

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด  
chloroform และ methanol จากเหง้าพุดรักษา (*Canna indica* Linn.)

ปริญญานิพนธ์  
ของ  
กัญญาณัฐ กกแก้ว

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
พฤษภาคม 2547  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๖๗๕.๖๒๔๓๙

๗๖๖๖๗

๘๖

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด  
chloroform และ methanol จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

บทคัดย่อ  
ของ  
กัญญาณัฐ กกแก้ว

- 6 ก.ย. 2547

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
พฤษภาคม 2547

๒ ๒๕๖๑๕๗

กัญญาณัฐ กกแก้ว. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด chloroform และ methanol จากเหง้าพุทธรักษา(*Canna indica* Linn.). ปริญญาณิพนธ์ กศ.ม.(เคมี) กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ศรีนครินทร-วิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพันธ์ ชัยนะกุล, อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง, อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา

เหง้าพุทธรักษา (*CANNA INDICA* LINN.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยารักษามะเร็งตำรับหนึ่ง โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่น จากการนำเหง้าพุทธรักษามาสกัดด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่าสารสกัด chloroform และ methanol มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 85 และมากกว่า 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัด chloroform ไปแยกโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบสารผสม 2 ชนิด คือ สารผสมของ stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และสารผสมของ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside มีค่า  $ED_{50}$  มากกว่า 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ส่วนสารสกัด methanol พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ trans-ferulic acid และสารผสม 2 ชนิด คือสารผสมของ stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และสารผสมของ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside และสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 19.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  การพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี

STUDY OF CHEMICAL CONSTITUENTS AND CYTOTOXICITY ON CANCER CELLS  
OF CRUDE CHLOROFORM AND CRUDE METHANOL EXTRACTS  
FROM THE RHIZOME OF *CANNA INDICA* LINN.

AN ABSTRACT  
BY  
KANYANAT KOKKAEW

Presented in partial fulfillment of requirements  
for the Master of Education degree in Chemistry  
at Srinakarinwirot University

May 2004

Kanyanat Kokkaew. (2004). *Study of Chemical Constituents and Cytotoxicity on Cancer Cells of Crude Chloroform and Crude Methanol Extracts from the Rhizome of *Canna indica* Linn.* Master thesis, M.Ed.(Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Asst. Prof. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

*Canna indica* Linn. has been used in a Thai folklore medicine with other herbs for anticancer. The Rhizome of *Canna indica* Linn. was extracted exhaustively with chloroform and methanol respectively. The crude extracts from chloroform, methanol, the isolated compounds and fractions were tested for cytotoxicity against P-388 leukemic cells. The ED<sub>50</sub> values of the crude extracts from chloroform and methanol were 85 and greater than 100 µg/mL respectively. Isolation of the crude chloroform extract by chromatographic method yielded two mixtures, a mixture of stigmasterol and β-sitosterol and a mixture of stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside and β-sitosteryl-3-O-β-D-glucopyranoside both had ED<sub>50</sub> greater than 100 µg/mL and one minor toxic fraction with ED<sub>50</sub> 12.50 µg/mL. From methanol extracts, a pure compound of trans-ferulic acid, a mixture of stigmasterol and β-sitosterol, a mixture of stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside and β-sitosteryl-3-O-β-D-glucopyranoside and one minor toxic fraction with ED<sub>50</sub> 19.00 µg/mL were isolated. The structure of compounds were elucidated by spectroscopic techniques.

ปริญญานิพนธ์

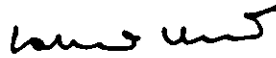
เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด  
chloroform และ methanol จากเหง้าพุดรักษา (*Canna indica* Linn.)

ของ

นางสาวกัญญาณัฐ กกแก้ว

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

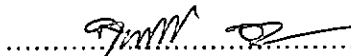


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

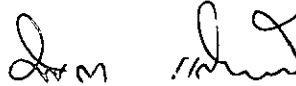
(รองศาสตราจารย์ ดร. นภาพรณี หะวานนท์)

วันที่ 13 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2547

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

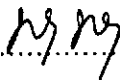
.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)



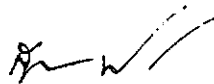
.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. จินดา แท้มบรรจง)



.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)



.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือ แนะนำ และให้ความอนุเคราะห์อย่างดีจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ดร. จินดา แต้มบรรจง และ ดร. พรทิพา พิชา กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสาพร ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์เกษร พะลัง อาจารย์ที่ปรึกษาและคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาตลอด

ขอขอบพระคุณ คุณสุชานุช อ่อนดี และคุณจรรย์ญา งามขำ นักวิจัยที่กรุณาเตรียมเซลล์มะเร็ง และให้คำแนะนำช่วยเหลือพร้อมทั้งถ่ายทอดวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ตลอดจนเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ทุกท่านที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยและจัดเตรียมวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ นิสิตปริญญาโทภาควิชาเคมีและผู้มีพระคุณทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ให้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

คุณความดีและประโยชน์ที่เกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแต่ บิดา มารดา ตลอดจนทุกคนในครอบครัว ครูอาจารย์ผู้ให้ความรู้และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ จนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

กัญญาณัฐ กกแก้ว

## สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	5
	ความสำคัญของการวิจัย.....	5
	ขอบเขตของการวิจัย.....	5
	นิยามศัพท์เฉพาะ.....	6
2	เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
	การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในวงศ์ CANNACEAE.....	8
	การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรต้านเซลล์มะเร็ง P-388.....	11
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
	พืชที่ใช้ในการวิจัย.....	16
	เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย.....	16
	สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา และการทำสารให้บริสุทธิ์.....	16
	สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง..	17
	การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์.....	17
	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	18
	การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้.....	21
4	ผลการวิจัย.....	26
	ผลการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา.....	26
	ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์.....	26
	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	35
	ข้อมูลทาง spectroscopy ของสารบริสุทธิ์.....	50

## สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5	
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	52
การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	52
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	63
ข้อเสนอแนะ.....	66
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	73
อภิธานศัพท์.....	89
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	91

## บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตารางแสดงปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารตัวอย่าง solvent control และ cell suspension ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	21
2	ผลการแยกสารสกัด chloroform ด้วย โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	26
3	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	27
4	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	28
5	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	28
6	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	29
7	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	30
8	ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	30
9	ผลการแยกสารกลุ่ม C-3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
10	ผลการแยกสารกลุ่ม C-3.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
11	ผลการแยกสารกลุ่ม C-3.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	32
12	ผลการแยกสารสกัดชั้น MeOH ด้วย โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	33
13	ผลการแยกสารกลุ่ม M-5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	34
14	ผลการแยกสารกลุ่ม M-5.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	34
15	ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	35
16	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของ 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	36
17	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด CHCl <sub>3</sub> และ MeOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	38
18	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด CHCl <sub>3</sub> ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	39
19	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	40

## บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
20	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-2.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	41
21	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-2.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	41
22	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ที่ความเข้มข้นชั้นต่างๆ.....	42
23	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-2.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	43
24	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	44
25	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-3.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	44
26	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม C-3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	45
27	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	45
28	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารสกัด MeOH ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	46
29	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม M-5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	47
30	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้ จากสารกลุ่ม M-5.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	47
31	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED <sub>50</sub> ของสารที่แยกได้จากสารสกัด chloroform.....	48
32	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED <sub>50</sub> ของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol.....	49

## บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
33	แสดงการเปรียบเทียบ $^{13}\text{C}$ NMR ของสารประกอบ A ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) กับ stigmasterol ( $\text{CDCl}_3$ , 62.5 MHz) และ $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 62.5 MHz)..... 53
34	แสดงการเปรียบเทียบ $^{13}\text{C}$ NMR ของสเปกตรัมของสารประกอบ B (pyridine- $d_5$ , 75 MHz) และ $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (pyridine- $d_5$ , 100 MHz) กับ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (pyridine- $d_5$ , 100 MHz)..... 56
35	แสดงการเปรียบเทียบ $^1\text{H}$ NMR ของสารประกอบ C ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) และ trans-ferulic acid ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz)..... 59
36	แสดงการเปรียบเทียบ $^{13}\text{C}$ NMR ของสารประกอบ C ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) และ trans-ferulic acid ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)..... 59
37	แสดงข้อมูล $^{13}\text{C}$ และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C..... 60
38	แสดงข้อมูล $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ cosy ของสารประกอบ C..... 60
39	แสดงข้อมูล HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ C..... 60
40	แสดงข้อมูล HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ C..... 60

## บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของ delphinidin.....	1
2 สูตรโครงสร้างของ 1- $\beta$ -O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine.....	2
3 สูตรโครงสร้างของ rhinacanthone.....	3
4 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากอบเชยจีน ( <i>Cinnamomum cassia</i> Blume.).....	3
5 สูตรโครงสร้างของ cannagenin.....	9
6 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา ( <i>Canna indica</i> Linn.).	10
7 สูตรโครงสร้างของ $\alpha$ -hederin.....	11
8 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากหญ้าลีนง ( <i>Hedyotis corymbosa</i> Lamk.).....	12
9 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้นหลอดเถื่อน ( <i>Mallotus odlongifolius</i> Muell.Arg.).....	13
10 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเปลือกลิ้น <i>Lindera communis</i> .....	14
11 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากใบ <i>Litsea acutivena</i> .....	14
12 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้า <i>Atractylodes ovata</i> .....	15
13 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารและค่า ED <sub>50</sub> ของสารจากเหง้าพุทธรักษา.....	22
14 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด CHCl <sub>3</sub> และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	22
15 แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม C-2 และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	23
16 แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม C-3 และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	24
17 แสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด MeOH และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	25
18 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388.....	35
19 กราฟแสดงค่า ED <sub>50</sub> ของ 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	37

## บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
20 กราฟแสดงค่า ED <sub>50</sub> ของสารสกัด CHCl <sub>3</sub> ต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	38
21 กราฟแสดงค่า ED <sub>50</sub> ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	42
22 กราฟแสดงค่า ED <sub>50</sub> ของสารกลุ่ม M-5.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P-388.....	48
23 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A.....	55
24 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B.....	58
25 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ C.....	61
26 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr).....	74
27 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	75
28 <sup>13</sup> C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ A (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	76
29 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr).....	77
30 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (pyridine-d <sub>5</sub> , 300 MHz).....	78
31 <sup>13</sup> C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ B (pyridine-d <sub>5</sub> , 75 MHz).....	79
32 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ C (CHCl <sub>3</sub> ).....	80
33 <sup>1</sup> H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	81
34 <sup>13</sup> C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	82
35 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม C-2.3.3 (CHCl <sub>3</sub> ).....	83
36 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม M-5.1 (CHCl <sub>3</sub> ).....	84
37 แสดงเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มควบคุมเมื่อเริ่มทดลอง.....	85
38 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4.....	85
39 แสดงเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL เมื่อเริ่มทดลอง.....	86
40 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ในวันที่ 4.....	86

## บทที่ 1

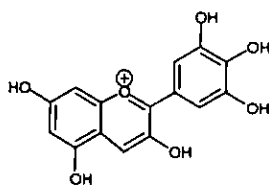
### บทนำ

#### ภูมิหลัง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความสมบูรณ์ทางธรรมชาติ มีความหลากหลายทางชีวภาพ ด้านสมุนไพรและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่เป็นประโยชน์ต่อมวลมนุษยชนเหนือกว่าประเทศอื่นในโลกอีกหลายประเทศ ในสถานการณ์ปัจจุบันกระแสความคิดของการนำสมุนไพรมาใช้ในการแพทย์แผนไทยกำลังได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางโดยการใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรค

การนำสมุนไพรนาซานิดมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งนั้นมีความเป็นเวลานานแล้ว จากการนำ vinblastine และ vincristine ซึ่งเป็น dimeric indole alkaloid ที่สกัดได้จากแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* G.Don) มาใช้เป็นยารักษามะเร็ง (Brule', et al. 1973 : 51-52) จึงทำให้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารสำคัญประเภทอื่นๆ ที่มีบทบาทต้านเซลล์มะเร็ง เช่น การศึกษาผลการป้องกันมะเร็งผิวหนังของสารสกัดฟีนอลิกจากชาเขียว โดยนำสารสกัดฟีนอลิกผสมในน้ำให้หนูดื่ม 2 สัปดาห์ ก่อนให้สารเหนี่ยวนำมะเร็ง ultraviolet B และหลังให้สารเหนี่ยวนำมะเร็ง 1 สัปดาห์ พบว่าสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งผิวหนังในหนูทดลองได้ (Wang, et al. 1992 : 1162-1170)

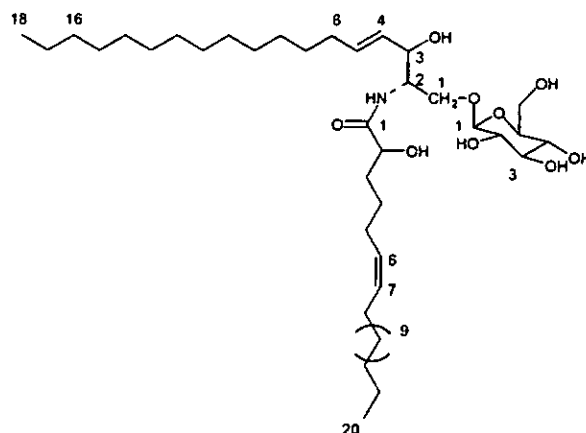
การศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกได้จากเปลือกผลมะเขือยาว (*Solanum melongena*.) พบว่า delphinidin ซึ่งเป็นสารจำพวก flavonoid สามารถยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง HT-1080 human fibrosarcoma (Nagase, et al. 1998 : 216-219) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างของ delphinidin

การศึกษาฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งจากหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy.) พบว่าสารสกัด methanol และสารสกัด ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BT 474) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน (SW 620) สารประกอบที่แยกได้จากสารสกัด methanol คือ 1- $\beta$ -O-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-cosamide)-sphingosine มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BT 474) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของคน (SW 620)

ที่ค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 16 µg/mL (Jiratchariyakul. 1998 : 10-20) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 2

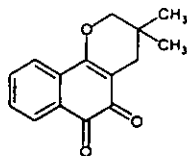


ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ 1-β-D-glucopyranosyl-2-(2'-hydroxy-6'-ene-icosamide)-sphingosine

การศึกษาฤทธิ์ป้องกันการเกิดมะเร็งของน้ำมันจากเมล็ดกะเพรา (*Ocimum sanctum*) โดยให้หนูถีบจักรได้รับน้ำมันจากเมล็ดกะเพรา ก่อนฉีดสารก่อมะเร็ง 20-methylcholanthrene 1 สัปดาห์ และหลังจากฉีดสารก่อมะเร็ง 15 สัปดาห์ พบว่าน้ำมันจากเมล็ดกะเพรา มีผลชะลอเวลาของการเริ่มเกิดมะเร็ง ลดจำนวนหนูที่เป็นมะเร็ง ลดขนาดของก้อนมะเร็ง และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูทดลอง (Prakash & Gupta. 2000 : 29-34)

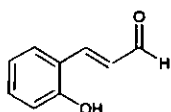
การศึกษาสารสกัดจากใบหม่อน (*Morus alba* Linn.) พบว่าสาร quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside และสาร quercetin-3,7-di-O-β-D-glucopyranoside ที่ความเข้มข้น  $2 \times 10^{-4}$  M มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงและสาร quercetin-3,7-di-O-β-D-glucopyranoside ยังสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวปกติชนิด granulocyte และ monocyte (Kim, Gao & Kang. 2000 : 451-455)

การศึกษาสารสกัดส่วนเหนือดินจากทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*(L.) Kurz.) พบว่าสาร rhinacanthone (3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-[1,2-B]pyran-5,6-dione) ช่วยยืดอายุของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งโดย Dalton's ascitic lymphoma(DAL) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Thirumurugan, Kavimani & Srivastava. 2000 : 1438-1440) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 3

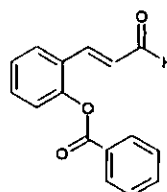


ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของ rhinacanthone

นอกจากนี้ยังพบว่า 2'-hydroxycinnamaldehyde ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume.) และ 2'-benzyloxycinnamaldehyde ซึ่งเตรียมจาก 2'-hydroxycinnamaldehyde สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อมะเร็งซึ่งปลูกถ่ายลงในหนูทดลอง (Lee, et al. 1999 : 263-266) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 4



2'-hydroxycinnamaldehyde



2'-benzyloxycinnamaldehyde

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Blume.)

เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เป็นสมุนไพรที่ใช้ในตำรับยารักษา มะเร็งตำรับหนึ่ง ซึ่งเดิมประกอบด้วย ต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssolpifolia* (G.Con) Ewell.) หญ้าปักไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbulariu* Kunth.) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem.) ต่อมาสมุนไพรตำรับนี้ได้มีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มสมุนไพรอีก 3 ชนิด ได้แก่ เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Wall.) หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) และหลอดเทียน (*Mallutus oblongifolius* Muell.Arg.) เข้าไป จากผลการวิจัยพบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับเดิม แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB ในหลอดทดลองต่ำกว่าระดับสากล สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดและยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pomsiriprasert.

1986) สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับเดิมซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด และ สัตว์อีก 5 ชนิด ได้แก่ เจียงกระเบน (*Dasyatis spp.*) อกตะพานน้ำ (*Trionyx cartilagineus* Boulenger.) ขนเม่น (*Hystrix brachyura* Linn.) เกล็ดนิ่ม (*Manis javanica* Desmarest.) และ กระดองเต่า (*Damonia subtrijuga* Boulenger.) พบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB ที่ค่า  $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  และยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 7,12-DMBA และช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูกลุ่มทดลอง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Na Bangchang, 1987) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรที่ประกอบด้วยพืชและสัตว์ในหนูโกรน พบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกรน และไม่พบการเกิดพิษของยาสมุนไพรดังกล่าวในหนูโกรน (Wiwatwithaya, 1992)

นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำต้มจากสมุนไพรตำรับที่ประกอบด้วยพืชและสัตว์นี้ยังสามารถเพิ่มการทำงานของ NK cells และ monocyte/macrophage ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม (Thisoda, 1995) ต่อมาได้มีการนำสมุนไพรบางชนิดที่อยู่ในตำรับยารักษามะเร็งมาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยนำหญ้าลิ้นงูมาศึกษาหาสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 จากการศึกษา สารสกัดหยาบ hexane พบว่ามีกลุ่มสาร 3 กลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เป็น 17.00 7.20 และ 21.00  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และสารสกัดหยาบ ethanol มีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เป็น 17.50  $\mu\text{g/mL}$  (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน, 2544) และได้มีการนำลำดับต้นหลอดเดือนมาหาสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 เช่นกัน พบว่าสารสกัดหยาบ hexane มีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เป็น 17.50  $\mu\text{g/mL}$  (อนันต์ คงชุม, 2544)

นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane ที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา พบว่ามีกลุ่มสารกิ่งบริสุทธ์ 2 กลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 19.00 และ 21.50  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ (วินัย สุขราช, 2544) เนื่องจากสมุนไพรตำรับนี้มีปริมาณของเหง้าพุทธรักษามากกว่าสมุนไพรชนิดอื่นๆ และมีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีสภาพขั้วปานกลาง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเหง้าพุทธรักษาเพิ่มเติมเพื่อหาสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 จากกลุ่มสารดังกล่าว และศึกษาองค์ประกอบหลักจากสารสกัด chloroform ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีสภาพขั้วปานกลาง และจากสารสกัด methanol ในส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อที่จะได้ข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการรักษามะเร็งของเหง้าพุทธรักษาและเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนายาต้านมะเร็งในอนาคต

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสาร การทำสารให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด chloroform และ methanol ที่ได้จากเหง้าพุทธรักษา

### ความสำคัญของการวิจัย

1. ทราบวิธีการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก
2. ทราบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดต่าง ๆ และสารบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจว่า น่าจะนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งชนิดอื่น หรือในสัตว์ทดลองต่อไปหรือไม่
3. ทราบสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ที่อาจใช้เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์สารชนิดใหม่

### ขอบเขตของการวิจัย

1. นำกากของพุทธรักษาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane แล้วจากการวิจัยของ วินัย สุขราช (วินัย สุขราช. 2544) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย chloroform และ methanol ตามลำดับ
2. นำสารสกัด chloroform และ methanol มาแยกและทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography techniques) และการตกผลึก
3. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ใช้เซลล์มะเร็ง P-388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง
4. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี (spectroscopic techniques) ได้แก่ อัลตราไวโอเลตสเปกโทรสโคปี (ultraviolet spectroscopy) อินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (infrared spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (nuclear magnetic resonance spectroscopy) และแมสสเปกโทรเมตรี (mass spectrometry)

### นียมศัพท์เฉพาะ

P-388 หมายถึง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ED<sub>50</sub> หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง ที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

LC<sub>50</sub> หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง ที่มีผลทำให้สัตว์ทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

IC<sub>50</sub> หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พุทธรักษามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Canna indica* Linn. อยู่ในวงศ์ CANNACEAE (ลินา ผู้พัฒนาพงศ์. 2544 : 103) มีชื่ออื่นว่า บัวหลวงศ พุทธศร กวงอิมเกีย เขียวปาเจีย มุยหึงเจีย Indian shot มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่าง ๆ คือ ดอกใช้ตำพอกแผลห้ามเลือดในบาดแผลสดหรือบาดแผลมีหนอง ลำต้นไต่ดินหรือเหง้า ใช้รักษาโรคตับอักเสบ วัณโรค บิดเรื้อรัง อาเจียนเป็นเลือด (วิทย์ เทียงบูรณะธรรม. 2542 : 567-568)

พรศิริประเสริฐ (Pomsiriprasert. 1986) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssolpifolia* (G.Con) Ewell.) หนุ้าปิกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbulariu* Kunth.) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem.) พบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB ที่ค่า  $ED_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$  ส่วนฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 7,12-dimethylbenzanthracene (7,12-DMBA) จำนวน 130 mg/kg พบว่า น้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอด ( $P = 0.041$ ) และการยืดอายุของหนู ( $P = 0.025$ ) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้

ณ บางช้าง (Na Bangchang. 1987) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ต้นไฟเดือนห้า หนุ้าปิกไก่ดำ เหง้าพุทธรักษา เหง้าข้าวเย็นเหนือ ต้นลิ้นงูเห่า และประกอบด้วยสัตว์อีก 5 ชนิด ได้แก่ เงี้ยวกระเบน (*Dasyatis spp.*) ออกตะพานน้ำ (*Trionyx cartilagineus* Boulenger.) ขนเม่น (*Hystrix brachyura* Linn.) เก ลี ด นีม (*Manis javanica* Desmarest.) และกระดองเต่า (*Damonia subtrijuga* Boulenger.) พบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง KB ที่ค่า  $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  ส่วนฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมในหนูขาวที่ได้รับสารก่อมะเร็ง 7,12-DMBA พบว่าน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 4 สัปดาห์แรกและมีผลช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำต้มจากสมุนไพร 1,500 mg/kg ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำต้มจากสมุนไพรตำรับนี้

วิวัฒน์วิทยา (Wiwatwithaya. 1992) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่ ณ บางช้างศึกษามา ( Na Bangchang. 1987) พบว่า หนูไกรนที่ได้รับการปลูกถ่ายมะเร็งปากมดลูก เมื่อดื่ม

น้ำต้มจากสมุนไพรปริมาณ 2,580 mg/kg/วัน เป็นเวลา 60 วัน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกรนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทาง Natural Killer (NK) cells พบว่ามีการเพิ่มความสามารถของ NK cells ต่อการทำลาย Yac-1 cell (lymphoma cells) ในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการศึกษาด้านพิษวิทยาของสมุนไพรตำรับนี้ในหนูโกรน พบว่าเมื่อให้น้ำต้มจากสมุนไพร 2,580 mg/kg/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ไม่พบการเกิดพิษของยาสมุนไพรในหนูโกรน

ต่อมา ธิโสดา (Thisoda. 1995) ได้นำสมุนไพรตำรับนี้มาศึกษาเพิ่มเติมโดยนำมาศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการทำงานของ NK cells และ monocyte/macrophage ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านม พบว่าผลจากการรับประทานน้ำต้มจากสมุนไพรวันละ 500 mg เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ NK cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ monocyte/macrophage มีการหลั่ง tumor necrosis factor- $\alpha$  เพิ่มขึ้น

### การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในวงศ์ CANNACEAE

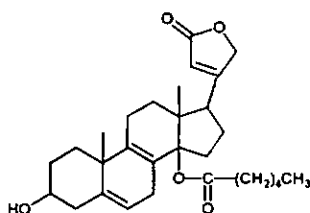
อดิวันมิและโซโฟวรา (Adewunmi & Sofowora. 1980 : 57-65) ได้ศึกษาพืชสมุนไพร 181 ชนิดในประเทศไนจีเรียโดยทำการสกัดสารด้วย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในทำลายหอย *Bulinus(Phyopsis) globosus*. พบว่า สารสกัดพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) จากส่วนราก ใบ และลำต้นที่ความเข้มข้น 100 ppm จะมีฤทธิ์ในการทำลายหอย 5 10 และ 0 % ตามลำดับ

อวิรุทนต์และพงค์พันธ์ (Avirutnant & Pongpan. 1983 : 81-86) ได้ศึกษาสารสกัด alcohol และสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนดอกของพืช 35 ชนิด และจากส่วนอื่นๆของพืชอีก 43 ชนิด เกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) 6 ชนิด คือ *S.aureus* *B.subtilis* *E.coli* *Sh.dysenteriae* *S.typhi* และ *C.albicans* โดยวิธี disk diffusion method พบว่า สารสกัด alcohol จากดอกพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S.aureus* ก่อนข้างต่ำ แต่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์อีก 5 ชนิด

ซิงและมเหศวารี (Singh & Maheshwari. 1994 : 51-58) ได้ศึกษาพืชทั้งหมด 63 ชนิด ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้ในการรักษาโรคติดต่อและโรคทั่วไปในเผ่า Tharu ประเทศอินเดีย พบว่าส่วนเหง้าของพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) จะนำมาพอกรักษาการเกิดฝีหนอง

ทิพาตรีและซิง (Tripathi & Singh. 2000 : 1351-1355) ได้ศึกษาเปลือกทับทิม (*Punica granatum.*) และส่วนรากของพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เกี่ยวกับฤทธิ์ในการ

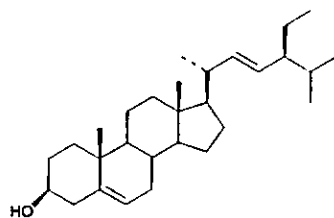
ทำลายหอย *Lymnaea acuminata*. พบว่าพืชทั้งสองชนิดนี้ มีฤทธิ์ในการทำลายหอยและมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น แต่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อปลา *Colisa fasciatus*. ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเดียวกัน จากการศึกษาพบว่าเมื่อนำรากแห้งบดละเอียดของสารสกัด methanol ethanol chloroform และ ether จากรากพุทธรักษา มาทดสอบฤทธิ์ในการทำลายหอย เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จะมีค่า  $LC_{50}$  เป็น 773.50 75.57 55.65 101.82 และ 111.43 mg/L ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง จะมีค่า  $LC_{50}$  เป็น 359.02 23.46 15.47 29.90 และ 23.12 mg/L ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัด ethanol มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์พบสาร cannagenin ฤทธิ์ในการทำลายหอยเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง มีค่า  $LC_{50}$  เป็น 6.54 และ 1.84 mg/L ตามลำดับสูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 5



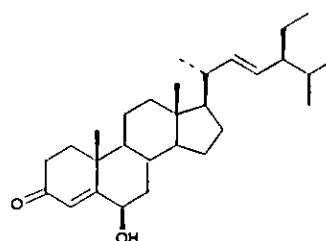
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของ cannagenin

ริวและคณะ (Ryu, et al. 2001 : 183-187) ได้ศึกษาพืชสมุนไพรของจีนทั้งหมด 80 ชนิดโดยนำพืชสมุนไพรมาสกัดด้วย methanol 70% แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสังเคราะห์ nitric oxide (NO) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง lipopolysaccharide (LPS) กับ เซลล์ RAW 264.7 พบว่า สารสกัดจากพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เข้มข้น 50  $\mu\text{g/mL}$  จะมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ nitric oxide ได้ถึง 51 %

วินัย สุขราช (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane และ ethanol จากเหง้าพุทธรักษา พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 64.50 และ 133.50  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ และจากการแยกสารสกัดหยาบ hexane ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ stigmasterol และ 6-hydroxystigmasta-4,22-diene-3-one (สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 6) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 55.50 และ 37.50  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับและพบกลุ่มสารกึ่งบริสุทธิ์ 2 กลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 19.00 และ 21.50  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ



stigmasterol



6-hydroxystigmasta-4,22-diene-3-one

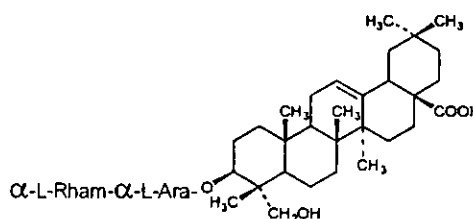
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

วรดุลยพินิจ (Woradulayapinij, 2002) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ recombinant reverse transcriptase ของเชื้อ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1 RT) ของสมุนไพรไทย จำนวน 20 ชนิด ที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/mL}$  พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากพืช 6 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากส่วนเหนือดินของผักบุ้งฝรั่ง (*Ipomoea carnea* Jacq. Subsp. *Fistulosa* (Mart.ex Cholsy) Austin) กิ่งไข่น้ำ (*Vitex glabrata* R.Br.) ส่วนเหนือดินของคนที่สอ (*Vitex trifolia* L.) ส่วนเหนือดินของคนที่เขมา (*Vitex negundo* L.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* L.) และส่วนเหนือดินของสันพร้าวอญ (*Justicia gendarussa* Bum.f.) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%IR) มากกว่า 90 % นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากเหง้าพุทธรักษาให้ผลยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT ได้ดี มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 22.56  $\mu\text{g/mL}$

มาดูเรียลาและคณะ (Madureira, et al. 2002 : 23-29) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ *Plasmodium falciparum* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 13 ชนิด พบว่าสารสกัด ethanol, petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol ในน้ำในอัตราส่วน 1 : 2 จาก *Canna bidentata* L. มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 500 130 25 245 และ 500  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

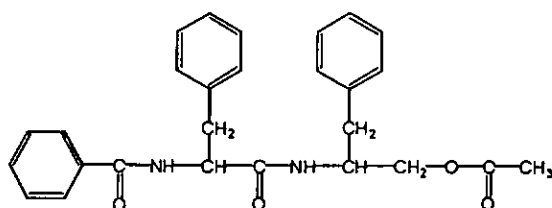
## การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรด่านเซลล์มะเร็ง P-388

สวามีและธาน (Swamy & Tan, 2001 : 29-32) ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง P-388 และมะเร็ง LL/2 จากเมล็ดเทียนดำ (*Nigella sativa*.) โดยทำการสกัดสารด้วย ethanol และนำสารสกัดไปแบ่งส่วนการละลาย (partition) ด้วย ethyl acetate แล้วนำสารสกัดที่ได้มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบกลุ่มสารที่ช่วยยืดอายุของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้ เป็นมะเร็ง P-388 เมื่อนำกลุ่มสารดังกล่าวมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสาร  $\alpha$ -hederin (สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 7) และสาร  $\alpha$ -hederin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของมะเร็ง LL/2 มากกว่า cyclophosphamide อย่างมีนัยสำคัญ

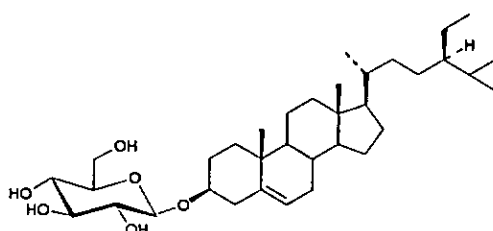
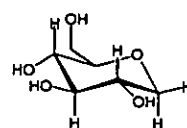


ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของ  $\alpha$ -hederin

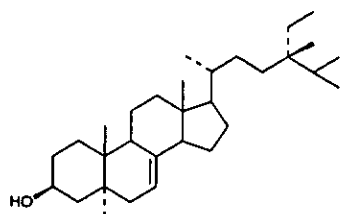
จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane และ ethanol จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 30 และ  $>100$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบ hexane มาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือ aurantiamide acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50} >100$   $\mu\text{g/mL}$  และพบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 3 กลุ่ม โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบ ethanol แยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside และ 1,5-anhydroglucitol โดยค่า  $ED_{50}$  ของสารทั้งสองชนิด  $>100$   $\mu\text{g/mL}$  และสารผสมของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol มีค่า  $ED_{50}$  21.50  $\mu\text{g/mL}$  และพบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า  $ED_{50}$  17.50  $\mu\text{g/mL}$  สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 8



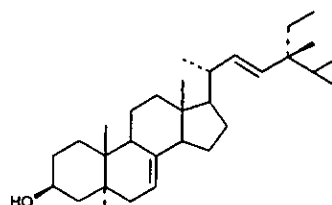
aurantiamide acetate

 $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

1,5- anhydroglucitol



22,23-dihydrochondrillasterol

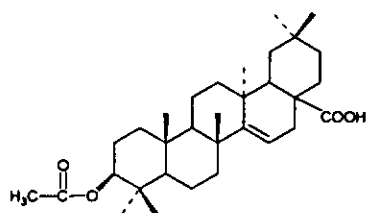


chondrillasterol

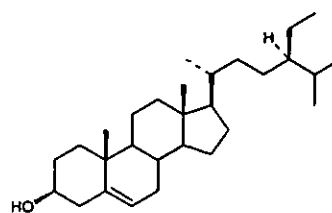
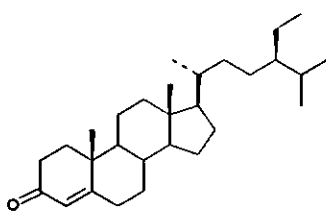
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

อนันต์ คงชุม (2544) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด hexane และ ethanol จากลำต้นหลอดเทียน (*Mallotus odlongifolius* Muell.Arg.) พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 64 และ  $> 100 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดหยาบ hexane มาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ

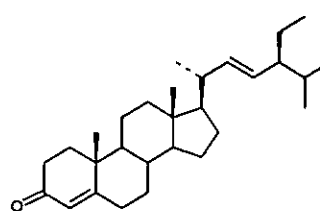
3-acetylaeuritolic acid สารผสมของ stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และสารผสมของ stigmasterol-4-en-3-one กับ stigmasterol-4,22-dien-3-one ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารผสมทั้ง 2 ชนิดนี้มีค่า  $ED_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  และพบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อีก 1 กลุ่ม โดยมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ  $17.00 \mu\text{g/mL}$  สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 9



3-acetylaeuritolic acid

 $\beta$ -sitosterol

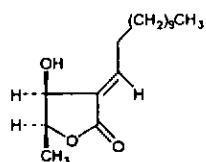
stigmasterol-4-en-3-one



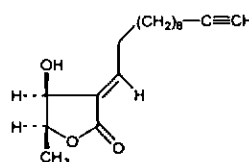
stigmasterol-4,22-dien-3-one

ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้นหลอดเดือน (*Mallotus odlongifolius* Muell.Arg.)

ไซ และคณะ (Tsai, et al. 2001 : 865-867) ได้แยกสารจากเปลือกต้น *Lindera communis*. โดยทำการสกัดสารด้วย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปแบ่งส่วนการละลายด้วย chloroform และน้ำ นำสารสกัดในชั้น chloroform มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารใหม่ 2 ชนิด คือ lincomolide A และ lincomolide B ซึ่งเป็นสารประเภท butanolides และสารประกอบอื่นๆ อีก 7 ชนิด ได้แก่ isolinderanolide E sepesteonol  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside tetradecane nonanoic acid และ decanol เมื่อนำสาร lincomolide A และ lincomolide B ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่าสาร butanolides ทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 สูง โดยมีค่า  $ED_{50}$  เป็น 0.890 และ 1.620  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 10



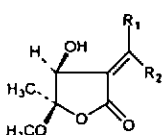
lincomolide A



lincomolide B

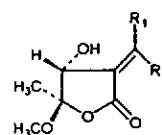
ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเปลือกต้น *Lindera communis*.

เซง และคณะ (Cheng, et al. 2001 : 1502-1505) ได้แยกสารจากใบของ *Litsea acutivena*. โดยทำการสกัดสารด้วย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปแบ่งส่วนการละลายด้วย chloroform และน้ำ นำสารสกัดในชั้น chloroform มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์พบสารใหม่ 6 ชนิด คือ สารประเภท nor-neollignan 1 ชนิด ได้แก่ dehydroxymethylailanthoidol และสารประเภท butanolides 5 ชนิด ได้แก่ litseakolide D litseakolide E litseakolide F litseakolide G และ isolincomolide D เมื่อนำสารประกอบทั้ง 6 ชนิด ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 พบว่าสาร butanolides ทั้ง 5 ชนิด มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 สูง โดยมีค่า  $ED_{50}$  เป็น 1.73 2.94 2.04 0.97 และ 2.97  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 11



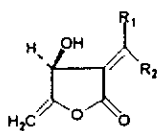
litseakolide D ( $R_1 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ )

litseakolide E ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ )

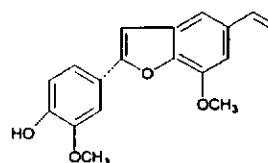


litseakolide F ( $R_1 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ )

litseakolide G ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ )



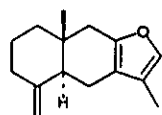
isolincomolide D ( $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = (\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ )



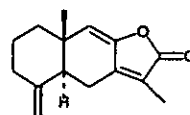
dehydroxymethylailanthoidol

ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากใบ *Litsea acutivena*.

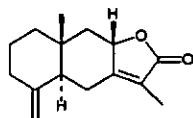
หวัง เซนและหยาง (Wang, Chen & Yang, 2002 : 204-208) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด hexane ที่แยกได้จากเหง้า *Atractylodes ovata*. พบสาร atractylon atractylenolide I atractylenolide II และ atractylenolide III ซึ่งเป็นสารประเภท sesquiterpenoids และพบว่า atractylon และ atractylenolide I ที่ความเข้มข้น 15 และ 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 อย่างมีนัยสำคัญ แต่ atractylenolide II และ atractylenolide III จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ต่ำ สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 12



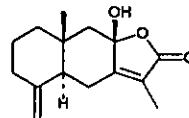
atractylon



atractylenolide I



atractylenolide II



atractylenolide III

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้จากเหง้า *Atractylodes ovata*

### บทที่ 3

## วิธีดำเนินการวิจัย

#### พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือ เหง้าพุทธรักษาที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane แล้ว จากงานวิจัยของวินัย สุขราช (วินัย สุขราช. 2544)

#### เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ คือ เซลล์มะเร็ง P-388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร

#### สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา และการทำสารให้บริสุทธิ์

##### สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ acetone chloroform dichloromethane ethanol ethyl acetate hexane และ methanol โดยตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
2. Silica gel สำหรับ column chromatography
  - silica gel 60 (0.063-0.200 mm, E.Merck, AR grade)
3. Silica gel สำหรับ thin-layer chromatography
  - silica gel 60 GF<sub>254</sub> (E.Merck, AR grade)
4. Spray reagent (anisaldehyde : conc.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : glacial acetic acid : methanol ในอัตราส่วน 0.50 : 5.00 : 10.00 : 85.00 mL (Jork, et al. 1990 : 196)

##### อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
3. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm 2.5 cm 3 cm 4 cm 5 cm 7 cm และ 10 cm
4. Glass drying oven (Buchi B-580)
5. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)

6. Mass spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
7. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Advance 300, 300MHz)
8. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT-IR Spectrum BX)

### **สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง** **สารเคมี**

1. 1% HCl
2. 7.5% NaHCO<sub>3</sub>
3. Trypan blue dye (BDH chemica, UK)
4. Newborn calf serum(NCS) (Biowhittaker, USA)
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (E.Merck, AR grade)
6. Roswell Park Memorial Institute medium number 1640 (RPMI 1640 medium) (Biowhittaker, USA)

### **อุปกรณ์/เครื่องมือ**

1. บีเปตขนาดต่างๆ
2. ตู้บ่ม (Shel-Lab. TC 2323, USA)
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง(Mettler P 1200N)
5. กล้องถ่ายรูปเซลล์มะเร็ง (Olympus, C-35AD-2)
6. กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus, Tokyo)
7. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm<sup>2</sup> (Aseptic Flask, Costar, UK)
8. Haematocytometer (Boeco, Germany)

### **การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์**

#### **การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา**

1. การสกัดสารด้วย chloroform

นำเหง้าพุทธรักษาที่สกัดด้วย hexane แล้ว 5.5 kg มาแช่ใน chloroform 18 L ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 50 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำมาแช่ใน chloroform อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 18 L รวมสารสกัดชั้น chloroform ทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วระเหย

chloroform ออก โดยใช้ rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ chloroformหนัก 56 g แบ่งสารไว้ 1 g สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนที่เหลือ นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 13)

## 2. การสกัดสารด้วย methanol

กากที่เหลือจากการสกัดสารด้วย chloroform แล้ว นำมาผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาแช่ใน methanol 18 L ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 50 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำมาแช่ใน methanol อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 18 L รวมสารสกัดชั้น methanol ทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วระเหย methanol ออก โดยใช้ rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ methanolหนัก 200 g แบ่งสารไว้ 1 g สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนที่เหลือ นำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 13)

### การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์

การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์ใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจลประมาณ 1 : 25 และใช้การบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์แบบเปียกแล้วชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกเป็น ส่วน ๆ ละประมาณ 20-100 mL นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง(TLC) การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 และ/หรือ 365 nm หรือใช้ spray reagent ฟันทนบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อนที่ 80-100°C เป็นเวลา 1-3 นาที รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันจะได้สารแต่ละกลุ่มที่มีขั้วใกล้เคียงกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่มีปริมาณมาก มาแยกต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ส่วนที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารบริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 13-17)

### การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine Lymphocytic Leukemia Cells, P-388) ซึ่งเป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 mL พื้นที่ผิว 25 cm<sup>2</sup> โดยใช้ RPMI 1640 ผสมกับ 10% NCS เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.00-7.20 ด้วย 1% HCl หรือ 7.5% NaHCO<sub>3</sub> เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มที่มี 5% CO<sub>2</sub> และเปลี่ยนถ่ายเซลล์มะเร็ง(subculture)ใส่ขวดเลี้ยงเซลล์ใหม่ 2 ครั้ง/สัปดาห์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีขั้นตอนดังนี้

### 1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 3-4 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) เพื่อหา dilution number (D.N.) ดังนี้

#### 1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบาๆ ให้เซลล์กระจายทั่วขวดแล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มา 0.20 mL ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.40% trypan blue dye ลงไป 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ ปล่อยให้ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

#### 1.2 การนับเซลล์

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

ตัวอย่างการคำนวณเซลล์ที่นับได้

ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 5 ช่องเล็ก	= 250 เซลล์
ปริมาณ cell suspension ใน 1 ช่องเล็ก	= ความกว้าง x ความยาว x ความลึก
	= 0.10 cm x 0.10 cm x 0.010 cm
	= 0.0001 mL
	= $1 \times 10^{-4}$ mL = $1 \times 10^{-4}$ mL
เนื่องจากเซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue dye เป็น 2 เท่า	
ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก	= 250 x 2 เซลล์
จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก ( $10^{-4}$ mL)	= 250 x 2/5 เซลล์
ปริมาตร $10^{-4}$ mL มีจำนวนเซลล์	= 250 x 2/5 เซลล์
ปริมาตร 1 mL มีจำนวนเซลล์	= 250 x 2/5 x $10^4$ เซลล์
	= $1 \times 10^6$ เซลล์
ถ้าต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ปริมาณ	= $5 \times 10^4$ เซลล์/mL
ดังนั้น dilution number (D.N.)	= $1 \times 10^6 / 5 \times 10^4$
	= 20 mL

นั่นคือ จะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 20 เท่า ดังนั้น ถ้าต้องการใช้เซลล์ปริมาณ  $5 \times 10^4$  เซลล์/mL จะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 19 mL ก็จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ

## 2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบประมาณ 4 mg (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO 0.10 mL ละลายสารตัวอย่างให้หมด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/mL}$  ในปริมาตร 4 mL

## 3. เตรียมสารละลาย negative control

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

## 4. การเตรียมสารละลาย positive control

ใช้ micropipette ดูดสารละลาย 5-Fluorouracil (5-Fu) ที่มีความเข้มข้น 250 mg/5 mL มา 5  $\mu\text{L}$  ซึ่งมีเนื้อสารเท่ากับ 250  $\mu\text{g}$  ใส่ในหลอดทดลอง เติม 2.5% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 5 mL ได้สารที่มีความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/mL}$  เจือจางสารจนมีความเข้มข้น 4  $\mu\text{g/mL}$

## 5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ

### 5.1 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์

5.2 เติมสารละลาย negative control และสารตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2 หรือสารละลาย positive control ที่เตรียมในข้อ 4 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยปริมาตรตามความเข้มข้นของสารที่ต้องการจะทดสอบ

### 5.3 เติม stock cell suspension ปริมาตร 1 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์

5.4 นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้ที่มี 5%  $\text{CO}_2$  ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน โดยแต่ละความเข้มข้น ทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 1 ตารางแสดงปริมาณของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารตัวอย่าง solvent control และ cell suspension ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ของสารตัว อย่าง ( $\mu\text{g/mL}$ )	อาหาร เลี้ยงเซลล์ (mL)	สาร ตัวอย่าง (mL)	Solvent Control (mL)	Cell Suspension (mL)	Final Volume (mL)	DMSO (%)
0	3	0.00	1.00	1	5	0.50
15	3	0.075	0.925	1	5	0.50
30	3	0.15	0.85	1	5	0.50
60	3	0.30	0.70	1	5	0.50
120	3	0.60	0.40	1	5	0.50

#### 6. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากผลที่นับได้ นำมาคำนวณหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในกลุ่มควบคุม}} \times 100 \quad (1)$$

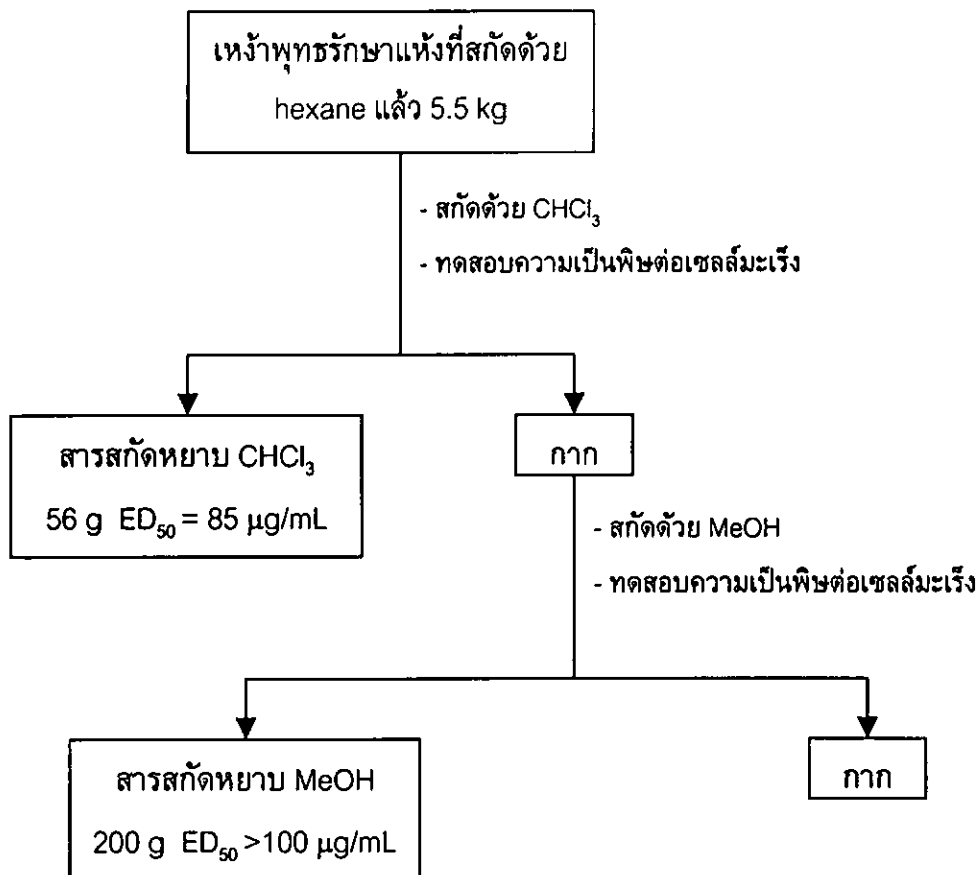
#### 7. การหาค่า $ED_{50}$

หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง ในหน่วย  $\mu\text{g/mL}$  (แกน X) กับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกน Y) ซึ่งคำนวณจากสมการ (1) บนกระดาษกราฟปกติ จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งเป็นค่า  $ED_{50}$  มีหน่วยเป็น  $\mu\text{g/mL}$

