}$
 = 0.0001 cm^3
 = $1 \times 10^{-4} \text{ mL}$

แต่เซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue เป็น 2 เท่า

ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 1 chamber = 245×2 เซลล์

จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก ($1 \times 10^{-4} \text{ mL}$) = $245 \times 2/5$ เซลล์

= 98 เซลล์

ปริมาตร 1 mL มีเซลล์ = 98×10^4 เซลล์

dilution number (D.N.) = $98 \times 10^4 / 5 \times 10^4$

= 19.6

นั่นคือจะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 19.6 เท่า ดังนั้นถ้าต้องการให้เซลล์ ปริมาตร 5×10^4 เซลล์ จะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 18.6 mL จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารตัวอย่าง (สารแต่ละกลุ่มทำการ ทดลอง 2 ครั้ง)

ผสมสารละลายที่ต้องการทดสอบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ (NCS 10% in RPMI ปรับค่า pH~7.0-7.2) สารละลาย solvent control และ stock cell suspension ให้ได้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบตามต้องการและให้มีเซลล์จำนวน 1×10^4 cell/mL ความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 0.5 % v/v ตัวอย่างในตาราง 1 นำไปบ่ม (incubate) ในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% ความชื้น 50% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 4 ตามวิธีการข้อ 3.1 และ 3.2

ตาราง 1 ตัวอย่างการแสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น ของสารตัวอย่าง (µg/mL)	อาหาร เลี้ยงเซลล์ (mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volumn (mL)
0	3	0.00	1.00	1	5
10	3	0.05	0.95	1	5
20	3	0.10	0.90	1	5
30	3	0.15	0.85	1	5
40	3	0.20	0.80	1	5
50	3	0.25	0.75	1	5

5. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์มานับเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) คำนวณหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

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

6. การหาค่า ED₅₀

ค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่างในหน่วย µg/mL (แกนนอน) กับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 (แกนตั้ง) จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์มะเร็ง P388 ตายครึ่งหนึ่งเป็นค่า ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/mL

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

1. การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างน้ำหนัก 2.0 mg ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม DMSO 0.04 mL เขย่าให้ละลายให้หมดแล้วเติม 10% NCS ใน EMEM 1.96 mL ลงไปผสมให้เข้ากันให้สารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ปริมาตร 2 mL

2. การเตรียมสารละลาย Solvent Control

ละลาย DMSO 0.20 mL ใน NCS 10 % ใน EMEM 9.80 mL ให้ได้สารละลาย solvent control ปริมาตร 10 mL

3. การเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (stock cell suspension)

การเตรียม cell suspension โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 4 วันจนหมด แล้วล้างเซลล์ด้วย HBSS 5 mL ย่อยเซลล์ให้หลุดด้วย 0.25% trypsin ใน HEPES buffer solution จำนวน 4-5 mL ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จนสังเกตเห็นว่าเซลล์เริ่มจะหลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นดูด trypsin ทิ้ง แล้วเติม 10% NCS ใน EMEM จำนวน 3 mL ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อชะเซลล์ให้หลุดออกจากผิวขวดเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เติมหาอาหารลงไปอีกประมาณ 7 mL เขย่าเพื่อให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ จากนั้นนำ cell suspension ที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์ โดยวิธีการย้อมสี ตามข้อ 3.1 และ 3.2 แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จนได้จำนวนเซลล์เป็น 4×10^4 cell/mL เช่นเดียวกับการเตรียมเซลล์มะเร็ง P388

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่าง (สารแต่ละกลุ่มทำการทดลอง 2 ครั้ง)

การเตรียมสารละลายสำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

4.1. สารละลาย Negative Control Day 0 (NC-0) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ในหลอด centrifuge นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS นำไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม ดูดสารละลาย PBS ทิ้ง นำเซลล์ไปเก็บที่ 0°C

4.2. สารละลาย Negative Control Day 4 (NC-4) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี 2.0% DMSO ใน 10% NCS ใน EMEM 1 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน

4.3. สารละลาย Positive Control Day 4 (PC-4) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี 5-FU (ความเข้มข้น 4 µg/mL) 1 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน

4.4. สารละลาย Test Solution Day 4 (TS-4 , สารละลายตัวอย่างที่ทดสอบ) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีสารตัวอย่างที่ผสมกับ solvent control ตามความเป็นเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ใช้ปริมาตร 1 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน

ตาราง 2 ตัวอย่างการแสดงผลของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น ของสารตัวอย่าง (µg/mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volumn (mL)
0	0.00	1.00	3	4
10	0.04	0.90	3	4
20	0.08	0.92	3	4
30	0.12	0.88	3	4
40	0.16	0.84	3	4

5. หลังจากครบ 4 วัน นำ NC-4 PC-4 และ TS-4 เทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ทั้งสารละลาย PBS วัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยการหาปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ โอยามา และ อิกิล (Oyama & Eagle. 1956 : 305-307) พร้อมกับ NC-0 ดังนั้น นำ NC-0 NC-4 PC-4 และ TS-4 มาเติม solution C ขวดละ 5 mL เพื่อละลายโปรตีนออกจากเซลล์ นำไปเขย่าด้วย vortex mixer ได้เป็น cell solution จากนั้น นำ cell solution ที่ได้หาปริมาณโปรตีน ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 การผสมสารเพื่อหาปริมาณโปรตีนของ NC-0 NC-4 PC-4 และ TS-4

	cell solution (mL)	solution C (mL)	น้ำกลั่น (mL)	สารละลาย F-C : น้ำ (5 : 7) (mL)
blank	-	5	1	0.5
NC-0	1	4	1	0.5
NC-4	1	4	1	0.5
PC-0	1	4	1	0.5
TS-4	1	4	1	0.5

หลังจากผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะมีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm วัดให้เสร็จภายใน 2 ชั่วโมง

6. การทดลองแต่ละครั้งมีการคำนวณค่า (O.D.Day 4)/(O.D.Day 0) เพื่อแสดงถึงอัตราส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เนื่องจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้เซลล์มะเร็ง MCF-7 มีอัตราส่วนการเจริญเติบโตประมาณ 4 เท่า ดังนั้นในการทดลองค่า (O.D.Day 4)/(O.D.Day 0) ที่ได้ควรมีค่าประมาณ 4 เท่า จึงถือว่าการทดลองนั้นเซลล์ที่ใช้มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ

7. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น คำนวณหาค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งคำนวณได้จากสมการดังนี้

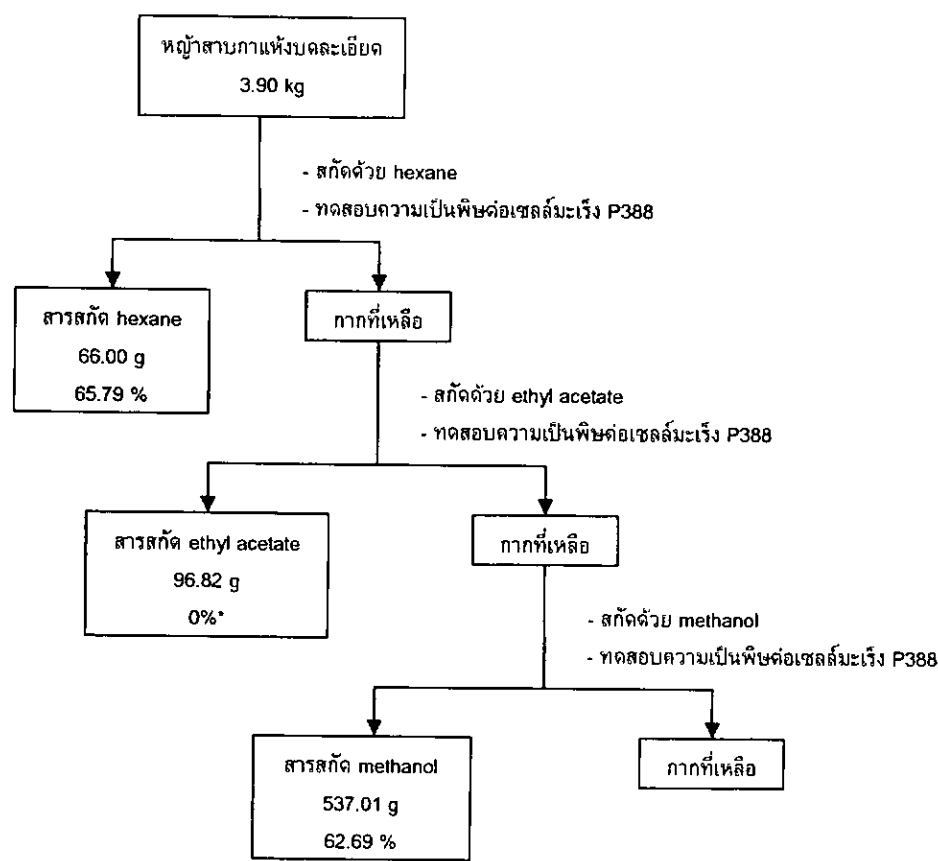
ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง =
$$\frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของกลุ่มทดลอง(TS-4)} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของกลุ่มควบคุม(NC-4)}}$$

8. การหาค่า ED₅₀

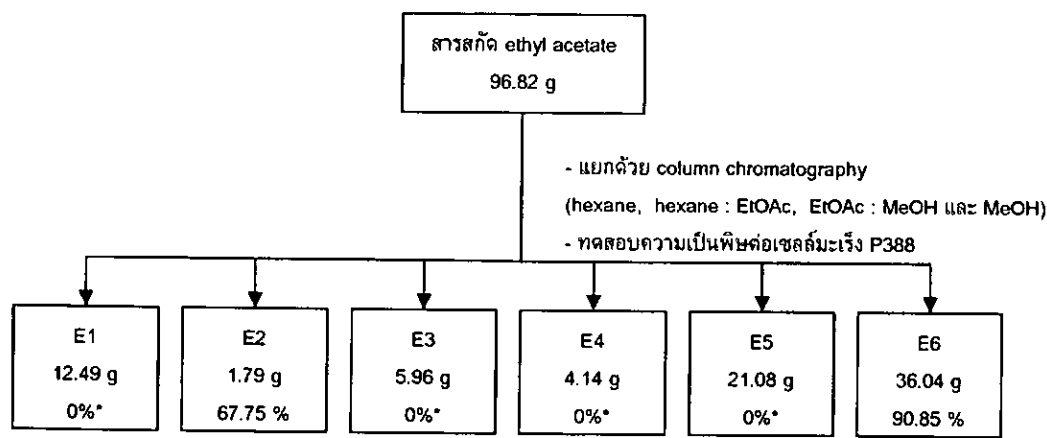
ค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่างในหน่วย µg/mL (แกนนอน) กับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ในวันที่ 4 (แกนตั้ง) จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์มะเร็ง MCF-7 ตายครึ่งหนึ่งเป็นค่า ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/mL

การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

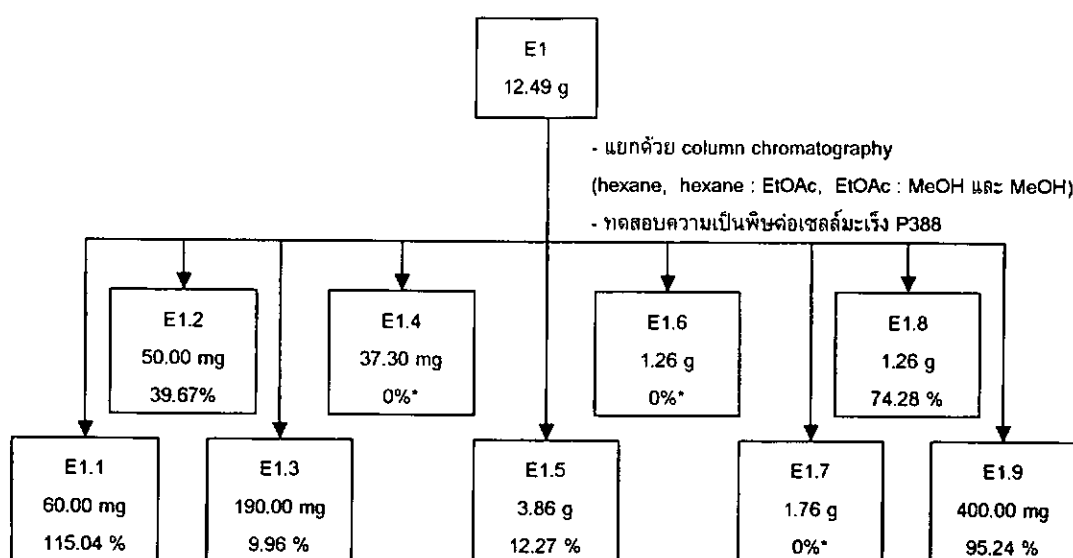
นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากหญ้าสาบงามาหาจุดหลอมเหลว (°C) และวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีโดย IR spectra แถบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (ν_{max},cm⁻¹) NMR spectra (ppm ที่ downfield จาก TMS) และ Mass spectra (m/z)



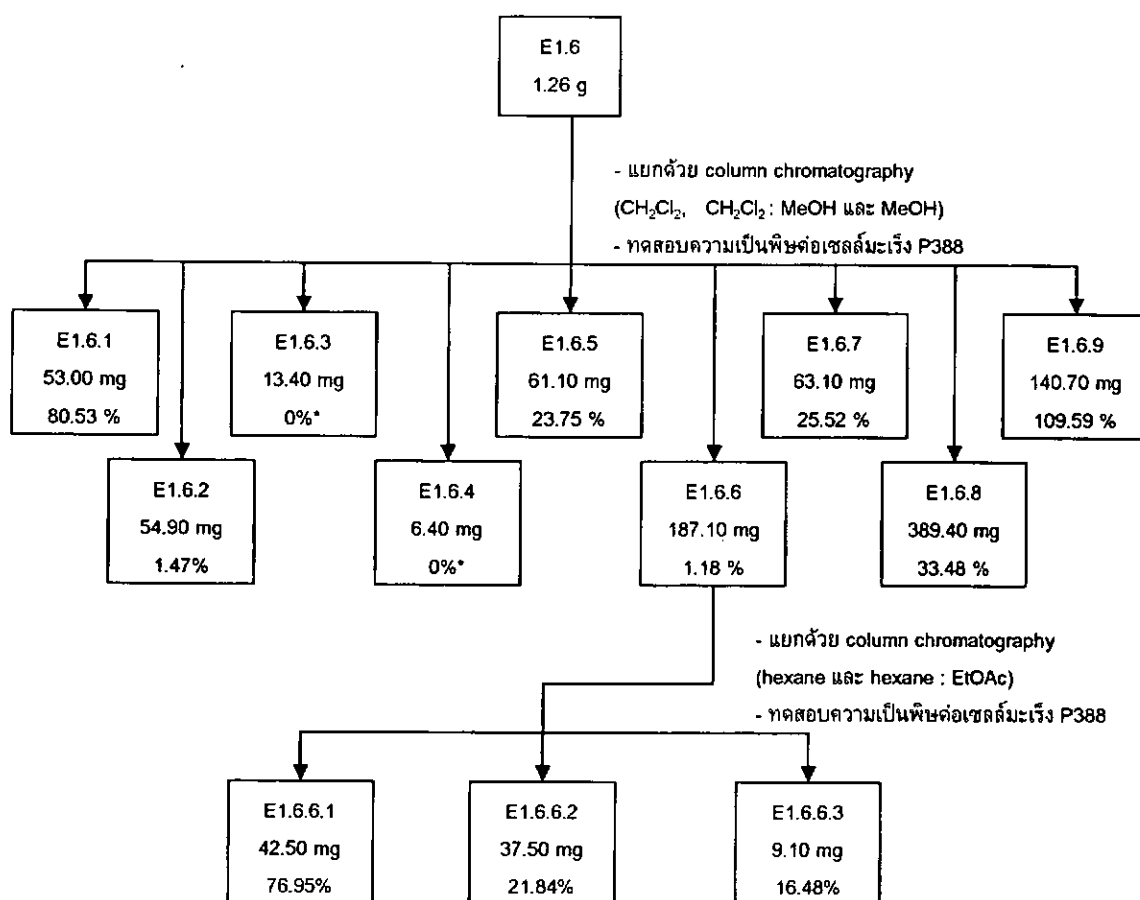
ภาพประกอบ 17 ขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าสาบกาและคำร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



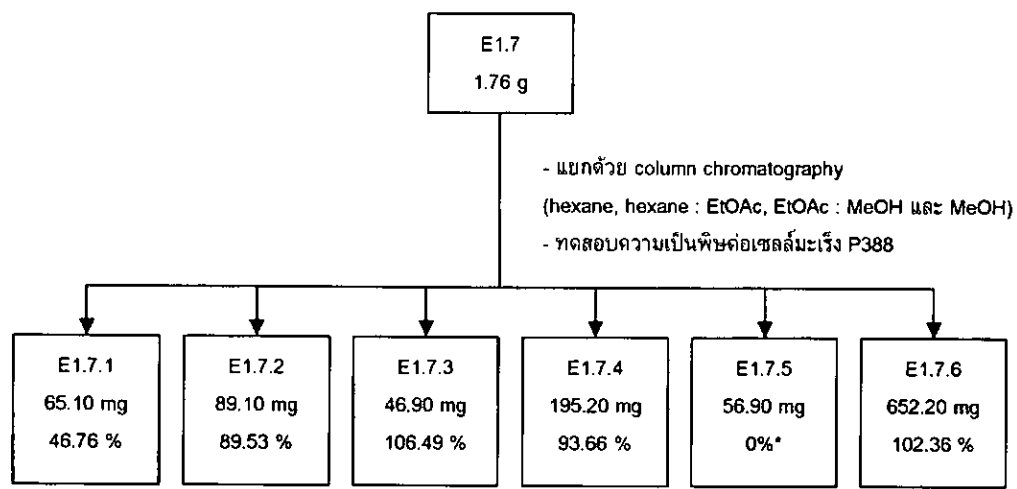
ภาพประกอบ 18 ขั้นตอนการแยกสารสกัด ethyl acetate และคำร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



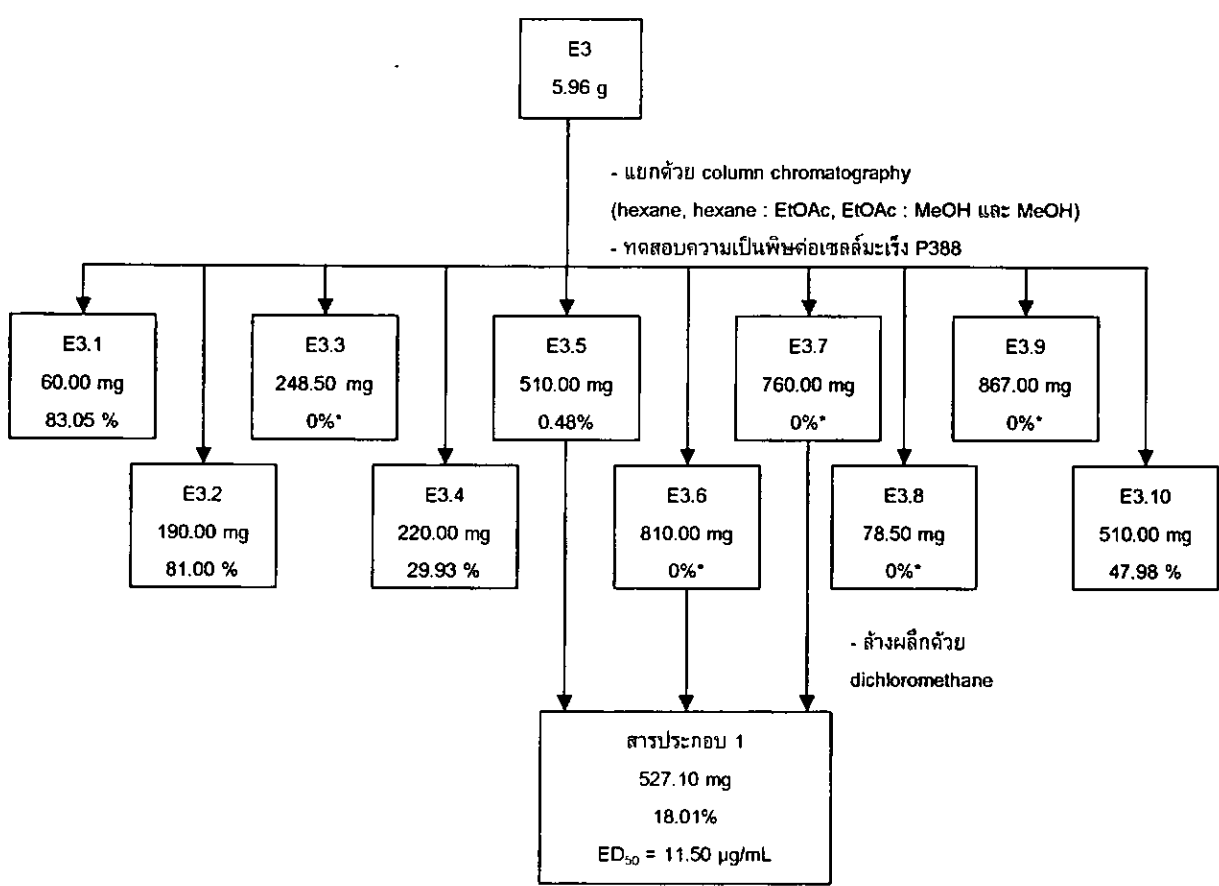
ภาพประกอบ 19 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1 และคำร้อยละการเจริญเติบโตของ
เซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



