

615.32369

๗46๘๘

๘-๒

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ฤทธิ์การทำลายเซลล์มะเร็ง P 388 ของสารสกัดจากลำต้นหลอดเดือน
CYTOTOXICITY ON P388 CELL LINE OF EXTRACTED COMPOUNDS
FROM STEM OF *MALLOTUS OBLONGILIUS* MUELL. ARG.

06 พ.ย. 2546

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ดร.จินดา แท้มบรรจง

ผศ.ดร.สุพันธ์ ชัยนะกุล

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ดร.พรทิพา ทิชา

กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2544

h.226689

บทคัดย่อ

จากการนำลำต้นหอยคดเถื่อนมาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดทั้ง 2 แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 64 $\mu\text{g/mL}$ และมากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัด hexane มาแยกด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ 3-acetylaleuritolic acid และสารผสม 2 กลุ่ม คือ สารผสมของ stigmasterol กับ β -sitosterol และสารผสมของ stigmast-4-en-3-one กับ stigmasta-4,22-dien-3-one สารเหล่านี้แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ (ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$) การพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้วิธีการทางสเปกโตรสโกปี

Abstract

The stem of *Mallotus ablongifolius* Muell. Arg. was extracted with hexane and ethanol respectively. Study on biological activity of hexane and ethanol extracts showed cytotoxicity against P 388 cell line with ED_{50} at 64 $\mu\text{g/mL}$ and greater than 100 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The hexane extract was purified by using chromatographic method to yield 3-acetylaleuritolic acid, a mixture of stigmasterol and β -sitosterol and a mixture of stigmast-4-en-3-one and stigmasta-4,22-dien-3-one. They showed weak cytotoxicity against P 388 cell line ($ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Their structures were elucidated based on the spectroscopic data.

ประกาศคุณูปการ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐที่ให้การสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณ คุณณรงค์ นันทะแสน นักวิชาการกรมป่าไม้ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

คณะผู้ดำเนินการวิจัย



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	2
ความสำคัญของงานวิจัย	2
ขอบเขตของงานวิจัย	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	7
อุปกรณ์ / เครื่องมือและสารเคมี	7
การสกัดสารสกัดหยาบ	8
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์มะเร็ง	9
การแยกกลุ่มสารจากสารสกัดหยาบ	10
4 ผลการวิจัย	11
ผลการสกัดสารสกัดหยาบ	11
ผลการแยกกลุ่มสารจากสารสกัดหยาบ	11
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	13
5 สรุปผล และอภิปรายผล	20
บรรณานุกรม	29

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

จากรายงานของกองสถิติ กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับสองรองจากโรคหัวใจ¹ ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียอย่างมหาศาลทางเศรษฐกิจและทรัพยากรมนุษย์ มะเร็งเกิดได้กับทุกส่วนของร่างกาย มีปัจจัย/สาเหตุมากมายที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง มะเร็งบางชนิดถ้าเป็นในระยะแรกและยังไม่มีมีการกระจายอาจรักษาให้หายได้ การรักษามะเร็งโดยแพทย์แผนปัจจุบันมี 4 วิธี คือ การผ่าตัด² รังสีบำบัด³ เคมีบำบัด⁴ และอิมมูโนบำบัด⁵ การรักษาอาจใช้เพียงวิธีการใดวิธีการหนึ่งหรืออาจต้องใช้หลายวิธีร่วมกัน เคมีบำบัดมักจะถูกนำมาใช้คู่กับวิธีการรักษาอื่น ๆ เพื่อเสริมการรักษาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เคมีบำบัดอาจใช้ยาที่สังเคราะห์ขึ้น หรือเป็นยาที่ประยุกต์จากผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ มีการพัฒนาสมุนไพรจำนวนมากเป็นยาเพื่อรักษามะเร็ง นอกจากนี้ยังพบว่ามีสมุนไพรจำนวนมากที่ใช้โดยตรง (โดยปราศจากการแปรรูป) เพื่อรักษามะเร็งโดยแพทย์แผนไทย⁶ สมุนไพรที่ใช้บางชนิดได้มีการศึกษาเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจนทั้งทางด้านพิษเคมี สารที่เป็นองค์ประกอบ ตลอดจนได้ทดสอบสรรพคุณในการศึกษา แต่ก็มีสมุนไพรจำนวนมากที่ใช้กันโดยอาศัยคำบอกเล่าสืบต่อกันมา ปราศจากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์หรือการทดสอบใด ๆ ซึ่งการนำมาใช้โดยปราศจากข้อมูลทั้งหมดหรือบางส่วน อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ในประเทศไทยมีพันธุ์พืชมากมายหลายชนิดที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น ขันทองพยาบาท (*Gelonium multiflorum*.A.Juss) คำแสด (*Mallotus philippensis*) แทงทวยพลึง (*Mallotus rependus*) เปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*.Roxb) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ดอกดิ้ง (*Gloriosa superba* Linn) วงศ์ Liliaceae ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasatus* Kruz.) วงศ์ Acanthaceae⁷ แกแล (*Maclura cochinchinensis*(Lour)Corn.) วงศ์ Maraceae⁸ พืชที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้นี้บางชนิดมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น สารสกัดด้วย chloroform จากแก่น แกแล พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB⁹ และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง P-388 ในหนูทดลองได้¹⁰ แต่ยังมีพืชอีกหลายชนิดที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งโดยที่ยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและองค์ประกอบทางเคมีและมีพืชบางชนิดที่ใช้เป็นยาด้านมะเร็งโดยไม่มีการบันทึกเป็นหลักฐานยังคงเป็นเพียงคำบอกเล่าสืบต่อกันมา

ตำรายาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็งตำรับหนึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ห้วข้าวเย็นเหนือ (*Smilax carbularia* Kunth) ไฟเดื่อนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* G.Don) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ต้นปึกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) ลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) สัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เกล็ดนึ่งม (*Manis javanica*) ขนเม่น (*Hystrix brachyura* Linn.) เจียงกระเบน (*Dasyatis spp.*) กระดองเต่า (*Domonia subtrijuga* Boulenger) และอกตะพานน้ำ (*Trionyx catalagneus* Boulenger) จากการศึกษาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดสมุนไพรเฉพาะส่วนพืชในยาตำรับนี้พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าค่ามาตรฐานสากล โดยค่า ED_{50} ของสารสกัดต่อเซลล์ KB ที่เลี้ยงในหลอดทดลองสูงกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ แต่เมื่อทดลองกับหนูทดลองพบว่าสามารถยืดอายุของหนูทดลองกลุ่มที่เป็นมะเร็งได้ และพบว่าสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกรน (nude mice) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีผลตอบสนองต่อระบบทางภูมิคุ้มกัน¹³

ปัจจุบันสมุนไพรตำรับนี้ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นพืชและได้มีการเติมหลอดเถื่อนเพื่อรักษามะเร็งตามคำบอกเล่า หลอดเถื่อนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mallotus oblongifolius* Muell.Arg. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อเรียกอื่น ๆ เช่น ข้าวหลอด ผักหวานช้างโขลง เตื่อขี้ฮั่น¹¹ เป็นไม้พุ่มกึ่งยืนต้นขนาดเล็ก สูง 5-15 เมตร กิ่งก้านมีขนสีน้ำตาล ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปวงรีหรือรูปไข่ กว้าง 3-8 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ดอกช่อออกที่ปลายกิ่งและซอกใบ ผลแห้งแตกได้มี 3 พู เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาใด ๆ เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็ง องค์ประกอบสำคัญทางเคมีและความเป็นพิษของหลอดเถื่อน ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญในการศึกษาเพื่อหาข้อมูลทางเคมีและเภสัชวิทยาของสมุนไพรนี้ เพื่อความปลอดภัยในการใช้ และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาให้เป็นยาด้านมะเร็งต่อไป

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อสกัดสารสำคัญจากลำต้นหลอดเถื่อน
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านมะเร็ง P-388 ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในลำต้นหลอดเถื่อน
3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ความสำคัญของงานวิจัย

เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาและพัฒนาสารให้เป็นยาด้านมะเร็งต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้เฉพาะส่วนที่เป็นลำต้นของต้นหลอดเถื่อน
2. การสกัดสารจากพืช ใช้ตัวทำละลาย hexane และ ethanol ตามลำดับ
3. นำสารสกัด hexane (สารสกัดที่เป็นพิษ) มาแยกและทำสารที่เป็นองค์ประกอบหลักให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี
4. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และสารที่แยกได้โดยใช้เซลล์มะเร็ง P-388