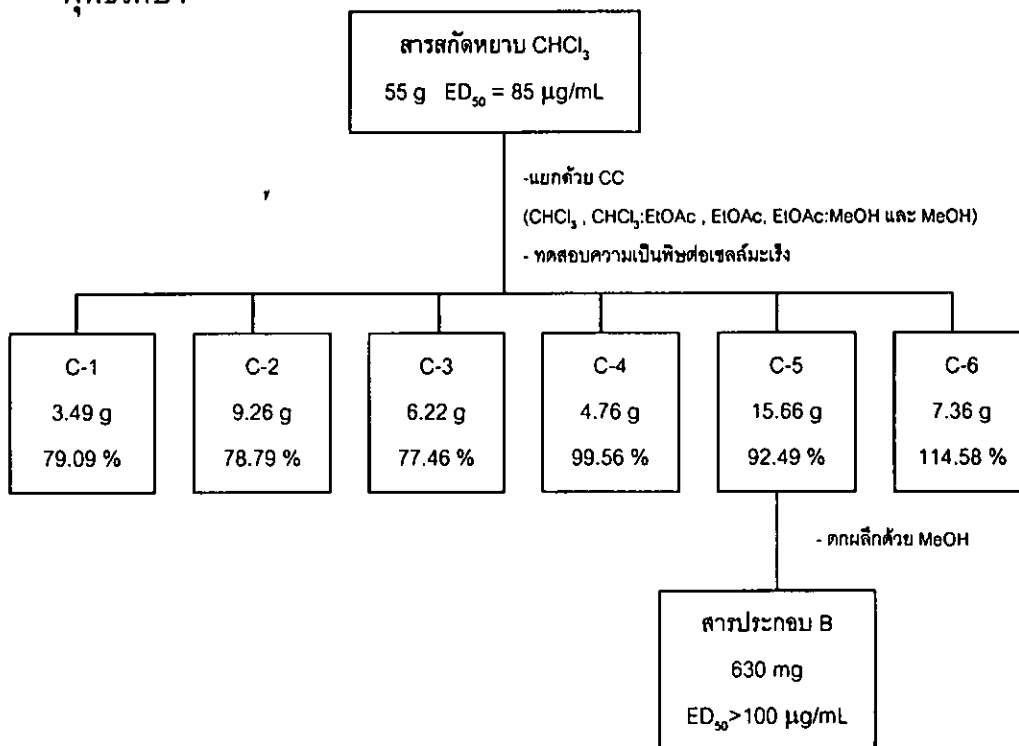
#### การศึกษาสมบัติทางกายภาพและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ รายงานค่าจุดหลอมเหลว ในหน่วยองศาเซลเซียส ( $^{\circ}\text{C}$ ) แถบการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด ( $V_{\text{max}}$ ) รายงานค่าในหน่วย reciprocal centimetre ( $\text{cm}^{-1}$ ) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโคปี รายงานในหน่วย ppm ที่ downfield จาก TMS ซึ่งใช้เป็น internal standard การตรวจสอบสารบน TLC ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 หรือ 356 nm และ spray reagent

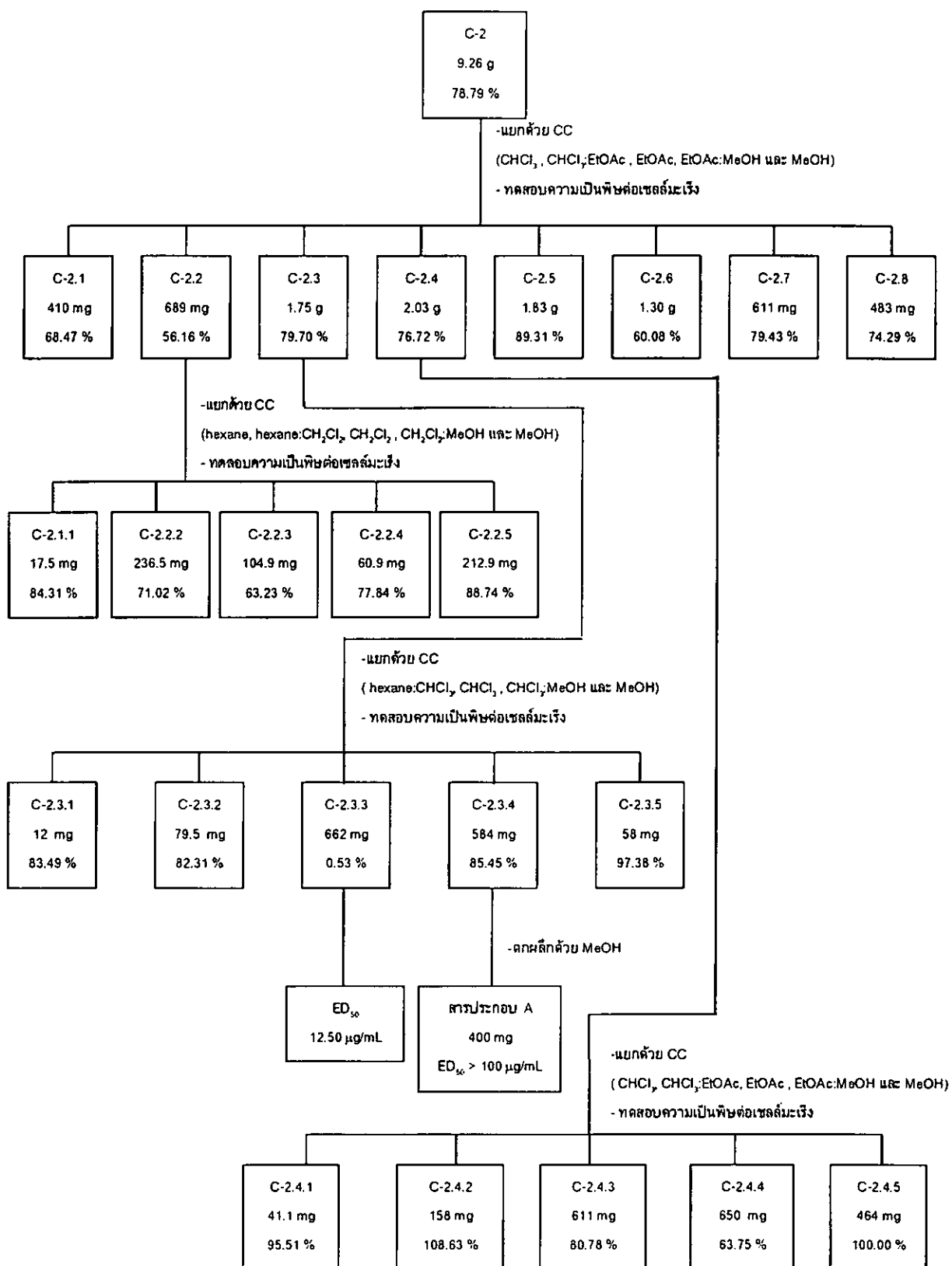
๒๕๐๑๖๑ ๖.๓



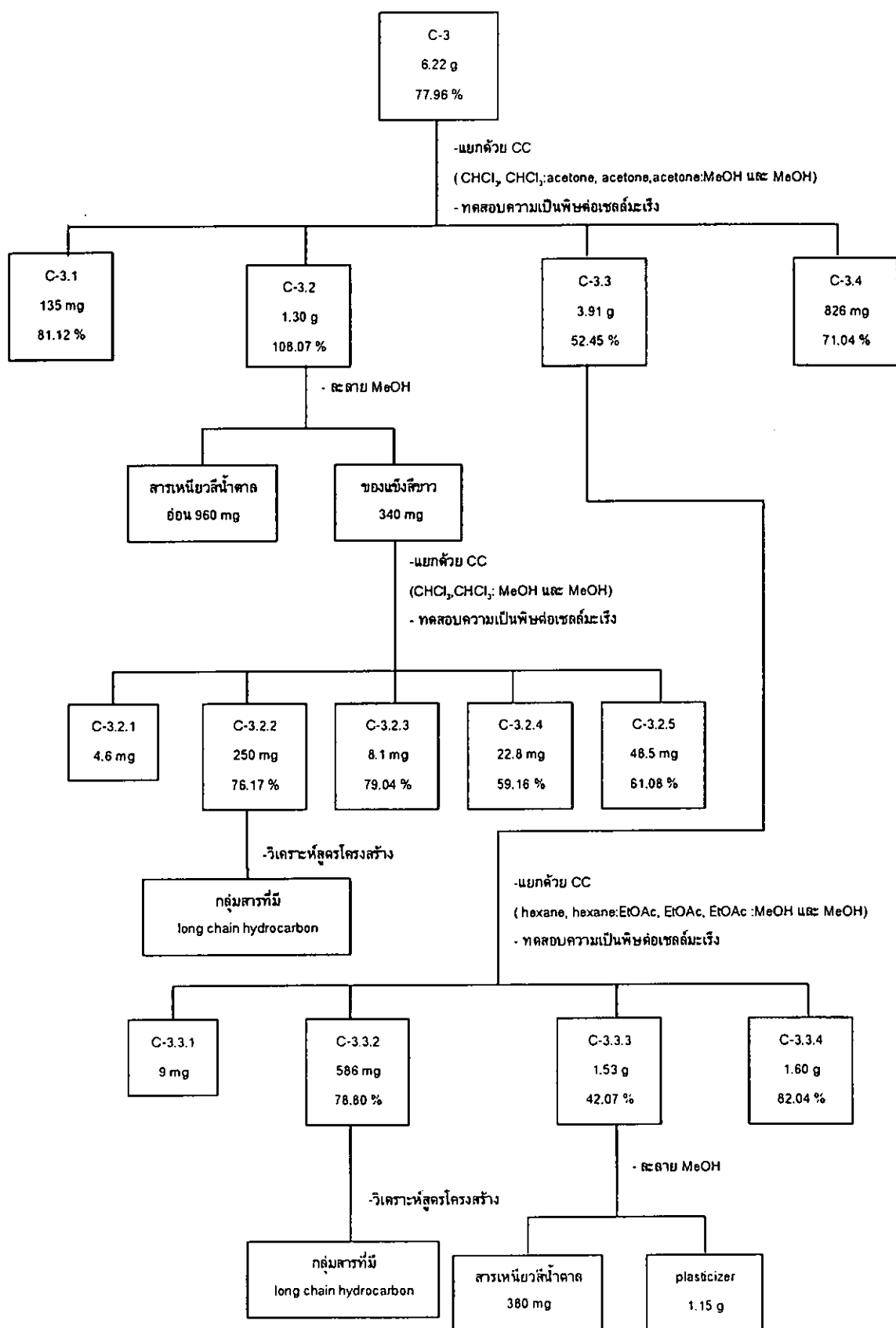
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารและค่า  $\text{ED}_{50}$  ของสารสกัดจากเหง้าพุดรักษา



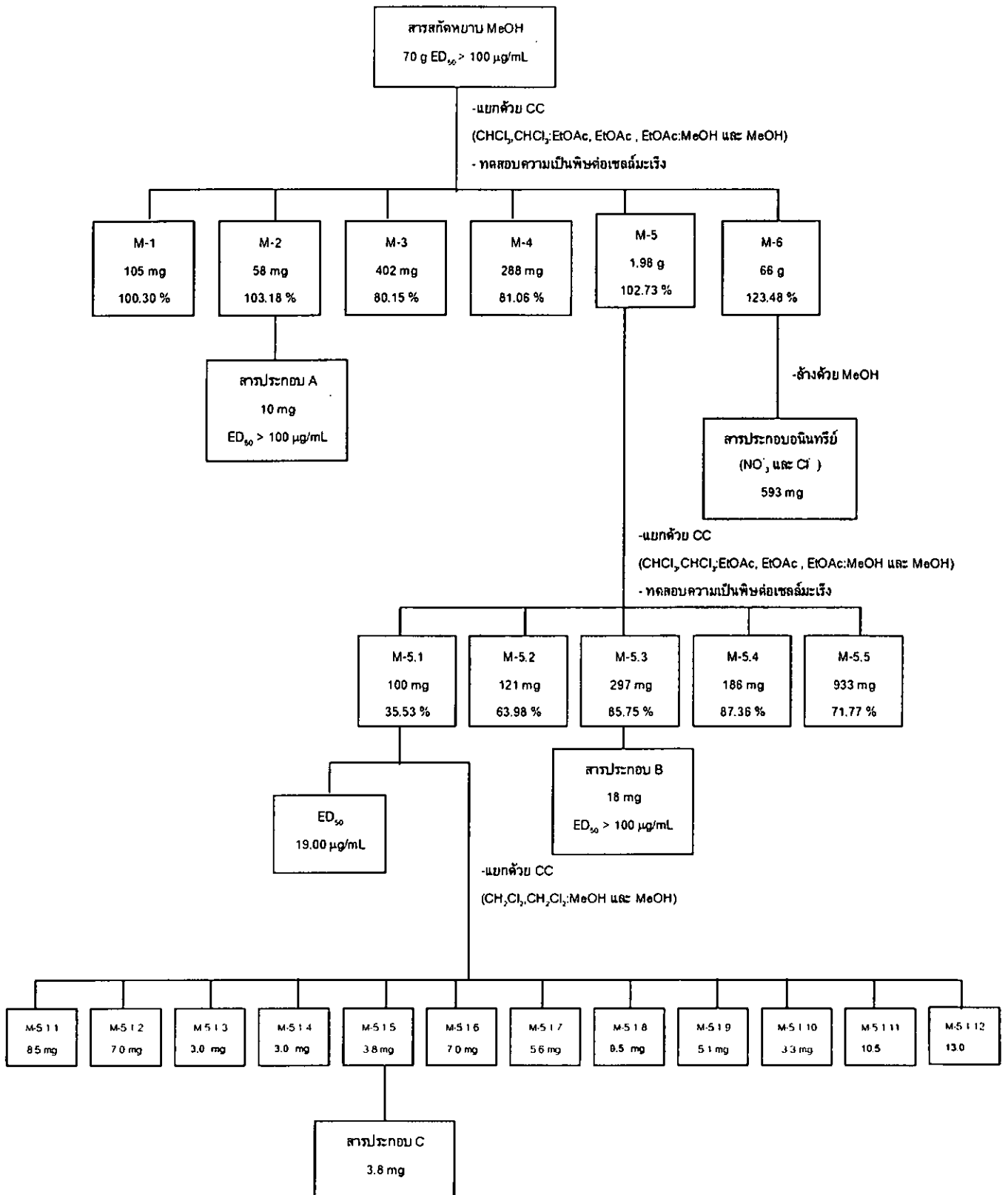
ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388



ภาพประกอบ 15 แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม C-2 และร้อยละการเจริญเติบโตของ  
เซลล์มะเร็ง P-388



ภาพประกอบ 16 แสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม C-3 และร้อยละการเจริญเติบโตของ  
เซลล์มะเร็ง P-388



ภาพประกอบ 17 แสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด MeOH และร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 1. ผลการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา

นำเหง้าพุทธรักษาที่สกัดด้วย hexane แล้ว 5.5 kg มาสกัดด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับ ได้สารสกัด chloroform เป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลอ่อนหนัก 56 g และสารสกัด methanol เป็นสารสีน้ำตาลดำหนัก 200 g

#### 2. ผลการแยกสารและการทำสารให้บริสุทธิ์

##### 2.1 ผลการแยกสารสกัด chloroform และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัด chloroform หนัก 55 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 1,300 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย  $\text{CHCl}_3$  เพิ่มขั้วด้วย EtOAc และ MeOH ตามลำดับ เก็บสารละลายเป็น ส่วนๆ ละ 100 mL นำสารแต่ละส่วนที่แยกได้มาระเหยตัวทำละลายออก ด้วย rotary evaporation ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิคทาง TLC รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ C-1 ถึง C-6 (ตาราง 2) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 18) พบสารกลุ่ม C-2 และ C-3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น และมีข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (infrared spectroscopy) เหมือนกับกลุ่มสารกึ่งบริสุทธิ์ของสารสกัดชั้น hexane ที่แสดงความพิษต่อเซลล์มะเร็ง (วินัย สุขราช. 2544) สำหรับสารกลุ่ม C-5 มีของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม C-2 C-3 และ C-5 มาแยกต่อ

ตาราง 2 ผลการแยกสารสกัด chloroform ด้วย โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$\text{CHCl}_3$	C-1	3.49 g	ของเหลวสีน้ำตาล
$\text{CHCl}_3$ : EtOAc (93 : 7)	C-2	9.26 g	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
(30 : 70)	C-3	6.22 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
(10 : 90)	C-4	4.76 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
EtOAc : MeOH (70 : 30)	C-5	15.66 g	ของแข็งสีขาวปนสารเหนียวสีน้ำตาลดำ
MeOH	C-6	7.36 g	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ

2.1.1 นำสารกลุ่ม C-2 หนัก 9.26 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 250 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย  $\text{CHCl}_3$  และเพิ่มขั้วด้วย EtOAc จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 40 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม คือ C-2.1 ถึง C-2.8 (ตาราง 3) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 19) พบสารกลุ่ม C-2.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ส่วนสารกลุ่ม C-2.3 และ C-2.4 มีลักษณะเป็นของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม C-2.2 C-2.3 และ C-2.4 มาแยกต่อ

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$\text{CHCl}_3$	C-2.1	410.00 mg	ของเหลวสีเหลือง
	C-2.2	689.00 mg	ของเหลวสีน้ำตาล
$\text{CHCl}_3$ : EtOAc	(99 : 1) C-2.3	1.75 g	ของเหลวสีเหลืองปนของแข็งสีขาว
	(96 : 4) C-2.4	2.03 g	ของเหลวสีเหลืองปนเขียวปนของแข็งสีขาว
	(90 : 10) C-2.5	1.83 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(50 : 50) C-2.6	1.30 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(20 : 80) C-2.7	611.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
MeOH	C-2.8	483.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.2 นำสารกลุ่ม C-2.2 หนัก 689 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063–0.200 mm หนัก 30 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย hexane และเพิ่มขั้วด้วย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 20 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ C-2.2.1 ถึง C-2.2.5 (ตาราง 4) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 20) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีกลุ่มสารอย่างน้อย 4 ชนิดปนกันอยู่ จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (75 : 25)	C-2.2.1	17.50 mg	ของเหลวสีเหลือง
(72 : 28)	C-2.2.2	236.50 mg	ของเหลวสีเหลืองเข้ม
(60 : 40)	C-2.2.3	104.90 mg	ของเหลวสีเขียวปนเหลือง
(55 : 45)	C-2.2.4	60.90 mg	สารเหนียวสีเหลือง
MeOH	C-2.2.5	212.90 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลปนเหลือง

2.1.3 นำสารกลุ่ม C-2.3 น้ก 1.75 g มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm น้ก 48 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย hexane-CHCl<sub>3</sub> และเพิ่มขั้วด้วย CHCl<sub>3</sub> จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 10 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ C-2.3.1 ถึง C-2.3.5 (ตาราง 5) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม C-2.3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 21) สารมีลักษณะเป็นสารเหนียวสีชมพูปนส้ม และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : acetone ; 80 : 20) พบว่ามีกลุ่มสารอย่างน้อย 9 ชนิดปนกันอยู่ จึงไม่นำมาแยกต่อ นำสารกลุ่ม C-2.3.3 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อหาค่า ED<sub>50</sub> (ตาราง 22) (ภาพประกอบ 21) ส่วนสารกลุ่ม C-2.3.4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย MeOH

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : CHCl <sub>3</sub> (50 : 50)	C-2.3.1	12.00 mg	สารเหนียวสีขาว
(50 : 50)	C-2.3.2	79.50 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
(49 : 51)	C-2.3.3	662.00 mg	สารเหนียวสีชมพูปนส้ม
(43 : 57)	C-2.3.4	584.00 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
MeOH	C-2.3.5	58.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.4 นำสารกลุ่ม C-2.3.4 หนัก 584 mg มาตกผลึกด้วย MeOH ได้ผลึกไม่มีสีหนัก 400 mg ให้ชื่อว่า สารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

2.1.5 นำสารกลุ่ม C-2.4 หนัก 2.03 g มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 70 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย  $\text{CHCl}_3$  และเพิ่มขั้วด้วย EtOAc จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 10 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ C-2.4.1 ถึง C-2.4.5 (ตาราง 6) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 23) ส่วนสารกลุ่ม C-2.4.2 และ สารกลุ่ม C-2.4.3 มีลักษณะกึ่งของแข็งปนอยู่ด้วยจึงนำสารกลุ่ม C-2.4.2 และ สารกลุ่ม C-2.4.3 มาแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$\text{CHCl}_3$	C-2.4.1	41.10 mg	สารเหนียวหนืดสีเหลือง
$\text{CHCl}_3$ : EtOAc	(99.5 : 0.5) C-2.4.2	158.00 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	(98 : 2) C-2.4.3	611.00 mg	ของแข็งปนของเหลวสีเหลือง
	(88 : 12) C-2.4.4	650.00 mg	สารหนืดสีเหลือง
MeOH	C-2.4.5	464.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.6 นำสารกลุ่ม C-2.4.2 หนัก 158 mg มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 13 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย hexane- $\text{CHCl}_3$  และ เพิ่มขั้วด้วย  $\text{CHCl}_3$  จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 10 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ C-2.4.2.1 ถึง C-2.4.2.5 (ตาราง 7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane :  $\text{CHCl}_3$ ) พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีกลุ่มสารอย่างน้อย 3 ชนิดปนกันอยู่จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ สารกลุ่ม C-2.4.2.4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลือง นำสารกลุ่ม C-2.4.2.4 ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นกลุ่มสารประกอบที่มี long chain hydrocarbon

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : CHCl <sub>3</sub> (50 : 50)	C-2.4.2.1	2.60 mg	ของเหลวไม่มีสี
(50 : 50)	C-2.4.2.2	3.50 mg	ควาบสีขาว
(50 : 50)	C-2.4.2.3	39.00 mg	ควาบสีขาว
CHCl <sub>3</sub> : MeOH (97 : 3)	C-2.4.2.4	38.90 mg	ของแข็ง สีขาวปนเหลือง
MeOH	C-2.4.2.5	64.60 mg	ของเหลวสีน้ำตาลเหลือง

2.1.7 นำสารกลุ่ม C-2.4.3 น้ำหนัก 611 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm น้ำหนัก 35 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย CHCl<sub>3</sub> และเพิ่มขั้วด้วย EtOAc จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 10 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่มคือ C-2.4.3.1 ถึง C-2.4.3.5 (ตาราง 8) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : CHCl<sub>3</sub>) พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีกลุ่มสารอย่างน้อย 8 ชนิดปนกันอยู่พบว่า มีกลุ่มสารหลายชนิดปนกัน จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม C-2.4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl <sub>3</sub> : EtOAc (99 : 1)	C-2.4.3.1	6.90 mg	ของเหลวสีเหลือง
(98 : 2)	C-2.4.3.2	251.70 mg	ของแข็งสีขาวปนของเหลว สีเหลือง
(97.5 : 2.5)	C-2.4.3.3	59.00 mg	สารเหนียวสีขาวปนเหลือง
EtOAc : MeOH (50 : 50)	C-2.4.3.4	70.00 mg	ของเหลวสีเหลือง
MeOH	C-2.4.3.5	187.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.8 นำสารกลุ่ม C-3 น้ำหนัก 6.22 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm น้ำหนัก 170 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย CHCl<sub>3</sub> และเพิ่มขั้วด้วย acetone จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 40 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่มคือ C-3.1 ถึง C-3.4 (ตาราง 9) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารกลุ่ม

C-3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น(ตาราง 24) ส่วนสารกลุ่ม C-3.2 มีลักษณะสารกึ่งของแข็งปนอยู่ จึงนำสารกลุ่ม C-3.2 และ C-3.3 มาแยกต่อ