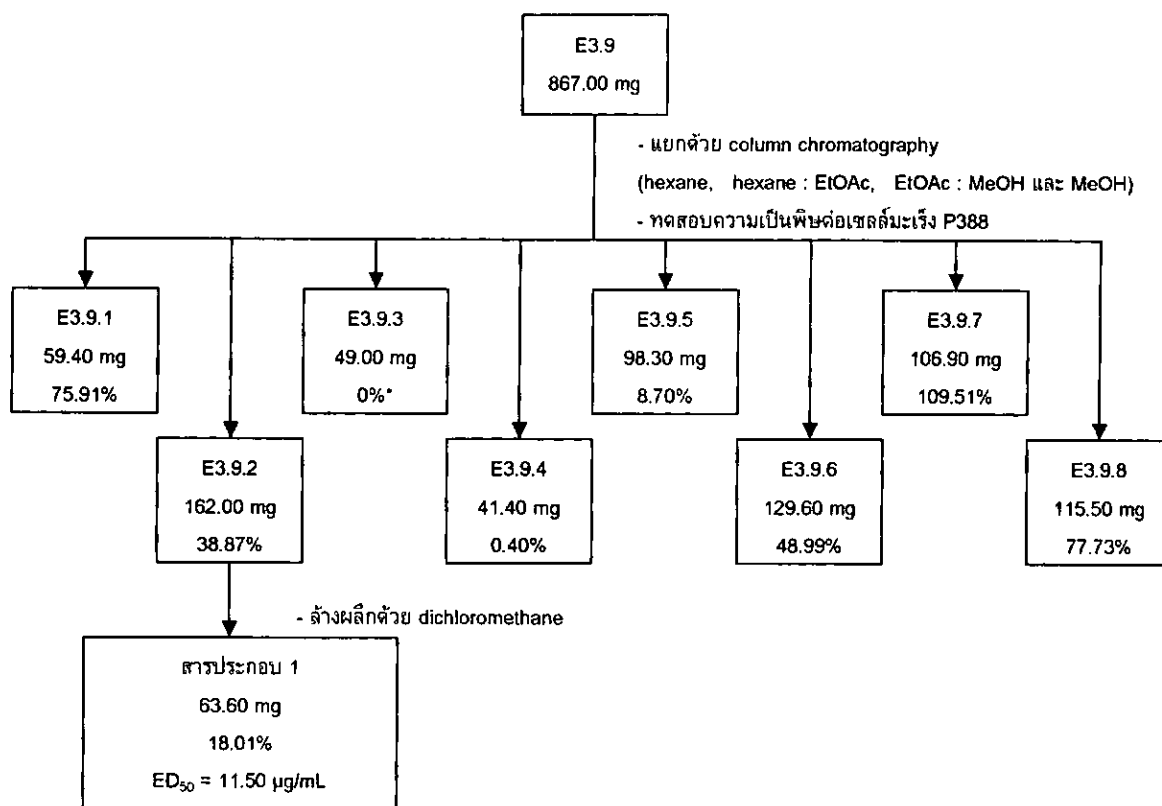
ภาพประกอบ 20 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1.6 และคำร้อยละการเจริญเติบโตของ
เซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



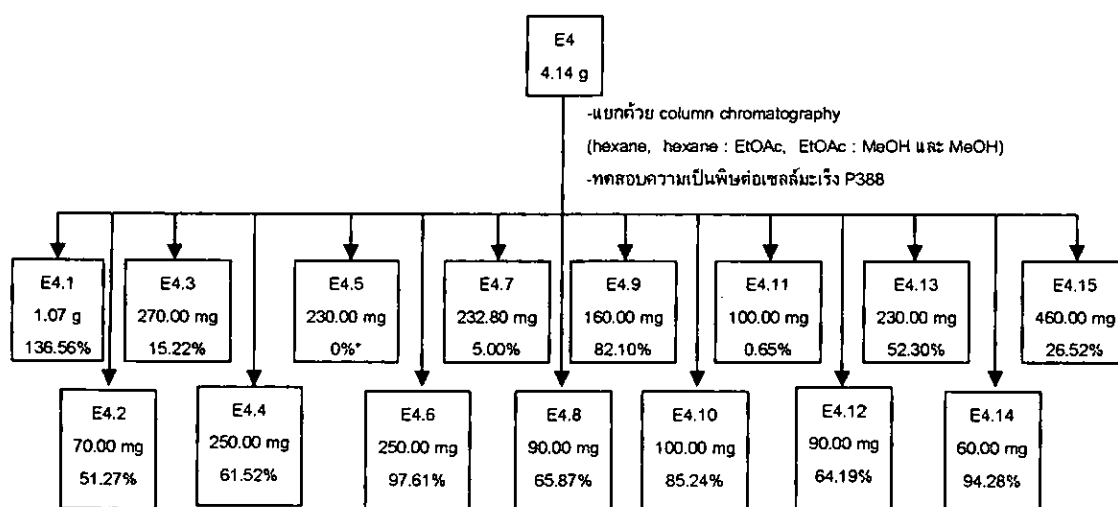
ภาพประกอบ 21 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E1.7 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



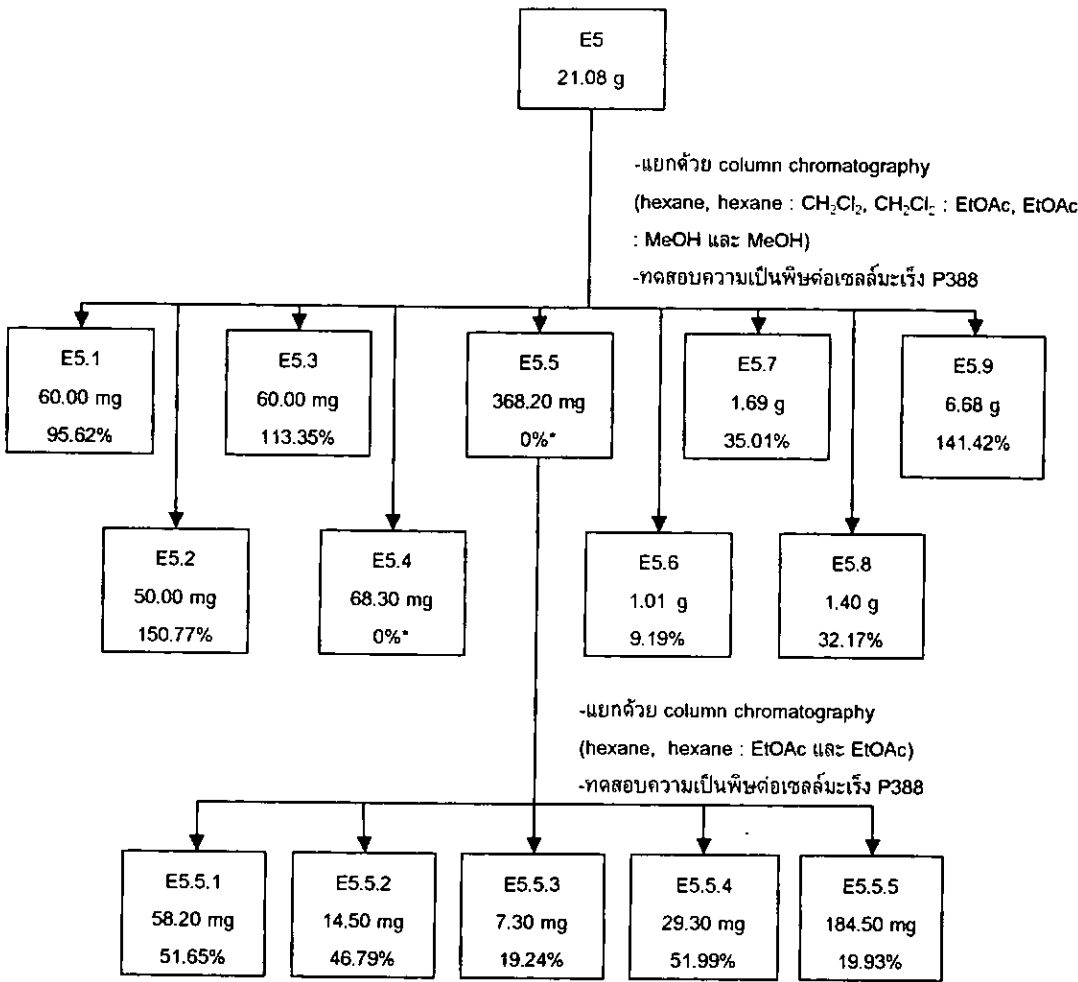
ภาพประกอบ 22 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E3 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



ภาพประกอบ 23 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E3.9 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



ภาพประกอบ 24 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E4 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)



ภาพประกอบ 25 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E5 และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (* ไม่พบเซลล์มะเร็ง)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากหญ้าสาบกา

ผลจากการสกัดหญ้าสาบกา 3.90 kg ด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีเขียวน้ำหนัก 66.00 g สารสกัด ethyl acetate มีลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำหนัก 96.82 g และสารสกัด methanol มีลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีดำหนัก 537.01 g

2. ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate และทำสารให้บริสุทธิ์

2.1. จากการนำสารสกัด ethyl acetateหนัก 96.82 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10.0 cm) ใช้ซิลิกาเจล 1.50 kg เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ methanol โดยค่อยๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 100 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 6 กลุ่ม (E1-E6) (ตาราง 4) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E1 E3 E4 และ E5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 17) จึงนำสารกลุ่ม E1 E3 E4 และ E5 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ

ตาราง 4 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane : EtOAc	(80 : 20)	E1	12.49 g	ของเหลวข้นสีดำ
	(55 : 45)	E2	1.79 g	เหนียวสีดำ
	(45 : 55)	E3	5.96 g	เหนียวสีดำปนของแข็งสีขาว
	(25 : 75)	E4	4.14 g	เหนียวหนืดสีดำ
EtOAc : MeOH	(95 : 5)	E5	21.08 g	ของเหลวเหนียวหนืดสีดำ
	(30 : 70)	E6	36.04 g	ของเหลวเหนียวหนืดสีดำ

2.2. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E1หนัก 12.49 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 250.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane และ hexane : ethyl acetate เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 50 mL มาระเหยตัวทำละลายออกตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 9 กลุ่ม (E1.1-E1.9) (ตาราง 5) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E1.4 E1.6 และ E1.7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 18) จึงนำสารกลุ่ม E1.6 และ E1.7 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ แต่เนื่องจาก E1.4 มีปริมาณน้อยและเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 60 : 40) พบว่ายังมีสารอีกอย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่สามารถนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ จึงได้ศึกษาเพียงค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม E1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane: EtOAc (90 : 10)	E1.1	60.00 mg	ของเหลวหนืดสีเหลือง
(80 : 20)	E1.2	50.00 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
(70 : 30)	E1.3	190.00 mg	เหนียวสีเขียวดำ
(60 : 40)	E1.4	37.30 mg	เหนียวหนืดสีดำ
(50 : 50)	E1.5	3.86 g	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
(40 : 60)	E1.6	1.26 g	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
(30 : 70)	E1.7	1.76 g	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
(10 : 90)	E1.8	1.26 g	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
(0 : 100)	E1.9	400.00 mg	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ

2.3. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E1.6หนัก 1.26 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 40.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ dichloromethane : methanol และเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 30 mL เมื่อนำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 9 กลุ่ม (E1.6.1-E1.6.9) (ตาราง 6) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 E1.6.4 และ E1.6.6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 20) จึงนำสารกลุ่ม E1.6.6 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ แต่เนื่องจากสาร E1.6.2 E1.6.3 และ E1.6.4 มีปริมาณน้อยเพียงพอสำหรับหาค่า ED₅₀ เท่านั้น ประกอบกับเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 95.5 : 0.5) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
CH ₂ Cl ₂ : MeOH (100 : 0)	E1.6.1	53.00 mg	ของเหลวหนืดสีเหลืองน้ำตาล
(99.9 : 0.1)	E1.6.2	54.90 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
(99.8 : 0.2)	E1.6.3	13.40 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
(99.6 : 0.4)	E1.6.4	6.40 mg	ของเหลวหนืดสีเหลืองแดง
(99.5 : 0.5)	E1.6.5	61.10 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
(99.2 : 0.8)	E1.6.6	187.10 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ
(99.0 : 1.0)	E1.6.7	63.10 mg	ของเหลวหนืดสีเขียวเหลือง
(97.5 : 2.5)	E1.6.8	389.40 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ
(97.0 : 3.0)	E1.6.9	140.70 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ

2.4. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E1.6.6 น้ำหนัก 187.10 mg ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm) ใช้ซิลิกาเจล 20.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane และ hexane : ethyl acetate เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 20 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 3 กลุ่ม (E1.6.6.1-E1.6.6.3) (ตาราง 7) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ (ตาราง 21) จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.6.6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane : EtOAc (80 : 20)	E1.6.6.1	42.50 mg	น้ำมันสีน้ำตาล
(70 : 30)	E1.6.6.2	37.50 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ
(50 : 50)	E1.6.6.3	9.10 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ

2.5. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E1.7 น้ำหนัก 1.76 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 50.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane และ hexane : ethyl acetate โดยค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 30 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 6 กลุ่ม (E1.7.1-E1.7.6) (ตาราง 8) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E1.7.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 20) แต่สารกลุ่ม E1.7.5 มีปริมาณน้อยเมื่อ

ตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 60 : 40) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 4 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ เพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม E1.7 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane: EtOAc	(88 : 12)	E1.7.1	65.10 mg	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
	(82 : 18)	E1.7.2	89.10 mg	น้ำมันสีน้ำตาล
	(75 : 25)	E1.7.3	46.90 mg	ของแข็งสีขาวปนของเหลวสีน้ำตาล
	(65 : 35)	E1.7.4	195.20 mg	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
	(60 : 40)	E1.7.5	56.90 mg	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ
	(20 : 80)	E1.7.6	625.20 mg	เหนียวหนืดสีดำ

2.6. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3หนัก 5.96 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 125.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate เก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 50 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 10 กลุ่ม (E3.1-E3.10) (ตาราง 9) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E3.3 E3.5 E3.6 E3.7 E3.8 และ E3.9 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 24) จึงนำสารกลุ่ม E3.3 E3.5 E3.6 E3.7 และ E3.9 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ และเนื่องจาก E3.8 มีปริมาณน้อยและเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 70 : 30) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ เพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่ม E3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane: EtOAc	(95 : 5)	E3.1	60.00 mg	น้ำมันสีเหลือง
	(90 : 10)	E3.2	190.00 mg	ไขสีส้ม
	(85 : 15)	E3.3	248.50 mg	ไขสีส้มน้ำตาล
	(80 : 20)	E3.4	220.00 mg	ไขสีน้ำตาล
	(75 : 25)	E3.5	510.00mg	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำปนของแข็ง
	(70 : 30)	E3.6	810.00 mg	เหนียวหนืดสีดำปนของแข็งสีขาว
	(65 : 35)	E3.7	760.00 mg	เหนียวหนืดสีดำปนของแข็งสีขาว
	(50 : 50)	E3.8	78.50 mg	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
	(20 : 80)	E3.9	867.00 mg	ของเหลวหนืดสีดำ
	(0 : 100)	E3.10	510.00 mg	ของเหลวหนืดสีดำ

2.7. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.3 น้ำหนัก 248.00 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 20.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate ได้ของแข็งสีขาวหนัก 5.18 mg นำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นสารกลุ่ม long chain hydrocarbon

2.8. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.5 ลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำปนของแข็งสีขาว โดยการล้างด้วย ethyl acetate ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 114.60 mg ให้ชื่อว่า สารประกอบ 1 นำสารประกอบ 1 ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและหาค่า ED₅₀

2.9. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.6 ลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีดำปนของแข็งสีขาว โดยการล้างด้วย ethyl acetate ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 285.40 mg เป็นสารประกอบ 1

2.10. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.7 ลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีดำปนของแข็งสีขาว โดยการล้างด้วย ethyl acetate ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 127.10 mg เป็นสารประกอบ 1

2.11. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.9 น้ำหนัก 867.00 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 40.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 30 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันได้สาร 8 กลุ่ม (E3.9.1-E3.9.8) (ตาราง 10) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 27) เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 65 : 35) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 4 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ เพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม E3.9 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane: EtOAc	(97 : 3)	E3.9.1	59.40 mg	น้ำมันสีส้ม
	(91 : 9)	E3.9.2	110.50 mg	ของเหลวสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว
	(85 : 15)	E3.9.3	49.00 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(80 : 20)	E3.9.4	41.40 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(75 : 25)	E3.9.5	98.30 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(65 : 35)	E3.9.6	129.60 mg	เหนียวหนืดเขียวดำ
	(50 : 50)	E3.9.7	106.90 mg	ของเหลวหนืดสีดำ
EtOAc : MeOH	(90 : 10)	E3.9.8	115.50 mg	ของเหลวหนืดสีดำ

2.12. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E3.9.2 ลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว โดยการล้างด้วย ethyl acetate ได้ผลลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 63.60 mg เป็นสารประกอบ 1

2.13. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E4 หนัก 4.14 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 75.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate, ethyl acetate : methanol และ methanol เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 100 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 15 กลุ่ม (E4.1-E4.15) (ตาราง 11) นำแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E4.5 E4.7 และ E4.11 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 29) จึงนำสารกลุ่ม E4.5 และ E4.7 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ แต่เนื่องจากสารกลุ่ม E4.11 มีปริมาณน้อยและเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 85 : 15) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ เพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม E4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane: EtOAc	(100 : 0)	E4.1	1.07 g	ของเหลวใส
	(99 : 1)	E4.2	70.00 mg	น้ำมันสีน้ำตาล
	(98.5 : 1.5)	E4.3	270.00 mg	ของเหลวเหนียวข้นสีเหลือง
	(98 : 2)	E4.4	250.00 mg	ไขสีเหลือง
	(97.5 : 2.5)	E4.5	230.00 mg	ไขสีน้ำตาลเข้ม
	(94 : 6)	E4.6	250.00 mg	ของเหลวข้นสีน้ำตาลเหลือง
	(90 : 10)	E4.7	232.80 mg	เหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(87.5 : 12.5)	E4.8	90.00 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(85 : 15)	E4.9	160.00 mg	ของเหลวข้นสีน้ำตาล
	(80 : 20)	E4.10	100.00 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(75 : 25)	E4.11	100.00 mg	เหนียวหนืดเขียวดำ
	(70 : 30)	E4.12	90.00 mg	เหนียวหนืดดำ
	(50 : 50)	E4.13	230.00 mg	เหนียวหนืดสีเหลืองดำ
EtOAc : MeOH	(50 : 50)	E4.14	60.00 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(0 : 100)	E4.15	460.00 mg	เหนียวหนืดสีเหลืองดำ

2.14. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E4.5 หนัก 230.00 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 40.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate ได้ของแข็งสีขาวหนัก 6.87 mg นำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นสารกลุ่ม long chain hydrocarbon

2.15. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E4.7หนัก 232.80 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 20.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate ได้ของแข็งสีขาวหนัก 5.22 mg นำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นสารกลุ่ม long chain hydrocarbon

2.16. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E5 หนัก 21.08 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 75.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane, hexane : dichloromethane และ dichloromethane : ethyl acetate เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 100 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 9 กลุ่ม (E5.1-E5.9) (ตาราง 12) นำแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E5.4 และ E5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 31) จึงนำสารกลุ่ม E5.5 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ต่อ แต่เนื่องจากสารกลุ่ม E5.4 มีปริมาณน้อยและเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : EtOAc = 70 : 30) พบว่ายังมีสารอย่างน้อย 4 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อ เพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀ เท่านั้น

ตาราง 12 ผลการแยกสารกลุ่ม E5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane:CH ₂ Cl ₂	(90:10)	E5.1	ไขสีเหลืองส้ม
	(80:20)	E5.2	ไขสีส้มน้ำตาล
	(40:60)	E5.3	ไขสีน้ำตาล
	(30:70)	E5.4	เหนียวหนืดสีดำ
	(20:80)	E5.5	เหนียวหนืดสีดำ
	(0:100)	E5.6	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
CH ₂ Cl ₂ :EtOAc	(90:10)	E5.7	เหนียวหนืดสีดำ
	(70:30)	E5.8	เหนียวหนืดสีดำ
	(50:50)	E5.9	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ

2.17. ผลจากการแยกสารกลุ่ม E5.5 หนัก 368.20 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 75.00 g เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยตัวทำละลาย hexane และ hexane : ethyl acetate เมื่อเก็บสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 30 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออกตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 5 กลุ่ม (E5.5.1-E5.5.5) (ตาราง 13) นำแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ (ตาราง 33) จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 13 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
hexane : EtOAc	(93 : 7)	E5.5.1	58.20 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(90 : 10)	E5.5.2	14.50 mg	เหนียวหนืดสีดำ
	(85 : 15)	E5.5.3	7.30 mg	ของเหลวหนืดสีดำ
	(80 : 20)	E5.5.4	29.30 mg	ของเหลวหนืดสีดำ
	(70 : 30)	E5.5.5	184.50 mg	ของเหลวหนืดสีดำ