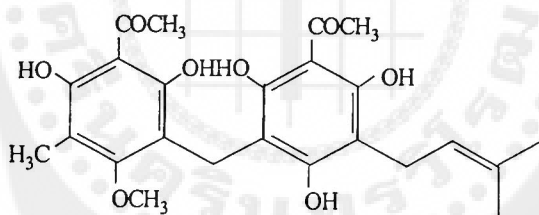
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

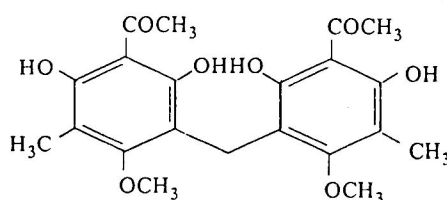
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Mallotus*

Smith และคณะพบว่าสารสกัดจากส่วน glandula ของ *Mallotus philippinensis* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ COLO320 (ED_{50} เท่ากับ $16.7 \mu\text{g/mL}$ และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ 100% ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/mL}$)¹⁴

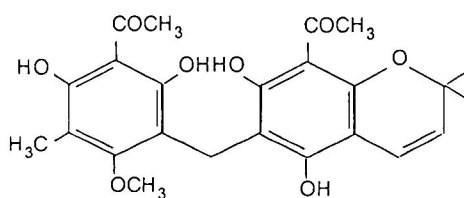
Arisawa และคณะ ได้ศึกษาองค์ประกอบที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* ได้สารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ 3 ชนิดคือ 3-(3,3-dimethylallyl)-5(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone , 5-methylene-bis-2,6-dihydroxy-3methyl-4-methoxyacetophenone หรือ mallotophenone และ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-2,2-dimethylchromene หรือ mallotochromene¹⁵



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของ 3-(3,3-dimethylallyl)-5(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phloracetophenone



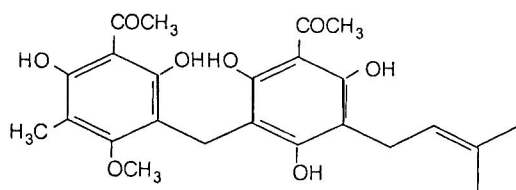
ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของ mallotophenone



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของ mallotochromene

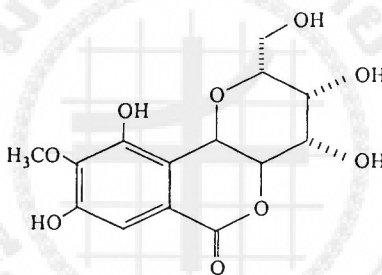
ต่อมา Arisawa และคณะ สามารถแยกสาร 3-(3-methyl-2-hydroxy-but-3-enyl)-5-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)-phlorbutyrophenone หรือ mallotolerin และ 8-acetyl-5,7-dihydroxy-6-(3-acetyl-2,4-dihydroxy-5-methyl-6-methoxybenzyl)2,2-dimethyl-3-hydroxychroman หรือ mallotochromanol จากสารสกัดเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* ด้วยเทคนิคทางคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับและใช้ 15% ethyl acetate/hexane เป็นตัวชะสารประกอบทั้งสองชนิดนี้เป็นสารประกอบใหม่ เมื่อนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่า สารประกอบ mallotolerin มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L5178Y เท่ากับ $0.95 \mu\text{g/mL}$ และ $0.82 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในขณะที่สารประกอบ mallotochromanol ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และเซลล์ L-5178Y ($ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) และพบว่าอนุพันธ์ acetate ของ mallotolerin มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำลง โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L-5178Y เท่ากับ $3.50 \mu\text{g/mL}$ และ $10.05 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แต่อนุพันธ์ acetate ของ mallotochromanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้น โดยมีค่า ED_{50} ต่อเซลล์ KB และเซลล์ L-5178Y เท่ากับ $8.6 \mu\text{g/mL}$ และ $4.50 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับและเมื่อทดลองในหนูทดลอง ปรากฏว่าสารทั้งสองมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ Ehrlich carcinoma ในหนูทดลองได้ปานกลาง¹⁶

ต่อมา Arisawa และคณะสามารถแยกสาร mallotojaponin ได้จากสารสกัดจากเปลือกผลของ *Mallotus japonicus* โครงสร้างของ mallotojaponin ดังแสดงในภาพประกอบ 4 จากการศึกษากิจกรรมต้านสารเสริมการเกิดมะเร็ง (antitumor promotor activity) พบว่า สาร mallotojaponin สามารถยับยั้งการทำงานร่วมกันของ ^3H -choline กับ phospholipid ของ C3H101/2 cells ที่สร้างขึ้นโดย 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) ซึ่งมีสมบัติเป็นสารเสริมการเกิดมะเร็งได้¹⁷



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของ mallotojaponin

Kim และคณะได้ศึกษาฤทธิ์การต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูของสารประกอบ bergenin (ภาพประกอบ 5) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ *Mallotus japonicus* จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มทดลองซึ่งเลี้ยงเซลล์ตับหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ CCl_4 และ bergenin อยู่ด้วย วัดปริมาณของเอนไซม์ GTP และ SDH ได้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงเซลล์ตับหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยใช้ CCl_4 แต่ไม่มี bergenin ดังนั้น Kim และคณะสรุปว่าสาร bergenin สามารถลดความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูของสาร CCl_4 ได้¹⁸



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ bergenin

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นหลอดเถื่อน

Cannon และคณะ ได้สำรวจพืชในภาคใต้ของไทยพบพันธุ์ไม้ 185 ชนิด จัดอยู่ใน 161 สกุล และ 74 ตระกูล ในจำนวน 185 ชนิดที่สำรวจพบว่ามีพืช 27 ชนิดที่มีสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับในหลอดเถื่อนซึ่งเป็นพืช 1 ใน 185 ชนิดที่สำรวจเมื่อนำใบสดมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและทดสอบด้วย Mayer's reagent (สารละลาย mercuric chloride 1.36 g และ potassium iodide 5.0 g ในน้ำ 100 mL) พบว่าให้ผลเป็น negative แสดงว่าไม่มีแอลคาลอยด์ในสารสกัดจากใบพืชชนิดนี้¹⁹ ต่อมา Arbain และคณะได้สำรวจพืชที่ขึ้นอยู่บนเกาะสุมาตรา พบพันธุ์ไม้ 293 ชนิด จัดอยู่ใน 203 สกุลและ 77 ตระกูล ในจำนวน 293 ชนิดนี้พบว่ามีพืช 58 ชนิดที่มีสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย สำหรับในหลอดเถื่อนซึ่งเป็นพืช 1 ใน 293 ชนิดที่สำรวจเมื่อทดสอบหาสารประกอบแอลคาลอยด์ พบว่าในใบพืชชนิดนี้มีสารประกอบแอลคาลอยด์อยู่ด้วย²⁰

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

1. การสกัด การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์จากลำต้นแห้งของต้นหลอดเดือน
2. การศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากหลอดเดือนและทำสารให้บริสุทธิ์

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 2.50 5 และ 10 cm
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240A)
3. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
4. หลอดอัลตราไวโอเลต (Spectroline ENF – 260 C/F)
5. Freeze – Dryer (FTS System FD – 3 – 55D – MP)
6. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT – IR Spectrum BX)
7. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
8. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Advance 300, 300 MHz)
9. Rotary Evaporator (Buchi Rotavapor R – 114)

สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane chloroform ethanol ethyl acetate และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
2. Anisaldehyde (E.Merck, AR grade)
3. conc.Sulfuric acid (E.Merck, AR grade)
4. Glacial acetic acid (E.Merck, AR grade)
5. Silica gel สำหรับโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
 - Silica gel 60 (<0.063 mm, E.Merck, AR grade)
 - Silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, E.Merck, AR grade)
6. Silica gel 60 GF₂₅₄ สำหรับโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (E.Merck, AR grade)

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus, Tokyo)
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด T-25 (Aseptic Flask, Costar, UK)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
4. ตู้บ่ม (Shel – Lab. TC 2323, USA)
5. Haematocytometer (Boeco, Germany)
6. ปิเปตขนาดต่าง ๆ