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่ม C-3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl <sub>3</sub>	C-3.1	135.00 mg	ของเหลวสีเหลือง
CHCl <sub>3</sub> : acetone (97 : 3) (30 : 70)	C-3.2	1.30 g	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อนปนของแข็งสีขาว
	C-3.3	3.80 g	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลอ่อนปนเหลือง
MeOH	C-3.4	826.00 mg	สารเหนียวสีดำ

2.1.9 นำสารกลุ่ม C-3.2 น้หนัก 1.30 g มาละลายใน MeOH กรองได้ส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวหนัก 340 mg นำส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 17 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย CHCl<sub>3</sub> และเพิ่มขั้วด้วย MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 10 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันแยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่มคือ C-3.2.1 ถึง C-3.2.5 (ตาราง 10) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 25) สารกลุ่ม C-3.2.2 มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็งสีขาวปนเหลือง นำสารกลุ่ม C-3.2.2 ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นกลุ่มสารประกอบที่มี long chain hydrocarbon

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม C-3.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
CHCl <sub>3</sub>	C-3.2.1	4.60 mg	สารเหนียวสีขาวปนเหลือง
	C-3.2.2	250.00 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
	C-3.2.3	8.10 mg	ของแข็งสีขาว
	C-3.2.4	22.80 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
MeOH	C-3.2.5	48.50 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.10 นำสารกลุ่ม C-3.3หนัก 3.8 g มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 120 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย hexane และเพิ่มขั้วด้วย EtOAc จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 40 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ C-3.3.1 ถึง C-3.3.4 (ตาราง 11) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารกลุ่ม C-3.3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 26) จึงนำสารกลุ่ม C-3.3.3 มาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม C-3.3.2 มีลักษณะเป็นกิ่งของแข็งสีขาว นำสารกลุ่ม C-3.3.2 ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง พบว่าเป็นกลุ่มสารประกอบที่มี long chain hydrocarbon

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม C-3.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane	C-3.3.1	9.00 mg	ของเหลวไม่มีสี
hexane : EtOAc (94 : 6)	C-3.3.2	586.00 mg	ของแข็งสีขาว
(70 : 30)	C-3.3.3	1.53 g	สารเหนียวสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว
MeOH	C-3.3.4	1.60 g	สารเหนียวสีน้ำตาล

2.1.11 นำสารกลุ่ม C-3.3.3หนัก 1.53 g มาละลายด้วย MeOH กรองได้ส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวหนัก 1.15 g จากข้อมูลทาง  $^1\text{H-NMR}$  พบว่าเป็นสารประเภท plasticizer จึงไม่นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนที่เป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (hexane : acetone ; 80 : 20) พบว่ามีกลุ่มสารอย่างน้อย 7 ชนิดปนกันอยู่ จึงไม่นำมาแยกต่อ

2.1.12 นำสารกลุ่ม C-5หนัก 15.66 g มาละลายใน MeOH แล้วกรองได้ส่วนที่เป็นของแข็งสีขาวหนัก 630 mg ให้ชื่อว่าสารประกอบ B นำสารประกอบ B ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อหาค่า  $ED_{50}$  (ตาราง 27)

## 2.2 ผลการแยกสารสกัดชั้น MeOH และการทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัด MeOHหนัก 70 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 1,400 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย  $\text{CHCl}_3$  เพิ่มขั้วด้วย EtOAc และ MeOH ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ถูก

ชะผ่านคอลัมน์เป็นส่วนๆ ละ 100 mL นำสารแต่ละส่วนที่แยกได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิคทาง TLC รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม คือ M-1 ถึง M-6 (ตาราง 12) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 28) และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีกลุ่มสารหลายชนิดปนกัน แต่สารกลุ่ม M-2 M-5 และ M-6 มีของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม M-2 M-5 และ M-6 มาแยกต่อ

ตาราง 12 ผลการแยกสารสกัดชั้น MeOH ด้วย โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร	
CHCl <sub>3</sub> : EtOAc	(85 : 15)	M-1	105.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(70 : 30)	M-2	58.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว
	(50 : 50)	M-3	402.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
EtOAc		M-4	288.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
EtOAc : MeOH	(80 : 20)	M-5	1.98 g	ของแข็งสีขาวปนสารเหนียวสีน้ำตาลดำ
MeOH		M-6	66.00 g	สารเหนียวสีน้ำตาลดำปนผลึกไม่มีสี

2.2.1 นำสารกลุ่ม M-2 น้ำหนัก 58 mg มาตกผลึกด้วย MeOH ได้ของแข็งสีขาวหนัก 10 mg นำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง พบว่าเป็น สารประกอบ A

2.2.2 นำสารกลุ่ม M-5 น้ำหนัก 1.98 g มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm หนัก 55 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย hexane และเพิ่มขั้วด้วย acetone จนถึง MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ส่วนละ 40 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่มคือ M-5.1 ถึง M-5.5 (ตาราง 13) นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารกลุ่ม M-5.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 29) นำสารกลุ่ม M-5.1 ไปแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์และแบ่งไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อหาค่า ED<sub>50</sub> (ตาราง 30) (ภาพประกอบ 22) ส่วนสารกลุ่ม M-5.3 พบกลุ่มของแข็งสีขาวปนอยู่ด้วย จึงนำมาแยกต่อ

ตาราง 13 ผลการแยกสารกลุ่ม M-5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : acetone (65 : 35)	M-5.1	100.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
(65 : 35)	M-5.2	121.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
(55 : 45)	M-5.3	297.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดปนของแข็งสีขาว
(50 : 50)	M-5.4	186.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
MeOH	M-5.5	933.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ

2.2.3 นำสารกลุ่ม M-5.1 น้หนัก 100 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm ซิลิกาเจลขนาด 0.063 – 0.200 mm น้หนัก 15 g) โดยชะด้วยตัวทำละลาย  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  และเพิ่มขั้วด้วย MeOH เก็บสารละลายที่ถูกชะผ่านคอลัมน์ ส่วนละ 20 mL รวมกลุ่มสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แยกสารได้ทั้งหมด 12 กลุ่ม คือ M-5.1.1 ถึง M-5.1.12 (ตาราง 14) เนื่องจากสารแต่ละกลุ่มมีปริมาณน้อยจึงไม่นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารกลุ่ม M-5.1.5 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองน้หนัก 3.8 mg เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่าเป็นสารบริสุทธิ์ ให้ชื่อว่า สารประกอบ C นำสารประกอบ C ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

ตาราง 14 ผลการแยกสารกลุ่ม M-5.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	M-5.1.1	8.50 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (99.3 : 0.7)	M-5.1.2	7.00 mg	สารเหนียวสีเหลือง
(99 : 1)	M-5.1.3	3.00 mg	คราบสีขาว
(98.9 : 1.1)	M-5.1.4	3.00 mg	สารเหนียวสีเหลืองอ่อน
(98.7 : 1.3)	M-5.1.5	3.80 mg	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
(97 : 3)	M-5.1.6	7.00 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
(94 : 6)	M-5.1.7	5.60 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
(90 : 10)	M-5.1.8	9.50 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
(75 : 25)	M-5.1.9	5.10 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
(60 : 40)	M-5.1.10	3.30 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
(10 : 90)	M-5.1.11	10.50 mg	สารเหนียวสีน้ำตาลดำ
MeOH	M-5.1.12	13.00 mg	สารเหนียวสีดำ

2.2.4 นำสารกลุ่ม M-5.3 หนัก 297 mg มาละลายด้วย MeOH กรองได้ส่วนที่เป็นของแข็งสีขาว หนัก 18 mg นำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างพบว่าเป็น สารประกอบ B

2.2.5 นำสารกลุ่ม M-6 หนัก 66 g มาละลายด้วย MeOH กรองส่วนที่เป็นผลึกไม่มีสีล้างผลึกซ้ำด้วย MeOH ได้ผลึกหนัก 593 mg นำไปวิเคราะห์ไอออนทางคุณภาพวิเคราะห์ พบว่าผลึกไม่มีสีดังกล่าวประกอบด้วยไอออนของ  $\text{NO}_3^-$  และ  $\text{Cl}^-$

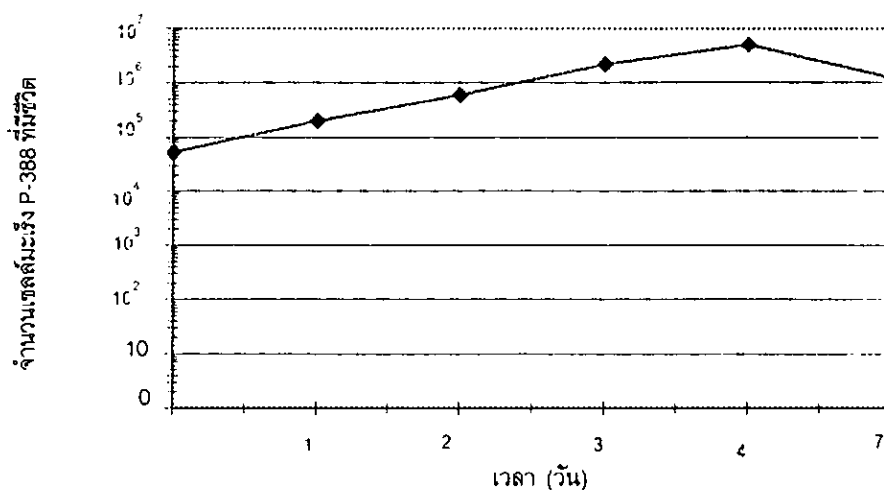
### 3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388

#### 3.1 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) นำผลการนับเซลล์ที่ได้ (ตาราง 15) มาเขียน growth curve บนกระดาษกราฟแบบ semi-logarithm ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกน X) กับจำนวนวันที่ทำการทดลอง (แกน Y) (ภาพประกอบ 18)

ตาราง 15 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิตต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)
0	$5.20 \times 10^4$
1	$2.00 \times 10^5$
2	$6.00 \times 10^5$
3	$2.14 \times 10^6$
4	$4.95 \times 10^6$
7	$1.22 \times 10^6$



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P-388 เจริญเติบโตได้ดีในระยะ 4 วันแรกที่ทำการทดลอง โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตสูงสุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388

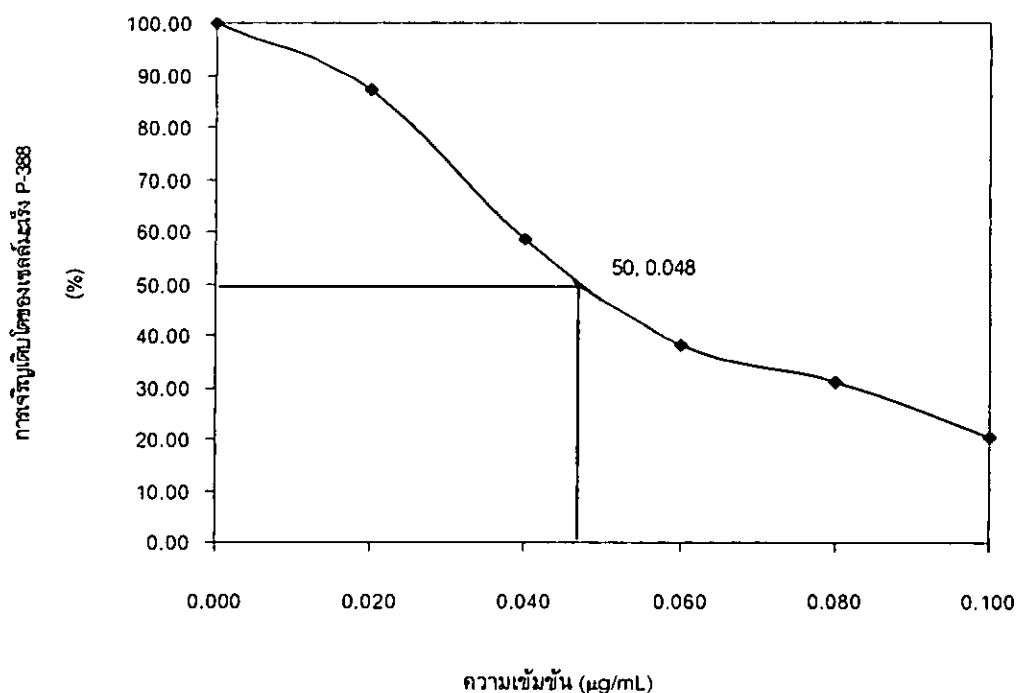
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้ 0.5 % DMSO เป็น negative control ซึ่งไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และใช้ 5-fluorouracil เป็น positive control เพื่อยืนยันว่าเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ สามารถตอบสนองต่อสารต้านมะเร็งได้ เนื่องจากปัจจุบันสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ใช้ 5-fluorouracil ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง และจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้ 5-fluorouracil เป็น positive control ก็ให้ผลดีตลอดมา

### 3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ 5-fluorouracil

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 โดยวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ในวันที่ 4 ของการทดลอง ด้วยการนำ 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้น 0.02 0.04 0.06 0.08 และ 0.10  $\mu\text{g/mL}$  ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 16) และนำผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น (แกน X) และร้อยละของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกน Y) ได้ค่า  $ED_{50}$  ของ 5-fluorouracil เท่ากับ 0.048  $\mu\text{g/mL}$  (ภาพประกอบ 19)

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของ 5-fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิตต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$4.99 \times 10^4$	$5.30 \times 10^6$	100.00
0.02	$4.99 \times 10^4$	$4.62 \times 10^6$	87.17
0.04	$4.99 \times 10^4$	$3.10 \times 10^6$	58.49
0.06	$4.99 \times 10^4$	$2.03 \times 10^6$	38.30
0.08	$4.99 \times 10^4$	$1.64 \times 10^6$	30.94
0.10	$4.99 \times 10^4$	$1.07 \times 10^6$	20.20



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงค่า  $ED_{50}$  ของ 5-fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็ง P-388

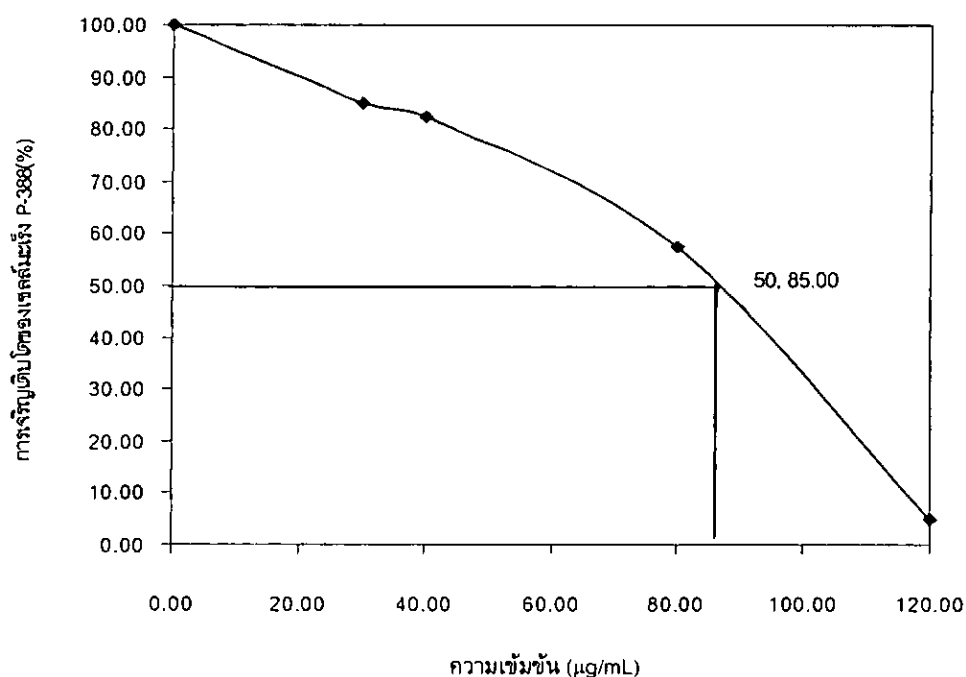
ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดค่าความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็ง KB ว่า สารสกัดหยาดควรมีค่า  $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$  ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ควรมีค่า  $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$  (Geran, et al. 1972 : 7-17) ในการวิจัยครั้งนี้จึงทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาที่ความเข้มข้น  $30 \mu\text{g/mL}$

### 3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด $\text{CHCl}_3$ และ MeOH

นำสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  และ MeOH ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยเตรียมสารให้มีความเข้มข้น 30 40 80 และ  $120 \mu\text{g/mL}$  เพื่อหาค่า  $ED_{50}$  ผลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  และ MeOH พบว่ามีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 85 และ  $> 100 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 17 ภาพประกอบ 20

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  และ MeOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL) วันเริ่มต้น		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	$5.0 \times 10^4$	$6.91 \times 10^6$	100.00
สารสกัด $\text{CHCl}_3$	30	$5.0 \times 10^4$	$5.88 \times 10^6$	85.09
	40	$5.0 \times 10^4$	$5.70 \times 10^6$	82.49
	80	$5.0 \times 10^4$	$3.98 \times 10^6$	57.59
	120	$5.0 \times 10^4$	$3.46 \times 10^5$	5.01
กลุ่มควบคุม	-	$5.0 \times 10^4$	$6.91 \times 10^6$	100.00
สารสกัด MeOH	30	$5.0 \times 10^4$	$5.86 \times 10^6$	84.80
	40	$5.0 \times 10^4$	$5.76 \times 10^6$	83.36
	80	$5.0 \times 10^4$	$4.74 \times 10^6$	68.60
	120	$5.0 \times 10^4$	$3.80 \times 10^6$	54.99



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงค่า  $\text{ED}_{50}$  ของสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  ต่อเซลล์มะเร็ง P-388

### 3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด $\text{CHCl}_3$

3.4.1 นำสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม (ตาราง 2) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด  $\text{CHCl}_3$  ที่ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิตต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$6.79 \times 10^6$	100.00
C-1	$5.0 \times 10^4$	$5.37 \times 10^6$	79.09
C-2	$5.0 \times 10^4$	$5.35 \times 10^6$	78.79
C-3	$5.0 \times 10^4$	$5.26 \times 10^6$	77.46
C-4	$5.0 \times 10^4$	$6.76 \times 10^6$	99.56
C-5	$5.0 \times 10^4$	$6.28 \times 10^6$	92.49
C-6	$5.0 \times 10^4$	$7.78 \times 10^6$	114.58

3.4.2 จากตาราง 18 สารกลุ่ม C-2 และ C-3 มีความเป็นพิษมากกว่าสารกลุ่มอื่น จึงนำสารกลุ่ม C-2 และ C-3 มาแยกต่อ สำหรับสารกลุ่ม C-5 พบว่ามีส่วนที่เป็นของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำมาแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์และหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำสารกลุ่ม C-2 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 8 กลุ่ม (ตาราง 3) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 19

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-2 ที่ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$7.39 \times 10^6$	100.00
C-2.1	$5.0 \times 10^4$	$5.06 \times 10^6$	68.47
C-2.2	$5.0 \times 10^4$	$4.15 \times 10^6$	56.16
C-2.3	$5.0 \times 10^4$	$5.89 \times 10^6$	79.70
C-2.4	$5.0 \times 10^4$	$5.67 \times 10^6$	76.72
C-2.5	$5.0 \times 10^4$	$6.60 \times 10^6$	89.31
C-2.6	$5.0 \times 10^4$	$4.44 \times 10^6$	60.08
C-2.7	$5.0 \times 10^4$	$5.87 \times 10^6$	79.43
C-2.8	$5.0 \times 10^4$	$5.49 \times 10^6$	74.29

3.4.3 จากตาราง 19 สารกลุ่ม C-2.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น และสารกลุ่ม C-2.3 และ C-2.4 มีของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม C-2.2 C-2.3 และ C-2.4 มาแยกต่อ นำสารกลุ่ม C-2.2 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ตาราง 4) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 20 พบว่าสารแต่ละกลุ่ม มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-2.2 ที่ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$8.35 \times 10^6$	100
C-2.2.1	$5.0 \times 10^4$	$7.04 \times 10^5$	84.31
C-2.2.2	$5.0 \times 10^4$	$5.93 \times 10^6$	71.02
C-2.2.3	$5.0 \times 10^4$	$5.28 \times 10^6$	63.23
C-2.2.4	$5.0 \times 10^4$	$6.50 \times 10^6$	77.84
C-2.2.5	$5.0 \times 10^4$	$7.41 \times 10^6$	88.74

3.4.4 นำสารกลุ่ม C-2.3 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ตาราง 5) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 21

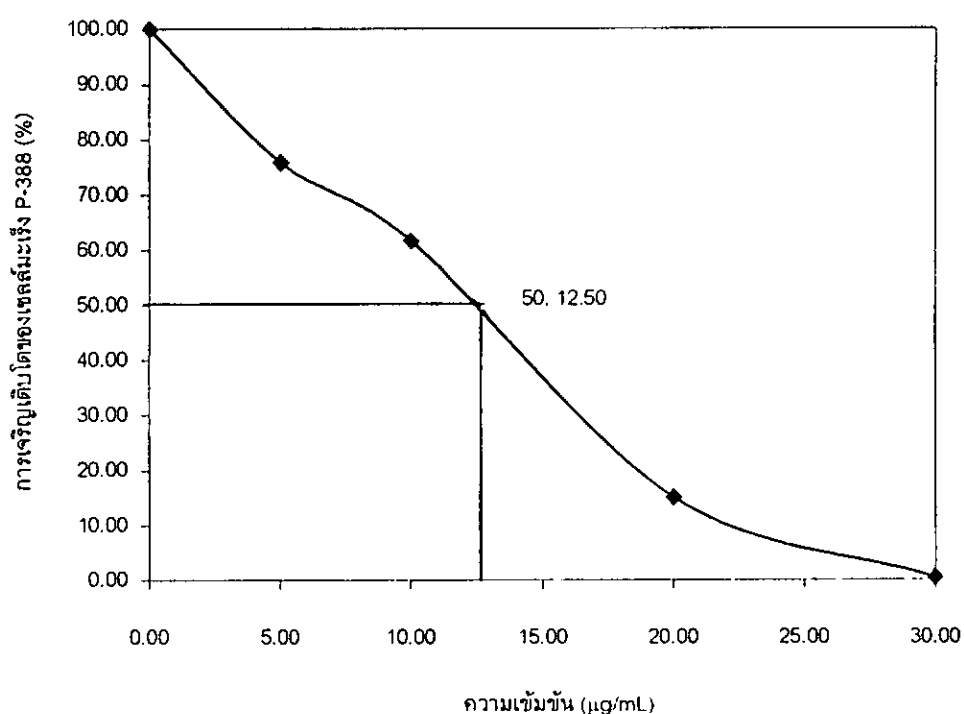
ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-2.3 ที่ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$7.63 \times 10^6$	100.00
C-2.3.1	$5.0 \times 10^4$	$6.37 \times 10^5$	83.49
C-2.3.2	$5.0 \times 10^4$	$6.28 \times 10^5$	82.31
C-2.3.3	$5.0 \times 10^4$	$4.04 \times 10^4$	0.53
C-2.3.4	$5.0 \times 10^4$	$6.52 \times 10^6$	85.45
C-2.3.5	$5.0 \times 10^4$	$7.43 \times 10^6$	97.38

3.4.5 จากตาราง 21 สารกลุ่ม C-2.3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ามีกลุ่มสารหลายชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ นำสารกลุ่ม C-2.3.3 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า  $ED_{50}$  พบว่าสารกลุ่ม C-2.3.3 มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ  $12.5 \mu\text{g/mL}$  ดังแสดงในตาราง 22 ภาพประกอบ 21

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มสารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	$5.0 \times 10^4$	$7.49 \times 10^6$	100.00
C-2.3.3	5	$5.0 \times 10^4$	$5.68 \times 10^6$	75.83
	10	$5.0 \times 10^4$	$4.62 \times 10^6$	61.68
	20	$5.0 \times 10^4$	$1.13 \times 10^6$	15.09
	30	$5.0 \times 10^4$	$4.00 \times 10^4$	0.53



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า  $ED_{50}$  ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P-388

3.4.6 นำสารกลุ่ม C-2.4 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ตาราง 6) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 23

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-2.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$8.69 \times 10^6$	100.00
C-2.4.1	$5.0 \times 10^4$	$8.30 \times 10^6$	95.51
C-2.4.2	$5.0 \times 10^4$	$9.44 \times 10^6$	108.63
C-2.4.3	$5.0 \times 10^4$	$7.02 \times 10^6$	80.78
C-2.4.4	$5.0 \times 10^4$	$5.54 \times 10^6$	63.75
C-2.4.5	$5.0 \times 10^4$	$8.69 \times 10^6$	100.00