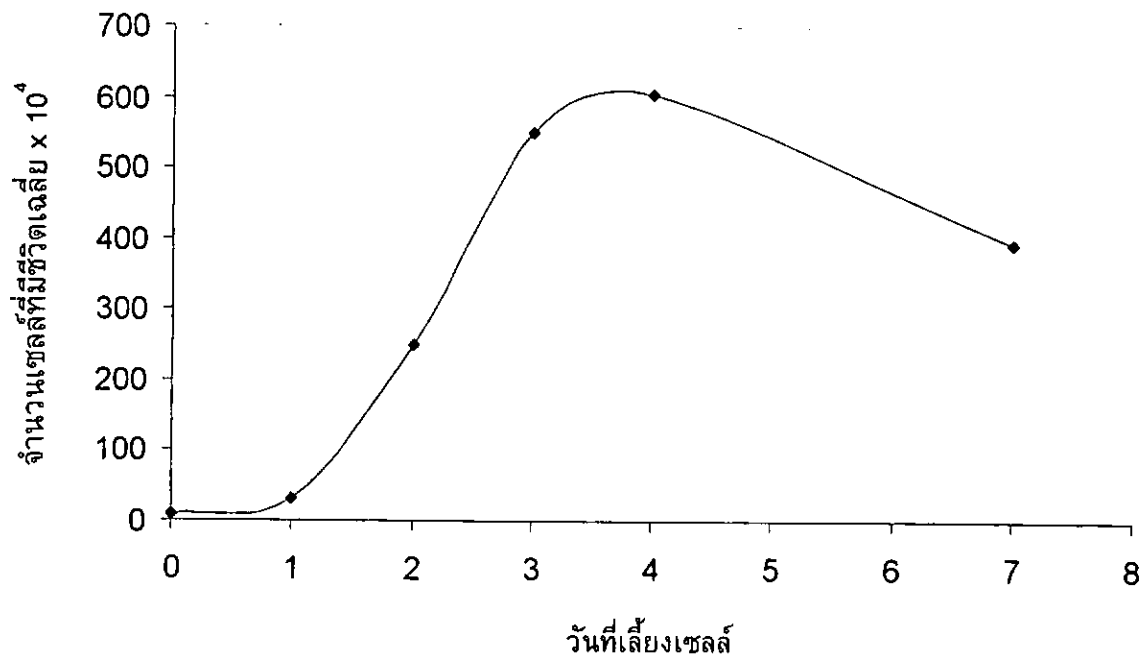
3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.1. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

ผลการนับเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ แสดงในตาราง 14 นำข้อมูลมาเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต (growth curve) บนกระดาษกราฟ ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างวันที่ทำการทดลอง (แกนนอน) กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกนตั้ง) แสดงในภาพประกอบ 26

ตาราง 14 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด (5 ml)		
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4
1	2.80×10^5	2.40×10^5	2.60×10^5
2	2.60×10^6	2.32×10^6	2.50×10^6
3	5.44×10^6	5.92×10^6	5.68×10^6
4	6.04×10^6	6.18×10^6	6.11×10^6
7	3.90×10^6	3.98×10^6	3.93×10^6



ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P388 เจริญเติบโตในขวดเลี้ยงเซลล์ได้ดีในระยะ 4 วันแรกที่ทำการศึกษา โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตสูงสุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด P388

3.2. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol

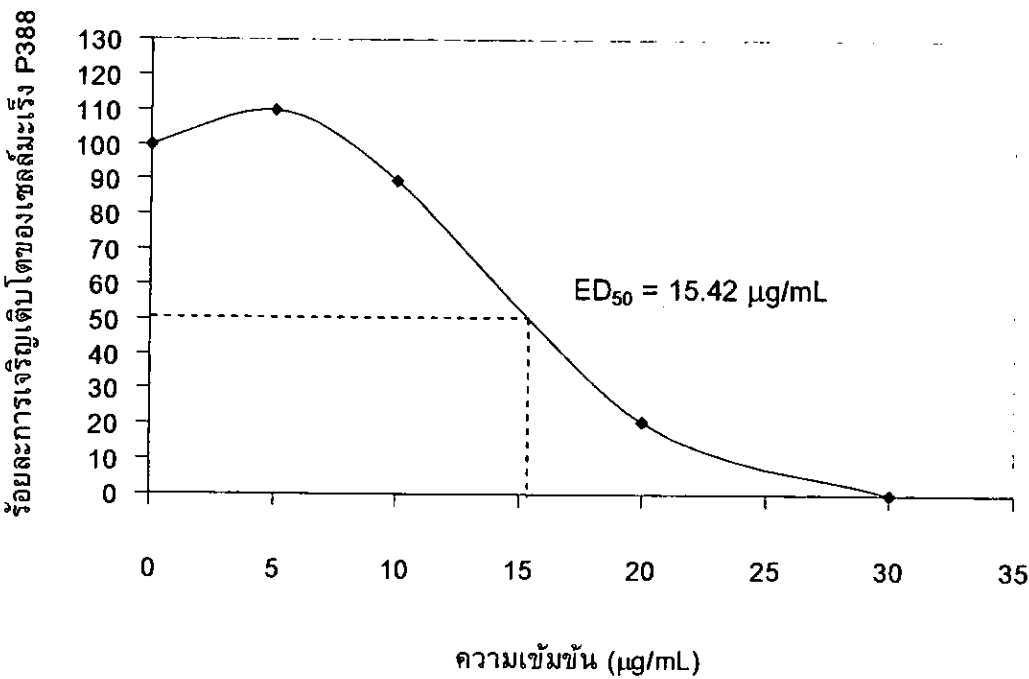
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL จากการนับจำนวนเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 ของการทดลอง พบว่าสารสกัด hexane และ methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ ส่วนสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง (ตาราง 15) และพบว่าสารสกัด ethyl acetate มีค่า ED₅₀ 15.42 µg/mL ดังตาราง 16 และภาพประกอบ 27

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.46×10^5	100.00
สารสกัด hexane	5.00×10^4	4.25×10^5	65.79
สารสกัด ethyl acetate	5.00×10^4	0.00	0.00
สารสกัด methanol	5.00×10^4	4.05×10^5	62.69

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด ethyl acetate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.23×10^5	100.00
5	5.00×10^4	6.06×10^5	115.87
10	5.00×10^4	4.69×10^5	89.67
20	5.00×10^4	1.08×10^5	20.65
30	5.00×10^4	0.00	0.00



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารสกัด ethyl acetate ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จาก สารสกัด ethyl acetate

จากการแยกสารสกัด ethyl acetate ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารสกัด hexane และ methanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 6 กลุ่ม (ตาราง 4) สารทั้ง 6 กลุ่ม (E1-E6) เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL (ตาราง 17) พบว่าสารกลุ่ม E1 E3 E4 และ E5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำมาศึกษาต่อได้ผลดังนี้

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1 ถึง E6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	7.10x10 ⁶	100.00
E1	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E2	5.00x10 ⁴	4.81x10 ⁶	67.75
E3	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E4	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E5	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E6	5.00x10 ⁴	6.45x10 ⁶	90.85

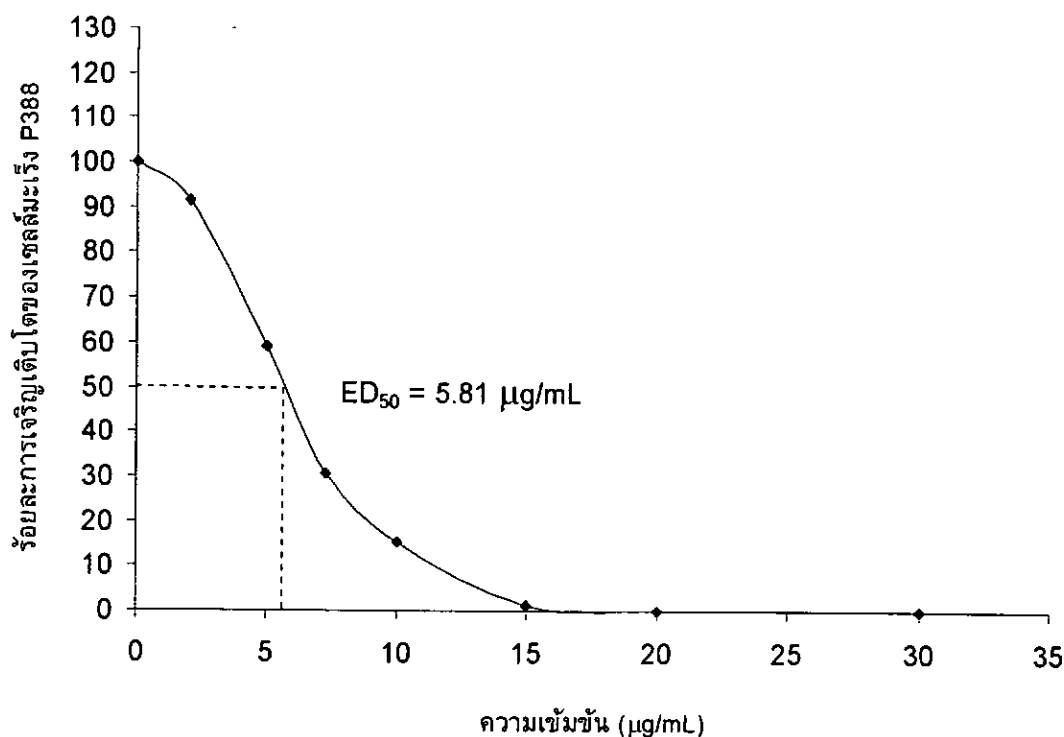
3.3.1. เมื่อแยกสารกลุ่ม E1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 9 กลุ่ม (ตาราง 5) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL (ตาราง 18) พบว่าสารกลุ่ม E1.4 E1.6 และ E1.7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง จึงนำมาแยกและศึกษาความเป็นพิษต่อ แต่เนื่องจากสารกลุ่ม E1.4 มีปริมาณน้อยไม่สามารถแยกต่อได้ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารกลุ่ม E1.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 5.81 µg/mL ดังแสดงในตาราง 19 และ ภาพประกอบ 28

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.1 ถึง E1.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	5.52x10 ⁵	100.00
E1.1	5.00x10 ⁴	6.35x10 ⁵	115.04
E1.2	5.00x10 ⁴	2.19x10 ⁵	39.67
E1.3	5.00x10 ⁴	6.90x10 ⁵	9.96
E1.4	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E1.5	5.00x10 ⁴	8.50x10 ⁵	12.27
E1.6	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E1.7	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E1.8	5.00x10 ⁴	4.10x10 ⁵	74.28
E1.9	5.00x10 ⁴	6.60x10 ⁵	95.24

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด(5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	4.14x10 ⁵	100.00
2	5.00x10 ⁴	3.79x10 ⁵	91.53
5	5.00x10 ⁴	2.52x10 ⁵	60.86
7	5.00x10 ⁴	1.22x10 ⁵	29.36
10	5.00x10 ⁴	6.00x10 ⁵	14.50
15	5.00x10 ⁴	5.00x10 ⁴	1.21
20	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00



ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E1.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ผลจากการแยกสารกลุ่ม E1.6 และ E1.7 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารกลุ่ม E1.6 แยกได้ 9 กลุ่ม (ตาราง 6) และสารกลุ่ม E1.7 แยกได้ 6 กลุ่ม (ตาราง 8) เมื่อนำสารทั้งหมดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL (ตาราง 20) พบว่าสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 E1.6.4 และ E1.7.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 แต่เนื่องจากมีเพียงกลุ่มเดียวคือ E1.6.6 ที่มีปริมาณมากพอที่จะนำมาแยกต่อได้ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสาร 3 กลุ่ม (ตาราง 7) ซึ่งสารกลุ่มทั้ง 3 กลุ่ม มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ต่ำ (ร้อยละการเจริญเติบโต > 5.00%) ดังแสดงในตาราง 21

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกได้จากกลุ่ม E1.6 และ E1.7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.78×10^5	100.00
E1.6.1	5.00×10^4	5.46×10^5	80.53
E1.6.2	5.00×10^4	1.00×10^5	1.47
E1.6.3	5.00×10^4	0.00	0.00
E1.6.4	5.00×10^4	0.00	0.00
E1.6.5	5.00×10^4	1.61×10^6	23.75
E1.6.6	5.00×10^4	8.00×10^4	1.18
E1.6.7	5.00×10^4	1.73×10^6	25.52
E1.6.8	5.00×10^4	2.27×10^6	33.48
E1.6.9	5.00×10^4	7.43×10^5	109.59
E1.7.1	5.00×10^4	3.17×10^5	46.76
E1.7.2	5.00×10^4	6.07×10^5	89.53
E1.7.3	5.00×10^4	7.22×10^6	106.49
E1.7.4	5.00×10^4	6.35×10^6	93.66
E1.7.5	5.00×10^4	0.00	0.00
E1.7.6	5.00×10^4	6.94×10^6	102.36

ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.6.6.1 ถึง E1.6.6.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.77×10^5	100.00
E1.6.6.1	5.00×10^4	4.44×10^5	76.95
E1.6.6.2	5.00×10^4	1.26×10^5	21.84
E1.6.6.3	5.00×10^4	9.51×10^5	16.48

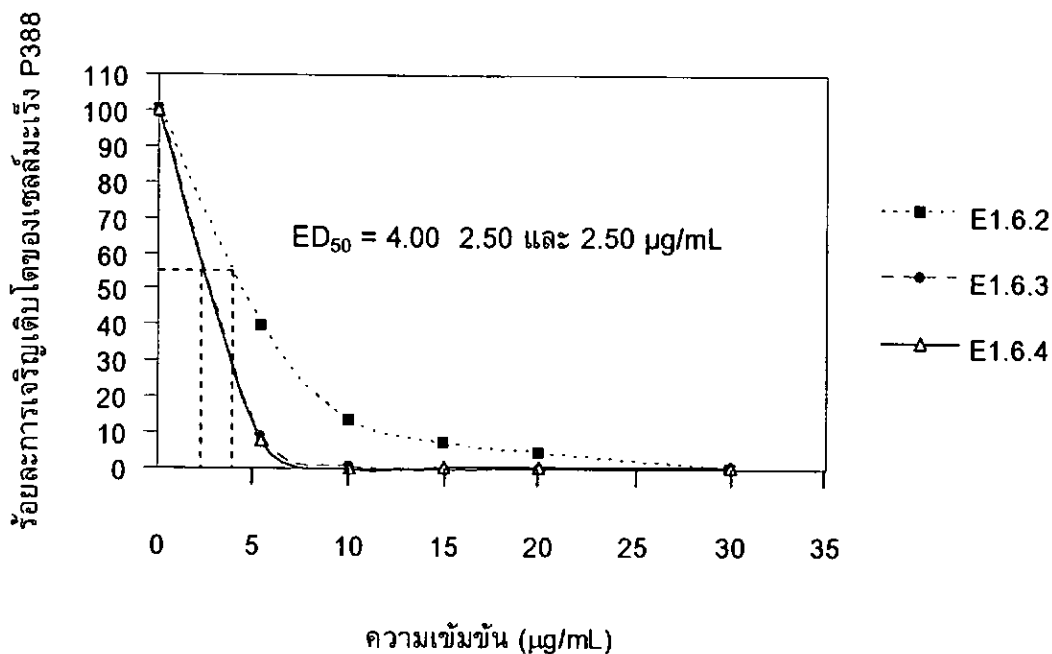
สารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 E1.6.4 และ E1.7.5 เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่ามีค่า ED₅₀ เท่ากับ 4.00 2.50 2.50 และ 3.00 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 22 และ 23 และภาพประกอบ 29 และ 30

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 และ E1.6.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

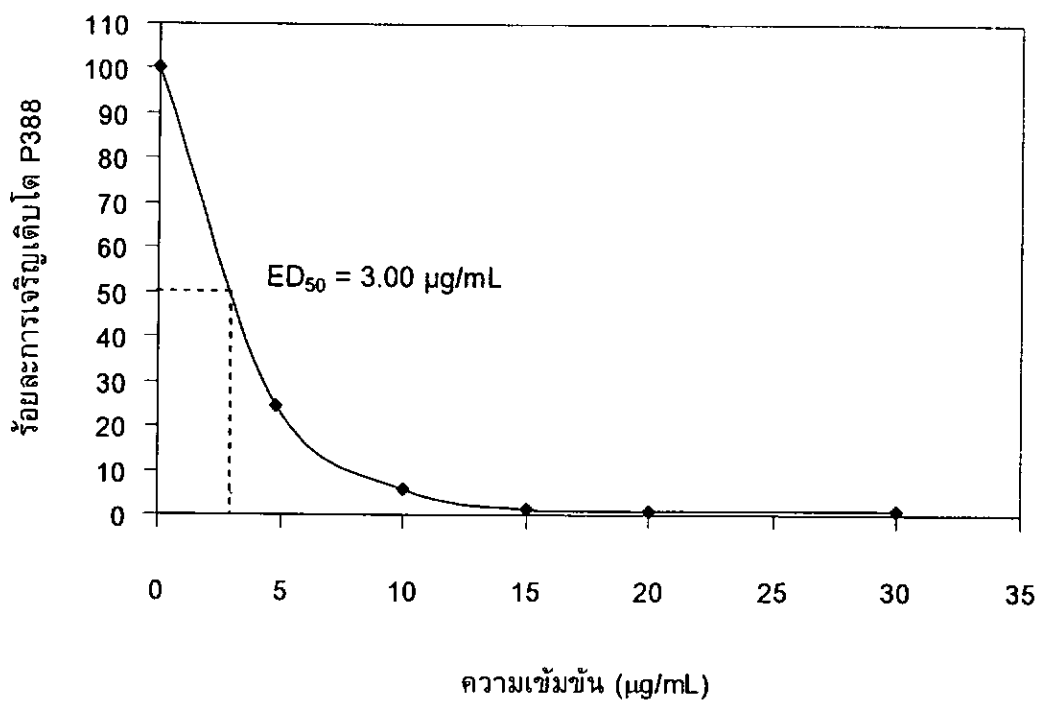
สารประกอบ	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388
		วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม E1.6.2	-	5.00x10 ⁴	4.98x10 ⁵	100.00
	5	5.00x10 ⁴	1.98x10 ⁵	39.76
	10	5.00x10 ⁴	6.60x10 ⁵	13.25
	15	5.00x10 ⁴	4.40x10 ⁵	8.84
	20	5.00x10 ⁴	2.20x10 ⁵	4.42
	30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
กลุ่มควบคุม E1.6.3	-	5.00x10 ⁴	6.56x10 ⁵	100.00
	5	5.00x10 ⁴	2.40x10 ⁵	3.66
	10	5.00x10 ⁴	8.00x10 ⁴	1.22
	15	5.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	1.07
	20	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
	30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E1.6.4	5	5.00x10 ⁴	1.60x10 ⁵	2.44
	10	5.00x10 ⁴	8.00x10 ⁴	1.22
	15	5.00x10 ⁴	7.00x10 ⁴	1.07
	20	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
	30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1.7.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด(5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	6.56x10 ⁶	100.00
5	5.00x10 ⁴	1.62x10 ⁶	24.70
10	5.00x10 ⁴	1.50x10 ⁵	22.87
15	5.00x10 ⁴	5.00x10 ⁴	0.76
20	5.00x10 ⁴	2.00x10 ⁴	0.30
30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E1.6.2 E1.6.3 และ E1.6.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388



ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E1.7.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.3.2. ผลการแยกสารกลุ่ม E3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้ 10 กลุ่ม (ตาราง 9) เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบ สารกลุ่ม E3.3 E3.5 E3.6 E3.7 E3.8 และ E3.9 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง ดังแสดงในตาราง 24

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.1 ถึง E3.10 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

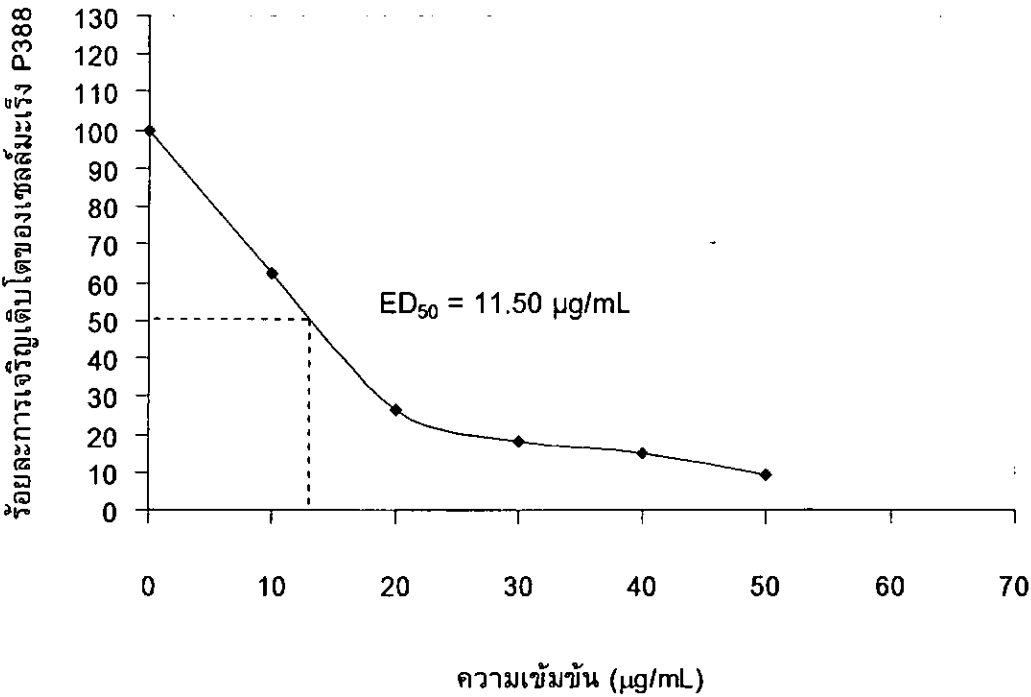
ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	5.52x10 ⁵	100.00
E3.1	5.00x10 ⁴	3.50x10 ⁵	83.05
E3.2	5.00x10 ⁴	3.41x10 ⁵	81.00
E3.3	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E3.4	5.00x10 ⁴	1.26x10 ⁵	29.93
E3.5	5.00x10 ⁴	2.00x10 ⁴	0.48
E3.6	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E3.7	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E3.8	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E3.9	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E3.10	5.00x10 ⁴	2.02x10 ⁵	47.98

เมื่อนำสารกลุ่ม E3.3 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่าได้สารกลุ่ม long chain hydrocarbon

สารกลุ่ม E3.5 E3.6 และ E3.7 มีของแข็งสีขาวผสมอยู่เมื่อนำมาล้างผลึกได้สารประกอบ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED₅₀ ของสารประกอบ 1 เท่ากับ 11.50 µg/mL ดังแสดงในตาราง 25 และภาพประกอบ 31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.8 ได้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 16.82 µg/mL ดังแสดงในตาราง 26 และภาพประกอบ 32