สารเคมี

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

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารสกัดหยาบ

1.1 นำลำต้นหลอดเถื่อนที่ได้มาล้างให้สะอาด ผึ่งลม และอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 °C

1.2 แห่หลอดเถื่อนที่แห้งหนักประมาณ 30 กิโลกรัมใน hexane โดยแบ่งแห่ในภาชนะฝาปิด 6 ใบ แต่ละใบแห่หลอดเถื่อนที่แห้งหนักประมาณ 5 กิโลกรัม ใน hexane 5 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แยกสารละลาย hexane ที่สกัดได้ นำกากที่ได้ทำการแห่ใน hexane ซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมสารละลาย hexane ที่สกัดได้เข้าด้วยกันกากที่ได้นำมาแห่ต่อใน ethanol 5 ลิตร 3 ครั้งๆ ละ 1 สัปดาห์ รวมสารละลาย ethanol ที่สกัดได้

1.3 ระเหยตัวทำละลายจากสารละลาย hexane และสารละลาย ethanol ด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้ สารสกัดหยาบ hexane 35 g และสารสกัดหยาบ ethanol 200 g

1.4 นำสารสกัดหยาบทั้งสองมาอย่างละ 10 มิลลิกรัม เพื่อเตรียมสารละลายใช้สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P 388 รายละเอียดดังแสดงในขั้นตอนที่ 2

1.5 นำสารสกัดหยาบ hexane ที่เหลือมาแยกต่อโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี รายละเอียดในขั้นตอนที่ 3

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาดต่อเซลล์มะเร็ง

2.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388 โดยดูดเซลล์ P-388 จาก stock cell suspension ให้มีปริมาณเซลล์ 5×10^4 cell/mL มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (10% New Born Calf Serum : NCS ใน RPMI 1640 medium) บ่มใน incubator สุ่มเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์ 0.2 mL นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในวันที่ 1 2 3 4 5 6 และ 7 โดยย้อมเซลล์ด้วย trypan blue (เซลล์ที่มีชีวิตไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตติดสีน้ำเงิน) นับเซลล์บน Haematocytometer ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาเขียน growth curve

พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 4 ดังนั้นจะใช้จำนวนเซลล์ในวันที่ 4 ของกลุ่มควบคุมเทียบเท่ากับร้อยละการเจริญเติบโตเป็น 100

2.2 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาดและสารสกัดที่แยกได้จากเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.2.1 เตรียมสารตัวอย่าง (sample stock solution ที่มีความเข้มข้น $1000 \mu\text{g/mL}$) ชั่งน้ำหนักสาร (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) 0.0040 กรัม ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม DMSO 0.1 mL เขย่าสารตัวอย่างให้ละลายหมด เติม 10% NCS ใน RPMI 3.9 mL จะได้ sample stock solution ที่มีความเข้มข้น $1000 \mu\text{g/mL}$

2.2.2 เตรียมสารละลาย solvent control โดยใช้ DMSO 0.25 mL ใน 10% NCS ใน RPMI 9.75 mL ได้สารละลาย solvent control ความเข้มข้น 2.5% 10 mL

2.2.3 ใส่สารตัวอย่างโดยปิเปต จาก sample stock solution ให้ได้ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง $30 \mu\text{g/mL}$ $60 \mu\text{g/mL}$ $80 \mu\text{g/mL}$ และ $100 \mu\text{g/mL}$ ลงในเซลล์ P-388 ที่มีเตรียมไว้แล้วที่มีปริมาณเซลล์ 5×10^4 cell/mL ปริมาตร 1 mL และอาหารเลี้ยงเชื้อ จนได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 5 mL ด้วยวิธีการเดียวกันใส่สารละลาย solvent control 1 mL ในเซลล์ P-388 ที่มีเตรียมไว้ 1 mL และอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 mL เพื่อเป็น negative control และใช้ 5-fluorouracil (5-FU) เป็น positive control

2.2.4 นำสารละลายจากข้อ 2.2.3 ใส่ใน incubator เป็นเวลา 4 วัน นับเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หาร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ P-388 ในแต่ละขวดที่ใส่สารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และที่ใส่ negative control และ positive control เขียนกราฟ หาค่า ED_{50}

หมายเหตุ : เหตุที่ต้องใช้ DMSO เนื่องจากสารตัวอย่างละลายในน้ำไม่ดี แต่ละลายได้ใน DMSO ความเข้มข้น 0.5% ความเข้มข้นนี้ทดสอบแล้วไม่เป็นพิษต่อเซลล์ P-388

3. การแยกสารจากสารสกัดหยาบ

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบ hexane และสารสกัดหยาบ ethanol พบว่า สารสกัดหยาบ hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 มากกว่าสารสกัดหยาบ ethanol ดังนั้นจึงนำสารสกัดหยาบ hexane มาแยกกลุ่มสารตามสมบัติความมีขั้วของสาร และทดสอบความเป็นพิษของแต่ละกลุ่มสาร นำกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษสูงและ/หรือมีปริมาณมากพอที่จะแยกต่อได้ มาแยกต่อให้ได้สารบริสุทธิ์

ขั้นตอนการแยกกลุ่มสารจากสารสกัดหยาบ hexane ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

1. นำสารสกัดหยาบ hexane หนัก 35 g แยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว บรรจุ silica gel for column ชนิดหยาบ 1200 g ชะด้วยตัวทำละลายของ hexane กับ CHCl_3 อัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร เก็บส่วนที่แยกได้ (fraction) ส่วนละ 100-120 ml ทดสอบส่วนที่มีสารกลุ่มเดียวกันด้วยเทคนิค TLC (ค่า R_f เท่าหรือใกล้เคียงกัน) รวมเข้าด้วยกันได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม

2. นำสารละลายแต่ละกลุ่ม ระเหยตัวทำละลายออก แบ่งบางส่วนจากแต่ละกลุ่ม ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 นำกลุ่มที่มีปริมาณมาก หรือที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 มาแยกและทดสอบความเป็นพิษต่อไปเรื่อย ๆ จนได้สารที่บริสุทธิ์

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารสกัดหยาบ

การสกัดหลอดเดือนที่แห้งและบดละเอียดหนัก 30 กิโลกรัม โดยการแช่ด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ เมื่อระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้วได้สารสกัดหยาบ hexane มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม หนัก 35 g และสารสกัดหยาบ ethanol มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงเข้ม หนัก 200 กรัม

2. ผลการแยกกลุ่มสารจากสารสกัดหยาบ

เนื่องจากสารสกัดหยาบ hexane มีความเป็นพิษมากกว่าสารสกัดหยาบ ethanol ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะดำเนินการแยกสารสกัดหยาบ hexane จากการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้ hexane กับ chloroform 1:4 เป็นตัวชะ

Fraction number	ปริมาตรตัวทำละลายที่ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
H-1	3,000	น้ำมันสีเหลือง	1.90
H-2	4,000	ของเหลวหนืด สีเหลือง	0.02
H-3	2,500	ของเหลวหนืด สีส้ม	0.74
H-4	800	ของเหลวหนืด สีชมพู	3.80
H-5	2,400	ของเหลวหนืด สีเขียวเข้ม	25.00
H-6	1,600	ของเหลวหนืด สีเขียว	0.03

เนื่องจากปริมาณสารที่แยกได้ในแต่ละ fraction มีปริมาณมากน้อยต่างกัน บาง fraction มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำมาแยกหรือศึกษาต่อได้ จึงนำส่วนที่มีปริมาณมากพอมาศึกษาต่อคือ fraction H-4 และ H-5

2.1. ผลการแยกสารกลุ่ม H-4

ผลการแยกสารกลุ่ม H-4 หนัก 3.80 g ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ได้สาร 2 กลุ่ม ดังนี้

Fraction Number	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
H 4-1	400	ของเหลวหนืดสีชมพู	0.022
H 4-2	1,200	ของแข็งสีขาว	2.42

สารกลุ่ม H 4-2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 1.70 g เรียกว่า สารผสม A

2.2. ผลการแยกสารกลุ่ม H-5

ผลการแยกสารกลุ่ม H-5 หนัก 25 g ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ ethyl acetate อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ได้สาร 5 กลุ่ม ดังนี้