3.4.7 จากตาราง 23 สารแต่ละกลุ่ม มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ แต่เนื่องจากสารกลุ่ม C-2.4.2 และสารกลุ่ม C-2.4.3 มีลักษณะกึ่งของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม C-2.4.2 และสารกลุ่ม C-2.4.3 มาแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

3.4.8 นำสารกลุ่ม C-3 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม (ตาราง 9) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 24 พบว่าสารกลุ่ม C-3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น และเนื่องจากสารกลุ่ม C-3.2 มีลักษณะกึ่งของแข็ง จึงนำสารกลุ่ม C-3.2 และ C-3.3 มาแยกต่อเพื่อหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$6.94 \times 10^6$	100.00
C-3.1	$5.0 \times 10^4$	$5.63 \times 10^6$	81.12
C-3.2	$5.0 \times 10^4$	$7.50 \times 10^6$	108.07
C-3.3	$5.0 \times 10^4$	$3.64 \times 10^6$	52.45
C-3.4	$5.0 \times 10^4$	$4.93 \times 10^6$	71.04

3.4.9 นำสารกลุ่ม C-3.2 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ตาราง 10) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 25 พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-3.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$8.35 \times 10^6$	100.00
C-3.2.2	$5.0 \times 10^4$	$6.36 \times 10^6$	76.17
C-3.2.3	$5.0 \times 10^4$	$6.60 \times 10^6$	79.04
C-3.2.4	$5.0 \times 10^4$	$4.94 \times 10^6$	59.16
C-3.2.5	$5.0 \times 10^4$	$5.10 \times 10^6$	61.08

3.4.10 นำสารกลุ่ม C-3.3 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม (ตาราง 11) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 26) พบว่าสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม C-3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิตต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$6.18 \times 10^5$	100.00
C-3.3.2	$5.0 \times 10^4$	$4.87 \times 10^5$	78.80
C-3.3.3	$5.0 \times 10^4$	$2.60 \times 10^5$	42.07
C-3.3.4	$5.0 \times 10^4$	$5.07 \times 10^5$	82.04

3.4.11 นำสารประกอบ B ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า  $ED_{50}$  พบว่าสารประกอบ B มีค่า  $ED_{50} > 100$  µg/mL ดังแสดงในตาราง 27

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารประกอบ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มสารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น µg/mL	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิตต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	$5.0 \times 10^4$	$6.20 \times 10^5$	100.00
สารประกอบ B	30	$5.0 \times 10^4$	$5.86 \times 10^5$	94.52
	40	$5.0 \times 10^4$	$5.78 \times 10^5$	93.22
	80	$5.0 \times 10^4$	$5.60 \times 10^5$	90.32
	120	$5.0 \times 10^4$	$5.93 \times 10^5$	95.65

### 3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด

MeOH

3.5.1 นำสารสกัด MeOH มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม (ตาราง 12) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 28

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด MeOH ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL) วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$6.60 \times 10^6$	100.00
M-1	$5.0 \times 10^4$	$6.62 \times 10^6$	100.30
M-2	$5.0 \times 10^4$	$6.81 \times 10^6$	103.18
M-3	$5.0 \times 10^4$	$5.29 \times 10^6$	80.15
M-4	$5.0 \times 10^4$	$5.35 \times 10^6$	81.06
M-5	$5.0 \times 10^4$	$6.78 \times 10^6$	102.73
M-6	$5.0 \times 10^4$	$8.15 \times 10^6$	123.48

3.5.2 จากตาราง 28 สารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ แต่สารกลุ่ม M-5 มีของแข็งปนอยู่ด้วย จึงนำสารกลุ่ม M-5 มาแยกต่อ เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์และหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำสารกลุ่ม M-5 มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกสารได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม (ตาราง 13) นำกลุ่มสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบแสดงในตาราง 29

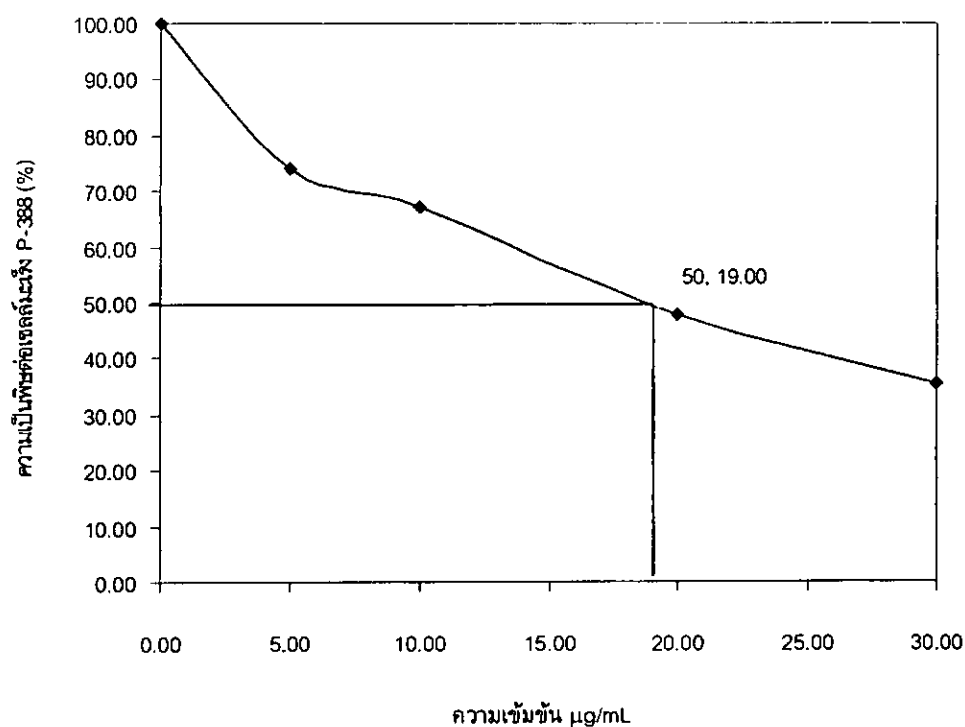
ตาราง 29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มสารที่แยกได้จากสารกลุ่ม M-5 ที่ความเข้มข้น 30  $\mu\text{g/mL}$

กลุ่มสารที่ทดสอบ	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	$5.0 \times 10^4$	$7.44 \times 10^6$	100.00
M-5.1	$5.0 \times 10^4$	$2.64 \times 10^6$	35.53
M-5.2	$5.0 \times 10^4$	$4.76 \times 10^6$	63.98
M-5.3	$5.0 \times 10^4$	$6.38 \times 10^4$	85.75
M-5.4	$5.0 \times 10^4$	$6.50 \times 10^6$	87.36
M-5.5	$5.0 \times 10^4$	$5.34 \times 10^6$	71.77

3.5.3 จากตาราง 29 สารกลุ่ม M-5.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น จึงนำสารกลุ่ม M-5.1 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า  $ED_{50}$  พบว่าสารกลุ่ม M-5.1 มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 19  $\mu\text{g/mL}$  ดังแสดงในตาราง 30 ภาพประกอบ 22

ตาราง 30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม M-5.1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

กลุ่มสารที่ทดสอบ	ความเข้มข้น $\mu\text{g/mL}$	จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่มีชีวิต ต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	$5.0 \times 10^4$	$6.53 \times 10^6$	100.00
M-5.1	5	$5.0 \times 10^4$	$4.85 \times 10^6$	74.27
	10	$5.0 \times 10^4$	$4.39 \times 10^6$	67.23
	20	$5.0 \times 10^4$	$3.13 \times 10^6$	47.93
	30	$5.0 \times 10^4$	$2.32 \times 10^6$	35.53



ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงค่า ED<sub>50</sub> ของสารกลุ่ม M-5.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P-388

ตาราง 31 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED<sub>50</sub> ของสารที่แยกได้จากสารสกัด chloroform

สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>	สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>
สารสกัด Chloroform	85.09	85.00	C-2.7	79.43	>30
C-1	79.09	>30	C-2.8	74.29	>30
C-2	78.79	>30	C-2.2.1	84.31	>30
C-3	77.46	>30	C-2.2.2	71.02	>30
C-4	99.56	>30	C-2.2.3	63.23	>30
C-5	92.49	>30	C-2.2.4	77.84	>30
C-6	114.58	>30	C-2.2.5	88.74	>30
C-2.1	68.47	>30	C-2.3.1	83.49	>30
C-2.2	56.16	>30	C-2.3.2	82.31	>30
C-2.3	79.70	>30	C-2.3.3	0.53	12.50**
C-2.4	76.72	>30	C-2.3.4	85.45	>30
C-2.5	89.31	>30	C-2.3.5	97.38	>30
C-2.6	60.08	>30	C-2.4.1	95.51	>30

ตาราง 31 (ต่อ)

สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>	สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>
C-2.4.2	108.63	>30	C-3.2.3	79.04	>30
C-2.4.3	80.78	>30	C-3.2.4	59.16	>30
C-2.4.4	63.75	>30	C-3.2.5	61.08	>30
C-2.4.5	100.00	>30	C-3.3.2	78.80	>30
C-3.1	81.12	>30	C-3.3.3	42.07	<30**
C-3.2	108.07	>30	C-3.3.4	82.04	>30
C-3.3	52.45	>30	สารประกอบ A*	70.27	>100
C-3.4	71.04	>30	สารประกอบ B	94.52	>100
C-3.2.2	76.17	>30			

หมายเหตุ \* (อนันต์ คงชุม. 2544)

\*\* กลุ่มสารสกัดหยาบที่มีค่า ED  $\leq$  30  $\mu$ g/mL เป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา

ตาราง 32 ค่าย่อยผลการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความเข้มข้น 30  $\mu$ g/mL และค่า ED<sub>50</sub> ของสารที่แยกได้จากสารสกัด methanol

สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>	สารประกอบ/ สารกลุ่ม	การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P-388(%)	ED <sub>50</sub>
สารสกัด methanol	84.80	>100	M-5.1	35.53	19.00**
M-1	100.30	>30	M-5.2	63.98	>30
M-2	103.18	>30	M-5.3	85.75	>30
M-3	80.15	>30	M-5.4	87.36	>30
M-4	81.06	>30	M-5.5	71.77	>30
M-5	102.73	>30	สารประกอบ A*	70.27	>100
M-6	123.48	>30	สารประกอบ B	94.52	>100

หมายเหตุ \* (อนันต์ คงชุม. 2544)

\*\* กลุ่มสารสกัดหยาบที่มีค่า ED  $\leq$  30  $\mu$ g/mL เป็นกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา

#### 4. ข้อมูลทาง spectroscopy ของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

##### สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 400 mg จุดหลอมเหลว 115 - 118 °C

ค่า  $R_f = 0.36$  ( $\text{CHCl}_3$  : EtOAc ; 96 : 4)

FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr) : (ภาพประกอบ 26)

3428 (OH) 2937 (CH) 1465 ( $\text{CH}_2$ ) และ 1382 ( $\text{CH}_3$ )

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) : (ภาพประกอบ 27)

0.68 (s, 3H, H-18) 0.73-2.40 (m, CH,  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ของ steroid)

3.53 (m, 1H, H-3) 5.05 (dd,  $J = 15.0, 8.1$  Hz, H-23) 5.15 (dd,  $J = 15.0, 8.1$  Hz, H-22) 5.35 (br s, 1H, H-6)

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) : (ภาพประกอบ 28)

(ตาราง 33)

##### สารประกอบ B

สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 630 mg จุดหลอมเหลว 266 - 267

°C(decompose) ค่า  $R_f = 0.50$  ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH ; 87.5 : 12.5)

FTIR ( $\text{cm}^{-1}$ ) (KBr) : (ภาพประกอบ 29)

3405 (OH) 2933 (CH) 1465 ( $\text{CH}_2$ ) 1367 ( $\text{CH}_3$ ) และ 1024 (C-O)

$^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) : (ภาพประกอบ 30)

0.60 (s, 3H, H-18) 0.70-2.80 (m, CH,  $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ของ steroid)

3.93 (m, 1H, H-3) 3.93-4.52 5.02 (m, CH และ  $\text{CH}_2$  ของ glucocidic protons)

5.31 (br s, 1H, H-6)

$^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_5$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) :

(ภาพประกอบ 31) (ตาราง 34)

### สารประกอบ C

สารประกอบ C เป็นผลึกสีขาวปนเหลือง น้ำหนัก 3.8 mg ค่า  $R_f = 0.60$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH ; 90 : 10)

FT IR ( $\text{cm}^{-1}$ ) ( $\text{CHCl}_3$ ) : (ภาพประกอบ 32)

3370 (OH) 2918 (CH) 1712 (C=O) 1604 1445 (C=C) และ 1282 (C-O)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm) : (ภาพประกอบ 33)

3.75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ) 6.23 (d, 1H,  $J = 15.92$  Hz, H- $\alpha$ ) 6.84 (d, 1H,  $J = 8.16$  Hz, H-5) 6.97 (d, 1H,  $J = 8.16$  Hz, H-6) 7.05 (s, 1H, H-2) และ 7.56 (d, 1H,  $J = 15.92$  Hz, H- $\beta$ )

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) : (ภาพประกอบ 34)

51.68 ( $\text{OCH}_3$ ) 127.49 (C-1) 114.22 (C-2) 146.37 (C-3) 143.93 (C-4)  
115.26 (C-5) 115.43 (C- $\alpha$ ) 122.39 (C-6) 144.95 (C- $\beta$ ) และ 170.00 (C=O)

### สารกลุ่ม C-2.3.3

สารกลุ่ม C-2.3.3 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีชมพูปนส้ม จากข้อมูล FTIR พบหมู่ hydroxy และ carbonyl แสดงในภาพประกอบ 35

### สารกลุ่ม M-5.1

สารกลุ่ม M-5.1 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีน้ำตาลดำ จากข้อมูล FTIR พบหมู่ hydroxy และ carbonyl แสดงในภาพประกอบ 36

## บทที่ 5

### สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

#### การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากเหง้าพุทธรักษา โดยนำเหง้าพุทธรักษาที่สกัดด้วย hexane แล้วมาสกัดต่อด้วย chloroform และ methanol ตามลำดับจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ผลการทดสอบพบว่าสารสกัด chloroform มีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 85 µg/mL และสารสกัด methanol มีค่า ED<sub>50</sub> มากกว่า 100 µg/mL นำสารสกัด chloroform และ methanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งสารสกัด chloroform แยกได้สารผสม 2 ชนิด และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม ส่วนสารสกัด methanol แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด สารผสม 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับสารผสมในสารสกัด chloroform และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม

ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีได้ข้อมูลดังนี้

#### สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 115 - 118 °C ค่า R<sub>f</sub> = 0.36 (CHCl<sub>3</sub> : EtOAc ; 96 : 4)

FTIR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3428 cm<sup>-1</sup> (OH) 2937 cm<sup>-1</sup> (CH) 1465 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub>) และ 1382 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub>) (ภาพประกอบ 26)

<sup>1</sup>H NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH<sub>3</sub> ตำแหน่งที่ 18 ปรากฏที่ δ 0.68 มีลักษณะเป็น singlet สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH CH<sub>2</sub> และ CH<sub>3</sub> ของ steroid ปรากฏที่ δ 0.73 – 2.40 มีลักษณะสัญญาณเป็น multiplet สัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-3 ปรากฏที่ δ 3.53 มีลักษณะเป็น multiplet สัญญาณเรโซแนนซ์ของ olefinic proton ของ H-22 และ H-23 ปรากฏที่ δ 5.15 และ 5.05 ตามลำดับ มีลักษณะเป็น doublet of doublet มีค่า J เท่ากันคือ 15.0 และ 8.1 Hz และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-6 ปรากฏที่ δ 5.35 มีลักษณะเป็น broad singlet (ภาพประกอบ 27)

<sup>13</sup>C NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 31 พีค เป็นของคาร์บอน 31 คาร์บอนอะตอมในโมเลกุล (ภาพประกอบ 28) โดยให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ

olefinic carbon ของ C-5 และ C-6 ที่  $\delta$  140.74 และ 121.71 ppm ตามลำดับ และให้สัญญาณ  
เรโซแนนซ์ของ C-22 และ C-23 ที่  $\delta$  138.30 และ 129.27 ppm ตามลำดับ ดังตาราง 33

ตาราง 33 แสดงการเปรียบเทียบ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารประกอบ A ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) กับ  
stigmasterol ( $\text{CDCl}_3$ , 62.5 MHz) และ  $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , 62.5 MHz)

ตำแหน่ง	สารประกอบ A $\delta(\text{ppm})$	stigmasterol* $\delta(\text{ppm})$	$\beta$ -sitosterol* $\delta(\text{ppm})$
1	37.24 ( $\text{CH}_2$ )	37.21 ( $\text{CH}_2$ )	37.27 ( $\text{CH}_2$ )
2	31.64 ( $\text{CH}_2$ )	31.64 ( $\text{CH}_2$ )	31.64 ( $\text{CH}_2$ )
3	71.81 (CH)	71.73 (CH)	71.77 (CH)
4	42.27 ( $\text{CH}_2$ )	42.26 ( $\text{CH}_2$ )	42.29 ( $\text{CH}_2$ )
5	140.74 (C)	140.75 (C)	140.76 (C)
6	121.71 (CH)	121.68 (CH)	121.69 (CH)
7	31.89 ( $\text{CH}_2$ )	31.85 ( $\text{CH}_2$ )	31.92 ( $\text{CH}_2$ )
8	31.90 ( $\text{CH}_2$ )	31.85 ( $\text{CH}_2$ )	31.92 ( $\text{CH}_2$ )
9	50.01 (CH)	50.11 (CH)	50.15 (CH)
10	36.49 (C)	36.46 (C)	36.51 (C)
11	21.07 ( $\text{CH}_2$ )	21.07 ( $\text{CH}_2$ )	21.10 ( $\text{CH}_2$ )
12	39.77 ( $\text{CH}_2$ )	39.65 ( $\text{CH}_2$ )	39.80 ( $\text{CH}_2$ )
13	42.27 (C)	42.26 (C)	42.33 (C)
14	56.76 (CH)	56.86 (CH)	56.78 (CH)
15	24.29 (CH)	24.47 ( $\text{CH}_2$ )	24.31 ( $\text{CH}_2$ )
16	28.90 ( $\text{CH}_2$ )	28.93 ( $\text{CH}_2$ )	28.25 ( $\text{CH}_2$ )
17	56.05 (CH)	55.90 (CH)	56.08 (CH)
18	12.23 ( $\text{CH}_3$ )	12.24 ( $\text{CH}_3$ )	11.89 ( $\text{CH}_3$ )
19	19.38 ( $\text{CH}_3$ )	19.39 ( $\text{CH}_3$ )	19.39 ( $\text{CH}_3$ )
20	40.47 (CH)	40.47 (CH)	36.16 (CH)
21	21.07 ( $\text{CH}_3$ )	21.07 ( $\text{CH}_3$ )	18.80 ( $\text{CH}_3$ )
22**	138.30 (CH)	138.31 (CH)	-

ตาราง 33 (ต่อ)

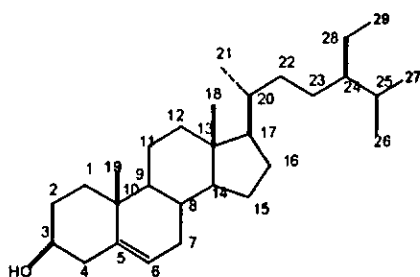
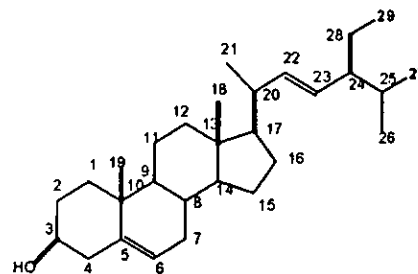
ตำแหน่ง	สารประกอบ A $\delta$ (ppm)	stigmasterol* $\delta$ (ppm)	$\beta$ -sitosterol* $\delta$ (ppm)
22 <sup>***</sup>	33.94 (CH <sub>2</sub> )	-	33.96 (CH <sub>2</sub> )
23 <sup>**</sup>	129.27 (CH)	129.26 (CH)	-
23 <sup>***</sup>	26.08 (CH <sub>2</sub> )	-	26.11 (CH <sub>2</sub> )
24	51.22 (CH)	51.19 (CH)	45.85 (CH)
25	31.89 (CH)	31.85 (CH)	29.18 (CH)
26	19.02 (CH <sub>3</sub> )	19.02 (CH <sub>3</sub> )	19.82 (CH <sub>3</sub> )
27	21.20 (CH <sub>3</sub> )	21.20 (CH <sub>3</sub> )	19.05 (CH <sub>3</sub> )
28	25.39 (CH <sub>2</sub> )	25.40 (CH <sub>2</sub> )	23.08 (CH <sub>2</sub> )
29	11.97 (CH <sub>3</sub> )	11.97 (CH <sub>3</sub> )	11.99 (CH <sub>3</sub> )

หมายเหตุ \* ( Boonyaratavej & Petsom. 1991 : 61-69)

\*\* กรณีที่พันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 เป็น -CH=CH-

\*\*\* กรณีที่พันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 เป็น -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

จากข้อมูลของสารประกอบ A เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol ( Boonyaratavej & Petsom. 1991 : 61-69) สรุปได้ว่าสารประกอบ A เป็นสารผสมของ stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 23 สารทั้ง 2 ชนิดเคยพบในพืชหลายชนิดเช่น *Typha latifolia* (Greca, Monaco & Previtera. 1990 : 1430 - 1435) และ *Euphorbia* (Zheng, Cui & Zhu. 1998 : 754-756) จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารพบว่า stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol มีฤทธิ์ต้านไวรัส (Abid Ali Khan, et al. 1991 : 161-165) นอกจากนี้ยังพบว่า  $\beta$ -sitosterol มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและแก้ไอ (Gupta, et al. 1980 : 157-163)

 $\beta$ -sitosterol

stigmasterol

### ภาพประกอบ 23 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A

#### สารประกอบ B

สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 266 - 267 °C (decompose)  
ค่า  $R_f = 0.50$  ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} ; 87.5 : 12.5$ )

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3405  $\text{cm}^{-1}$  (OH) 2933  $\text{cm}^{-1}$  (CH) 1465  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ) 1367  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ ) และ 1024  $\text{cm}^{-1}$  (C-O) (ภาพประกอบ 29)

$^1\text{H}$  NMR spectrum (pyridine- $d_5$ , 300 MHz) สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่  $\text{CH}_3$  ตำแหน่งที่ 18 ปรากฏที่  $\delta$  0.60 มีลักษณะสัญญาณเป็น singlet สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่  $\text{CH}$   $\text{CH}_2$  และ  $\text{CH}_3$  ของ steroid ปรากฏที่  $\delta$  0.70-2.80 มีลักษณะสัญญาณเป็น multiplet สัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-3 ปรากฏที่  $\delta$  3.93 มีลักษณะสัญญาณเป็น multiplet ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ glucocidic protons ปรากฏที่  $\delta$  3.93-4.52 และ 5.02 สำหรับสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-6 ปรากฏที่  $\delta$  5.31 มีลักษณะสัญญาณเป็น broad singlet (ภาพประกอบ 30)

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum (pyridine- $d_5$ , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 37 พีค ซึ่งประกอบด้วยสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่  $\text{CH}_3$  6 หมู่  $\text{CH}_2$  12 หมู่  $\text{CH}$  16 หมู่ และ quaternary carbon 3 หมู่ โดยให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-22 และ C-23 ที่  $\delta$  138.58 และ 129.27 ppm ตามลำดับดังตาราง 34 (ภาพประกอบ 31)

ตาราง 34 แสดงการเปรียบเทียบ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสเปกตรัมของสารประกอบ B (pyridine- $d_5$ , 75 MHz) และ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (pyridine- $d_5$ , 100 MHz) กับ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (pyridine- $d_5$ , 100 MHz)

ตำแหน่ง	สารประกอบ B $\delta$ (ppm)	$\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ - D-glucopyranoside* $\delta$ (ppm)	stigmasteryl-3-O- $\beta$ - D-glucopyranoside** $\delta$ (ppm)
1'	102.34 (CH)	102.59 (CH)	102.60 (CH)
2'	75.08 (CH)	75.27 (CH)	75.33 (CH)
3'	78.35 (CH)	78.55 (CH)	78.60 (CH)
4'	71.49 (CH)	71.76 (CH)	71.76 (CH)
5'	78.19 (CH)	78.34 (CH)	78.40 (CH)
6'	62.61 (CH <sub>2</sub> )	62.88 (CH <sub>2</sub> )	62.89 (CH <sub>2</sub> )
1	37.27 (CH <sub>2</sub> )	37.49 (CH <sub>2</sub> )	37.53 (CH <sub>2</sub> )
2	30.03 (CH <sub>2</sub> )	30.24 (CH <sub>2</sub> )	30.29 (CH <sub>2</sub> )
3	77.97 (CH)	78.17 (CH)	78.60 (CH)
4	39.12 (CH <sub>2</sub> )	39.34 (CH <sub>2</sub> )	39.40 (CH <sub>2</sub> )
5	140.73 (C)	140.95 (C)	140.96 (C)
6	121.68 (CH)	121.84 (CH)	121.92 (CH)
7	31.94 (CH <sub>2</sub> )	32.16 (CH <sub>2</sub> )	32.20 (CH <sub>2</sub> )
8	31.85 (CH)	32.07 (CH)	32.11 (CH)
9	50.14 (CH)	50.38 (CH)	50.42 (CH)
10	36.71 (C)	36.92 (C)	36.97 (C)
11	21.06 (CH <sub>2</sub> )	21.28 (CH <sub>2</sub> )	21.30 (CH <sub>2</sub> )
12	28.30 (CH <sub>2</sub> )	28.49 (CH <sub>2</sub> )	40.01 (CH <sub>2</sub> )
13	42.27 (C)	42.49 (C)	42.53 (C)
14	56.62 (CH)	56.85 (CH)	56.89 (CH)
15	24.28 (CH <sub>2</sub> )	24.48 (CH <sub>2</sub> )	24.55 (CH <sub>2</sub> )
16	39.74 (CH <sub>2</sub> )	39.97 (CH <sub>2</sub> )	29.33 (CH <sub>2</sub> )
17	56.05 (CH)	56.29 (CH)	56.13 (CH)

ตาราง 34 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สารประกอบ B $\delta$ (ppm)	$\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ - D-glucopyranoside*	stigmasteryl-3-O- $\beta$ - D-glucopyranoside**
		$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
18	11.75 (CH <sub>3</sub> )	11.95 (CH <sub>3</sub> )	12.19 (CH <sub>3</sub> )
19	18.79 (CH <sub>3</sub> )	18.99 (CH <sub>3</sub> )	19.21 (CH <sub>3</sub> )
20	36.16 (CH)	36.36 (CH)	40.78 (CH)
21	19.74 (CH <sub>3</sub> )	19.92 (CH <sub>3</sub> )	21.50 (CH <sub>3</sub> )
22***	23.19 (CH <sub>2</sub> )	23.43 (CH <sub>2</sub> )	-
22****	138.59 (CH)	-	138.83 (CH)
23***	34.00 (CH <sub>2</sub> )	34.24 (CH <sub>2</sub> )	-
23****	129.27 (CH)	-	129.52 (CH)
24	45.84 (CH)	46.09 (CH)	51.46 (CH)
25	29.28 (CH)	29.54 (CH)	32.11 (CH)
26	19.00 (CH <sub>3</sub> )	19.22 (CH <sub>3</sub> )	21.50 (CH <sub>3</sub> )
27	19.19 (CH <sub>3</sub> )	19.38 (CH <sub>3</sub> )	20.00 (CH <sub>3</sub> )
28	26.21 (CH <sub>2</sub> )	26.50 (CH <sub>2</sub> )	25.71 (CH <sub>2</sub> )
29	11.93 (CH <sub>3</sub> )	12.14 (CH <sub>3</sub> )	12.53 (CH <sub>3</sub> )

หมายเหตุ \* (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1994 : 31-39.)