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

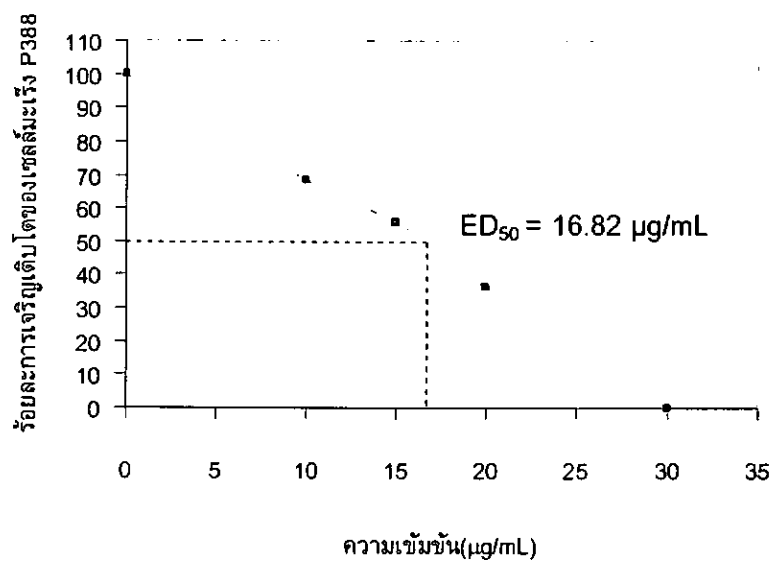
ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.94×10^5	100.00
10	5.00×10^4	3.71×10^6	62.46
20	5.00×10^4	1.57×10^6	26.43
30	5.00×10^4	1.07×10^6	18.01
40	5.00×10^4	9.00×10^5	15.15
50	5.00×10^4	5.60×10^5	9.43



ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารประกอบ 1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.8 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารประกอบ	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388
		วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม E3.8	-	5.00×10^4	2.66×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	4.66×10^6	63.14
	15	5.00×10^4	4.34×10^6	58.81
	20	5.00×10^4	2.46×10^6	33.33
	30	5.00×10^4	0.00	0.00



ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E3.8 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

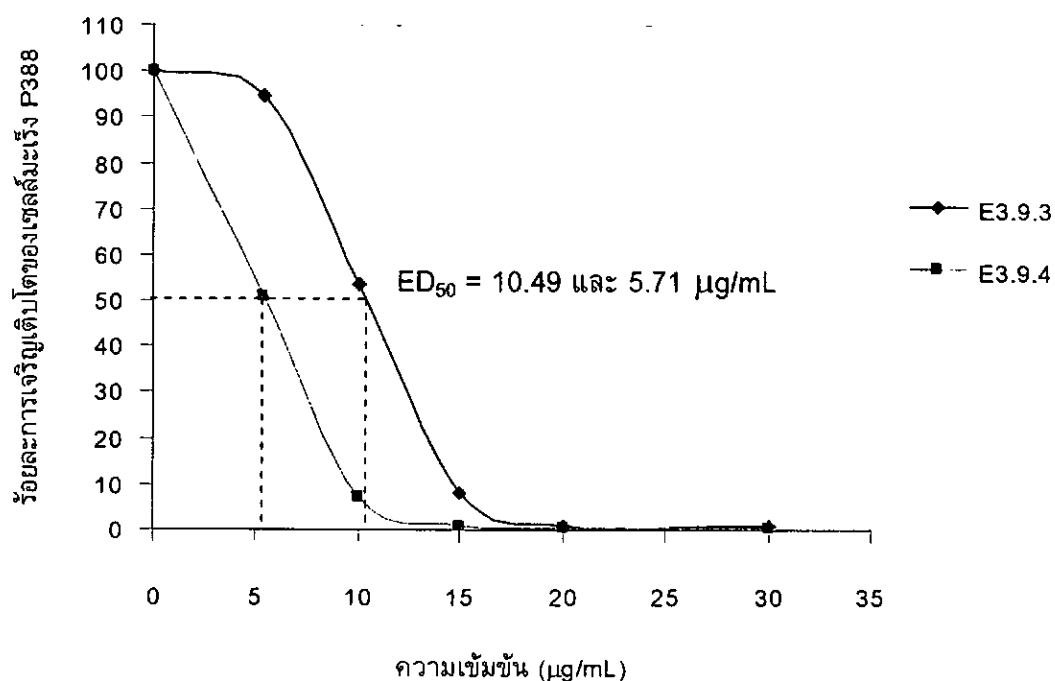
เมื่อนำสารกลุ่ม E3.9 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ 8 กลุ่ม พบว่าสารกลุ่ม E3.9.2 มีของแข็งสีขาวผสมอยู่เมื่อนำมาล้างผลึกได้สารประกอบ 1 (ตาราง 10) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกได้ ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบว่าสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาต่อได้ ดังแสดงในตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 10.49 และ 5.71 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 28 และภาพประกอบ 33

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.9.1 ถึง E3.9.8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.94×10^5	100.00
E3.9.1	5.00×10^4	3.75×10^6	75.91
E3.9.2	5.00×10^4	1.92×10^5	38.87
E3.9.3	5.00×10^4	0.00	0.00
E3.9.4	5.00×10^4	2.00×10^4	0.40
E3.9.5	5.00×10^4	4.30×10^5	8.70
E3.9.6	5.00×10^4	2.42×10^6	48.99
E3.9.7	5.00×10^4	5.41×10^5	109.51
E3.9.8	5.00×10^4	3.84×10^6	77.73

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารประกอบ	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
		วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	6.56×10^6	100.00
E3.9.3	5	5.00×10^4	6.93×10^6	105.64
	10	5.00×10^4	3.41×10^6	51.98
	15	5.00×10^4	5.20×10^5	7.93
	20	5.00×10^4	6.00×10^4	0.91
	30	5.00×10^4	0.00	0.00
E3.9.4	5	5.00×10^4	3.35×10^6	51.07
	10	5.00×10^4	4.60×10^5	7.01
	15	5.00×10^4	2.80×10^5	4.27
	20	5.00×10^4	1.00×10^5	1.52
	30	5.00×10^4	0.00	0.00



ภาพประกอบ 33 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E3.9.3 และ E3.9.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.3.3. ผลการแยกสารกลุ่ม E4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ 15 กลุ่ม (ตาราง 11) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ได้ผลดังแสดงในตาราง 29

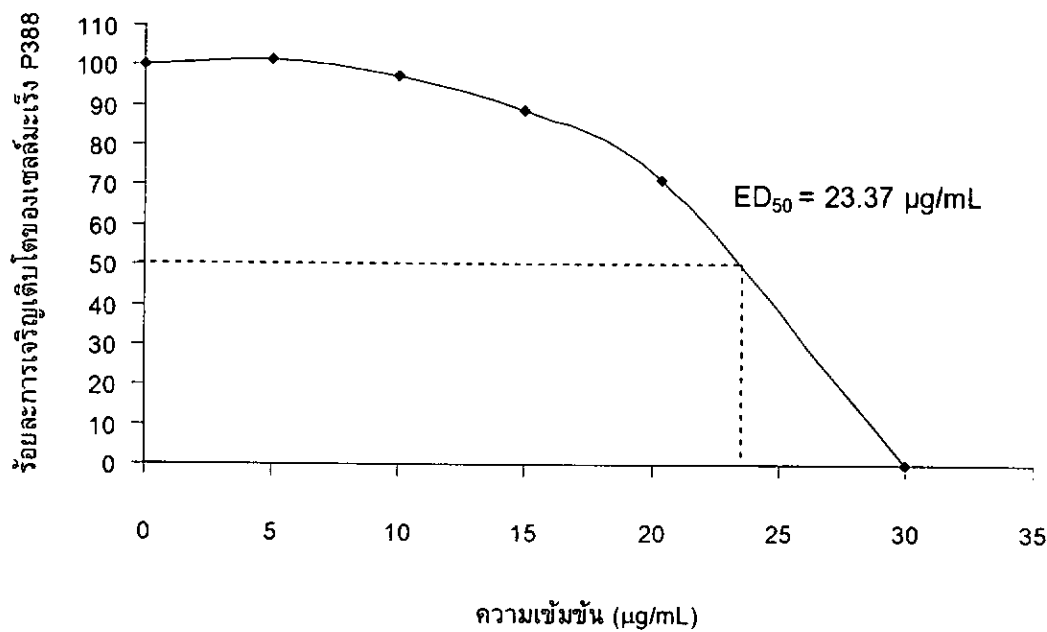
ตาราง 29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E4.1 ถึง E4.15 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	4.60x10 ⁶	100.00
E4.1	5.00x10 ⁴	6.29x10 ⁶	136.65
E4.2	5.00x10 ⁴	2.36x10 ⁶	51.27
E4.3	5.00x10 ⁴	7.00x10 ⁵	15.22
E4.4	5.00x10 ⁴	2.83x10 ⁶	61.52
E4.5	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E4.6	5.00x10 ⁴	4.49x10 ⁶	97.61
E4.7	5.00x10 ⁴	2.30x10 ⁵	5.00
E4.8	5.00x10 ⁴	3.03x10 ⁵	65.87
E4.9	5.00x10 ⁴	3.78x10 ⁶	82.10
E4.10	5.00x10 ⁴	3.92x10 ⁶	85.24
E4.11	5.00x10 ⁴	3.00x10 ⁴	0.65
E4.12	5.00x10 ⁴	2.95x10 ⁵	64.19
E4.13	5.00x10 ⁴	2.40x10 ⁵	52.30
E4.14	5.00x10 ⁴	4.34x10 ⁶	94.28
E4.15	5.00x10 ⁴	1.22x10 ⁶	26.52

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E4.11 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 23.37 µg/mL ดังแสดงในตาราง 30 และ ภาพประกอบ 34

ตาราง 30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E4.11 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	4.98x10 ⁶	100.00
5	5.00x10 ⁴	5.24x10 ⁵	105.22
10	5.00x10 ⁴	4.68x10 ⁶	93.98
15	5.00x10 ⁴	4.10x10 ⁵	82.33
20	5.00x10 ⁴	3.71x10 ⁶	74.50
30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00



ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E4.11 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.3.4. ผลการแยกสารกลุ่ม E5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ 9 กลุ่ม (ตาราง 12) เมื่อนำสารกลุ่มที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ได้ผลดังแสดงในตาราง 31

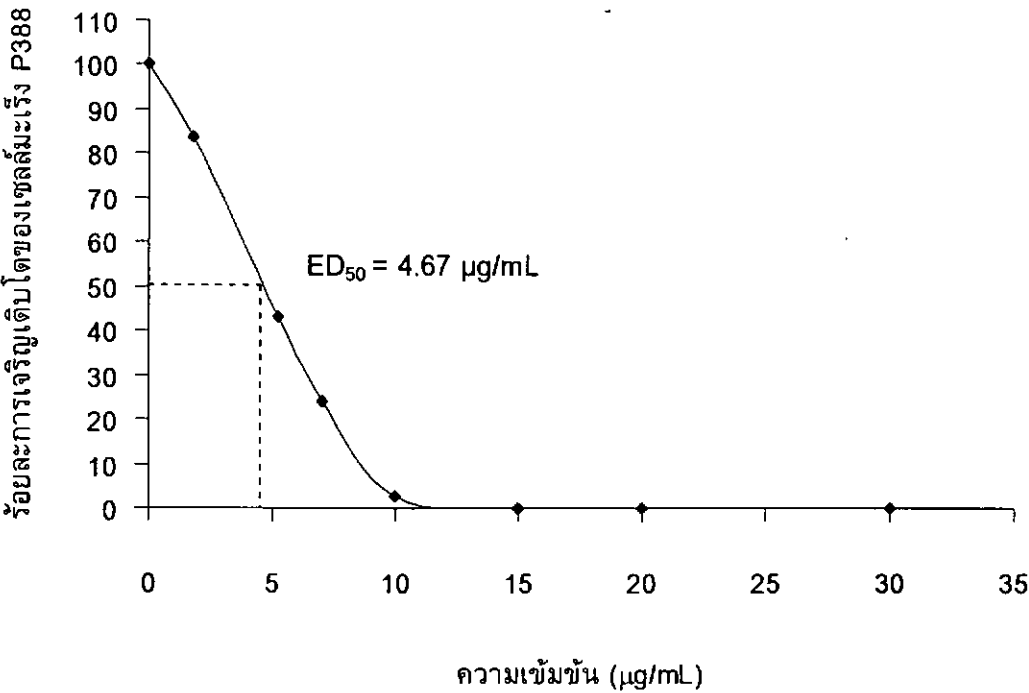
ตาราง 31 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.1 ถึง E5.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	4.57x10 ⁶	100.00
E5.1	5.00x10 ⁴	4.37x10 ⁶	95.62
E5.2	5.00x10 ⁴	6.89x10 ⁶	150.77
E5.3	5.00x10 ⁴	5.18x10 ⁶	113.35
E5.4	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E5.5	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
E5.6	5.00x10 ⁴	4.20x10 ⁵	9.19
E5.7	5.00x10 ⁴	1.60x10 ⁶	35.01
E5.8	5.00x10 ⁴	1.47x10 ⁶	32.17
E5.9	5.00x10 ⁴	6.76x10 ⁶	141.42

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 4.67 µg/mL ดังแสดงในตาราง 32 และภาพประกอบ 35

ตาราง 32 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00x10 ⁴	6.59x10 ⁶	100.00
2	5.00x10 ⁴	5.52x10 ⁶	83.76
5	5.00x10 ⁴	2.91x10 ⁶	44.16
7	5.00x10 ⁴	1.83x10 ⁶	27.77
10	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
15	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
20	5.00x10 ⁴	0.00	0.00
30	5.00x10 ⁴	0.00	0.00



ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E5.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

เมื่อนำสารกลุ่ม E5.5 ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และมีปริมาณมากพอ มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้ 5 กลุ่ม (ตาราง 13) เมื่อนำสารกลุ่มที่แยกได้ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ไม่พบสารกลุ่มใดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ตามที่กำหนด ดังแสดงในตาราง 33

ตาราง 33 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.5.1 ถึง E5.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
	วันที่เริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.77×10^6	100.00
E5.5.1	5.00×10^4	2.98×10^6	51.65
E5.5.2	5.00×10^4	2.70×10^6	46.79
E5.5.3	5.00×10^4	1.11×10^6	19.24
E5.5.4	5.00×10^4	3.00×10^6	51.99
E5.5.5	5.00×10^4	1.15×10^6	19.93

ตาราง 34 สรุปผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มต่าง ๆ

สารกลุ่ม/สารประกอบ	ED ₅₀ (µg/mL)	หมายเหตุ
สารสกัด EtOAc	15.42	
E1	10.24	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E3	15.16	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E4	16.94	
E5	22.82	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E1.4	5.81	
E1.6	13.23	
E1.7	20.50	
E1.6.2	4.00	
E1.6.3	2.50	
E1.6.4	2.50	
E1.7.5	3.00	
E3.3	15.00	
E3.5	8.52	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E3.6	8.03	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E3.7	2.17	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7
E3.8	16.82	
E3.9	20.42	
E3.9.3	10.49	

ตาราง 34 (ต่อ)

สารกลุ่ม/สารประกอบ	ED ₅₀ (µg/mL)	หมายเหตุ
E3.9.4	5.71	
E4.5	18.00	
E4.11	23.37	
E5.4	4.67	
E5.5	4.67	
สารประกอบ 1	11.50	ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

4. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่มที่มีพิษต่อเซลล์ P388 มากกว่ากลุ่มอื่น

จากตาราง 34 พบว่าสารกลุ่ม E1 E3 E5 E3.5 E3.6 E3.7 และ สารประกอบ 1 ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 10.24 15.16 22.82 8.52 8.03 2.17 และ 11.50 µg/mL ตามลำดับ จึงนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ได้ผลการทดสอบแสดงในตาราง 35 และ 36

ตาราง 35 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E1 E3 E5 และ E3.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	0.076	0.076	0.076	-
กลุ่มควบคุม (NC-4)	0.311	0.307	0.309	100.00
E1	0.051	0.058	0.0545	17.64
E3	0.106	0.101	0.1035	33.50
E5	0.126	0.120	0.123	39.81
E3.5	0.144	0.152	0.148	47.90

(O.D.Day 4)/(O.D.Day 0) = 0.309/0.076
= 4.07 เท่า

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ตาราง 36 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E3.6 E3.7 และสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	ค่าการดูดกลืนกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	0.095	0.130	0.1125	-
กลุ่มควบคุม (NC-4)	0.448	0.449	0.4485	100.00
E3.6	0.131	0.166	0.1485	33.11
E3.7	0.056	0.056	0.056	12.49
สารประกอบ 1	0.040	0.044	0.042	9.36

$$\begin{aligned} \text{(O.D.Day 4)/ (O.D.Day 0)} &= 0.4485/0.1125 \\ &= 3.99 \text{ เท่า} \end{aligned}$$

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

4.2. จากตาราง 35 และ 36 พบว่าสารประกอบ 1 และสารกลุ่ม E3.7 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากกว่ากลุ่มอื่น ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เท่ากับ 9.36 และ 12.49 ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 20.60 และ 4.50 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 37 และ 38 และภาพประกอบ 36 และ 37

ตาราง 37 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	-	0.051	0.065	0.058	-
กลุ่มควบคุม (NC-4)	-	0.217	0.283	0.250	100.00
PC-4	4	0.057	0.057	0.057	22.80
สารประกอบ 1	5	0.273	0.243	0.258	103.20
	10	0.193	0.193	0.193	77.20
	15	0.139	0.163	0.151	60.40
	20	0.129	0.129	0.129	51.60
	30	0.021	0.027	0.024	9.60

$$\begin{aligned} \text{(O.D.Day 4)/ (O.D.Day 0)} &= 0.250/0.058 \\ &= 4.31 \text{ เท่า} \end{aligned}$$

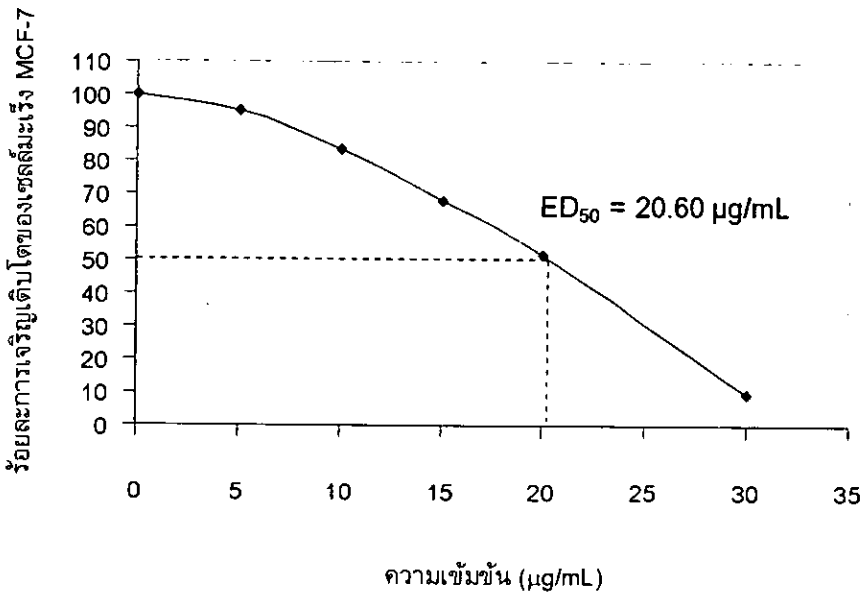
ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ตาราง 38 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E3.7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

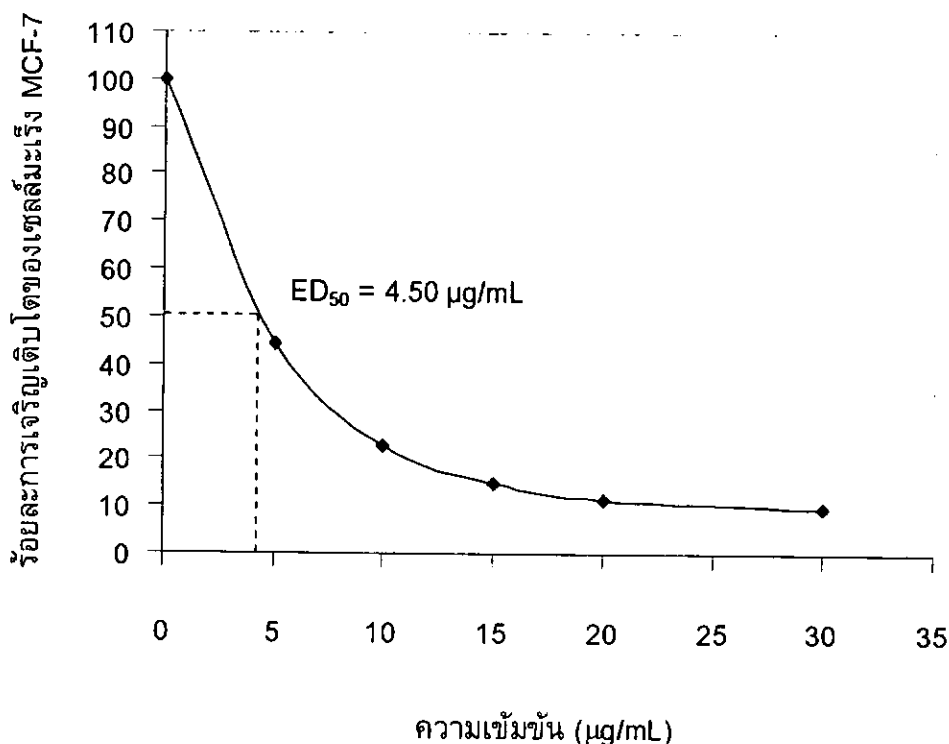
ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	-	0.084	0.084	0.084	-
กลุ่มควบคุม (NC-4)	-	0.332	0.331	0.3315	100.00
PC-4	4	0.076	0.076	0.076	22.93
E3.7	5	0.178	0.122	0.150	45.25
	10	0.073	0.049	0.061	18.40
	15	0.053	0.047	0.050	15.08
	20	0.051	0.035	0.043	12.97
	30	0.036	0.028	0.032	9.50

$$\frac{(O.D.Day\ 4)/(O.D.Day\ 0)}{= 0.3315/0.084}$$
$$= 3.95\ เท่า$$

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ



ภาพประกอบ 36 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารประกอบ 1 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7



ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E3.7 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

4.3. จากตาราง 35 36 37 และ 38 ค่า (O.D.Day 4)/(O.D.Day 0) มีอัตราส่วนการเจริญเติบโตประมาณ 4 เท่า แสดงว่าอัตราส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ในการทดลองแต่ละครั้งเซลล์ที่ใช้มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ

4.4. จากการที่งานวิจัยนี้ใช้ 5-fluorouracil (5-FU) เป็น positive control (PC-4) ตามสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าเซลล์มะเร็ง MCF-7 ตอบสนอง 5-FU เป็นอย่างดี มีค่าร้อยละการเจริญเติบโตเท่ากับ 22.80 และ 22.93 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ($ED_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$) ดังแสดงในตาราง 37 และ 38

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ของสารกลุ่มที่แยกได้จากหญ้าสาบคา พบว่ากลุ่มสารและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มาก แต่เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 จะมีความเป็นพิษน้อยลง ดังแสดงในตาราง 39

ตาราง 39 สรุปค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED₅₀ ของสารที่แยกได้จากหญ้าสาบกาต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7

สารประกอบ/สารกลุ่ม	ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง		ED ₅₀ (µg/mL)	
	P388	MCF-7	P388	MCF-7
Hexane	65.79	-	> 30	-
EtOAc	0.00	-	15.42	-
MeOH	62.69	-	> 30	-
E1	0.00	17.64	10.24	< 30
E2	67.75	-	> 30	-
E3	0.00	33.50	15.16	< 30
E4	0.00	-	16.94	-
E5	0.00	39.81	22.82	< 30
E6	90.85	-	> 30	-
E1.1	115.04	-	> 30	-
E1.2	39.67	-	< 30	-
E1.3	9.96	-	< 30	-
E1.4	0.00	-	5.81	-
E1.5	12.27	-	< 30	-
E1.6	0.00	-	13.23	-
E1.7	0.00	-	20.50	-
E1.8	74.28	-	> 30	-
E1.9	95.24	-	> 30	-
E3.1	83.05	-	> 30	-
E3.2	81.00	-	> 30	-
E3.3	0.00	-	15.00	-
E3.4	29.93	-	< 30	-
E3.5	0.48	47.90	8.52	< 30
E3.6	0.00	33.11	8.30	< 30
E3.7	0.00	12.49	2.17	4.50
E3.8	0.00	-	16.82	-
E3.9	0.00	-	20.42	-
E3.10	47.98	-	~ 30	-
E4.1	136.65	-	> 30	-
E4.2	51.27	-	~ 30	-
E4.3	15.22	-	< 30	-
E4.4	61.52	-	> 30	-
E4.5	0.00	-	18.00	-
E4.6	97.61	-	> 30	-
E4.7	5.00	-	< 30	-
E4.8	65.87	-	> 30	-

ตาราง 39 (ต่อ)

สารประกอบ/สารกลุ่ม	ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง		ED ₅₀ (µg/mL)	
	P388	MCF-7	P388	MCF-7
E4.9	82.10	-	> 30	-
E4.10	85.24	-	> 30	-
E4.11	0.65	-	23.37	-
E4.12	64.19	-	> 30	-
E4.13	52.30	-	> 30	-
E4.14	94.28	-	> 30	-
E4.15	26.52	-	< 30	-
E5.1	95.62	-	> 30	-
E5.2	150.77	-	> 30	-
E5.3	113.35	-	> 30	-
E5.4	0.00	-	4.67	-
E5.5	0.00	-	4.67	-
E5.6	9.19	-	< 30	-
E5.7	35.01	-	< 30	-
E5.8	32.17	-	< 30	-
E5.9	141.42	-	> 30	-
E1.6.1	80.53	-	> 30	-
E1.6.2	1.47	-	4.00	-
E1.6.3	0.00	-	2.50	-
E1.6.4	0.00	-	2.50	-
E1.6.5	23.75	-	< 30	-
E1.6.6	1.18	-	< 30	-
E1.6.7	25.52	-	< 30	-
E1.6.8	33.48	-	< 30	-
E1.6.9	109.59	-	> 30	-
E1.7.1	46.76	-	< 30	-
E1.7.2	89.53	-	> 30	-
E1.7.3	106.49	-	> 30	-
E1.7.4	93.66	-	> 30	-
E1.7.5	0.00	-	3.00	-
E1.7.6	102.36	-	> 30	-
E3.9.1	75.91	-	> 30	-
E3.9.2	38.87	-	< 30	-
E3.9.3	0.00	-	10.49	-
E3.9.4	0.40	-	5.71	-
E3.9.5	8.70	-	< 30	-
E3.9.6	48.99	-	~ 30	-
E3.9.7	109.51	-	> 30	-
E3.9.8	77.73	-	> 30	-

ตาราง 39 (ต่อ)

สารประกอบ/สารกลุ่ม	ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง		ED ₅₀ (µg/mL)	
	P388	MCF-7	P388	MCF-7
E5.5.1	51.65	-	~ 30	-
E5.5.2	46.79	-	~ 30	-
E5.5.3	19.24	-	< 30	-
E5.5.4	51.99	-	~ 30	-
E5.5.5	19.93	-	< 30	-
E1.6.6.1	76.95	-	> 30	-
E1.6.6.2	21.84	-	< 30	-
E1.6.6.3	16.48	-	< 30	-
สารประกอบ 1	18.01	9.36	11.50	20.60

หมายเหตุ การทดสอบเพื่อหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ใช้สารที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

5. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ผลการนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (ภาพประกอบ 38-40 แสดงในภาคผนวก)

สารประกอบ 1 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 590.70 mg จุดหลอมเหลว 265-270 °C (จุดหลอมเหลวของ betulinic acid เท่ากับ 264 °C, Schuhly, et al. 1999 : 740-743) ให้สีชมพูม่วงกับ anisaldehyde-sulphuric spray reagent ค่า R_f = 0.40 (hexane : ethyl acetate 70:30) ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ดังนี้

FT IR (KBr) : 3449 (O-H) 1685 (C=O) 1642 (C=C) และ 1044 (C-O)

จากข้อมูล ¹H NMR spectrum (CDCl₃-CD₃OD, 300 MHz) พบสัญญาณของหมู่ methyl proton ทั้งหมด 6 สัญญาณที่ δ 0.68 (3H, s, H-24) 0.75 (3H, s, H-25) 0.86 (3H, s, H-26) 0.89 (3H, s, H-23) 0.90 (3H, s, H-27) และ 1.67 (3H, s, H-30) สัญญาณของ methylene proton 2 สัญญาณที่ δ 4.53 (1H, br s, H-29) และ 4.66 (1H, br s, H-29) สัญญาณของ methine proton 2 สัญญาณที่ δ 0.61 (1H, d, J = 9.34 Hz, H-5) และ 2.98 (1H, m, H-19) และสัญญาณของ carbinol proton 1 สัญญาณที่ δ 3.10 (1H, m, H-3) ดังตาราง 41

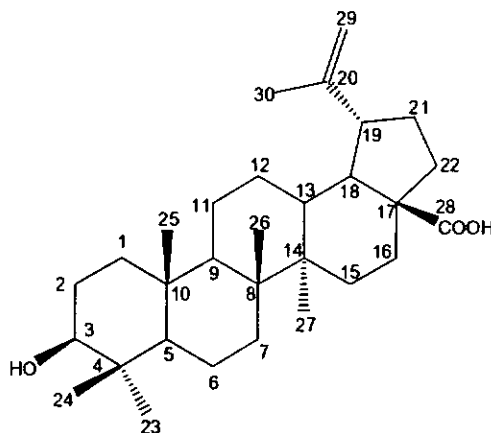
จากข้อมูล COSY spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ methylene proton H-29 กับหมู่ methyl proton H-30 และจาก HMBC spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่าง

H-29 กับ C-19 และ C-30 และพบความสัมพันธ์ระหว่าง H-19 กับ C-18 C-21 และ C-30 ดังตาราง 42

จากข้อมูล ^{13}C NMR และ DEPT spectra ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 75 MHz) δ (ppm) พบสัญญาณทั้งหมด 30 คาร์บอนในโมเลกุลเป็นของ methyl carbon 6 สัญญาณที่ δ 14.4 (C-27) 15.1 (C-24) 15.7 (C-26) 15.9 (C-25) 19.0 (C-30) และ 27.6 (C-23) methylene carbon 11 สัญญาณที่ δ 18.1 (C-6) 20.7 (C-11) 25.4 (C-12) 26.7 (C-2) 29.5 (C-21) 30.4 (C-15) 32.1 (C-16) 34.2 (C-7) 37.0 (C-22) 38.6 (C-1) และ 109.4 (C-29) methane carbon 6 สัญญาณที่ δ 38.2 (C-13) 46.8 (C-19) 48.6 (C-18) 50.4 (C-9) 55.3 (C-5) และ 78.8 (C-3) และ quaternary carbon 7 สัญญาณที่ δ 37.2 (C-10) 39.0 (C-4) 40.5 (C-8) 42.3 (C-14) 56.1 (C-17) 150.6 (C-20) และ 179.2 (C-28) ดังตาราง 43

EIMS (% relative intensity) : 456 (28) [M^+ , $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$] 438 (33) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$] 423 (15) [$\text{M}^+ - \text{COOH}$] 410 (13) [$\text{M}^+ - \text{H}$]

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ 1 กับ betulinic acid (ณัฐชัย อุ่นใจ. 2545; Yagi, et al. 1978 : 1798-1802; Hess & Monache. 1999 : 104-106) สรุปได้ว่า สารประกอบ 1 คือ 3β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid หรือ betulinic acid



ภาพประกอบ 38 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ 1

ตาราง 40 แสดงข้อมูล FT IR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1

ν_{max} (cm^{-1})		แถบการสั่น
betulinic acid ^a	สารประกอบที่ 1	
3440	3449	O-H (stretch)
1050	1044	C-O
1690	1685	C=O (stretch)
1640	1642	C=C (stretch)

^a Yagi, et al. 1978 : 1798-1802

ตาราง 41 ข้อมูล ¹H NMR ของ betulinic acid และสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	δ (ppm)		ชนิดของ proton
	betulinic acid ^a	สารประกอบที่ 1 ^b	
3	3.10 (1H , m)	3.10 (1H , m)	carbinol proton
5	ไม่ได้รายงานไว้	0.61 (1H , d , J = 9.34 Hz)	methine proton
19	3.25 (1H , m)	2.98 (1H , m)	methine proton
23	0.83	0.89 (3H , s)	methyl proton
24	0.99	0.68 (3H , s)	methyl proton
25	1.01	0.75 (3H , s)	methyl proton
26	1.04	0.86 (3H , s)	methyl proton
27	0.83	0.90 (3H , s)	methyl proton
29	4.63 (1H , d , J = 2 Hz)	4.53 (1H , br s)	methylene proton
	4.79 (1H , d , J = 2 Hz)	4.66 (1H , br s)	methylene proton
30	1.73 (3H , s)	1.67 (3H , s)	methyl proton

^a บันทึกใน pyridine (Yagi, et al. 1978 : 1798-1802), ^b บันทึกใน CDCl₃-CD₃OD

ตาราง 42 ข้อมูลของ ¹H NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ 1

ตำแหน่ง	สารประกอบ 1			
	¹ H NMR (δ , ppm)	COSY	HMQC	HMBC
3	3.10 (1H , m)		C-3	C-23 C-24
5	0.61 (1H , d , J = 9.34 Hz)		C-5	C-4 C-10 C-24 C-25
19	2.98 (1H , m)		C-19	C-18 C-21 C-30
23	0.89 (3H , s)		C-23	C-3 C-4 C-5 C-24
24	0.68 (3H , s)		C-24	C-3 C-4 C-5 C-23
25	0.75 (3H , s)		C-25	C-1 C-5 C-9 C-10
26	0.86 (3H , s)		C-26	C-7 C-8 C-9 C-14
27	0.90 (3H , s)		C-27	C-8 C-13 C-14 C-15
29	4.53 (1H , br s)		C-29	C-19 C-30
	4.66 (1H , br s)			
30	1.67 (3H , s)	H-29	C-30	C-19 C-20 C-29

ตาราง 43 ข้อมูล ^{13}C NMR DEPT 90 และ DEPT 135 ของ betulinic acid และ สารประกอบ 1

ตำแหน่ง	betulinic acid			สารประกอบ 1 ^c			ชนิดของ proton
	^{13}C NMR δ^a (ppm)	DEPT 90 ^b	DEPT 135 ^b	^{13}C NMR δ (ppm)	DEPT 90	DEPT 135	
1	38.5		38.7	38.6		38.7	CH ₂
2	28.2		27.4	26.7		26.7	CH ₂
3	78.1	79.0	79.0	78.8	78.8	78.8	CH
4	39.4			39.0			C
5	55.9	55.3	55.3	55.3	55.3	55.3	CH
6	18.7		18.3	18.1		18.1	CH ₂
7	34.7		34.3	34.2		43.2	CH ₂
8	41.0			40.5			C
9	50.9	50.5	50.5	50.4	50.4	50.4	CH
10	37.5			37.2			C
11	21.1		20.8	20.7		20.7	CH ₂
12	26.0		25.5	25.4		25.4	CH ₂
13	39.2	38.4	38.4	38.2	38.2	38.2	CH
14	42.8			42.3			C
15	30.2		30.5	30.4		30.4	CH ₂
16	32.8		32.1	32.1		32.1	CH ₂
17	56.6			56.1			C
18	49.7	49.3	49.3	48.6	48.6	48.6	CH
19	47.7	46.9	46.9	46.8	46.8	46.8	CH
20	151.4			150.6			C
21	31.1		29.7	29.5		29.5	CH ₂
22	37.4		37.0	37.0		37.0	CH ₂
23	28.5		28.0	27.6		27.6	CH ₃
24	16.2		15.3	15.1		15.1	CH ₃
25	16.3		16.1	15.9		15.9	CH ₃
26	16.2		16.0	15.7		15.7	CH ₃
27	14.8		14.7	14.4		14.4	CH ₃
28	179.0			179.2			C
29	110.0		109.7	109.4		109.4	CH ₂
30	19.4		19.4	19.0		19.0	CH ₃

^a บันทึกใน pyridine-d₅, 75 MHz (Hess & Monache. 1999 : 104-106), ^b บันทึกใน CDCl₃ (ณัฐชัย อุ๋นใจ. 2545), ^c บันทึกใน CDCl₃-CD₃OD

6. การวิเคราะห์โครงสร้างสารกลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

ผลการวิเคราะห์สารกลุ่มที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 จากข้อมูล FT IR (CHCl₃) เพื่อศึกษาข้อมูล functional group ที่น่าสนใจ ดังแสดงในตาราง 44

ตาราง 44 ข้อมูล FT IR ของกลุ่มสารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

กลุ่มสาร	น้ำหนัก (mg)	ลักษณะของสาร	ค่า ED ₅₀ (µg/mL)	V _{max} (cm ⁻¹)	แถบการสั่น
E1.4	37.30	เหนียวหนืดสีดำ	5.81	3386	O-H
				1710	C=O
E1.6.2	54.90	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล	4.00	3450	O-H
				1670	C=O
				1274	C-O
E1.6.3	13.40	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง	2.50	4350	O-H
				1670	C=O
				1263	C-O
E1.6.4	6.40	ของเหลวหนืดสีเหลืองแดง	2.50	3431	O-H
				1667	C=O
				1262	C-O
E1.7.5	56.90	ของเหลวหนืดสีเขียวดำ	3.00	3476	O-H
				1704	C=O
				1632	C=C
E3.8	78.50	เหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ	16.82	3458	O-H
				1642	C=O
E3.9.3	49.00	เหนียวหนืดสีดำ	10.49	3394	O-H
				1712	C=O
E3.9.4	41.40	เหนียวหนืดสีดำ	5.71	3400	O-H
				1716	C=O
				1262	C-O
E4.11	100.00	เหนียวหนืดสีเขียวดำ	23.37	3404	O-H
				1713	C=O
E5.4	68.30	สารเหนียวหนืดสีดำ	4.67	3436	O-H
				1670	C=O
				1263	C-O

หมายเหตุ ภาพประกอบ FT IR ของกลุ่มสารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 แสดงในภาคผนวก

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane, ethyl acetate และ methanol ที่แยกได้จากหญ้าสาบคา พบว่าสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 (ED_{50} เท่ากับ 15.42 $\mu\text{g/mL}$) มากกว่าสารสกัด hexane และ methanol ($ED_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$) เมื่อนำสารสกัด ethyl acetate มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ betulinic acid และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 10 กลุ่ม และเมื่อนำกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate ในช่วงแรก ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูงและมีอยู่ในปริมาณมากพอมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากกว่ากลุ่มอื่น คือ สารบริสุทธิ์ betulinic acid และ E3.7

จากการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่า สารประกอบ 1 คือ betulinic acid เป็นสารประกอบ triterpene เคยพบในพืชสกุลอื่นหลายชนิด เช่น พบในเปลือกของ *Arbutus menziesii* (Robinson & Martel, 1969) ในส่วนที่เหนือดินของ *Melilotus messanensis* (Macias, Simonet & Esteban, 1994 : abstract) ใบของ *Diospyros leucomelas* (Recio, et al. 1995 : 9-12) เปลือกลำต้นของ *Vochysia divergens* (Hess & Monache, 1999 : 104-106) เปลือกลำต้นของ *Zizyphus joazeiro* (Schuhly, et al. 1999 : 740-743) ใบและลำต้นของ *Eugenia moraviana* (Lunardi, et al. 2001) เปลือกของ *Quercus suber* L. (Castola, et al. 2002) รากของ *Anemone raddeana* (Yamashita, et al. 2002 : 91-96) ใบและผลของ *Licania tomentosa* Bench. และใบของ *Chrysobalanus icaco* L. (Fernandes, et al. 2003 : 165-169) และพบว่า betulinic acid มีฤทธิ์ด้านการอักเสบของอาการบวมที่อุ้งเท้าและอาการบวมน้ำในหู (Recio, et al. 1995 : 9-12) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด melanoma (MEL-2) และเซลล์มะเร็งเยื่อในช่องปาก (KB) (Jeong, et al. 1999 : abstract) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Schuhly, et al. 1999 : 740-743) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ มะเร็งปอด มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งชนิด melanoma (Zuco, et al. 2002 : 17-25) มีฤทธิ์ต้านไวรัส Influenza A และ herpes simplex type 1 (HSV-1) มีค่า EC_{50} มากกว่า 219.0 และ เท่ากับ 8.2 μM ตามลำดับ (Baltina, et al. 2003 : 3549-3552) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตและต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดในคน (K562) (Fernandes, et al. 2003 : 165-169) และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดในคน (HL60 U937 และ K562) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.48 1.50 และ 1.80 μM ตามลำดับ มะเร็งปอด

(A549 LU65 และ Lu99) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.30 2.40 และ 0.81 μM ตามลำดับ และมะเร็งปากมดลูก (HeLa) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.10 μM (Hata, et al. 2003)

จะเห็นว่า betulinic acid เป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการต้านและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ จึงสอดคล้องกับผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า betulinic acid จากหญ้าสาบกา มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบในเม็ดเลือดขาวของหนู มีค่า ED_{50} 11.50 $\mu g/mL$ และเซลล์มะเร็ง MCF-7 ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบในเต้านมของมนุษย์ มีค่า ED_{50} 20.60 $\mu g/mL$

นอกจากนี้ในหญ้าสาบกายังพบกลุ่มสารอีกจำนวนมากที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 สารกลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 10 กลุ่ม คือ E1.4 E1.6.2 E1.6.3 E1.6.4 E1.7.5 E3.8 E3.9.3 E3.9.4 E4.11 และ E5.4 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 5.81 4.00 2.50 2.50 3.00 16.82 10.49 5.71 23.37 และ 4.67 $\mu g/mL$ ตามลำดับ และสารกลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 คือ E3.7 มีค่า ED_{50} 4.50 $\mu g/mL$ สารกลุ่มดังกล่าวมีหมู่ O-H C=O ซึ่งมักพบมากในสารที่มีฤทธิ์ในการต้านและ/หรือยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ดังนั้นจากผลการศึกษาดังกล่าว แสดงว่าหญ้าสาบกาน่าจะเป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาโดยใช้หญ้าสาบกาปริมาณมากขึ้นเพื่อจะได้มีปริมาณสารในแต่ละกลุ่มสารมากพอที่จะแยกและศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และ/หรือเซลล์มะเร็งชนิดอื่นอีก
2. ควรศึกษาองค์ประกอบหลัก และ/หรือสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในสารสกัดหยาบ hexane และ methanol
3. สารบริสุทธิ์ที่ได้อาจนำมาเป็นสารต้นตอในการสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพื่อให้ได้สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น
4. สารบริสุทธิ์และ/หรือสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น การต้านการอักเสบ การต้านมาลาเรีย การต้านเชื้อ HIV หรือการต้านเชื้อรา

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กมลวรรณ อนันต์. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทิลแอซีเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.). ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- กัญญาณัฐ กกแก้ว. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด chloroform และ methanol จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.). ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.). ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- ณัฐชัย อุ่นใจ. (2545). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากของเล็บเหยี่ยว (*Zizyphus oenoplia* (Linn.) Mull.). ปรินญาณิพนธ์ วท.ม. (เคมีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- เต็ม สมิตินันท์. (2544). ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ประชาชน.
- บุศบรรณ ณ สงขลา. (2525). สมุนไพรไทย ตอนที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : หอพรรณไม้ กรมป่าไม้.
- วินัย สุรราช. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.). ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- อนันต์ คงชุม. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.). ปรินญาณิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน, นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข และรวีวรรณ พัทธนาโชคชัย. (2545). "การวิเคราะห์หาสารต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่จากตะไคร้," (ออนไลน์). แหล่งที่มา : <http://webdb.dmsc.moph.go.th>.
- Ballina, L.A., et al. (2003). "Lupane Triterpenes and derivative with Antiviral Activity," *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 13 : 3549-3552.