Fraction Number	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
H 5-1	1,500	ของแข็งสีขาว	8.60
H 5-2	300	ของแข็งสีขาวปนเหลือง	0.01
H 5-3	1,000	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.31
H 5-4	1,200	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.20
H 5-5	2,000	ของเหลวหนืดสีดำ มีกลิ่นหอม	0.03

สารกลุ่ม H 5-1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 5.41g เรียกว่า สารประกอบ B

2.3. ผลการแยกสารกลุ่ม H 5-3

สารกลุ่ม H5-3 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง หนัก 0.31 g มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ alumina เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ได้สาร 2 กลุ่ม ดังนี้

Fraction Number	ปริมาตรตัวทำละลาย ที่ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
H 5-3-1	140	ของแข็งสีขาว	0.08
H 5-3-2	400	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.02

สารกลุ่ม H 5-3-1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol กับ acetone อัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ได้ผลึกสีขาวหนัก 0.06 เรียกว่า สารผสม C

2.4. ผลการแยกสารกลุ่ม H 5-4

นำสารกลุ่ม H 5-4 ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีส้ม หนัก 0.20 g มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง hexane กับ acetone อัตราส่วน 95 : 5 โดยปริมาตร ได้สาร 3 กลุ่ม ดังนี้

Fraction Number	ปริมาตรตัวทำละลายที่ชะ (mL)	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (g)
H 5-4-1	100	ของเหลวหนืดสีเหลือง	0.02
H 5-4-2	160	ของเหลวหนืดสีส้ม	0.07
H 5-4-3	400	ของเหลวหนืดสีส้มเข้ม	0.05

2.5. ผลการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารกลุ่ม H5-4-2

สารกลุ่ม H 5-4-2 เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้แผ่น procoated silica gel GF₂₅₄ เป็นตัวดูดซับ ละด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง chloroform กับ acetone อัตราส่วน 92 : 8 โดยปริมาตร เมื่อพ่นด้วย anisaldehyde – sulfuric acid spray reagent จุดที่ให้ค่า R_f ประมาณ 0.8 ให้ผลเป็นสีเหลือง

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบ

3.1.1 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ P-388

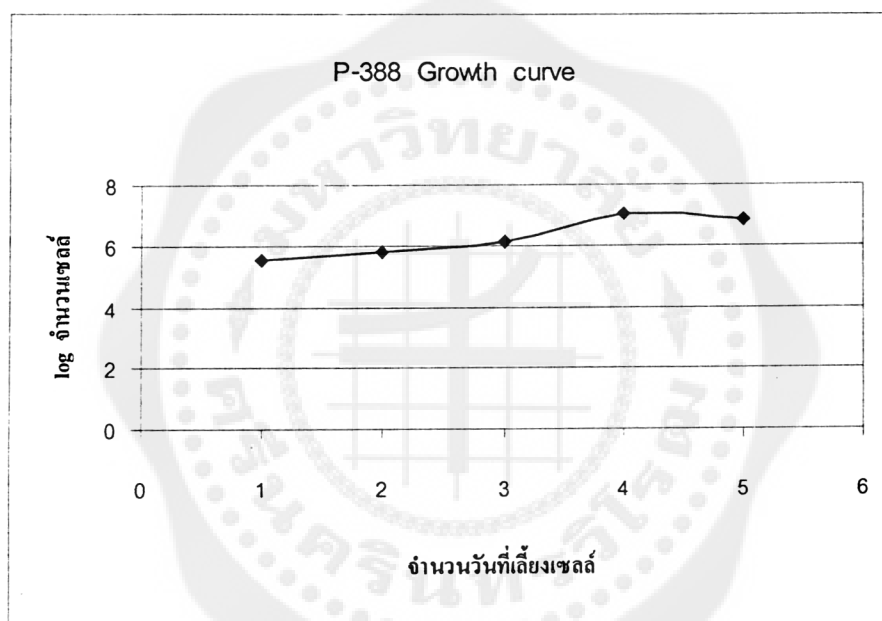
วันที่	จำนวนเซลล์ P-388 ต่อ 5 mL		เฉลี่ย
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	
0	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4
1	1.60×10^5	1.40×10^5	1.50×10^5
2	4.82×10^5	5.22×10^5	5.02×10^5
3	1.74×10^6	1.66×10^6	1.70×10^6
4	6.72×10^6	7.28×10^6	7.00×10^6
5	6.00×10^6	6.40×10^6	6.20×10^6
6	5.80×10^6	5.60×10^6	5.70×10^6
7	5.20×10^6	4.90×10^6	5.05×10^6

เมื่อนำข้อมูลมาเขียนกราฟแบบ semilogarithm ระหว่างวันที่เลี้ยงเซลล์ จะเห็นได้ว่าวันที่เซลล์เจริญเติบโตมากที่สุดคือวันที่ 4 ดังกราฟ จึงใช้วันที่ 4 เป็นวันที่จะศึกษาผลของสารตัวอย่างในการทำลายเซลล์ P-388 ต่อไป โดยถือจำนวนเซลล์ในขวดที่เป็น negative control ที่บ่มไว้ 4 วัน เป็นตัวอย่างที่มีร้อยละการอยู่รอด (% survival) เป็น 100 และเป็นจำนวนที่ใช้เทียบร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ P-388

$$\text{ร้อยละการอยู่รอด} = (N_s / N_c) \times 100$$

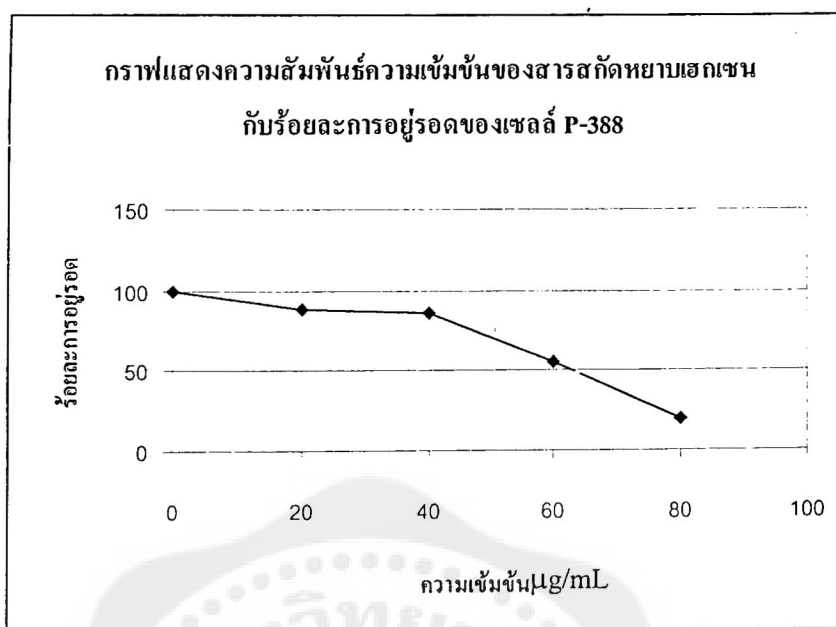
เมื่อ N_s = จำนวนเซลล์ในขวดที่ได้สารตัวอย่าง

N_c = จำนวนเซลล์ในขวดที่เป็น negative control



3.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ P-388 ของสารสกัดหยาบ hexane

ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวด (5 mL)		% การอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
negative control	5.00×10^4	6.10×10^6	100
20	5.00×10^4	5.49×10^6	89.10
40	5.00×10^4	5.31×10^6	86.20
60	5.00×10^4	3.40×10^6	55.20
80	5.00×10^4	1.21×10^6	19.6
100	5.00×10^4	0	0



ค่า ED_{50} ของสารสกัดหยาบ hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 = 64 $\mu\text{g/mL}$

3.1.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ P-388 ของสารสกัดหยาบ ethanol