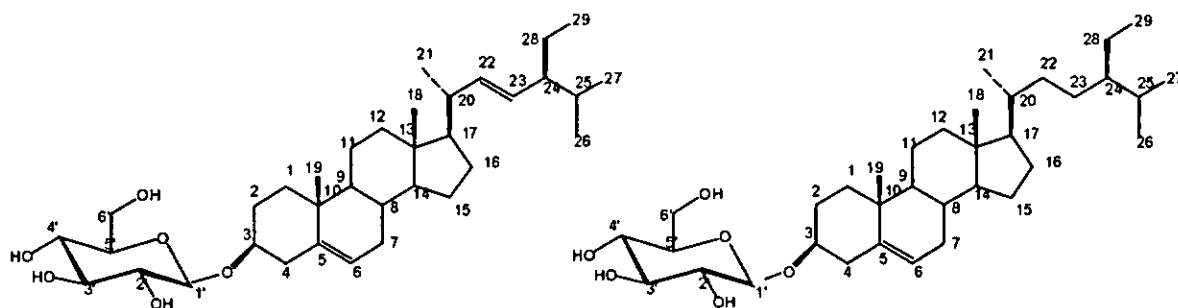
\*\* (Jarikasem. 2000)

\*\*\* กรณีที่พันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 เป็น -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

\*\*\*\* กรณีที่พันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 เป็น -CH=CH-

จากข้อมูลของสารประกอบ B เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1996 : 31-39.) กับ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Jarikasem. 2000) สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ สารผสมของ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 24 สารทั้ง 2 ชนิดเคยพบในพืชหลายชนิด เช่น *Murdannia Loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1996 : 31-39.) *Bridelia Tomentosa* BL. (Boonyaratavej & Petsom. 1991 : 61-69) จากการรายงานของ

โอดีกาและคณะ (Ortega, et al. 1998 : 778) พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

$\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

### ภาพประกอบ 24 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B

#### สารประกอบ C

สารประกอบ C เป็นผลึกสีขาวปนเหลือง ค่า  $R_f = 0.60$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH ; 90 : 10)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $3370\text{ cm}^{-1}$  (OH ของหมู่ carboxyl)  $2918\text{ cm}^{-1}$  (CH)  $1712\text{ cm}^{-1}$  (C=O)  $1604$  และ  $1445$  (C=C ของ aromatic) และ  $1282\text{ cm}^{-1}$  (C-O) (ภาพประกอบ 32)

$^1\text{H}$  NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่  $\text{OCH}_3$  ที่  $\delta$  3.75 มีลักษณะเป็น singlet สัญญาณเรโซแนนซ์ของ H- $\alpha$  ปรากฏที่  $\delta$  6.23 มีลักษณะเป็น double มีค่า  $J = 15.92$  Hz ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H- $\beta$  ปรากฏที่  $\delta$  7.56 มีลักษณะเป็น doublet มีค่า  $J = 15.92$  Hz แสดงว่าเป็น trans olefinic proton สำหรับสัญญาณเรโซแนนซ์ H-5 และ H-6 ปรากฏที่  $\delta$  6.84 และ 6.97 ตามลำดับ มีลักษณะเป็น doublet มีค่า  $J$  เท่ากันคือ 8.16 Hz เนื่องจากเป็น ortho coupling และสัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-2 ปรากฏที่  $\delta$  7.05 เป็น singlet (ภาพประกอบ 33)

$^{13}\text{C}$  NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 10 พีค เป็นของคาร์บอน 10 คาร์บอนโนโมเลกุล จาก DEPT-90 และ DEPT-135 spectra ให้สัญญาณของหมู่  $\text{CH}_3$  1 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  51.68 ( $\text{OCH}_3$ ) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH 5 หมู่ ปรากฏที่  $\delta$  114.22 (C-2) 115.26 (C-5) 122.39 (C-6) 115.43 (C- $\alpha$ ) และ 144.95 (C- $\beta$ ) สำหรับสัญญาณ

ของ quaternary carbon ปรากฏที่  $\delta$  127.49(C-1) 143.93 (C-4) และ 146.37(C-3) สัญญาณของหมู่ COOH ปรากฏที่ 170.00 (C=O) ดังตาราง 37 (ภาพประกอบ 34)

ตาราง 35 แสดงการเปรียบเทียบ  $^1\text{H}$  NMR ของสารประกอบ C ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) และ trans-ferulic acid ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

ตำแหน่ง	สารประกอบ C	trans-ferulic acid*
	$\delta_{\text{H}}$ , mult, J (Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , mult, J (Hz)
2	7.05 (1H, s)	7.26 (1H, s)
5	6.84 (1H, d, 8.16)	7.17 (1H, d, 8.40)
6	6.97 (1H, d, 8.16)	7.13 (1H, d, 8.40)
$\alpha$	6.23 (1H, d, 15.92)	6.45 (1H, d, 15.90)
$\beta$	7.56 (1H, d, 15.92)	7.62 (1H, d, 15.90)
$\text{OCH}_3$	3.75 (3H, s)	3.90 (3H, s)

หมายเหตุ \* (Calis, Lahloub & Sticher. 1984 : 160-165)

ตาราง 36 แสดงการเปรียบเทียบ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสารประกอบ C ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) และ trans-ferulic acid ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)

ตำแหน่ง	สารประกอบ C	trans-ferulic acid*
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	127.49 (C)	130.53 (C)
2	114.22 (CH)	112.55 (CH)
3	146.37 (C)	150.97 (C)
4	143.93 (C)	150.08(C)
5	115.26 (CH)	117.41(CH)
6	122.39 (CH)	123.74(CH)
$\alpha$	115.43 (CH)	117.60 (CH)
$\beta$	144.95 (CH)	146.20(CH)
$\text{OCH}_3$	51.68 ( $\text{CH}_3$ )	57.00 ( $\text{CH}_3$ )
COOH	170.00 (COOH)	168.61 (COOH)

หมายเหตุ \* (Calis, Lahloub & Sticher. 1984 : 160-165)

ตาราง 37 แสดงข้อมูล  $^{13}\text{C}$  และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta(\text{ppm})$	DEPT-90 $\delta(\text{ppm})$	DEPT-135 $\delta(\text{ppm})$
1	127.49 (C)	-	-
2	114.22 (CH)	114.22 (CH)	114.22 (CH)
3	146.37 (C)	-	-
4	143.93 (C)	-	-
5	115.26 (CH)	115.26(CH)	115.26 (CH)
6	122.39 (CH)	122.39 (CH)	122.39 (CH)
$\alpha$	115.43 (CH)	115.43 (CH)	115.43 (CH)
$\beta$	144.95 (CH)	144.95 (CH)	144.95 (CH)
$\text{OCH}_3$	51.68 ( $\text{CH}_3$ )	-	51.68 ( $\text{CH}_3$ )
$\text{C}=\text{O}$	170.00 ( $\text{COOH}$ )	-	-

ตาราง 38 แสดงข้อมูล  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  cosy ของสารประกอบ C

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	ความสัมพันธ์กับ $\delta_{\text{H}}$ (ppm)
6.23 (H- $\alpha$ )	7.56 (H- $\beta$ )
6.84 (H-5)	6.97 (H-6)

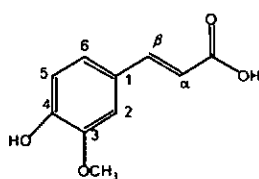
ตาราง 39 แสดงข้อมูล HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ C

$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	ตำแหน่งของ $^{13}\text{C}$ และ $^1\text{H}$
51.68 ( $\text{OCH}_3$ )	3.75 ( $\text{OCH}_3$ )	O- $\text{CH}_3$
114.22 (C-2)	7.05 (H-2)	CH-2
115.26 (C-5)	6.84 (H-5)	CH-5
115.43 (C- $\alpha$ )	6.23(H- $\alpha$ )	CH- $\alpha$
122.39 (C-6)	6.97 (H-6)	CH-6
144.95 (C- $\beta$ )	7.56 (H- $\beta$ )	CH- $\beta$

ตาราง 40 แสดงข้อมูล HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ C

$\delta_c$ (ppm)	ความสัมพันธ์กับ $\delta_H$ (ppm)
127.49 (C-1)	6.23 (H- $\alpha$ ) 6.84 (H-5) 7.05 (H-2) 7.56 (H- $\beta$ )
114.22 (C-2)	6.97 (H-6) 7.56 (H- $\beta$ )
146.37 (C-3)	6.84 (H-5) 3.75 (OCH <sub>3</sub> )
143.93 (C-4)	6.84 (H-5) 6.97 (H-6) 7.05 (H-2)
115.26 (C-5)	6.97 (H-6) 7.56 (H- $\beta$ )
122.39 (C-6)	7.05 (H-2) 7.56 (H- $\beta$ ) 6.84 (H-5)
115.43 (C- $\alpha$ )	6.97 (H-6) 7.56 (H- $\beta$ )
144.95 (C- $\beta$ )	6.23 (H- $\alpha$ ) 6.97 (H-6) 7.05 (H-2)
170.00 (C=O)	6.23 (H- $\alpha$ ) 7.56 (H- $\beta$ )

จากข้อมูลของสารประกอบ C เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ trans-ferulic acid (Calis, Lahloub & Sticher. 1984 : 160-165) สรุปได้ว่าสารประกอบ C คือ trans-ferulic acid สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 25 ซึ่งสารดังกล่าวเคยพบในพืชชนิดอื่นเช่น *Cimicifuga heracleifolia* และจากผลการวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของอิราบายาชิ และคณะ (Hirabayashi, et al. 1994 : 221-226) พบว่า trans-ferulic acid มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดใหญ่ในหนูทดลองได้ ส่วนการศึกษาฤทธิ์จากต้น *Carpobrotus edulis* L. พบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิด *B. subtilis* *S. epidermidis* *S. aureus* *S. pneumoniae* และ *Mcatarrhalis* (Van der Watt & Pretorius. 2001 : 87-91) นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน (antioxidation) พบว่า สารประเภท trans-hydroxycinnamic acids ซึ่งประกอบด้วย trans-ferulic acid caffeic acid p-coumaric acid และ sinapic acid มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ดี (Gorinstein, et al. 2003 : 337-343)



trans-ferulic acid

ภาพประกอบ 25 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ C

### สารกลุ่ม C-2.3.3 และสารกลุ่ม M-5.1

#### สารกลุ่ม C-2.3.3

สารกลุ่ม C-2.3.3 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีชมพูปนส้ม น้ำหนัก 662 mg

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $3424\text{ cm}^{-1}$ (OH)  $2926\text{ cm}^{-1}$ (CH)  $1718\text{ cm}^{-1}$ (C=O)  $1465\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>2</sub>) และ  $1378\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>3</sub>) (ภาพประกอบ 35)

#### สารกลุ่ม M-5.1

สารกลุ่ม M-5.1 มีลักษณะเป็นสารเหนียวสีน้ำตาลดำ น้ำหนัก 120 mg

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $3385\text{ cm}^{-1}$ (OH)  $2926\text{ cm}^{-1}$ (CH)  $1706\text{ cm}^{-1}$ (C=O)  $1603\text{ cm}^{-1}$ (C=C)  $1447\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>2</sub>) และ  $1376\text{ cm}^{-1}$ (CH<sub>3</sub>) (ภาพประกอบ 36)

### กลุ่มสารที่มี long chain hydrocarbon

#### สารกลุ่ม C-2.4.2.4

สารกลุ่ม C-2.4.2.4 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองหนัก 38.90 mg

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $2918\text{ cm}^{-1}$  (CH)  $2849\text{ cm}^{-1}$  (C=O)  $1717\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>) และ  $1473\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>) และ  $1378\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub>)

#### สารกลุ่ม C-3.2.2

สารกลุ่ม C-3.2.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเหลืองหนัก 250.00 mg

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $2849\text{ cm}^{-1}$  (CH)  $2916\text{ cm}^{-1}$  (C=O) และ  $1461\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>)

#### สารกลุ่ม C-3.3.2

สารกลุ่ม C-3.3.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวหนัก 586.00 mg

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่  $2850\text{ cm}^{-1}$  (CH)  $1918\text{ cm}^{-1}$  (C=O) และ  $1465\text{ cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub>)

<sup>1</sup>H NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) สารกลุ่ม C-2.4.2.4 C-3.2.2 และสารกลุ่ม C-3.3.2 ให้สัญญาณเรโซแนนซ์อยู่ในช่วง  $\delta$  1.0-2.5 ซึ่งเป็นลักษณะสัญญาณของกลุ่มสารที่มี long chain hydrocarbon เป็นส่วนประกอบ

## การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ในหลอดทดลอง ของสารที่แยกได้จาก เหง้าพุทธรักษาที่สกัดด้วย hexane แล้ว โดยนำเซลล์มะเร็ง P-388 ซึ่งเป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) ด้วย trypan blue เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue นำผลที่ได้จากการนับเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มที่ใส่สารตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อคำนวณหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด chloroform และ methanol พบว่าสารสกัด chloroform มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 85  $\mu\text{g/mL}$  ส่วนสารสกัด methanol มีค่า  $ED_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$  (ตาราง 17 ภาพประกอบ 20) ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งว่า สารสกัดหยาบมีค่า  $ED_{50} \leq 30$   $\mu\text{g/mL}$  ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ควรมีค่า  $ED_{50} \leq 4$   $\mu\text{g/mL}$  เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์มาตรฐานจะพบว่า สารสกัด chloroform และ methanol มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์

จากการนำสารสกัด chloroform และ methanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์พบว่า

1. สารสกัด chloroform ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่มคือ C-2.3.3 น้ำหนัก 662 mg และสารผสม 2 ชนิด คือ สารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol น้ำหนัก 400 mg และสารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside น้ำหนัก 650 mg

เมื่อนำสารกลุ่ม C-2.3.3 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ได้ค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 12.50  $\mu\text{g/mL}$  ส่วนสารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol มีค่า  $ED_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$  (อนันต์ คงชุม. 2544) สารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside มีค่า  $ED_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$  ผลจากการทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่า สารกลุ่ม C-2.3.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา แต่เนื่องจากสารกลุ่มดังกล่าว มีลักษณะเป็นสารเหนียวและมีกลุ่มสารหลายชนิดปนกันอยู่ จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ ส่วนสารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และ สารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา อาจเป็นผลเนื่องมาจากสารดังกล่าว มีคุณสมบัติเฉพาะในการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งบางชนิดเท่านั้น จากผลการวิจัยของฮาร์ดเวลล์ (Hartwell. 1970 : 117-209) พบว่า stigmasterol ไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด

P-388 (lymphocytic leukemia) CA (carcinoma 755) L1210 (L1210 lymphoid leukemia) SA (sarcoma 180) และ WA (walker 256 carcinoma) ส่วนสาร  $\beta$ -sitosterol พบว่าไม่สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด B16 (B16 melanocarcinoma) LE (Lewis lung carcinoma) SA (sarcoma 180) และ KB (Human nasopharyngeal carcinoma) แต่สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด CA (carcinoma 755) L1210 (L1210 lymphoid leukemia) และ WA (walker 256 carcinoma) นอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการใช้สารเพียงชนิดเดียว อาจจะไม่มีการออกฤทธิ์ในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดนี้ จากรายงานการวิจัยของนิโกรและคณะ (Nigro, et al. 1982 : 103-107) พบว่าเมื่อใช้สาร  $\beta$ -sitosterol ร่วมกับ 13-cis-retinoic acid (13-cis-RA) และ selenium จะมีผลในการต้านมะเร็งลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อมะเร็ง azoxymethane (AOM) ในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สารเพียงชนิดเดียว จะไม่ออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง แต่ถ้าใช้ร่วมกับสารชนิดอื่นที่เหมาะสมอาจจะให้ผลเสริมกันในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งก็ได้ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต้านอื่นๆ พบว่า stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol มีฤทธิ์ต้านไวรัส (Abid Ali Khan, et al. 1991 : 161-165) และนอกจากนี้ยังพบว่า  $\beta$ -sitosterol มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและแก้ไอ (Gupta, et al. 1980 : 157-163) ส่วน stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูทดลอง (Ortega, et al. 1998 : 778) ดังนั้นผลจากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด chloroform จากเหง้าพุทธรักษาอาจจะไม่มีการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดนี้โดยตรง แต่มีฤทธิ์ในการต้านอักเสบและช่วยลดไข้ซึ่งจะช่วยส่งผลลดอาการเจ็บปวด และลดไข้ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ทำให้ผู้ป่วยไม่มีการแทรกซ้อนจากอาการข้างเคียงอื่นๆ ซึ่งจะช่วยส่งผลให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีขึ้น

2. สารสกัด methanol ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม คือ M-5.1 น้ำหนัก 120 mg และสารผสม 2 ชนิด คือ สารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol น้ำหนัก 10 mg และสารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside น้ำหนัก 18 mg และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ trans-ferulic acid น้ำหนัก 3.8 mg

เมื่อนำสารกลุ่ม M-5.1 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 19.00  $\mu$ g/mL ตามลำดับ (ตาราง 30 ภาพประกอบ 22) แสดงว่าสารกลุ่ม M-5.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกาที่กำหนด แต่เมื่อนำสารกลุ่มดังกล่าวไปแยกต่อพบว่า กลุ่มสารทั้งหมดที่แยกได้รวมทั้ง trans-ferulic acid มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำสารดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้

จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ trans-ferulic acid พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน (antioxidation) ได้ดี (Gorinstein, et al. 2003 : 337-343) และการศึกษาฤทธิ์ของ

1-( $\omega$ -feruloyl)glycerol ซึ่งเป็น long-chain ester ของ trans-ferulic acid พบว่ามีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดีเช่นกัน (Tringali, Spatafora & Longo. 2000 : 118-125) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของ 8,8-diferulic acid ซึ่งเป็น dimer ของ ferulic acid พบว่ามีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดีกว่า trans-ferulic acid (Garcia -Conesa, et al. 1999 : 379-384) เนื่องจากในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะมีส่วนช่วยลดอนุมูลอิสระ (free radical) ในร่างกายที่เกิดจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นออกซิแดนท์ (oxidant) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญตัวหนึ่งที่กระตุ้นหรือส่งเสริมให้เกิดมะเร็งตามมา จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า trans-ferulic acid และสารที่เป็นอนุพันธ์ของ trans-ferulic acid มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็ง (anticarcinogenic) นอกจากนี้สารดังกล่าวยังมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดใหญ่ในหนูทดลองได้ (Hirabayashi, et al. 1995 : 221-226) และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียชนิด *B. subtilis* *S. epidermidis* *S. aureus* *S. pneumoniae* และ *Mcatarrhalis* (Van der Watt & Pretorius. 2001 : 87-91) แสดงให้เห็นว่าสารดังกล่าวนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็งแล้ว ยังมีฤทธิ์ในการต้านอักเสบและยับยั้งเชื้อไข้หวัดได้ซึ่งจะช่วยส่งผลลดอาการเจ็บปวด และลดไข้ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง ทำให้ผู้ป่วยไม่มีการแทรกซ้อนจากอาการข้างเคียงอื่นๆ อันจะช่วยส่งผลให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีขึ้น

จากการนำสารสกัด hexane chloroform และ methanol จากเหง้าพุทธรักษา มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า สารสกัด hexane มีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 64.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และมีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง 2 กลุ่ม โดยมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 19.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ 21.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และพบสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ stigmasterol และ 6-hydroxystigmasta-4,22-diene-3-one โดยมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 55.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และ 37.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ตามลำดับ (วินัย สุขราช. 2544) สารสกัด chloroform มีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 85.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และมีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง โดยมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 12.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และพบสารผสม 2 ชนิด คือ สารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และสารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside โดยมีค่า ED<sub>50</sub> > 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  สำหรับสารสกัด methanol มีค่า ED<sub>50</sub> > 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และมีกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ซึ่งมีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 19.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  และพบสารผสม 2 ชนิด คือ สารผสมระหว่าง stigmasterol กับ  $\beta$ -sitosterol และสารผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside กับ  $\beta$ -sitosteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ trans-ferulic acid แสดงให้เห็นว่า การนำสารสกัดหยาบมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นจะช่วยกำจัดสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งออกไป ทำให้ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น

การนำเหง้าพุทธรักษาซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้ในตำรับยารักษามะเร็งตำรับหนึ่ง มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่ากลุ่มสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane chloroform และ methanol มีกลุ่มสารบางกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา และ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัด methanol ยังมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันจึงช่วยลดปริมาณอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเกิดมะเร็ง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการรักษามะเร็ง โดยมีเหง้าพุทธรักษาเป็นส่วนประกอบในตำรับยาดังกล่าว และสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับยารักษามะเร็งได้

### ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 และ M-5.1 พบว่ามีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง มีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 12.5 และ 19.0  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ควรนำไปศึกษาต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง หรือนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น
2. สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งร่วมกับสารชนิดอื่นๆที่เหมาะสมซึ่งอาจจะให้ผลเสริมกันในการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งก็ได้
3. สารบริสุทธิ์ และ/หรือสารที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น เช่น การต้านการอักเสบ การต้านจุลชีพ และการต้านไวรัส เป็นต้น
4. ควรมีการนำเครื่องมือที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพมาใช้ในการแยกสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P-388 และสารกลุ่มอื่นที่แยกยาก เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่อาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเป็นสารต้นตอสำคัญในการสังเคราะห์ยารักษามะเร็ง

บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

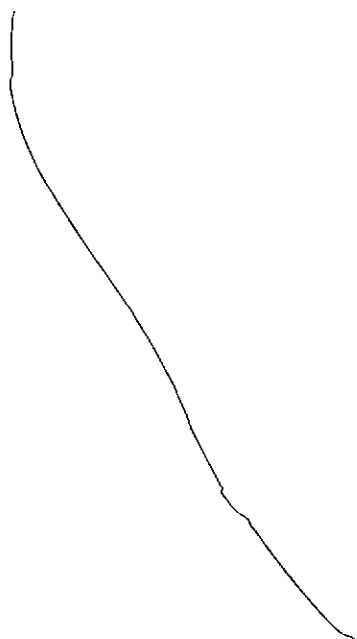
- จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้น  
งู(*Hedyotis corymbosa* Lamk.). ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ :  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ถ่ายเอกสาร.
- ลีนา ผู้พัฒนาพงษ์. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม  
พ.ศ.2544. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.
- วิทย์ เทียงบุรณธรรม. (2542). พจนานุกรมสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : อักษรพิทยา.
- วินัย สุวราช. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากเหง้า  
พุทธรักษา(*Canna indica* Linn.). ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ :  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ถ่ายเอกสาร.
- อนันต์ คงชุม. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จากลำ  
ต้นหลอดเดือน (*Mallotus oblongifolius* Muell.Arg.). ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี).  
กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ถ่ายเอกสาร.
- Abid Ali Khan, M.M., et al. (1991, January). " Occurrence of Some Antiviral Sterols in  
*Artemisia annua*," *Plant Science*. 75 : 161-165.
- Adewunmi, C.O. & Sofowora, E.A. (1980). "Preliminary Screening of Some Plant  
Extracts for Molluscicidal Activity," *Planta Med*. 39 : 57-65.
- Avirutnant, W. & Pongpan, A. (1983). *The Antimicrobial Activity of Some Thai Flowers  
and Plants*. Master thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate school  
Mahidol University. Photocopied.
- Boonyaratavej, S. & Petsom, A. (1991, March). " Chemical Constituents of the Roots of  
*Bridelia Tomentosa* BL.," *J. Sci. Soc. Thai*. 17 : 61-69.
- Brule', G., et al. (1973). *Drug Therapy of Cancer*. Switzerland : Belgium.
- Calis, I., Lahloub, M.F. & Sticher, O. (1984) " Loganin, Loganic Acid and  
Pericyclenoside, a New Biosidic Ester Iridoid Glucoside from *Lonicera  
periclymenum* L. (Caprifoliaceae)," *Helv. Chim. Acta*. 67 : 160-165.
- Cheng, H.-I., et al. (2001, May). "New Cytotoxic Butanolides from *Litsea acutivena*,"  
*J. Nat. Prod*. 64 : 1502-1505.