- Benoist,R. (1935). *Flore Generale de L'Indo-Chine T.IV Fasc.* Paris : ม.ป.พ.
- Boily,Y. & Puyvelde,L.V. (1986). "Screening of Medicinal Plants of Rwanda (Central Africa) for Antimicrobial Activity," *J.Ethnopharmacol.* 16 : 1-13.
- Castola,V.,et al. (2002). "Composition and Chemical Variability of the Triterpene Fraction of Dichloromethane Extracts of Cork (*Quercus suber* L.)," *Industrial Crops and Products.* (Online). 15 : 15-22. Available :www.sciencedirect.com.
- Day,S.,et al. (2002). "Potent Cytotoxic Lignans from *Justicia procumbens* and Their Effects on Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Production in Mouse Macrophages," *J.Nat. Prod.* 65 : 379-381.
- Fernandes,J.,et al. (2003). "Pentacyclic Triterpenes from Chrysobalanaceae Species : Cytotoxicity on Multidrug Resistant and Sensitive Leukemia Cell Lines," *Cancer Letters.* 190 : 165-169.
- Geran,R.I.,et al. (1972). *Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems.* Maryland: National Cancer Institute National Institutes of Health.
- Hakim,E.H.,et al. (1999). "Artoindonesianins A and B,Two New Prenylated Flavones form the Root of *Artocarpus champeden*," *J.Nat. Prod.* 62 : 613-615.
- Hata,A.,et al. (2003). "Anti-Leukemia Activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a Lupane Triterpene," *Toxicology Letters.* 143 : 1-7.
- Hayashi,K.,et al. (2003). "Antitumor Agents. 221. Buceracidins A and B,Two New Flavanones from *Bucida buceras*," *J.Nat. Prod.* 66 : 125-127.
- Hess, S.C. & Monache, F.D. (1999). "Divergioic Acid, a Triterpene from *Vochysia divergens*," *J.Braz.Chem.Soc.* 10(2) : 104-106.
- Jeong,H.J.,et al. (1999). "Preparation of Amino Acid Conjugates of Betulinic Acid with Activity Against Human Melanoma," *Bioorg.&Med. Chem. Lett.* 9 : 1201-1204.
- Jiratchariyakul,W.,et al. (1999,December). "Cytotoxic Principles from *Trichosanthes cucumerina* L," *Thai J. of Phytopharmacy.* 6(2) : 1-9.
- Jiwajinda,S.,et al. (2002). "In vitro Anti-tumor Promoting and Anti-parasitic Activities of the Quassinoides from *Eurycoma longifolia* , a Medicinal Plant in Southeast Asia," *J.Ethnopharmacol.* 82 : 55-58.
- Jose,J.K., Kuttan,R. & Kuttan,G. (2001). "Antitumour Activity of *Embllica officinalis*," *J.Ethnopharmacol.* 75 : 65-69.

- Kham,M.R. & Omoloso,A.D. (2002). "Antibacterial Activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida* (L.) Kunth," *Fitoterapia*. 73(3) : 251-254.
- Lin,L.,Yang,L. & Chou,C. (2003). "Cytotoxic Nephthoquinones and Plumbagic Acid Glucosides from *Plumbago zeylanica*," *Phytochemistry*. 62 : 619-622.
- Lunardi,I.,et al. (2001). "Triterpenic Acids from *Eugenia moraviana*," *J.Braz.Chem. Soc.* 12(2) : unpagued.
- Macias,F.A.,Simonet,A.M. & Esteban,M.D. (1994). "Potential Allelopathic Lupane Triterpenes from Bioactive Fractions of *Melilotus Messanensis*," *Phytochemistry*. 36(6) : 1396 : 1379.
- Mazumdar,U.K.,Gupta,M.&Maiti,S. (1999). "Chemical and Pharmacological Evaluation of *Hygrophila spinosa* Root," *Indian J. of Pharmaceutical Sciences*. 61(3) : 181-183.
- Min,B.S.,et al. (2001). "Cytotoxic Alkaloids and a Flavan from the Bulbs of *Crinum asiaticum* var.*japonicum*," *Chem. Pharm. Bull.* 49(9) : 1217-1219.
- Oyama,V.I. & Eagle,H. (1956). "Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)," *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 91 : 305-307.
- Pavia, D.L., et al. (1995). *Organic Laboratory Techniques*. 2nd ed Philadelphia : Saunder College Publishing.
- Pecere,T., et al. (2000,June 1). "Aloe-emodin Is a New Type of Anticancer Agent with Selective Activity Against Neuroectodermal Tumors," *Cancer Research*. 60 : 2800-2804.
- Pornsiriprasert,D. (1986). *Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of a Thai Folkloric Remedy*. Master thesis.M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate School, Mahidol University. Photocopied.
- Recio,M.,et al. (1995). "Investigation on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids form *Diospyros leucomelas*," *Planta Med.* 61 : 9-12.
- Robinson,F.P. & Martel,H. (1969). "Betulinic Acid from *Arbutus menziesii*," *Phytochemistry*. 9 : 907-909.
- Schuhly,W.,et al. (1999). "New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazei*," *Planta Medica*. 65 : 740-743.
- Singh,A. & Handa,S.S. (1995). "Hepatoprotective Activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* Against Paracetamol and Thioacetamide Intoxication in Rats" *J.Ethnopharmacol.* 49 : 119-126.

- Su,B.,et al. (2002). "Bioactive Constituents of the Seeds of *Brucea Javanica*," *Planta Med.* 68 : 730-733.
- Syu,W.,et al. (2001). "Cytotoxic and Novel Compounds from *Solanum indicum*," *J.Nat.Prod.* 64 : 1232-1233.
- Vlietinck,A.J.,et al. (1995). "Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Properties," *J.Ethnopharmacol.* 46 : 31-47.
- Wang,S.,Cheng,Y. & Duh,C. (2001). "Cytotoxic Constituents from Leaves of *Aglaia elliptifolia*," *J.Nat.Prod.* 64 : 92-94.
- Weniger,B.,et al. (2001). "Antiprotozoal Activities of Colombian Plants," *J.Ethnopharmacol.* 78 : 193-200.
- Wu,T.,Shi,L. & Kuo,S. (2001). "Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* Triterpenes," *J.Nat.Prod.* 64 : 1121-1122.
- Yagi,A.,et al. (1978). "Studies on the Constituents of Zizyphi Fructus. I. Structure of Three New p-Coumaroylates of Alphitolic Acid," *Chem. Pharm. Bull.* 26(6) : 1798-1802.
- Yamashita,K.,et al. (2002). "Effect of Three Triterpenoids, Lupeol, Betulin and Betulinic Acid on the Stimulus-Induced Superoxide Generation and Tyrosyl Phosphorylation of Proteins in Human Neutrophils," *Clinica Chimica Acta.* 325 : 91-96.
- Zuco,V.,et al. (2002). "Selective Cytotoxicity of Betulinic Acid on Tumor Cell Lines, but not on Normal Cells," *Cancer Letters.* 175 : 17-25.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเซลล์มะเร็ง P388

1. RPMI 1640 medium

RPMI medium 1640 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 medium 1640 powder ในน้ำกลั่น โดยคนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม sodium bicarbonate และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.20-7.40 ด้วยสารละลาย 1M NaOH หรือ 1M HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปกรองด้วย Millipore filter และเติม Sodium penicillin G และ Streptomycin เพื่อให้ปราศจากเชื้อเก็บสารละลายที่เตรียมได้ในตู้เย็น และก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้เสร็จแล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น

2. Trypan blue dye

Trypan blue	0.40	g
Sodium chloride	0.81	g
Potassium phosphate	0.06	g
Methyl-p-hydroxybenzoate	0.05	g

ละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น 90 mL ต้มให้เดือดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 7.20-7.30 ด้วยสารละลาย 1M NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

การเตรียมสารเคมีสำหรับเซลล์มะเร็ง MCF-7

1. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

EMEM BOWHITTAKER (powder)	19.02	g
Sterile water for injection	2.00	L

HEPES	3.00	g
NaHCO ₃	2.00	g
ปรับ pH ด้วย 7.5% NaHCO ₃ ให้ได้ pH ประมาณ 7.0-7.2		
เติม Sodium Penicillin G	0.40	mL
เติม Steptomycin	1.00	mL

กรองด้วย Millipore filter นำไปทดสอบ sterility เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง
ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเติม 10% Newborn Calf Serum

หมายเหตุ

1. การเตรียม Sodium Penicillin G โดยใช้ Sodium Penicillin G 5,000,000 units
เติมน้ำกลั่น 10 mL จะได้ stock มีความเข้มข้น 500,000 units/mL ซึ่งปริมาตรของ
Sodium Penicillin G ที่ต้องใช้คือ 100,000 units/media 1 L
2. การเตรียม Steptomycin โดยใช้ Steptomycin base 1 g เติมน้ำกลั่น 5 mL จะได้
stock มีความเข้มข้น 0.2 g/mL ซึ่งปริมาณที่ต้องการคือ Steptomycin 0.1 g/media 1 L

2. Hank' s Balanced Salt Solution (HBSS)

Per liter of 10X solution

Solution 1

NaCl	80.00	g
KCl	4.00	g
CaCl ₂	1.40	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.00	g

Solution 2

Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0.7557	g
KH ₂ PO ₄	0.60	g
Glucose	10.00	g
Phenol red 1%	16.00	mL

ค่อย ๆ เทสารละลาย 2 ลงในสารละลาย 1 ให้มีปริมาตรรวมไม่เกิน 500 mL คน
สารละลายด้วยแท่งคนแม่เหล็ก ปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย Millipore
filter จะได้สารละลาย HBSS ที่มีความเข้มข้นเป็น 10X ซึ่งตอนนำมาใช้ต้องเจือจางให้มีความ
เข้มข้นเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปเลี้ยงด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็น
เวลา 10 นาที ปรับ pH ให้ได้ 7.0-7.2 ด้วย 2.8% NaHCO₃

3. Phosphate Buffer Saline Solution (PBS)

NaCl	8.00	g
KCl	0.20	g
Na ₂ PO ₄	1.15	g
KH ₂ PO ₄	0.02	g
น้ำกลั่น 2 ครั้ง	1,000	mL

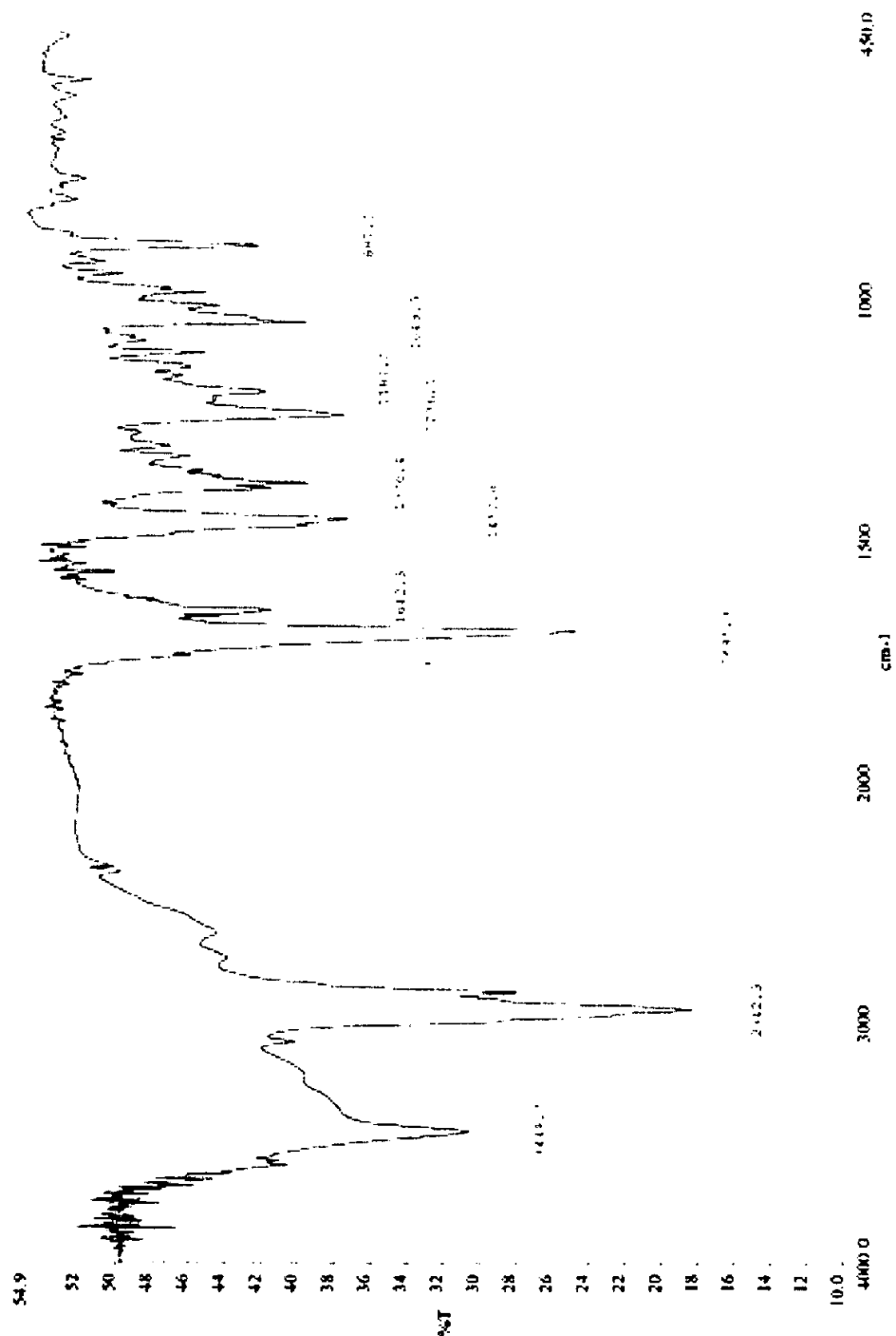
ละลายส่วนประกอบข้างบนในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 0.25% Trypsin solution ใน HEPES buffer solution

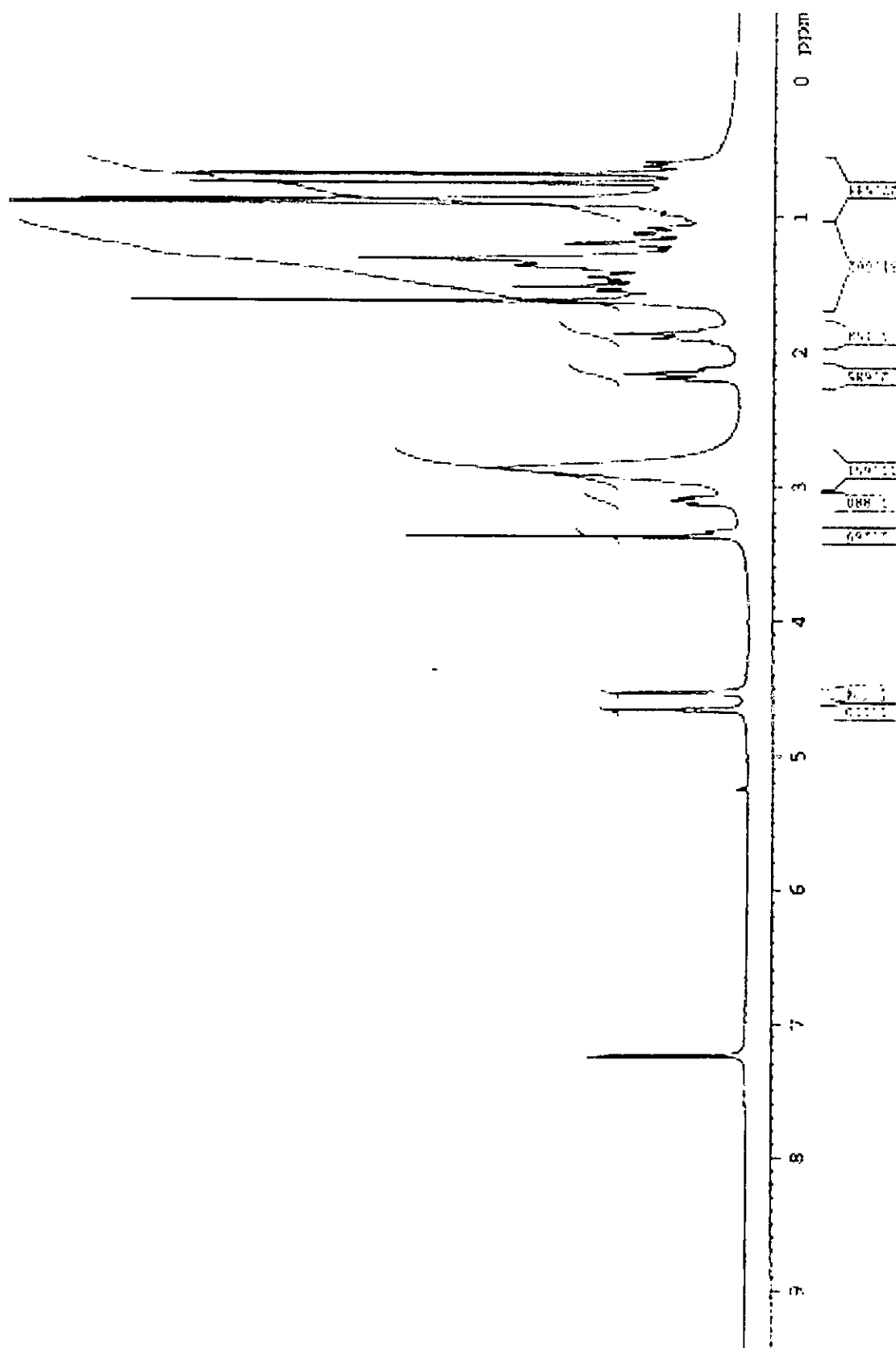
HEPES buffer solution ประกอบด้วย

NaCl	8.00	g
KCl	0.40	g
Na ₂ HPO ₄	0.10	g
Dextrose	1.00	g
HEPES	2.38	g
น้ำกลั่น	1,000	mL

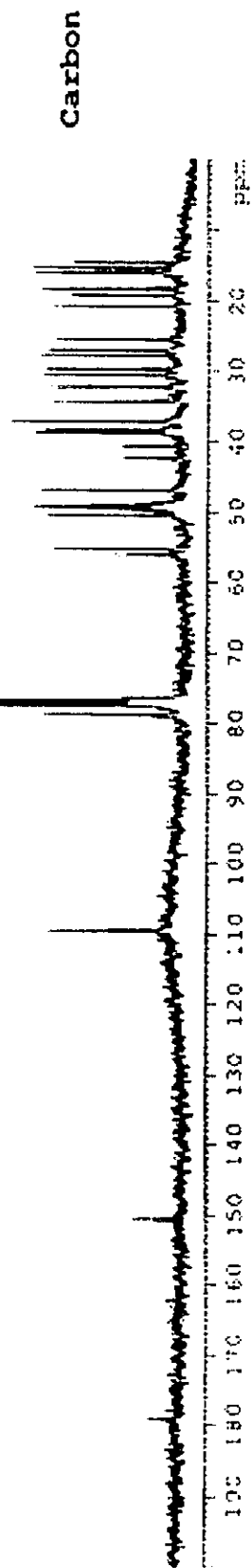
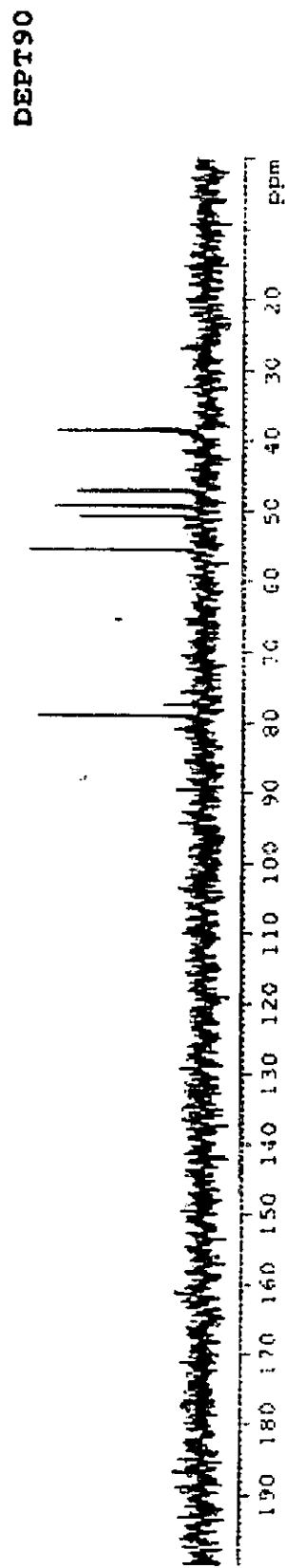
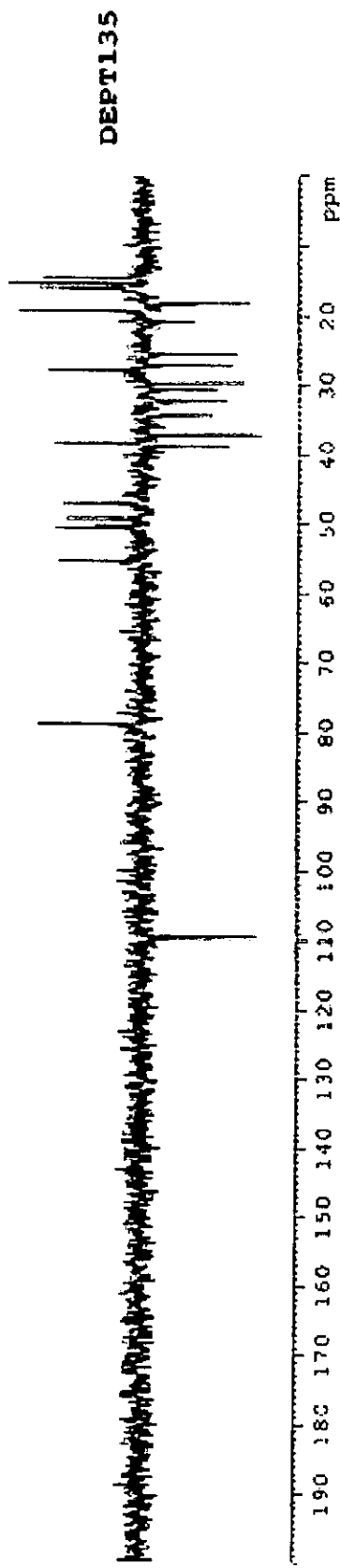
ละลาย Trypsin 2.5 g ใน HEPES buffer solution 1,000 mL คนด้วยแท่งคนแม่เหล็กเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 7.4 กรองด้วย Millipore filter