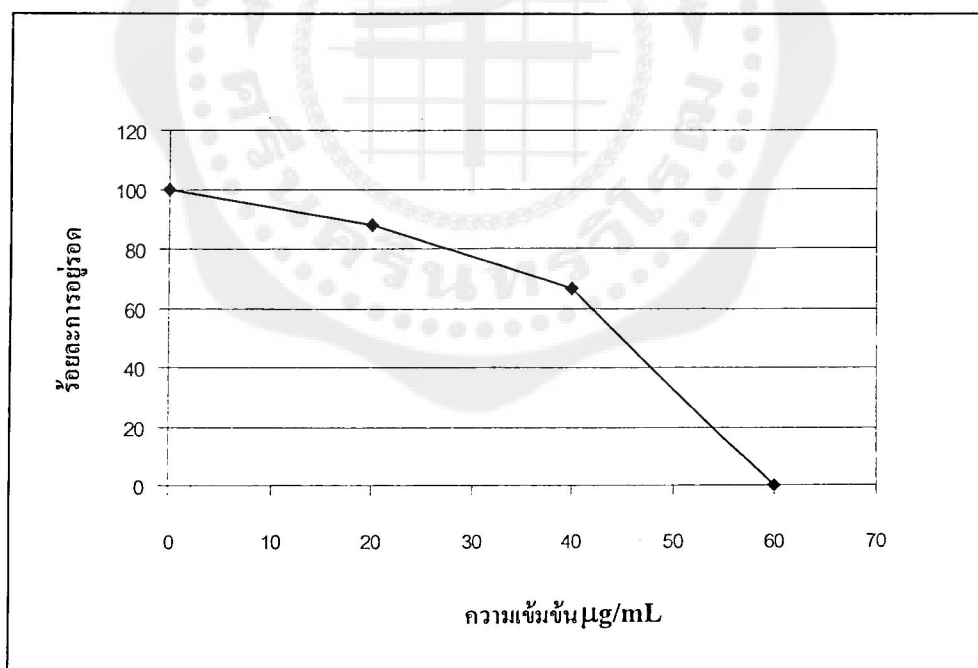
ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวด (5 mL)		% การอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
negative control	5.00×10^4	6.10×10^6	100
30	5.00×10^4	5.62×10^6	92.16
60	5.00×10^4	5.37×10^6	88.03
100	5.00×10^4	5.54×10^6	85.00

จะเห็นว่าสารสกัดหยาบ ethanol มีความเป็นพิษต่ำ มีค่า ED_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$

3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร กลุ่ม H-5

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

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกลุ่ม H-5 กับร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ P-388

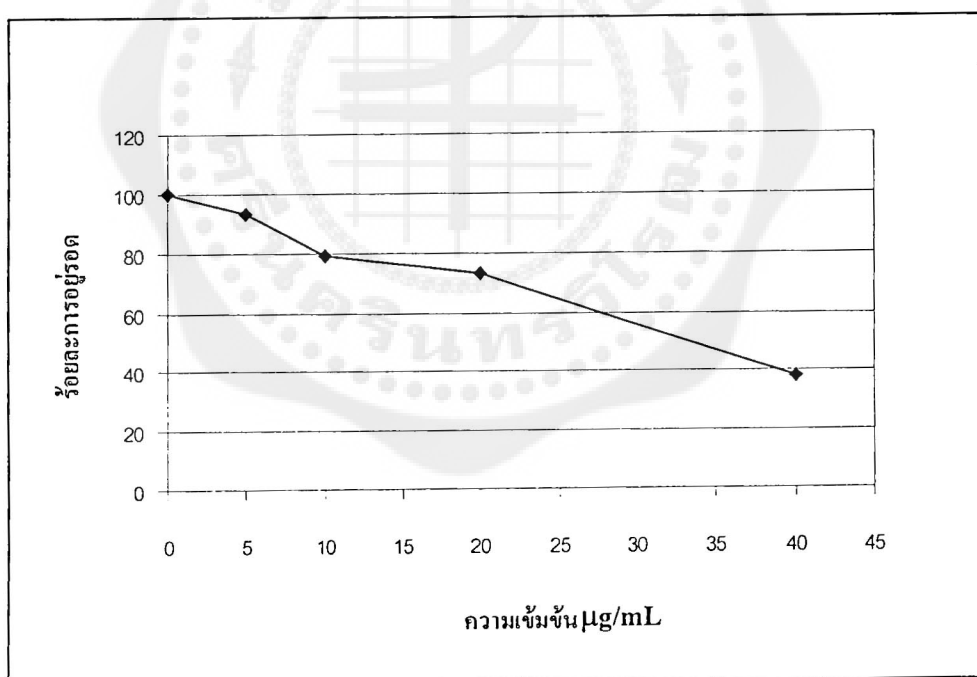


ค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H-5 = 45 $\mu\text{g/mL}$

3.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม H 5-4

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

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกลุ่ม H 5-4 กับร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ P 388

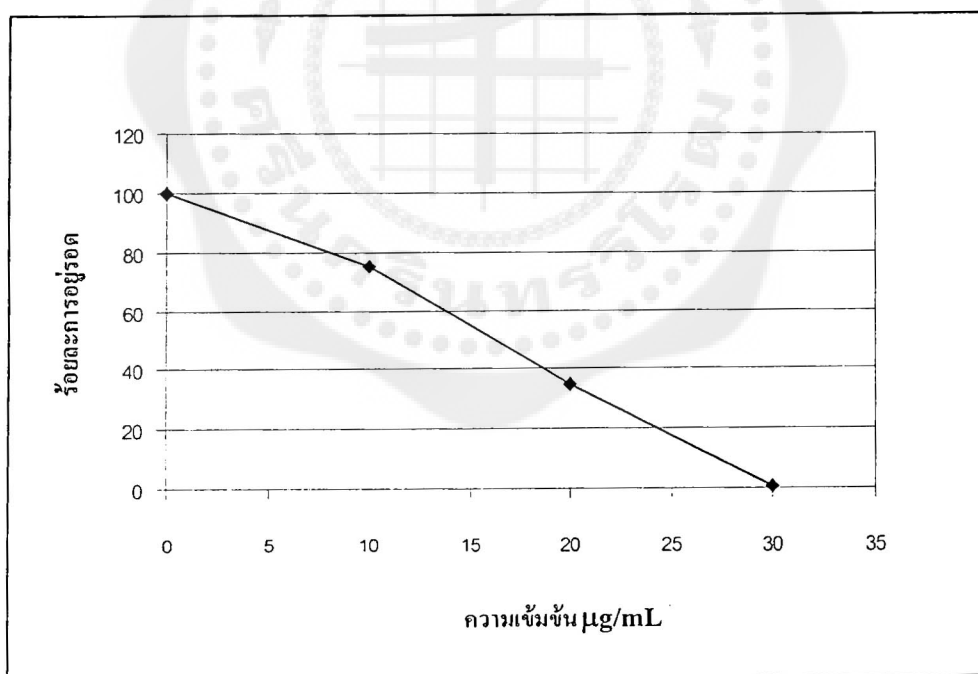


ค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 5-4 = $34 \mu\text{g/mL}$

3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม H 5-4-2

ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวด (5 mL)		% การอยู่รอด
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
negative control	5.00×10^4	6.83×10^6	100.00
10	5.00×10^4	5.19×10^6	75.00
20	5.00×10^4	2.37×10^6	34.60
30	5.00×10^4	4.00×10^6	0.58
100	5.00×10^4	0	0

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารกลุ่ม H 5-4-2 กับร้อยละของการอยู่รอดของเซลล์ P-388



ค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 5-4-2 = 17 $\mu\text{g/mL}$

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์

นำสารผสม A สารประกอบ B และสารผสม C ที่แยกได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 10 µg/mL และ 30 µg/mL ผลการทดสอบเป็นดังนี้

สาร	ความเข้มข้น µg/mL	จำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อขวด (5 mL)		% การอยู่รอด
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
A	negative control	5.00×10^4	7.20×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	6.32×10^6	87.77
	30	5.00×10^4	5.06×10^6	70.27
B	negative control	5.00×10^4	6.63×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	5.60×10^6	84.6
	30	5.00×10^4	2.86×10^6	43.14
C	negative control	5.00×10^4	7.39×10^6	100.00
	10	5.00×10^4	6.95×10^6	94.18
	30	5.00×10^4	5.75×10^6	77.80

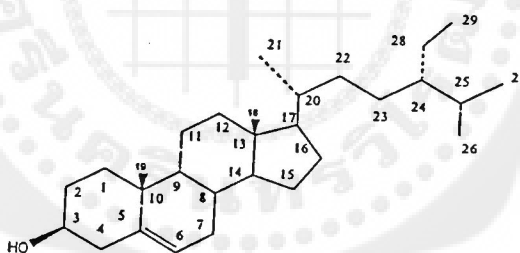
บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