- Garcia-Conea a, MT., et al. (1999). "Antioxidant Properties of 4,4<sup>o</sup>-Dihydroxy-3,3<sup>o</sup>-Dimethoxy-b,b<sup>o</sup>-Bicinnamic Acid (8-8-Diferulic Acid, non Cyclic Form)," *J Sci Food Agric.* 79 : 379-384.
- Gorinstein, S., et al. (2003, November). "Comparision of the Contents of the Main Antioxidant Compounds and the Antioxidant Activity of White Grapefruit and His New Hybrid," *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologies.* 37(3) : 337-343.
- Grece, M., Monaco, P. & Previtera, L. (1990, November-December). "Stigmasterols from *Typha Latifolia*," *J. Nat. Prod.* 53(6) : 1430-1435.
- Gupta, MB., et al. (1980). "Antiinflammatory and Antipyretic Activities of  $\beta$ -sitosterol," *Planta Med.* 39 : 157-163.
- Hartwell, JL. (1970). "Types of anticancer agent from plants," *Cancer Treatment Report.* 60(8) : 117-209.
- Hirabayashi, T., et al. (1995, November). "Inhibitory Effect of Ferulic Acid and Isoferulic Acid on Murine Interleukin-8 Production in Response to Influenza Virus Infections *In Vitro* and *In Vivo*," *Planta Med.* 61 : 221-226.
- Jarikasem, S. (2000). *A Phytochemical Study of Anti-Herpes Simplex Components from Gynura Procumbens Merr.* Dissertation, Ph.D. (Pharmaceatical Chemistry and Phytochemistry). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied
- Jiratchariyakul, W., Okabe, H. & Frahm, AW. (1996, June) "A Steroridal Glucoside from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy," *Thai J. Phytopharm.* 3(1) : 31-39.
- \_\_\_\_\_, W., et al. (1998, June ). "Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy," *Thai J. Phytopharm.* 5(1) : 10-20.
- Jork, H., Funk, W. & Wimme, H. (1990). *Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods Vol. 1a.* Germany : VCH-Verlag, Weinheim.
- Kim, S.Y., Gao, J.J. & Kang, H.K. (2000, December). "Two Flavonoids from the Leaves of *Morus Alba* Induce Differentiation of the Human Promyelocytic Leukemia (HL-60) Cell Line," *Biol. Pharm.Bull.* 23(4) : 451-455.

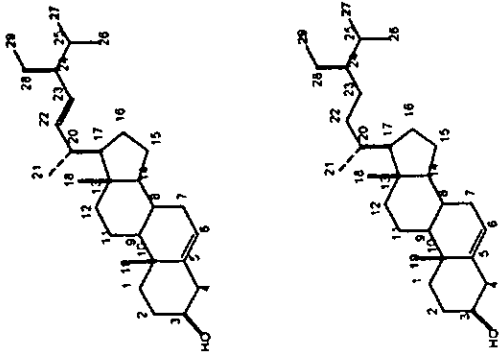
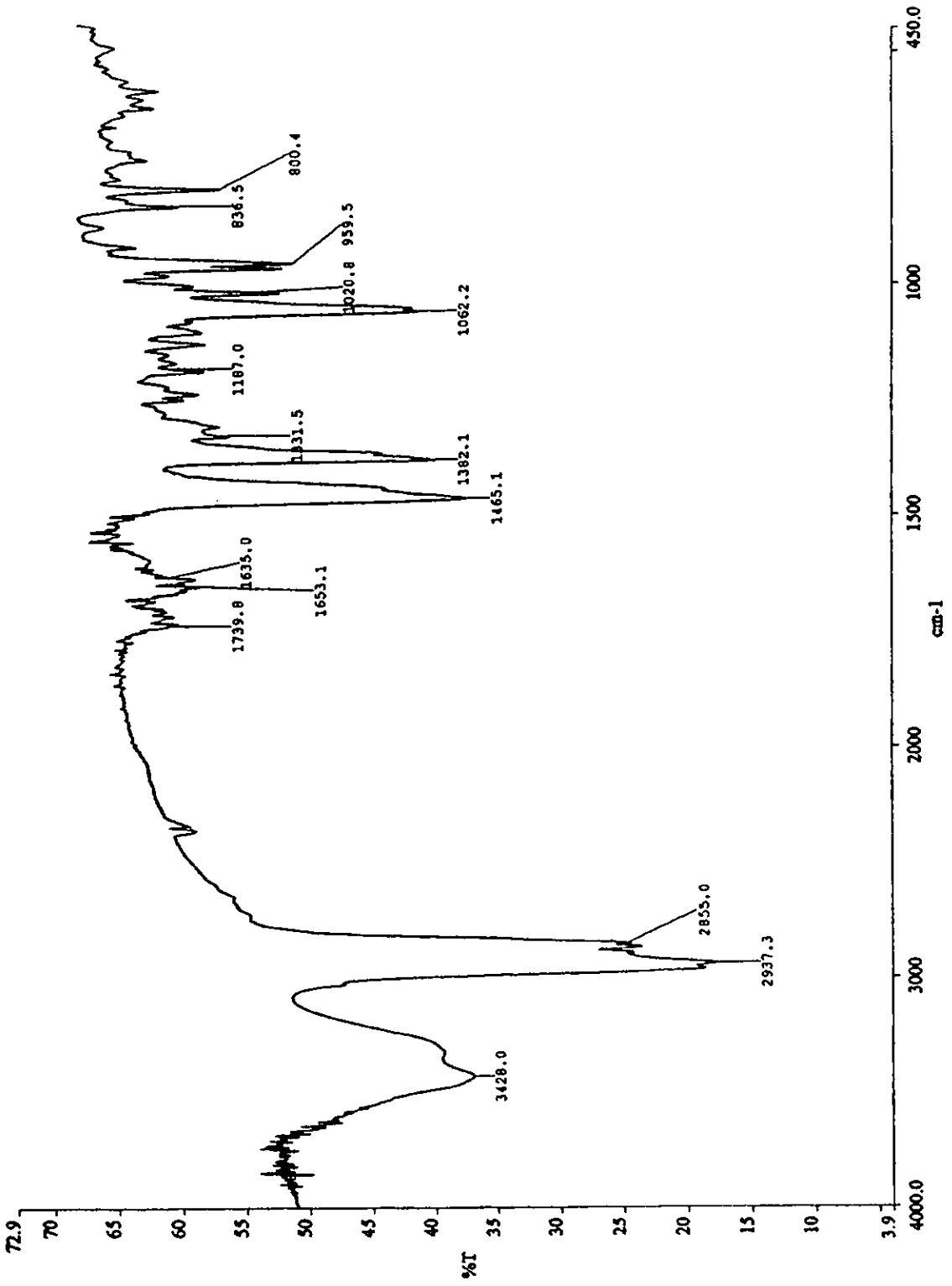
- Lee, C.W., Hong, D.H. & Han, S. B. (1999, November). "Inhibition of Human Tumor Growth by 2'-Hydroxy-and 2'-Benzoyloxy-cinnamaldehydes," *Planta Med.* 65 : 263-266.
- Madureira, M.C., et al. (2002, December) " Antimalarial Activity of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine in S. Tome' and Principe Islands," *J. Ethnopharmacol.* 81 : 23-29.
- Na Bangchang, K. (1987). *Study on Anticancer Activity of a Well-Know Thai Remedy.* Master thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.
- Nagase, H., et al. (1998, October). "Inhibitory Effect of Delphinidin from *Solanum melongena* on Human Fibrosarcoma HT-1080 Invasiveness *in vitro*," *Planta Med.* 64 : 216-219.
- Nigro, ND., et al. (1982). " Combined Inhibitors of Carcinogenesis : Effect on Azoxymethane Induced Intestinal Cancer in Rats," *J Nat Cancer Inst.* 9 : 103-107.
- Ortega, C.A., et al. (1998, August). " Chemical Components and Anti-Inflammatory Activity from *Bidens sibalternans*," *Planta Med.* 64 : 778.
- Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of a Well-Know Thai Folkloric Remedy.* Master thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.
- Prakash, J. & Gupta, S.K. (2000, February). "Chemopreventive Activity of *Ocimum sanctum* Seed Oil," *J. Ethnopharmacol.* 72 : 29-34.
- Ryu, J.-H., et al. (2001, September). "Inhibitory Activity of Chinese Medicinal Plants on Nitric Oxide synthesis in Lipopolysaccharide Activated Macrophages," *J. Appl. Pharmacol.* 9 : 183-187.
- Singh, K.K. & Maheshwari, J.K. (1994, June). "Traditional Phytotherapy of Some Medicinal Plants Used by the Tharus of the Nainital District, Uttar Pradesh, India," *Int. J. Pharmacogn.* 32(1) : 51-58.
- Swamy, S.M.K. & Tan, B.K.H. (2001, June). " Extraction, Isolate and Characterisation of Antitumor Principle,  $\alpha$ -Hederin, from the Seeds of *Nigella sativa*," *Planta. Med.* 67 : 29-32.

- Thirumurugan, R.S., Kavimani, S. & Srivastava, R.S. (2000, July). "Antitumour Activity of Rhinacanthone Against Dalton's ascitic Lymphoma," *Biol. Pharm.Bull.* 23(12) : 1438-1440.
- Thisoda, P. (1995). *Immunostimulatory Effect of a Thai Folkloric Remedy in Breast Cancer Patients*. Master thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.
- Tringali, C., Spatafora, C. & Longo, O.D. (2000, September). " Bioactive Constituents of the Bark of *Parkia biglobosa*," *Fitoterapia.* 71 : 118-123.
- Tripathi, S.M. & Singh, D.K. (2000, November). "Molluscicidal Activity of *Punica granatum* Bark and *Canna indica* Root," *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33(11) : 1351-1355.
- Tsai, I.-L., et al. (2001, February). "Cytotoxic Butanolides from the Stem Bark of Formosan *Lindera communis*," *Planta. Med.* 67 : 865-867.
- Van Der Watt, E. & Pretorius, J.C. (2001, January). " Purification and Identification of Active Antibacterial Components in *Carpobrotus edulis* L.," *J. Ethnopharmacol.* 76 : 87-91.
- Wang, C.-C., Chen, L.-G. & Yang, L.-L. (2002, September). " Cytotoxic Activity of Sesquiterpenoids from *Atractylodes ovata* on Leukemia Cells Lines," *Planta. Med.* 68 : 204-208.
- Wang, Z.-Y., et al. (1992, December). "Inhibitory Effect of Green Tea in the Drinking Water on Tumorigenesis by Ultraviolet Light and 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in the Skin of SKH-1 Mice," *Cancer Res.* 52 : 1162-1170.
- Wiwatwittaya , S. (1992). *The Study of Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of a Well-Know Thai Folkloric Remedy*. Master thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.
- Woradulayapinij, W. (2002, May). *In Vitro Assay for Anti-HIV Type 1 Reverse Transcriptase of Canna indica L. Rhizomes*. Master thesis, M.Sc. (Biopharmaceutical Sciences). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.

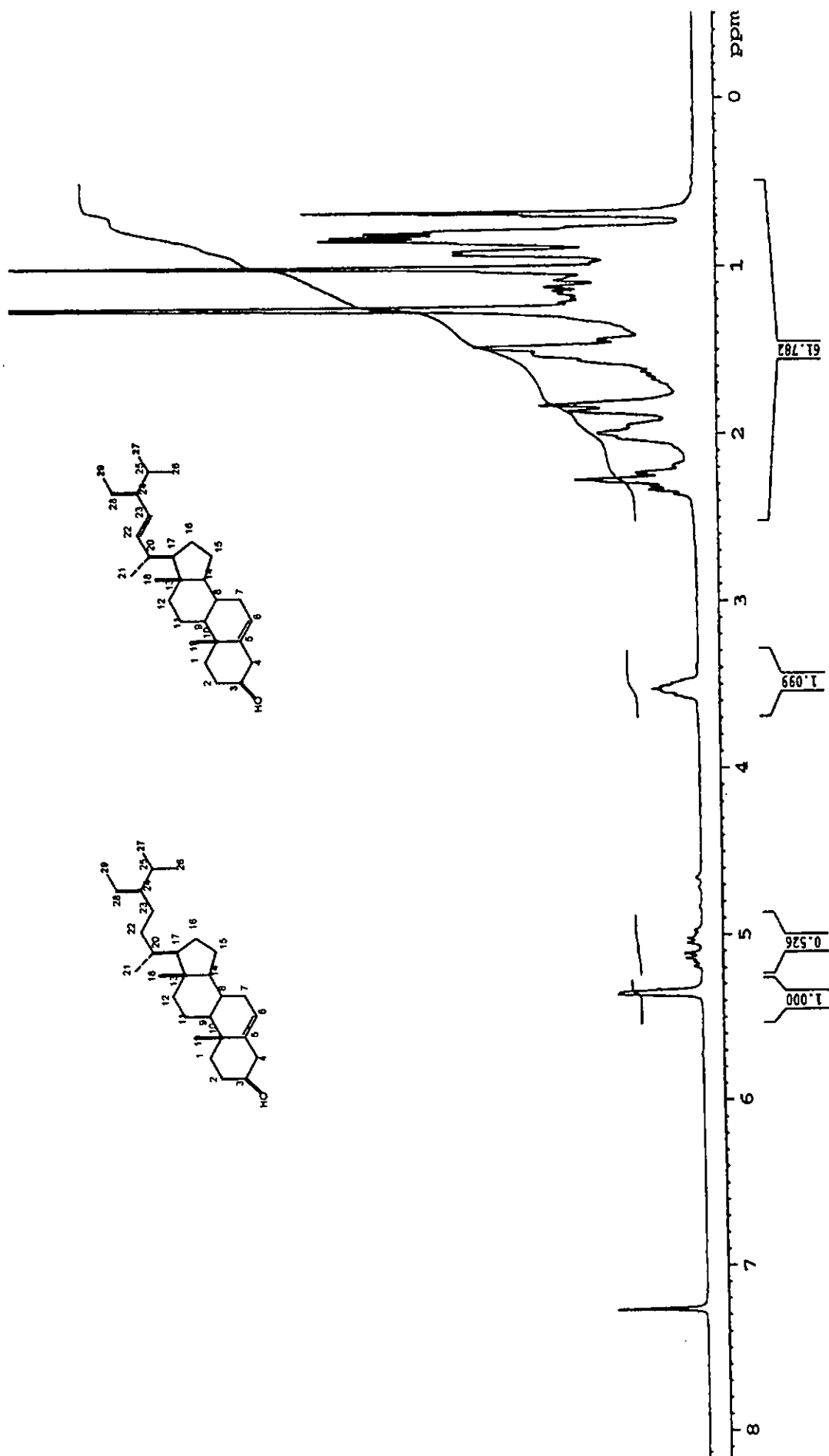
Zheng, W.F., Cui, Z. & Zhu, Q. (1998, July). " Cytotoxicity and Antiviral Activity of the Compounds from *Euphorbia kansui*," *Planta. Med.* 64 : 754-756.



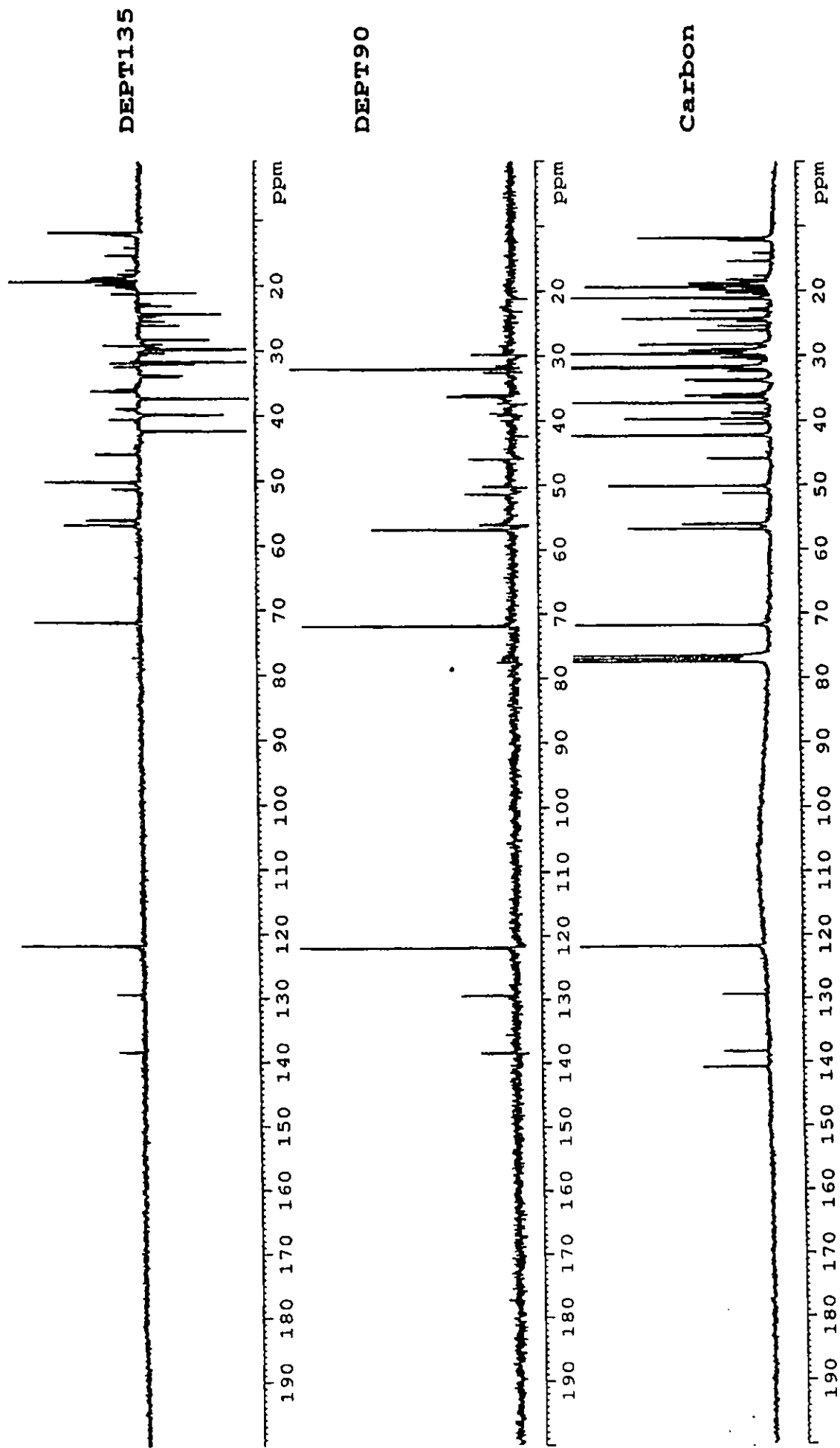
ภาคผนวก



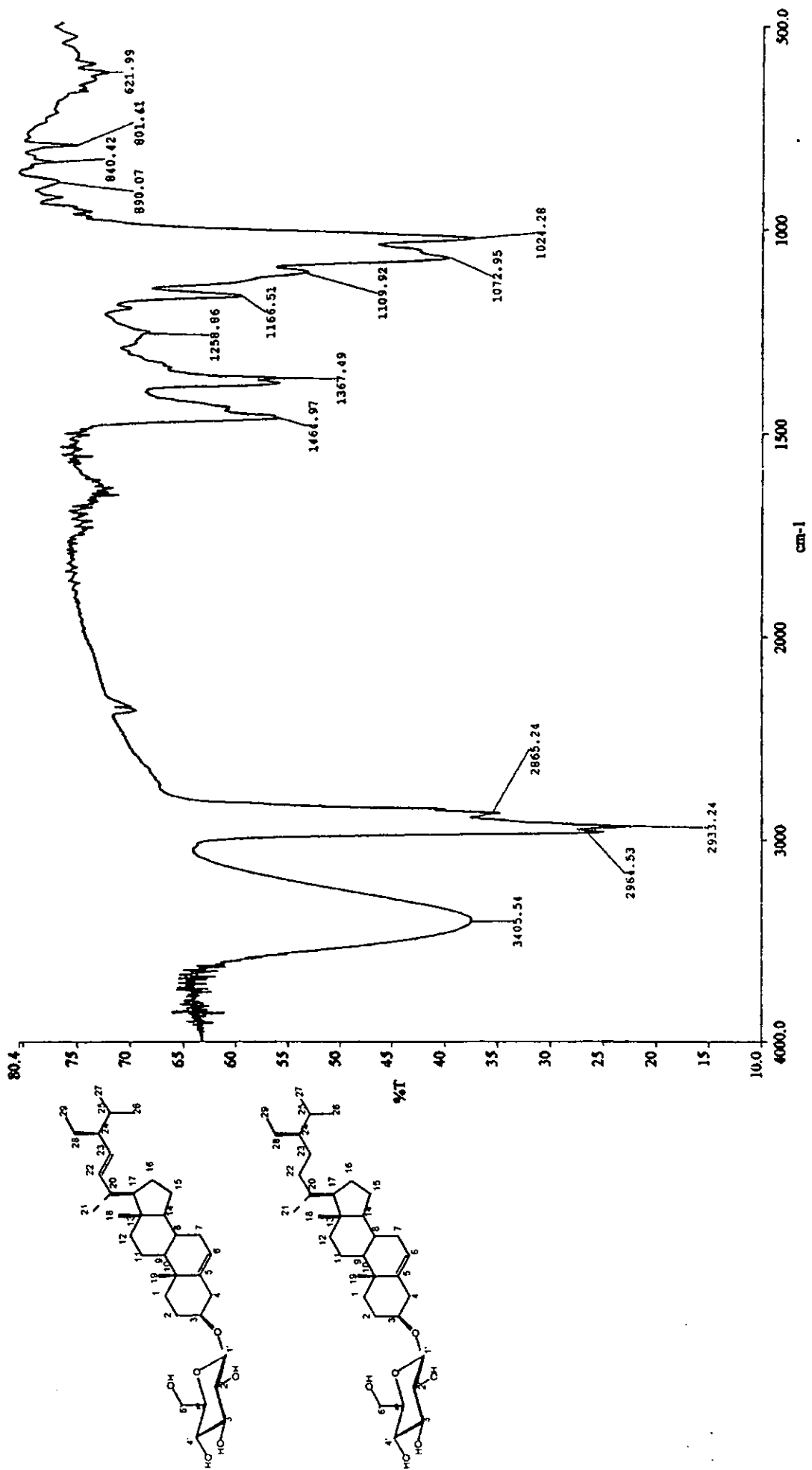
ภาพประกอบ 26 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr)