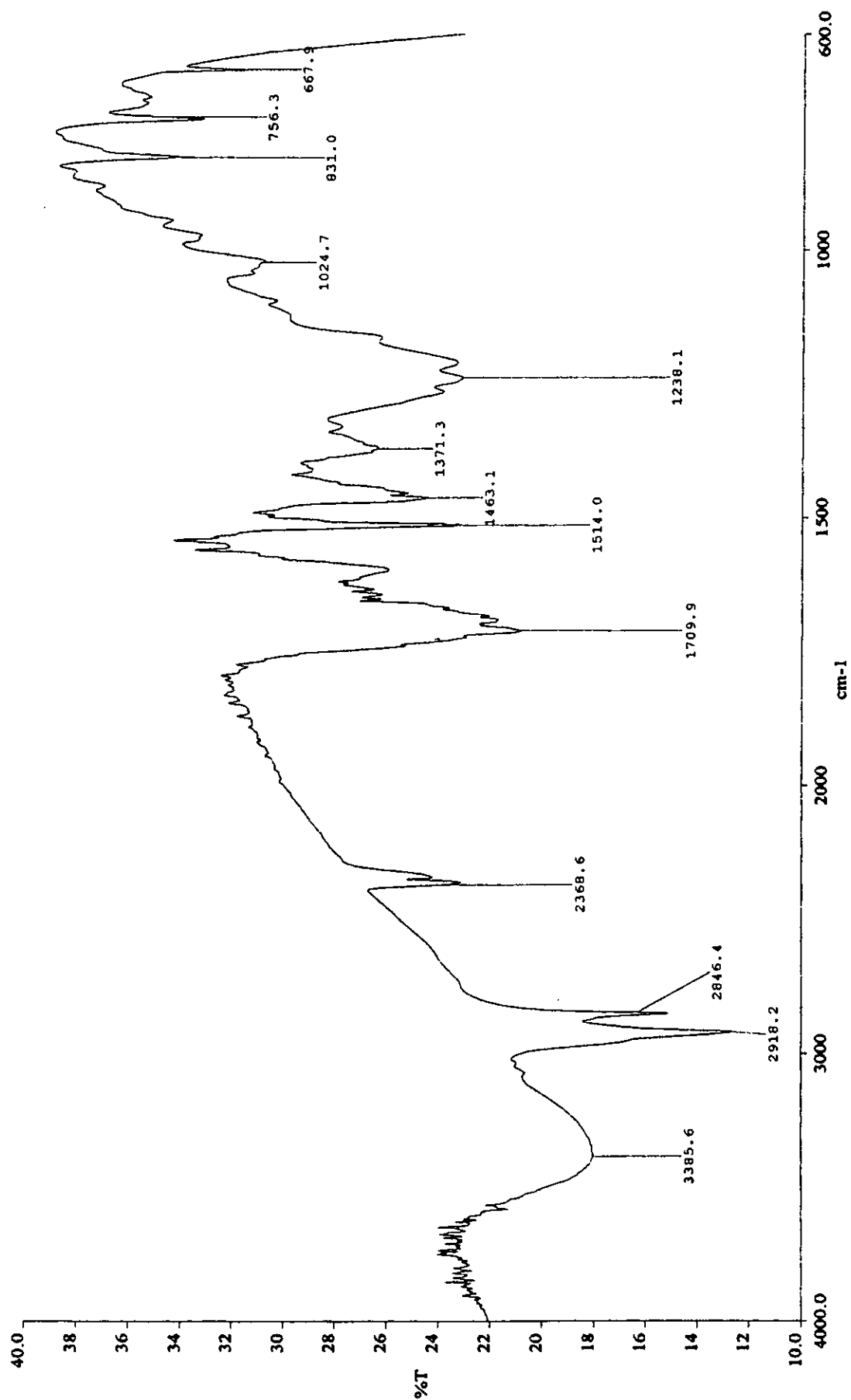
ภาพประกอบ 39 FT IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ 1



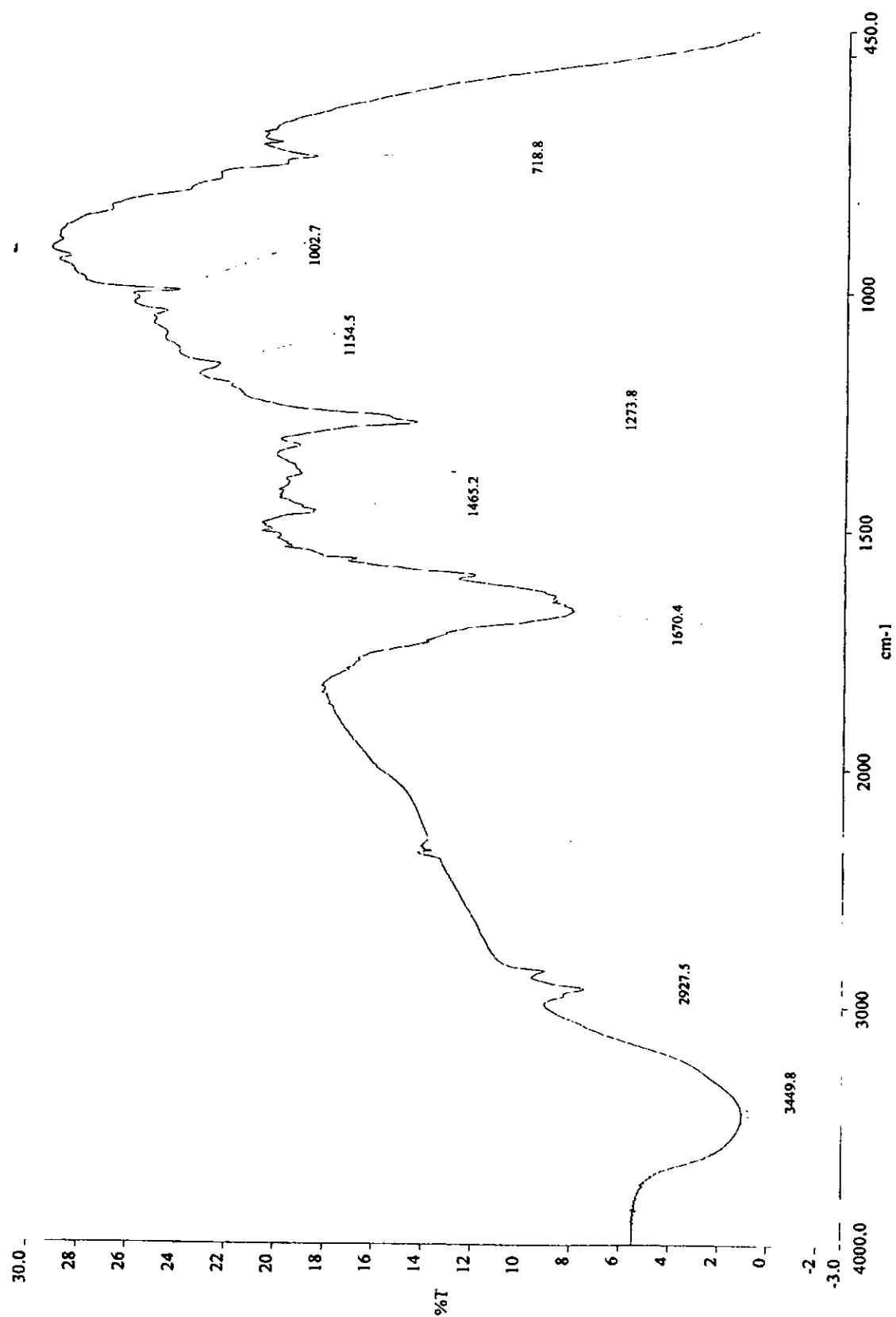
ภาพประกอบ 40 ^1H NMR spectrum (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) ของสารประกอบ 1



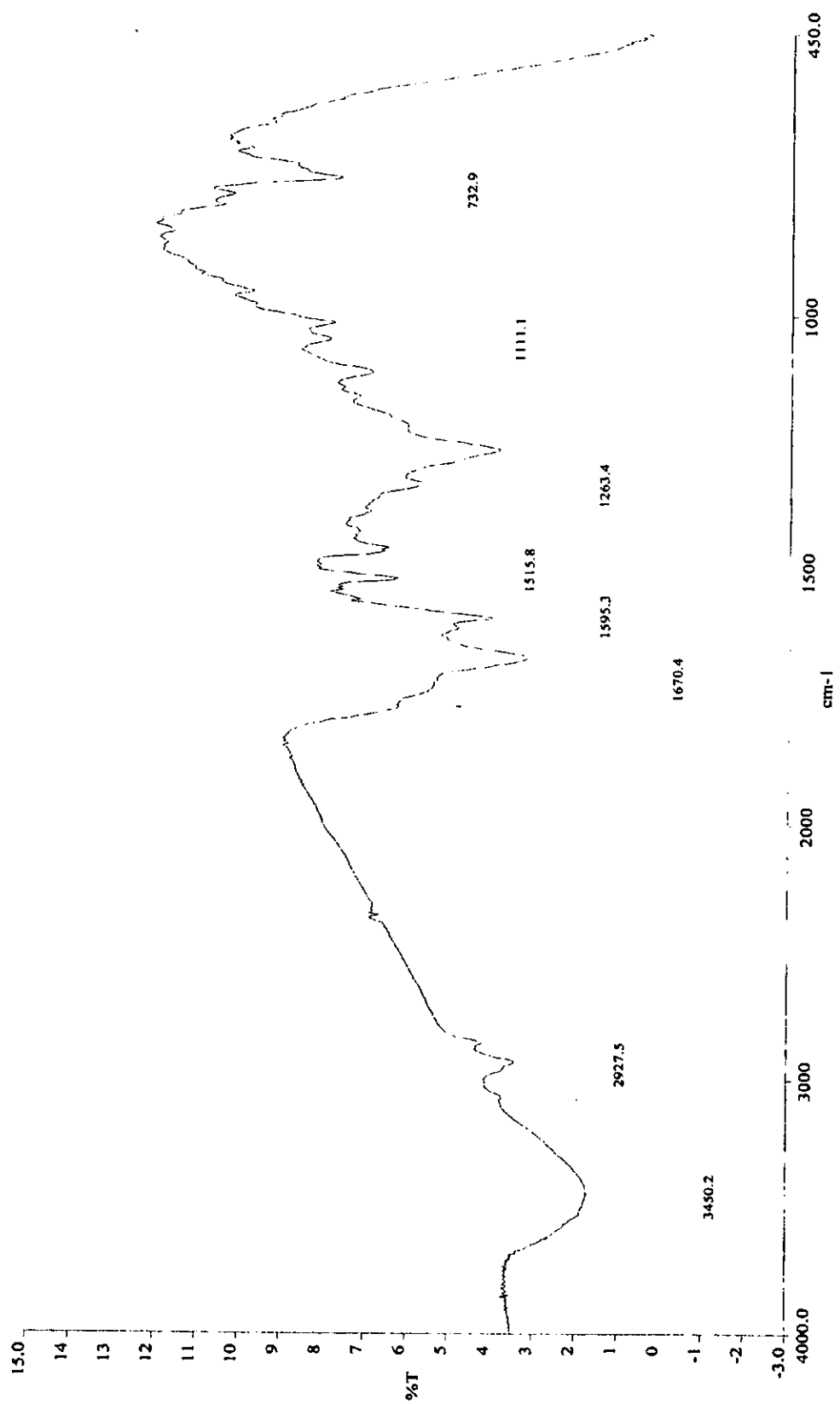
ภาพประกอบ 41 ^{13}C NMR และ DEPT spectrum (75 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) ของสารประกอบ 1



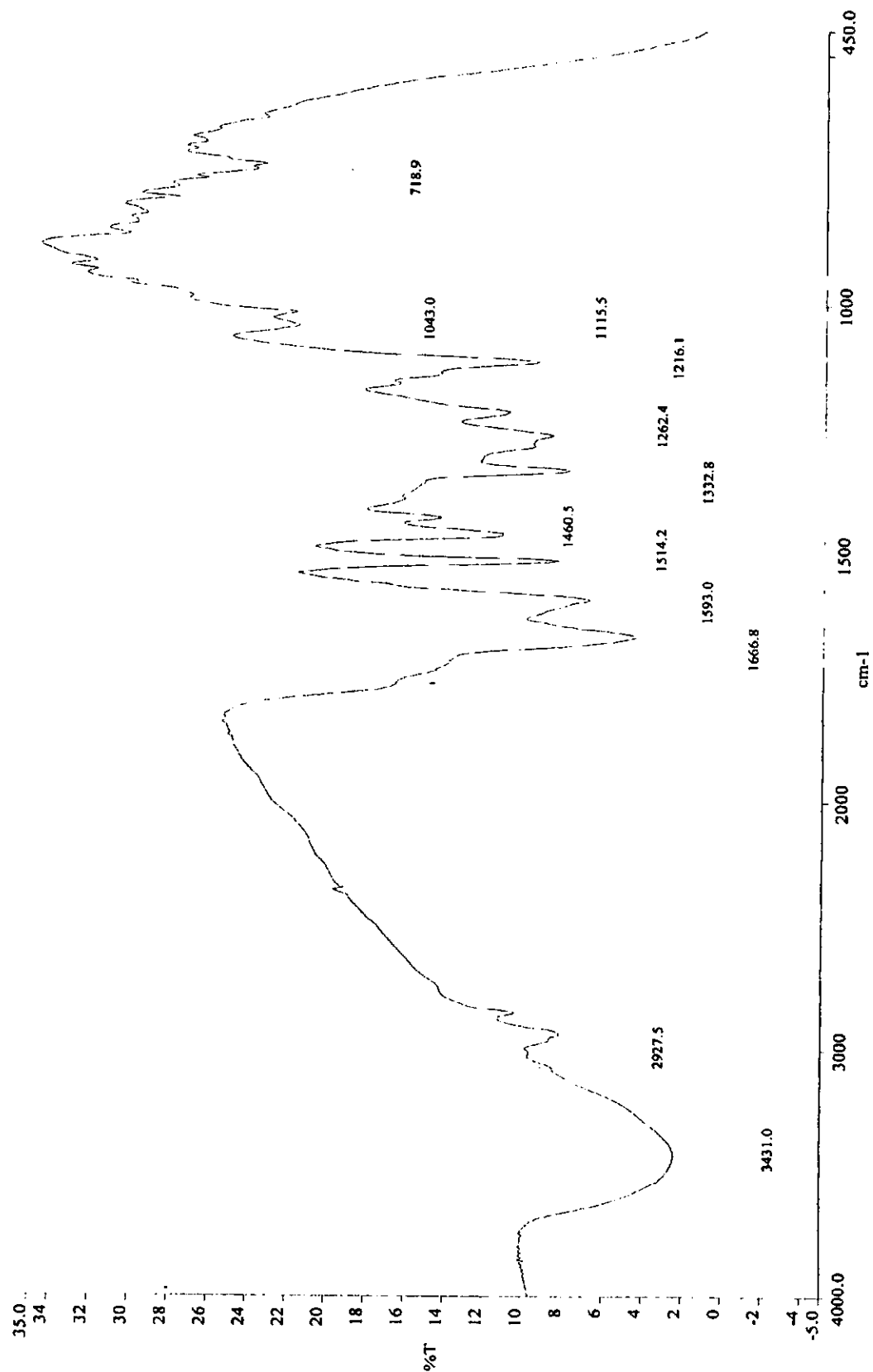
ภาพประกอบ 42 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.4



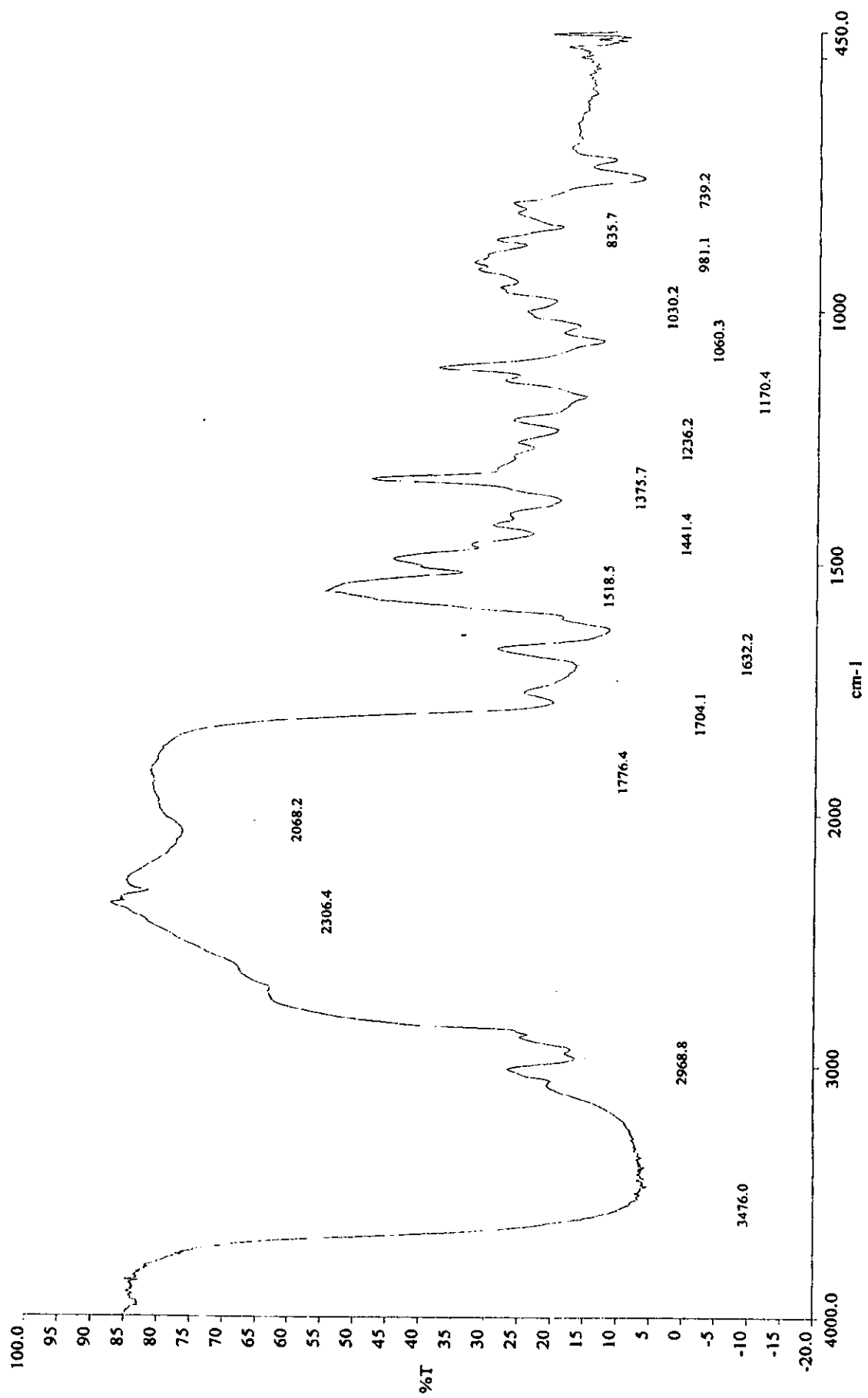
ภาพประกอบ 43 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.2