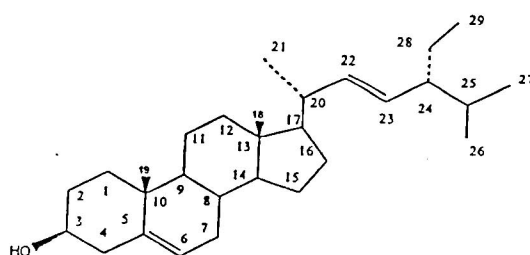
1. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

จากการนำหลอดเดือนที่แห้งและบดละเอียดมาสกัดด้วย hexane แล้วสกัดต่อด้วย ethanol สารสกัดที่ได้นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์ P-388 พบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ED_{50} เท่ากับ $64 \mu\text{g/mL}$) มากกว่า สารสกัด ethanol ($ED_{50} > 64 \mu\text{g/mL}$) จึงนำสารสกัด hexane มาแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel และ alumina เป็นตัวดูดซับ ะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีพบว่า ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด สารผสม 2 กลุ่มที่ประกอบด้วยสารบริสุทธิ์ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน และสารผสมที่มีสารประกอบหลายชนิดอีก 1 กลุ่ม เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีได้ข้อมูล ดังนี้

สารผสม A



β -sitosterol



stigmasterol

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

FT IR (cm⁻¹)(KBr)

3,422	OH
2,937	CH
1,466	CH ₂
1,382	CH ₃

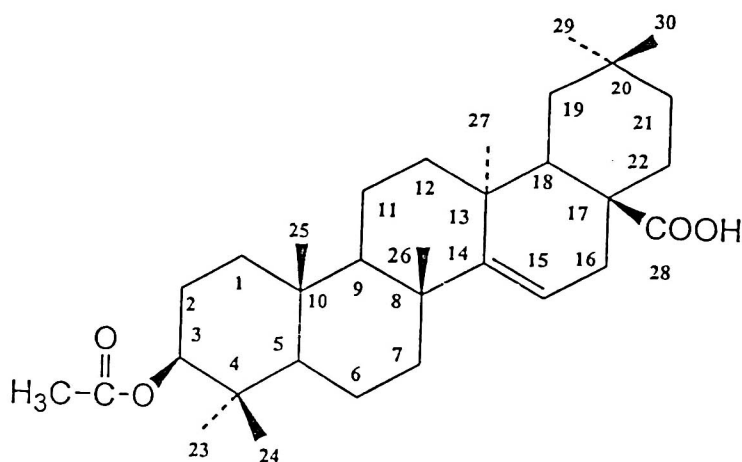
¹H NMR (CDCl₃ , 300MHz)

	δ (ppm)
0.68-1.02 m	18H (6 x CH ₃)
1.02-2.31 m	25H (9 x CH ₂ , 7 x CH)
3.40-3.60 m	1H (H-3)
4.90-5.20 m	2H (บางส่วนของ H-22,H-23)
5.35 s	1H (H-6)

¹³C NMR spectrum (CDCl₃ , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 29 พีค เป็นของคาร์บอน 29 อะตอมในโมเลกุล

จากจุดหลอมเหลวที่กว้าง (132-136 °C) และข้อมูล FTIR ของสาร A เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ stigmasterol และ β-sitosterol²¹ สรุปได้ว่าสาร A เป็นสารผสมของ stigmasterol และ β-sitosterol

สารประกอบ B



3-acetylaleuritic acid

226689 จ.1

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

FT IR (cm⁻¹)(KBr)

3,350	OH
2,944	CH
1,734	C = O (ester)
1,689	C = O (carboxyl)
1,246	C – O

¹H NMR (CDCl₃ , 400MHz)

δ (ppm)

0.85 - 0.95 m	21H (7 x CH ₃)
1.00 - 2.00 m	20H (10 x CH ₂)
2.04 s	3H (CH ₃ ของหมู่ acetoxy ที่ C-3)
4.47 dd	1H (H-3, J = 6 Hz และ 10 Hz)
5.52 dd	1H (H-15, J = 3.30 Hz และ 7.88 Hz)

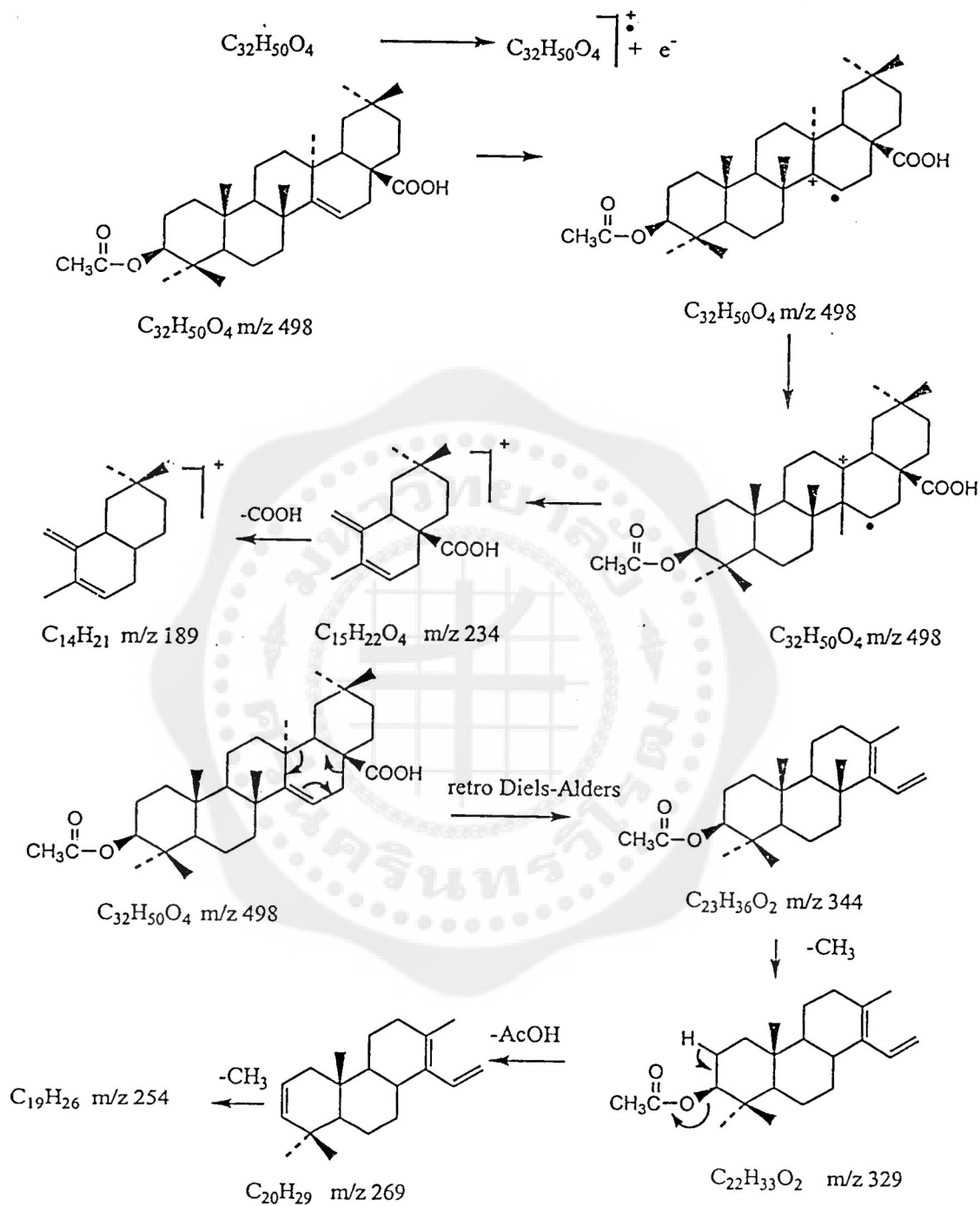
¹³C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
1	37.30(CH ₂)		37.30
2	23.45(CH ₂)		23.45
3	80.87(CH)	80.87	80.87
4	37.67(C)		
5	55.58(CH)	55.58	55.58
6	18.73(CH ₂)		18.73
7	40.73(CH ₂)		40.73
8	39.03(C)		
9	49.06(CH)	49.06	49.06
10	37.92(CH ₂)		37.02
11	17.30(CH ₂)		17.30
12	33.66(CH ₂)		33.66
13	37.37(C)		

(ต่อ)

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
14	160.53(C)		
15	116.87(C)		
16	31.83(C)		
17	51.51(C)		
18	41.36(CH)	41.36	41.36
19	35.32(CH ₂)		35.32
20	29.30(C)		
21	33.31(CH ₂)		33.31
22	30.68(CH ₂)		30.68
23	27.95(CH ₃)		27.95
24	16.80(CH ₃)		16.80
25	15.64(CH ₃)		15.64
26	26.20(CH ₃)		26.20
27	22.46(CH ₃)		
28	184.47(COOH)		
29	31.28(CH ₃)		31.28
30	28.63(CH ₃)		28.63
31	170.99(C=O)		
32	21.27(CH ₃)		21.27

EIMS ของสารประกอบ B ให้ค่า m/z (% relative intensity) ที่ 329 (3) [M⁺-C₉H₁₄O₂-CH₃] 269(7) [M⁺-C₉H₁₄O₂-CH₃-COOH] 234(42) [M⁺-C₁₇H₂₈O₂] 189(100) [M⁺-C₁₇H₂₈O₂-COOH] จากพีคที่ m/z 189 และ 234 แสดงว่ามีการแตกของพันธะระหว่าง C-11 กับ C-12 และพันธะระหว่าง C-8 กับ C-9 การแตกแบบ retro Diels-Alders ทำให้ได้พีคที่ m/z 329 และ 269²² ดังนี้

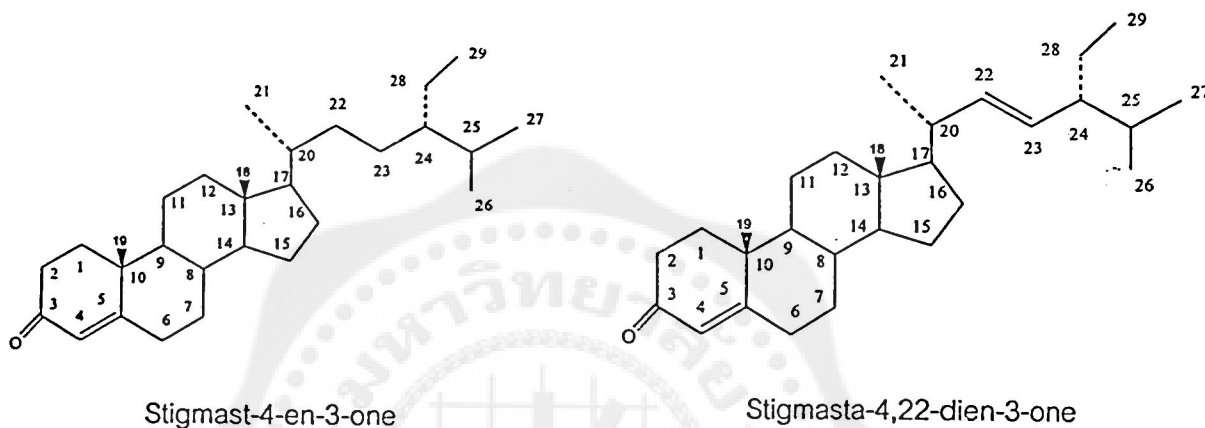


การแตกตัวพันธะของสารประกอบ B

จากข้อมูลของสารประกอบ B เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 3-acetylaleuritolic acid²²
สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ 3-acetylaleuritolic acid

สารผสม C

สารผสม C ที่แยกได้เป็นของผสมของสารประกอบ 2 ชนิดที่มีโครงสร้างคล้ายกัน ดังนี้



สารผสม C เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 60 mg จุดหลอมเหลว 79-85 °C ค่า R_f 0.56
(silica gel GF₂₅₄/ hexane : ethyl acetate 4 : 1)

FT IR (cm⁻¹)(KBr)

2,957	CH
1,680	C=O
1,618	C=C

¹H NMR (CDCl₃ , 400MHz)

	δ (ppm)
0.73 s	3H (CH ₃ ที่ H-18)
0.80-1.10 m	12H (4 x CH ₃ , H-21,26,27,29)
1.18 s	3H (CH ₃ , H-19)
1.20-2.50 m	29H (11 x CH ₂ , 7 x CH)
4.90-5.20 m	2H (บางส่วนของ H-22,H-23)
5.70 s	1H (H-4)

¹³C NMR และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารผสม C

ตำแหน่ง	¹³ C NMR δ _c (ppm)	DEPT-90 δ _c (ppm)	DEPT-135 δ _c (ppm)
1	36.25(CH ₂)		36.25
2	34.51(CH ₂)		34.51
3	200.6(C=O)		
4	124.35(CH)	124.35	124.35
5	172.31(C)		
6	33.57(CH ₂)		33.57
7	32.67(CH ₂)		32.67
8	36.31(CH)	36.31	36.31
9	54.44(CH)	54.44	54.44
10	39.22(C)		
11	21.64(CH ₂)		21.64
12	40.25(CH ₂)		40.25
13	43.01(C)		
14	56.50(CH)	56.50	56.50
15	24.80(CH ₂)		24.80
16	28.80(CH ₂)		28.80
17	56.63(CH)	56.63	56.63
18	12.85(CH ₃)		12.85
19	18.00(CH ₂)		18.00
20	36.73(CH)	36.73	36.73
21	19.32(CH ₃)		19.32
22 [*]	34.59(CH ₂)		34.59
22 ^{**}	138.72(CH)	138.72	138.72
23 [*]	26.71(CH ₁)		26.71
23 ^{**}	130.08(CH)	130.08	130.08
24	46.46(CH)	46.46	46.46
25	29.78(CH)	29.78	29.78
26	20.43(CH ₃)		20.43

(ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_{C} (ppm)	DEPT-90 δ_{C} (ppm)	DEPT-135 δ_{C} (ppm)
27	19.65(CH ₃)		19.65
28	23.69(CH ₃)		23.69
29	12.76(CH ₃)		12.76

หมายเหตุ * สำหรับพันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น -CH₂-CH₂-

** สำหรับพันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่ง 22 และ 23 เป็น -CH=CH-

จากข้อมูลของสาร C นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ stigmast-4-en-3-one และ stigmas-4,22-dien-3-one จากรายงานของ Sheikh²³ Gaspar²⁴ และ Greca สรุปได้ว่า สาร C เป็นสารผสมของ stigmast-4-en-3-one และ stigmas-4,22-dien-3-one

สารกลุ่ม A-5-4-2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเมื่อทดสอบด้วย Liebermann – Burchads (acetic anhydride + H₂SO₄) ให้ผลการทดสอบเป็นสีเขียว แสดงว่าในสารกลุ่มนี้มีสารประกอบกลุ่ม steriod อยู่ด้วย สารกลุ่มนี้มีค่า ED₅₀ ต่ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ในระดับที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้

2. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากลำต้นหลอดเดือน พบว่า สารสกัด ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำมาก (ED₅₀ > 100 µg/mL) สารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างต่ำ (ED₅₀ 64 µg/mL) ตามเกณฑ์มาตรฐานของ National Cancer Institute (NCI) แห่งสหรัฐอเมริกา²⁶ กำหนดว่า สารที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งที่อยู่ในระดับที่น่าสนใจถ้าเป็นสารสกัดควรมีค่า ED₅₀ ≤ 30 µg/mL ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ควรมีค่า ED₅₀ ≤ 4 µg/mL เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์นี้ เห็นได้ว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน แต่เมื่อนำสารสกัด hexane มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นพบว่า มีบางส่วนที่ได้จากการแยกมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้น ดังนี้

ค่า ED₅₀ ของสารสกัด hexane และสารที่ได้จากการแยกบางส่วน

กลุ่มสาร	ค่า ED ₅₀ (µg/mL)
สารสกัด hexane	64
สารส่วน H-5	45
สารส่วน H 5-4	34
สารส่วน H 5-4-2	17

อภิปรายผล

สมุนไพรตำรับนี้ใช้รักษามะเร็งในลักษณะยาหม้อ ตำรับดั้งเดิมใช้ส่วนที่มาจากพืช 5 ชนิด และมาจากสัตว์ 5 ชนิดดังได้กล่าวในเบื้องต้น แต่ในภายหลังใช้เฉพาะส่วนที่มาจากพืช และเพิ่มลำต้นแห้งของหลอดเดือนเข้าไปด้วย จากคำบอกเล่าของเจ้าของสมุนไพรตำรับนี้ถึงเหตุที่ไม่ใช้ส่วนที่มาจากสัตว์เนื่องจากหายากและไม่ต้องการทำลายสัตว์ เหตุที่เพิ่มหลอดเดือนเข้าในตำรับนี้เพราะพบว่าหลอดเดือนสามารถยืดอายุผู้ป่วยมะเร็งได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลทางด้านเภสัชวิทยาที่ชัดเจนของการใช้สมุนไพรตำรับนี้ที่ใช้เฉพาะส่วนที่มาจากพืช 5 ชนิดและหลอดเดือนแต่อย่างไร