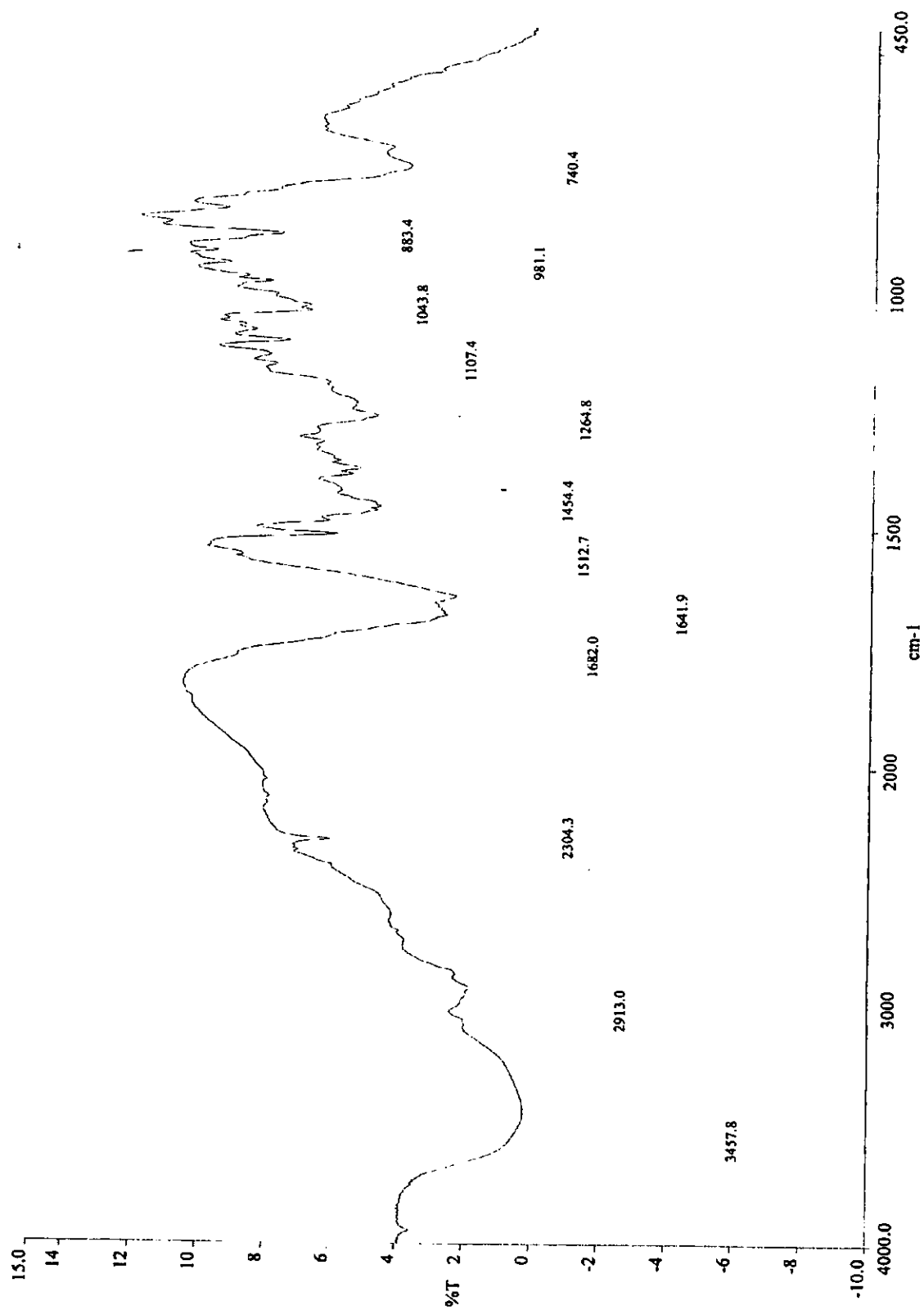
ภาพประกอบ 44 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.3



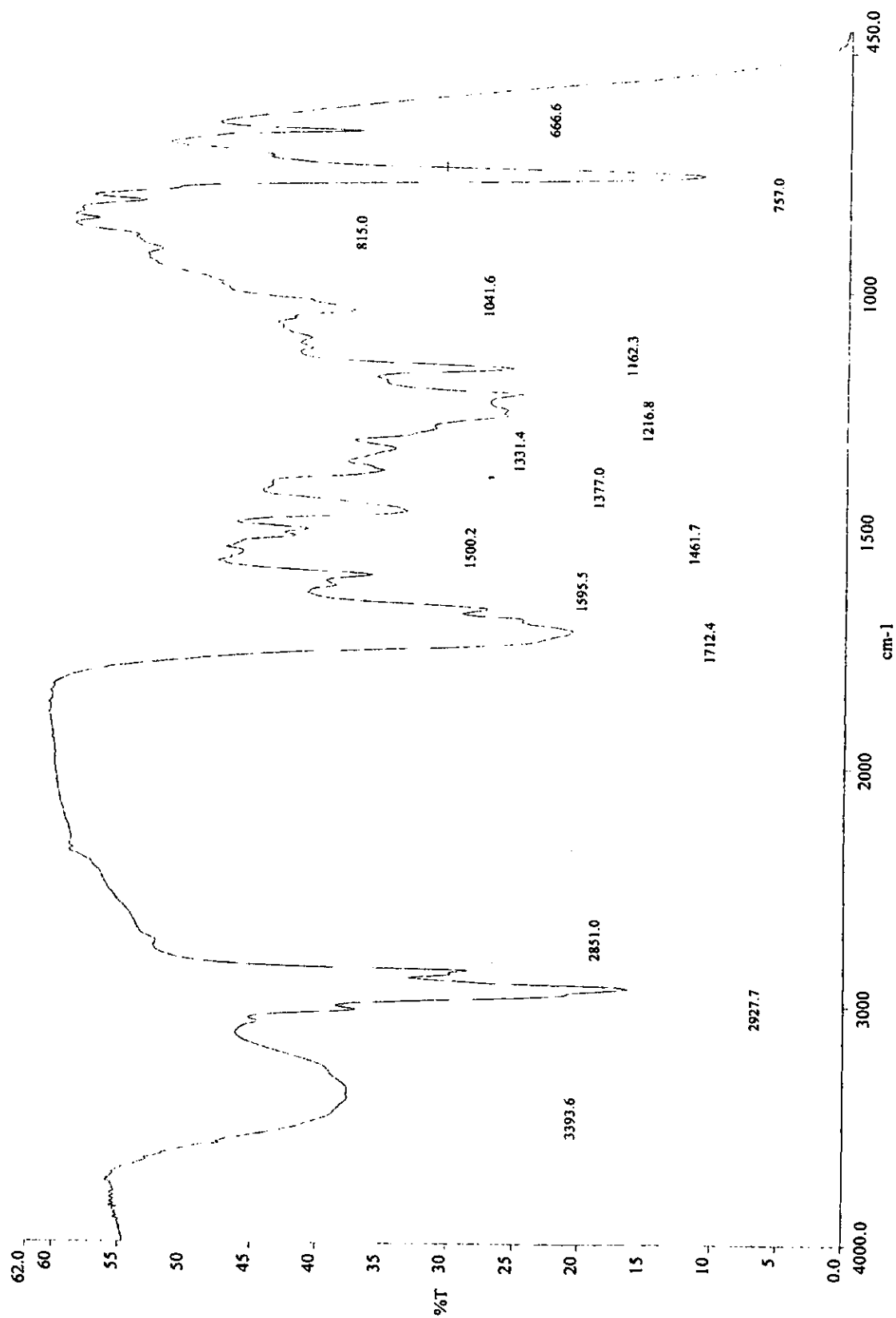
ภาพประกอบ 45 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.6.4



ภาพประกอบ 46 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E1.7.5



ภาพประกอบ 47 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.8



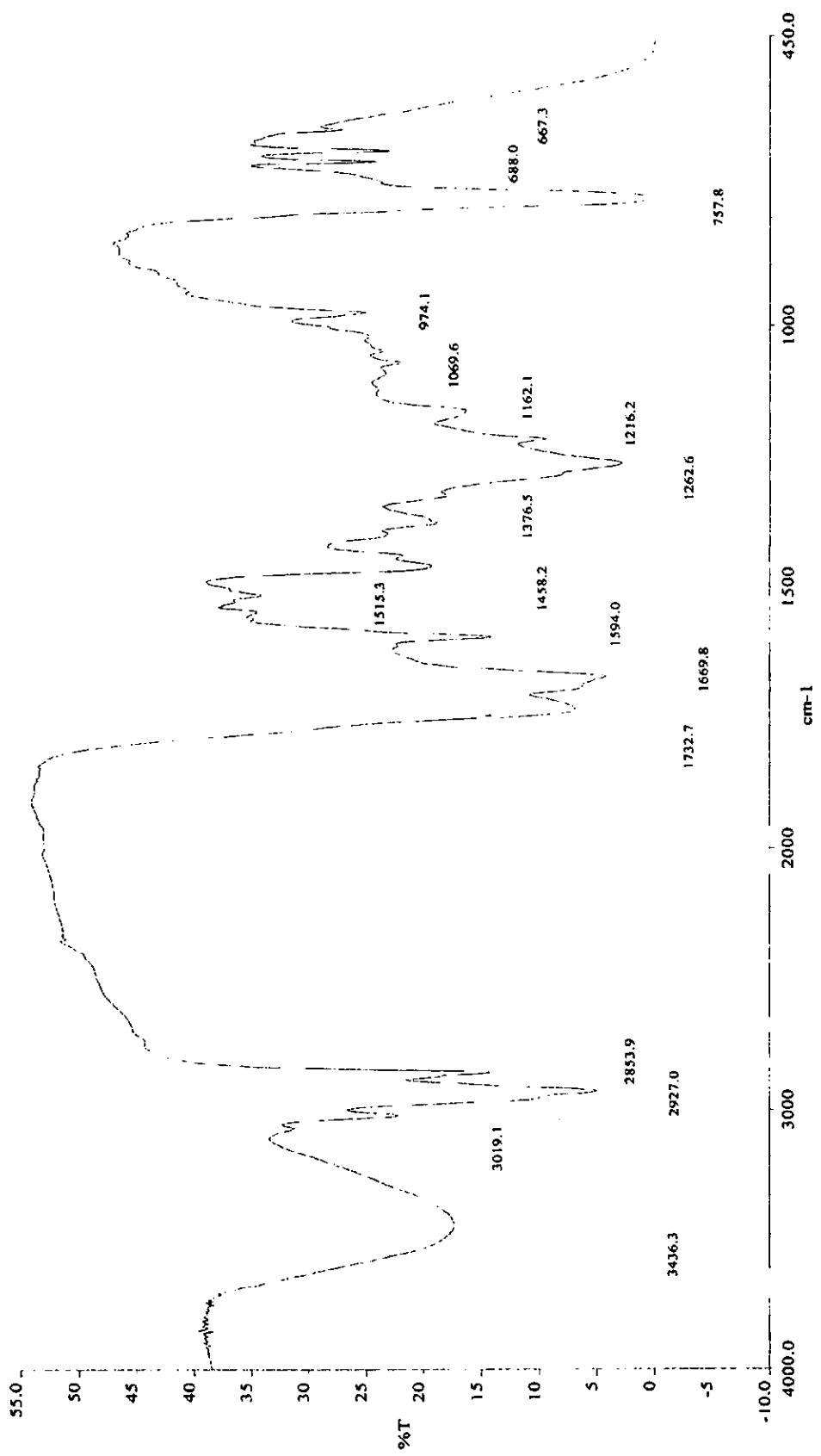
ภาพประกอบ 48 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.9.3



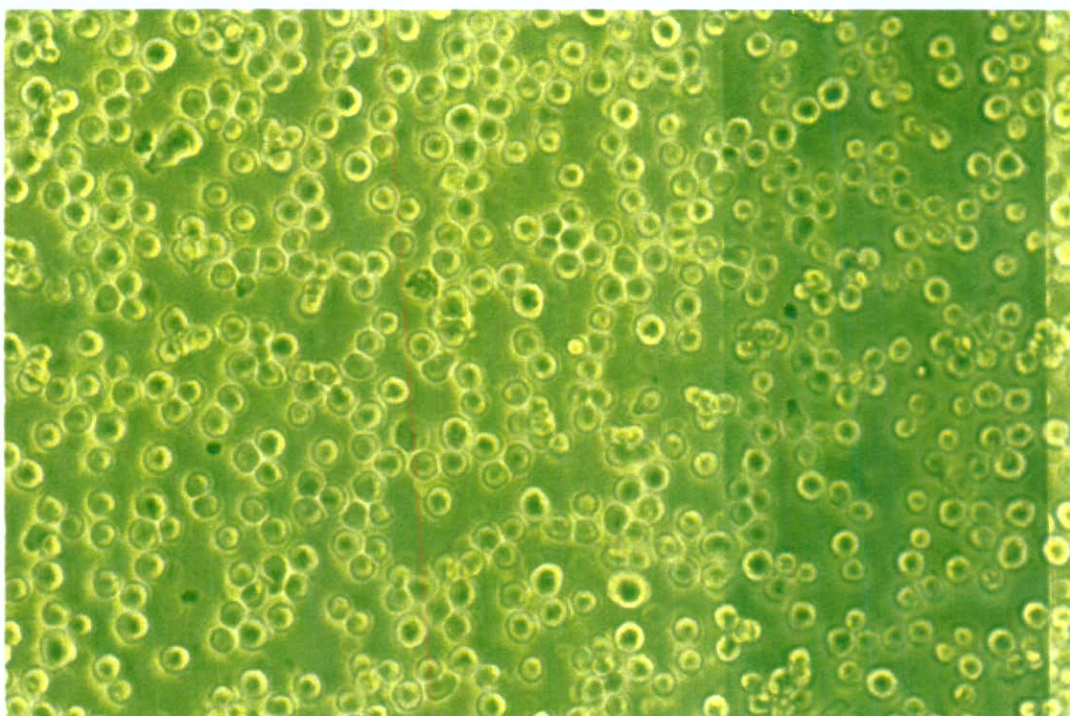
ภาพประกอบ 49 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E3.9.4



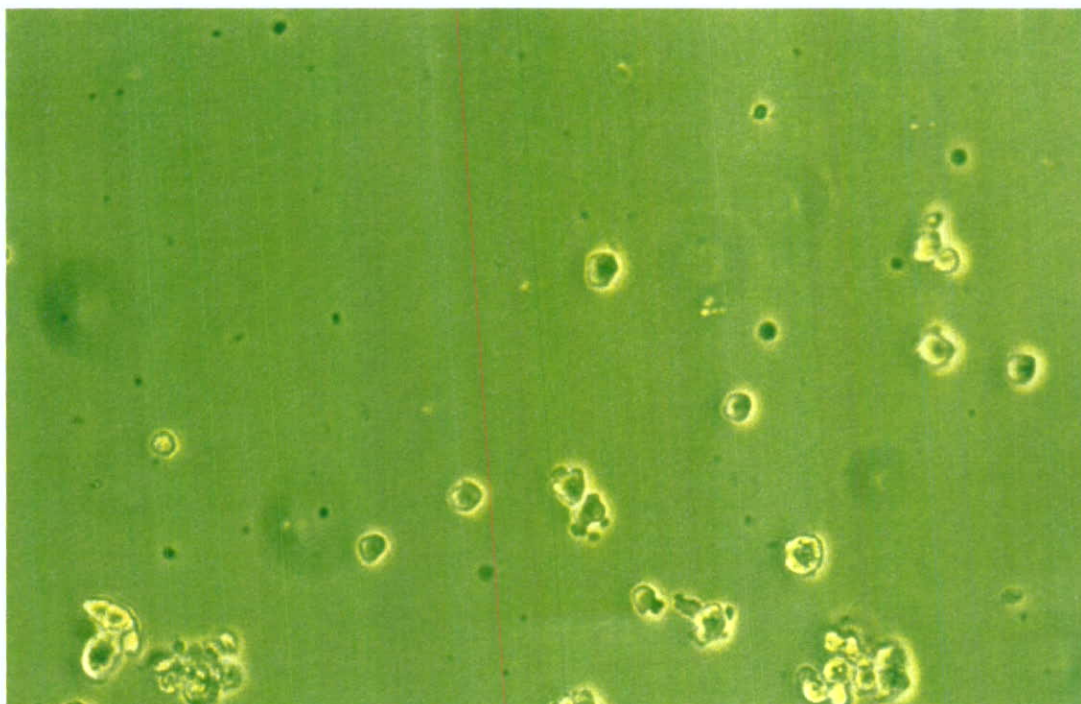
ภาพประกอบ 50 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E4.11



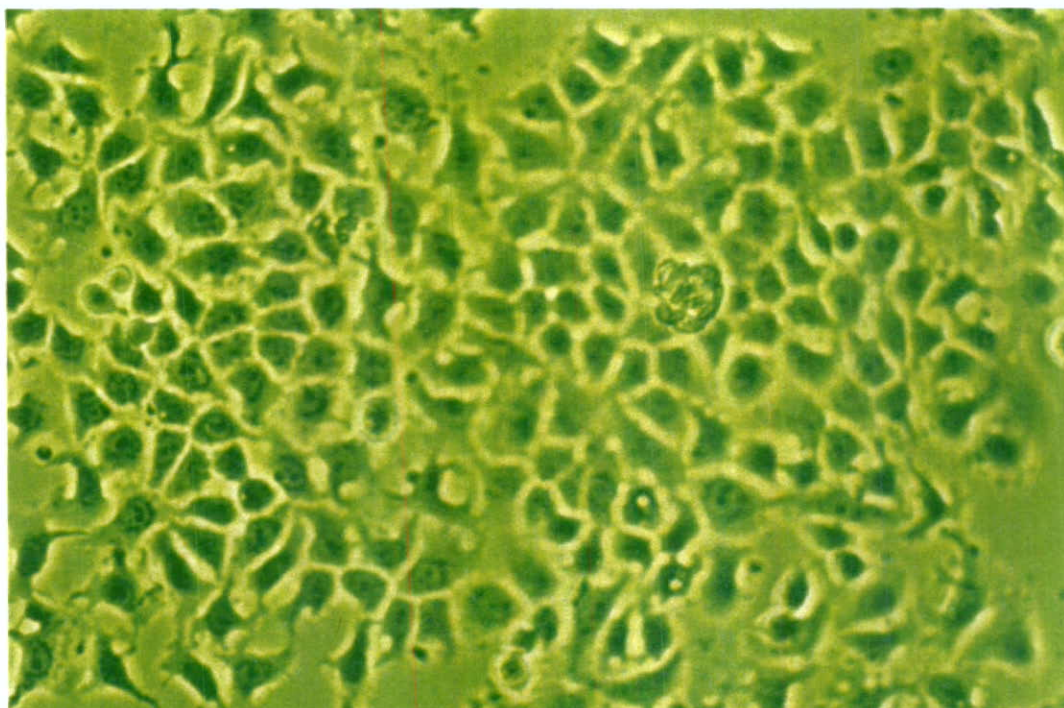
ภาพประกอบ 51 FT IR spectrum ของสารกลุ่ม E5.4



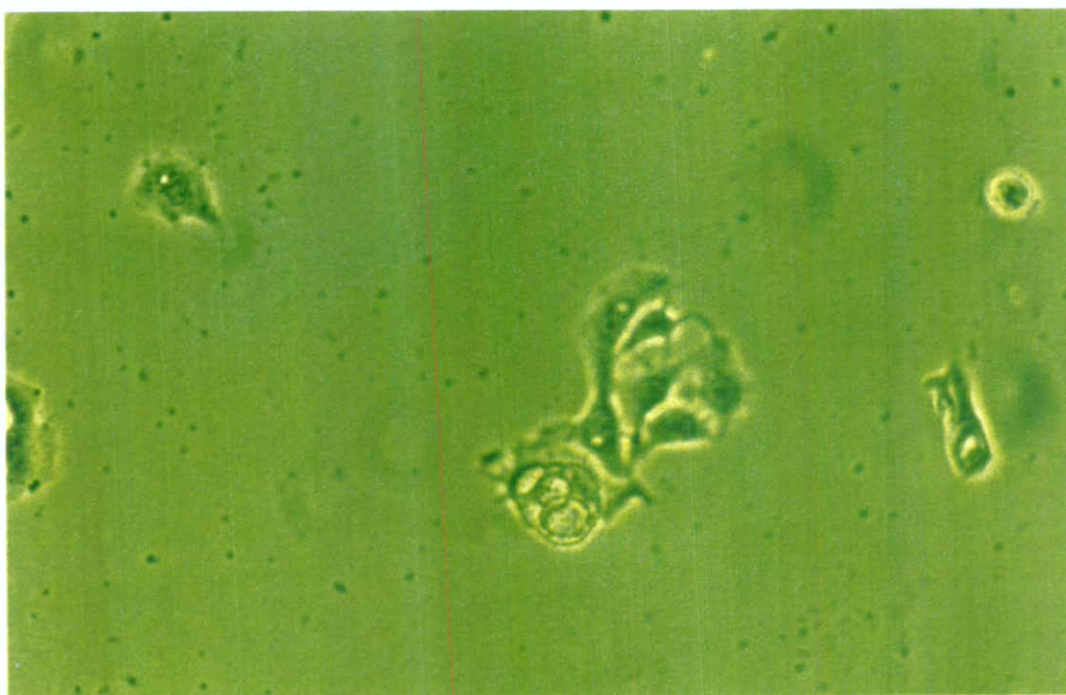
ภาพประกอบ 52 เซลล์มะเร็ง P388 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4



ภาพประกอบ 53 เซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ในวันที่ 4



ภาพประกอบ 54 เซลล์มะเร็ง MCF-7 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4



ภาพประกอบ 55 เซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ 1 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL
ในวันที่ 4

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

5-FU	5-Fluorouracil
TMS	tetramethylsilane
EtOAc	ethyl acetate
MeOH	methanol
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
KBr	potassium bromide
CDCl ₃	deuteriochloroform
CD ₃ OD	methyl alcohol-d ₄
TLC	Thin layer chromatography
UV	Ultra violet
FT IR	Fourier Transform Infrared Spectra
¹ H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
¹³ C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
COSY	Proton-proton correlation
HMQC	1-bond heteronuclear ¹ H- ¹³ C correlation
HMBC	long range heteronuclear ¹ H- ¹³ C correlation
EI MS	Electron Ionization Mass Spectrometry
M ⁺	Molecular ion
μg	microgram
mL	milliliter
cm	centimetre
nM	nanomolar
μM	micromolar
g	gram
mg	milligram
° C	degree celcius
cm ⁻¹	wave number
ppm	parts per million

m/z	mass to charge ratio
mm	millimetre
kg	kilogram
mp	melting point
MHz	Mega Hertz
δ	Chemical shift
J	coupling constant
Hz	Hertz
m	multiplet
d	doublet
s	singlet
br s	broad singlet
nm	nanometer

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาว นันทรัตน์ รุ่งสกุล
วันเดือนปีเกิด	21 สิงหาคม 2521
สถานที่เกิด	อำเภออินทร์บุรี จังหวัดสิงห์บุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	65/21 แฟลตการเคหะนวนคร หมู่ 13 ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2547	กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
พ.ศ. 2543	กศ.บ. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
พ.ศ. 2539	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสิงห์บุรี
พ.ศ. 2536	มัธยมศึกษาปีที่ 3 จากโรงเรียนสิงห์บุรี