เนื่องจากสมุนไพรตำรับนี้รักษามะเร็งโดยการนำพืชทั้ง 6 ชนิดในไปต้มน้ำแล้วใช้ดื่ม ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานในเบื้องต้นว่าส่วนที่น่าจะเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงน่าจะมาจากสารสกัดหยาบที่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลายเนื่องจาก ethanol มีขั้วใกล้เคียงกับน้ำ โดยคาดว่าจะใช้ hexane สกัดเอาสารที่มีขั้วต่ำออกไปก่อนเพื่อเป็นการง่ายต่อการศึกษองค์ประกอบสำคัญในสารสกัด ethanol ต่อไป แต่จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบทั้งสอง พบว่าขัดแย้งกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ในเบื้องต้น จึงได้ศึกษาในสารสกัดหยาบ hexane แทน อย่างไรก็ตามก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าหลอดเดือนที่ใช้ในลักษณะยาหม้อจะไม่มีประสิทธิภาพในการรักษามะเร็ง สารในหลอดเดือนส่วนที่น่าจะถูกสกัดออกมาในชั้นน้ำ(ตามลักษณะการนำไปใช้) หรือในชั้น ethanol ส่วนที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งอาจมีปริมาณน้อยมากแต่เพียงพอที่จะไปทำลายเซลล์มะเร็งหรืออาจมีสารที่เสริมประสิทธิภาพการทำลายเซลล์มะเร็งของสารที่สกัดได้จากพืชชนิดอื่นในตำรับนี้ ผลการศึกษาคือความเป็นพิษของสารสกัดหยาบ hexane พบว่ามีความเป็นพิษน้อยกว่ากลุ่มสารที่แยกได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มสารที่มีขั้วมากกว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P 388 มากกว่า สารที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นอนุพันธ์ของสารประเภท polyol ซึ่งเป็นสารประเภทต่อต้านหรือทำลายมะเร็ง ถึงแม้สารที่แยกได้บริสุทธิ์และกลุ่มสารที่แยกได้ส่วนใหญ่จะมีความเป็นพิษน้อย(ตามมาตรฐาน NCI) สารเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพเสริมการทำลายเซลล์มะเร็งซึ่งกันและกันและ/หรือเสริมการทำลายเซลล์มะเร็งของสารที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรตำรับนี้ก็ได้ และยังพบว่าในกลุ่มสาร 5-4-2 ที่มีปริมาณน้อยมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์มะเร็งสูง ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าหลอดเดือนเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็ง P388 ได้

ผลจากการวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับฤทธิ์การทำลายเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัดจากหลอดเดือนเท่านั้น แต่ก็มีประเด็นท้าทายที่ควรทำการศึกษาวิจัยต่อเพื่อประโยชน์ต่อวงการแพทย์ เภสัชวิทยา วิทยาศาสตร์ อีกมากมาย เช่น การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากส่วนของพืชทั้ง 5 ชนิด(ในตำรับเดิม) เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ 6 ชนิด(เมื่อเพิ่มหลอดเดือนเข้าไป) การศึกษาทางเคมีและความเป็นพิษขององค์ประกอบสำคัญในกลุ่มสาร 5-4-2 การศึกษาประสิทธิภาพการเสริมการความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารผสม เป็นต้น

บรรณานุกรม

1. สาธารณสุข, กระทรวง.(2541). สถิติสาธารณสุข. พ.ศ. 2540. กรุงเทพฯ : กองสถิติสาธารณสุข .
2. Hellman,A. (1993). "Principle of Radiation Therapy ," in *Cancer Principle&Practice of Oncology* , Vol 1,Philadelphia , p238-247
3. Rosenberg,S.A. (1993). "Principle of Radiation Therapy ,"in *Cancer Principle& Practice of Oncology* , Vol 1,Philadelphia,p248-275
4. Devitas,V.T. (1993). "Principles of Chemotherapy,"in *Cancer Principle & Practice of Oncology*, Vol 1,Philadelpia ,p276-292
5. Rosenberg,S.A. (1993). "Principle and Applications of Biologic Therapy," in *Cancer Principle & Practice of Oncology*,Vol 1,Philadelphia,p.301-332
6. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (2526). "ทองพันชั่ง," *วารสารโรคมะเร็ง*, 9(2) , 60.
7. วุฒิ วุฒิธรรมเวช.(2540). สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ :โอเอสพรีนติ้ง
8. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (2533,เมษายน-มิถุนายน). "สมุนไพรแก้แสบมะเร็ง," *วารสารโรคมะเร็ง*. 16(2) : 70.
9. พรทิตา พินาและคณะ(2528). "Biological Assay of Antitumour Agents from Natural Product" ในรายงานการประชุมเชิงวิชาการเรื่องการพัฒนายาจากสมุนไพร.ม.ป.พ. 129-130.
10. Sun,N.J.,Chang,C.J.&Casady,J.M.(1988). "A Cytotoxic Flavone from *Cudrania Cochinchinensis*," *Phytochemistry*.27(3):1951-1952.
11. เต็ม สมิตินันท์ .(2544). ชื่อพืชพรรณไม้ประเทศไทย. (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง) กรุงเทพฯ : พันธุ์พืชขึ้น.
12. Kesara Na Bangchang.(1987). *Study on Anticancer Activity of a Well-Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis,M.Sc.(Pharmacology).Bangkok:Graduate School Mahidol University.Photocopied.
13. Suchitra Wiwatwittaya.(1992).*The Study on Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis ,M.Sc.(Pharmacology). Bangkok: Graduate School Mahidol University.Photocopied.
14. Smith,H.F.*et.al.* (19๙5). "Ayurvedic Harbal Drug with Possible Cytostatic Activity," *J.Ethnopharmacol*.47(1):75-84.

15. Arisawa, M.*et.al.* (1985, May-June). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, Part I," *J.Nat.Prod.* 48(3):455-459.
16. Arisawa, M.*et.al.* (1986, March-April). "Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, Part II," *J.Nat.Prod.* 49(2):298-302.
17. Arisawa, M.*et.al.* (1991, September-October). "Inhibition of Tumor-Promotor-Enhanced by ³H-Cholin Incorporation into Cellular Phospholipids by Phloroglucinal Derivatives from *Mallotus japonicus*," *J.Nat.Prod.* 54(5):1409-1412.
18. Kim, H.S.*et.al.* (2000, January). "Antihepatotoxic Activity of Bergenin, the Major Constituent of *Mallotus japonicus*, on Carbontetrachloride Intoxicated Hepatocytes," *J.Ethanopharmacol.* 69(1):79-83.
19. Cannon, J.R.*et.al.* (1980). "A Contribution to the Thai Phytochemical Survey," *J.Sci.Soc. Thailand.* 6(2):46-53.
20. Arbain, D.*et.al.* (1989). "Survey of some West Sumatran Plants for Alkaloids" *Econ.Bot.* 43(1): 73-78.
21. Pouchert, J.C. & Behke, J. (1993). *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra*, Vol. 3 Wisconsin: Aldrich Chemical.
22. Woo, W.S. & Wagner, H. (1977). "3-Acetylaleuritic acid from the Seed of *Phytolacca americana*," *Phytochemistry.* 16(10):1845-1846.
23. Sheikh, Y.M. & Djerassi, C. (1974). "Steroids from Sponges," *Tetrahedron.* 30:4095-4103.
24. Gaspar, E.M. & Neves, H.J. (1993). "Steroidals Constituents from Mature Wheat Straw," *Phytochemistry.* 34(2):523-527.
25. Greca, M.D., Monaco, P. & Previtera, L. (1990, November-December). "Stigmasterol from *Typha Latifolia*," *J.Nat.Prod.* 53(6):1430-1435.
26. Geran, R.I.*et.al.* (1972). "Protocols for Screening Chemical Agent and Natural Products Against Animal Tumors and other Biological System," *Cancer Chemoter.Rep.* 3:7-17.