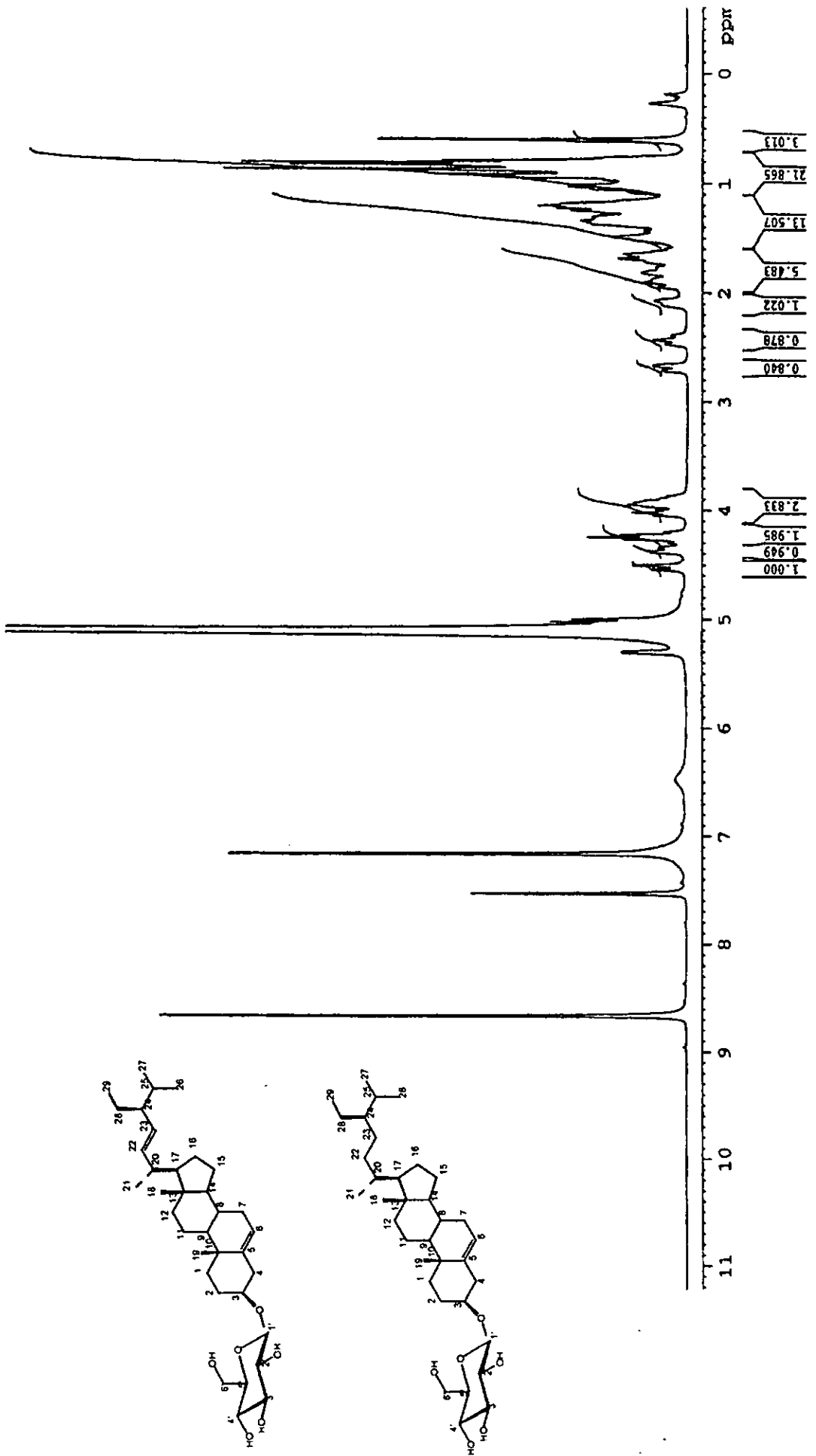
ภาพประกอบ 27  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)



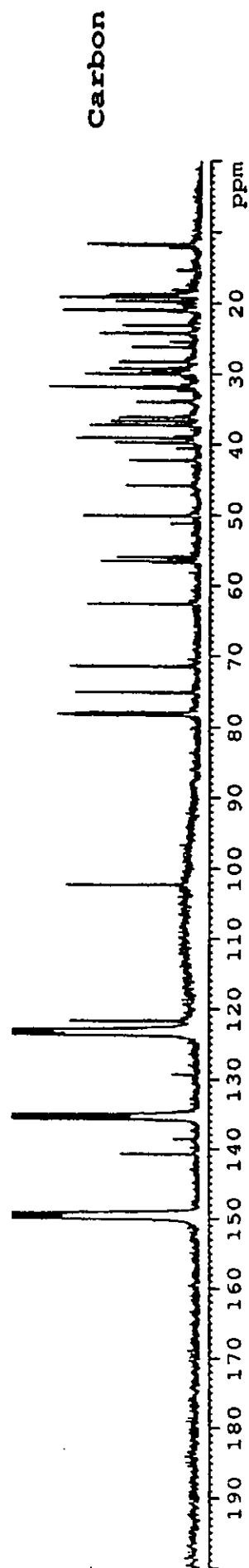
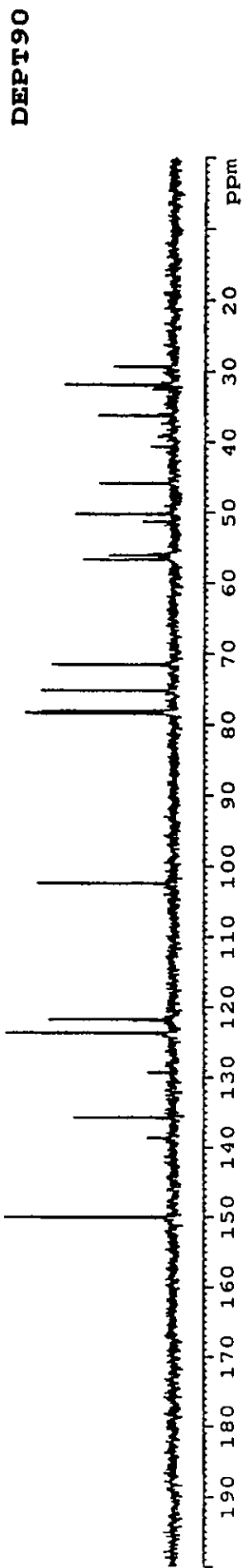
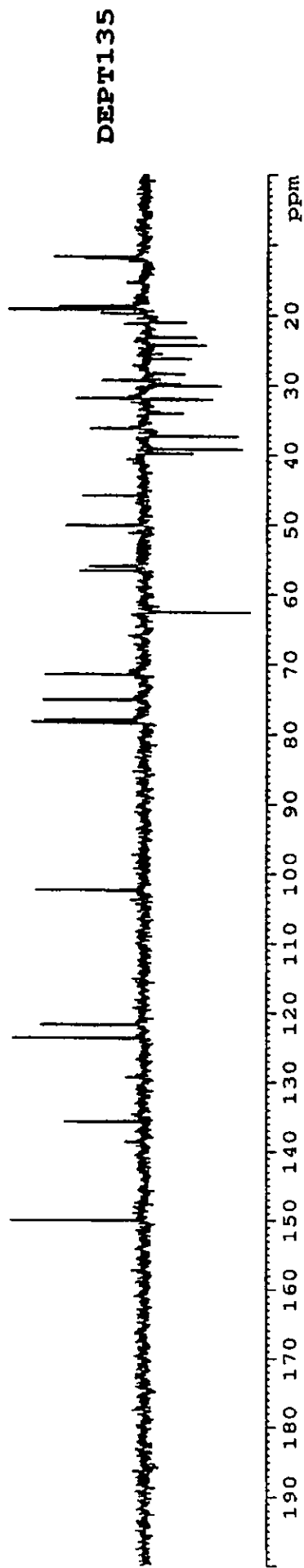
ภาพประกอบ 28 <sup>13</sup>C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ A (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)



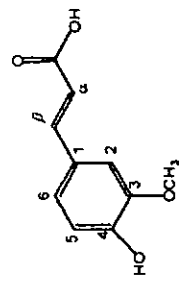
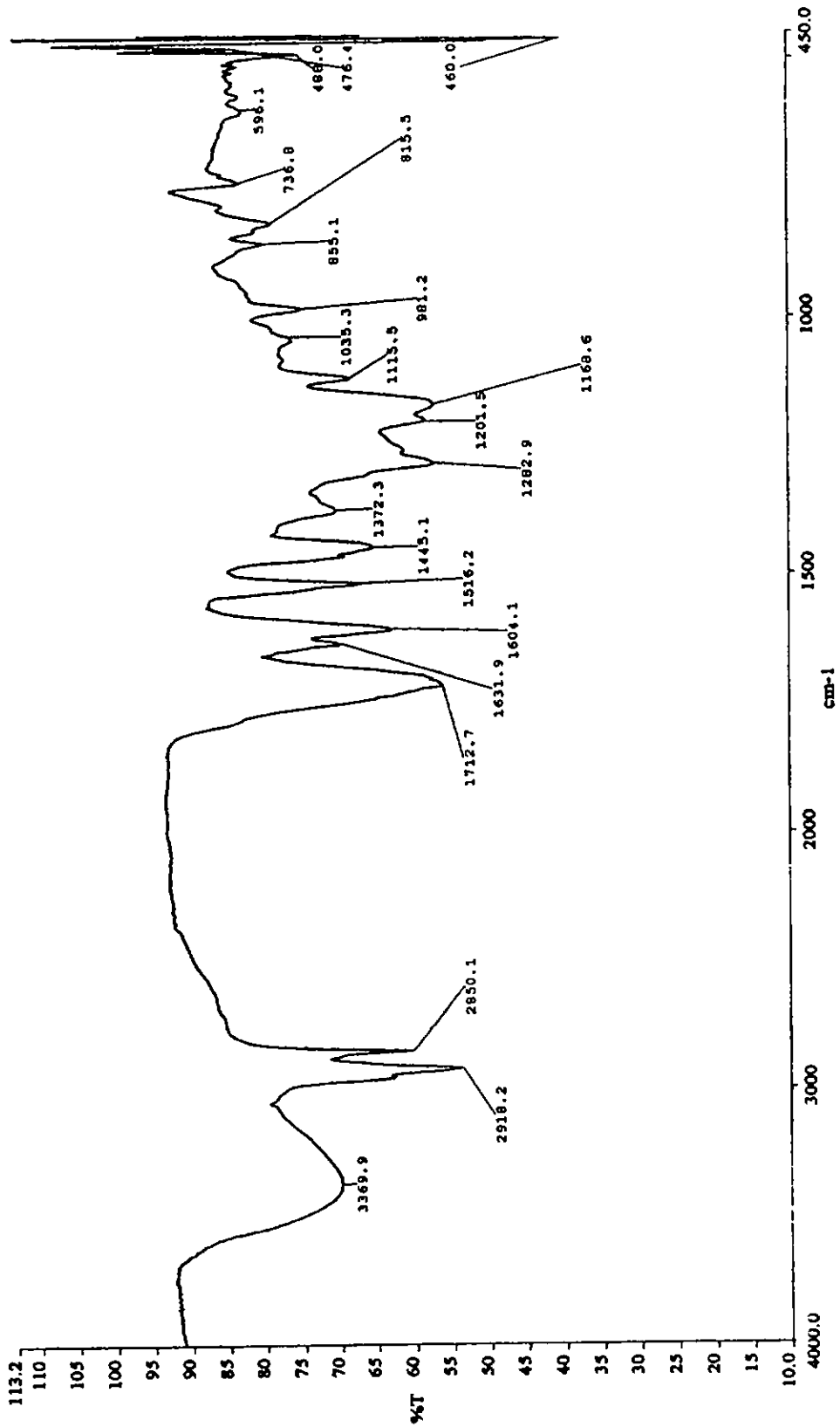
ภาพประกอบ 29 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr)



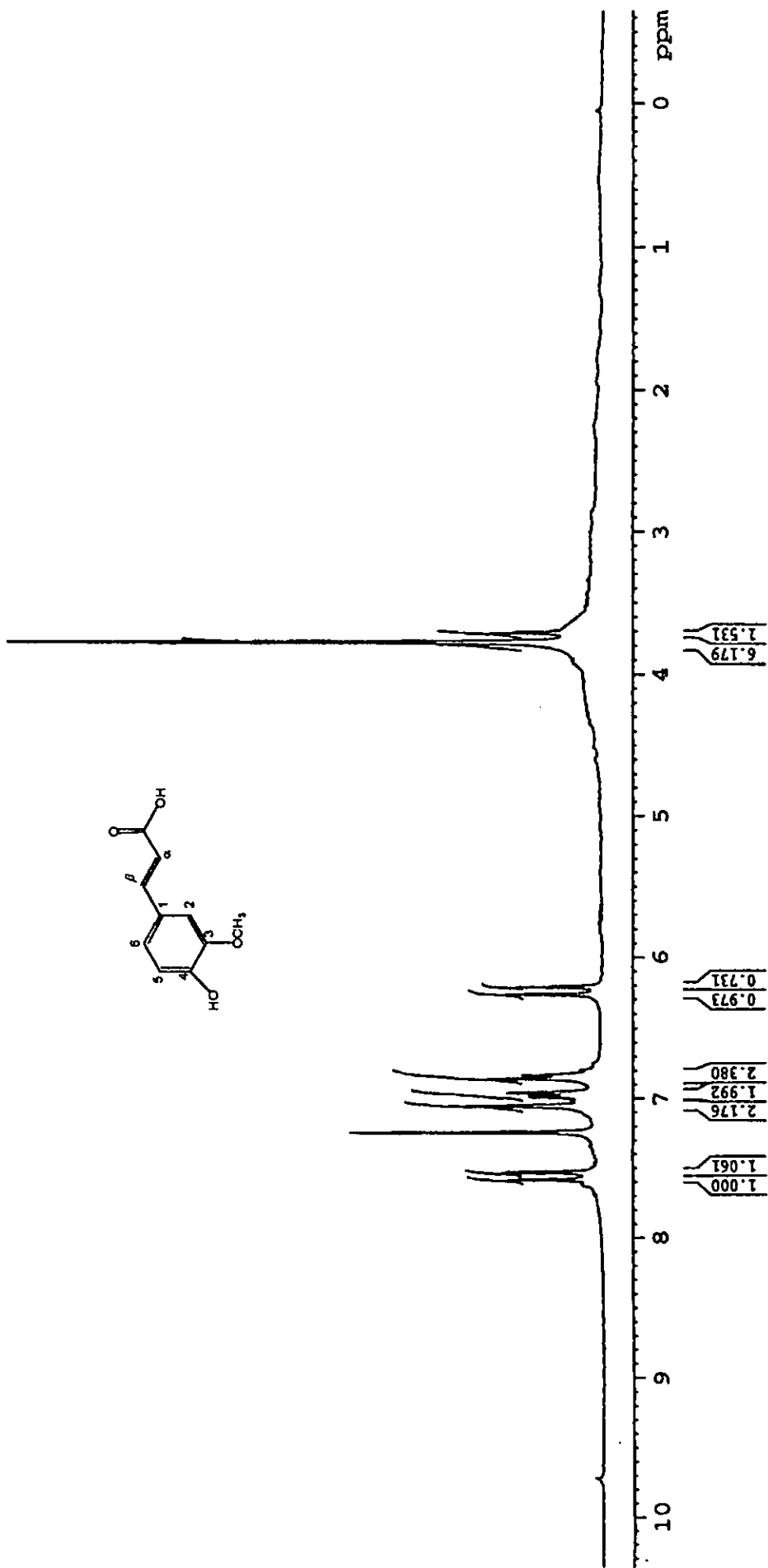
ภาพประกอบ 30  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (pyridine- $\text{d}_5$ , 300 MHz)



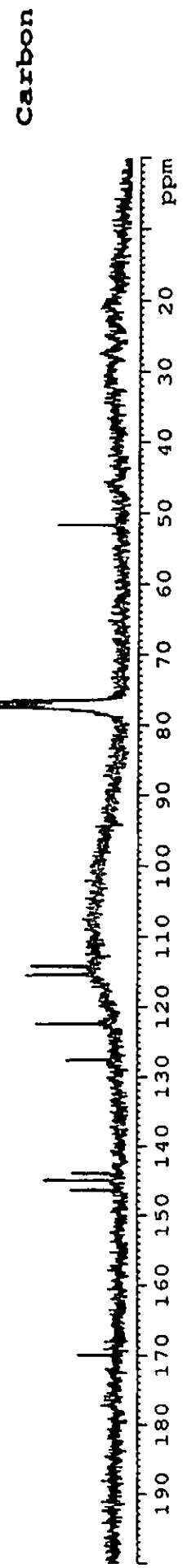
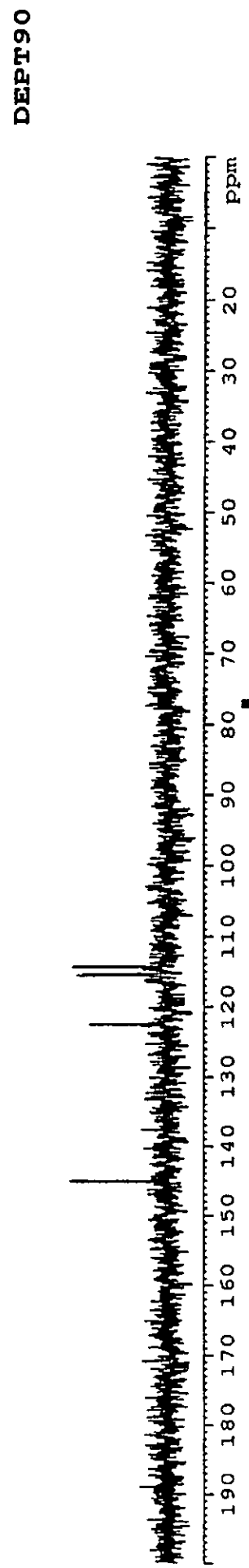
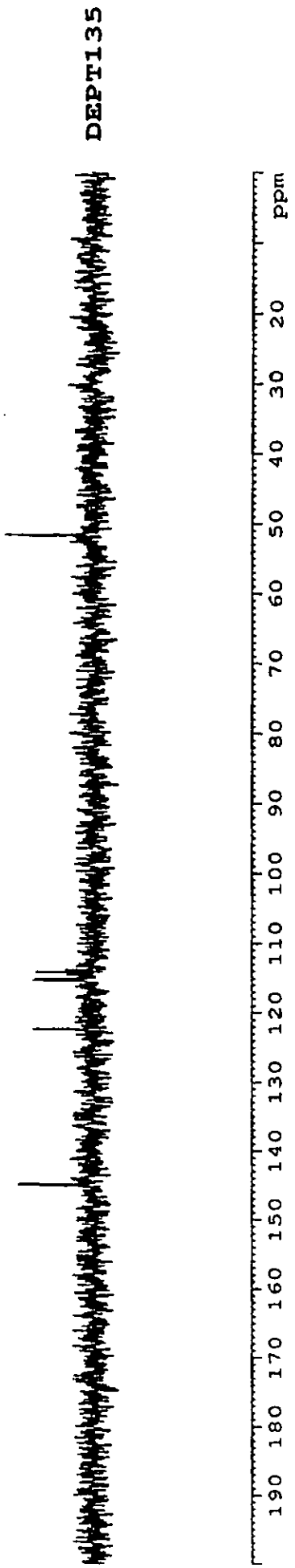
ภาพประกอบ 31 <sup>13</sup>C NMR DEPT-90 และ DEPT-135 ของตัวอย่งสารประกอบ B (pyridine-d<sub>5</sub>, 75 MHz)



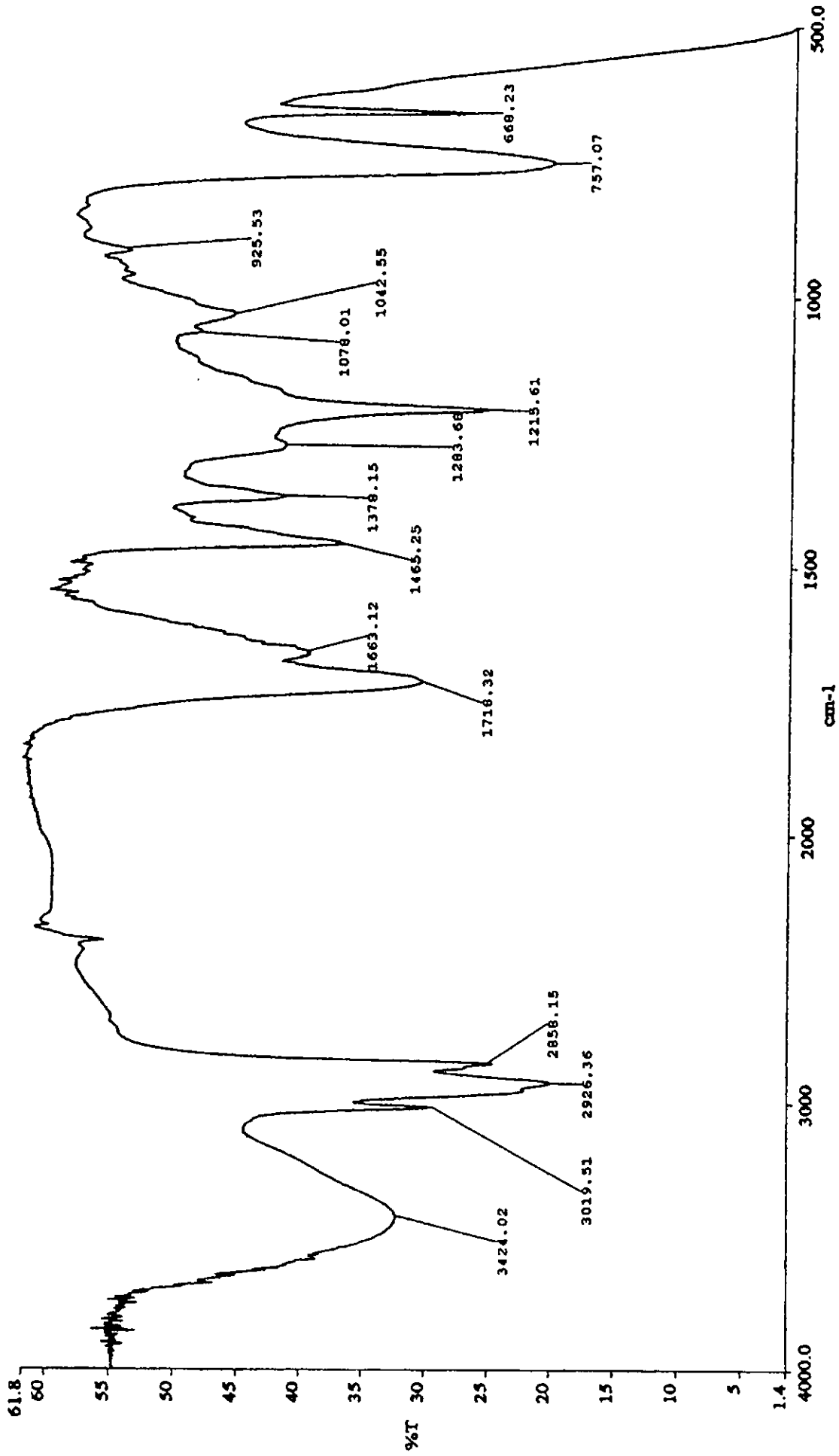
ภาพประกอบ 32 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ C (CHCl<sub>3</sub>)



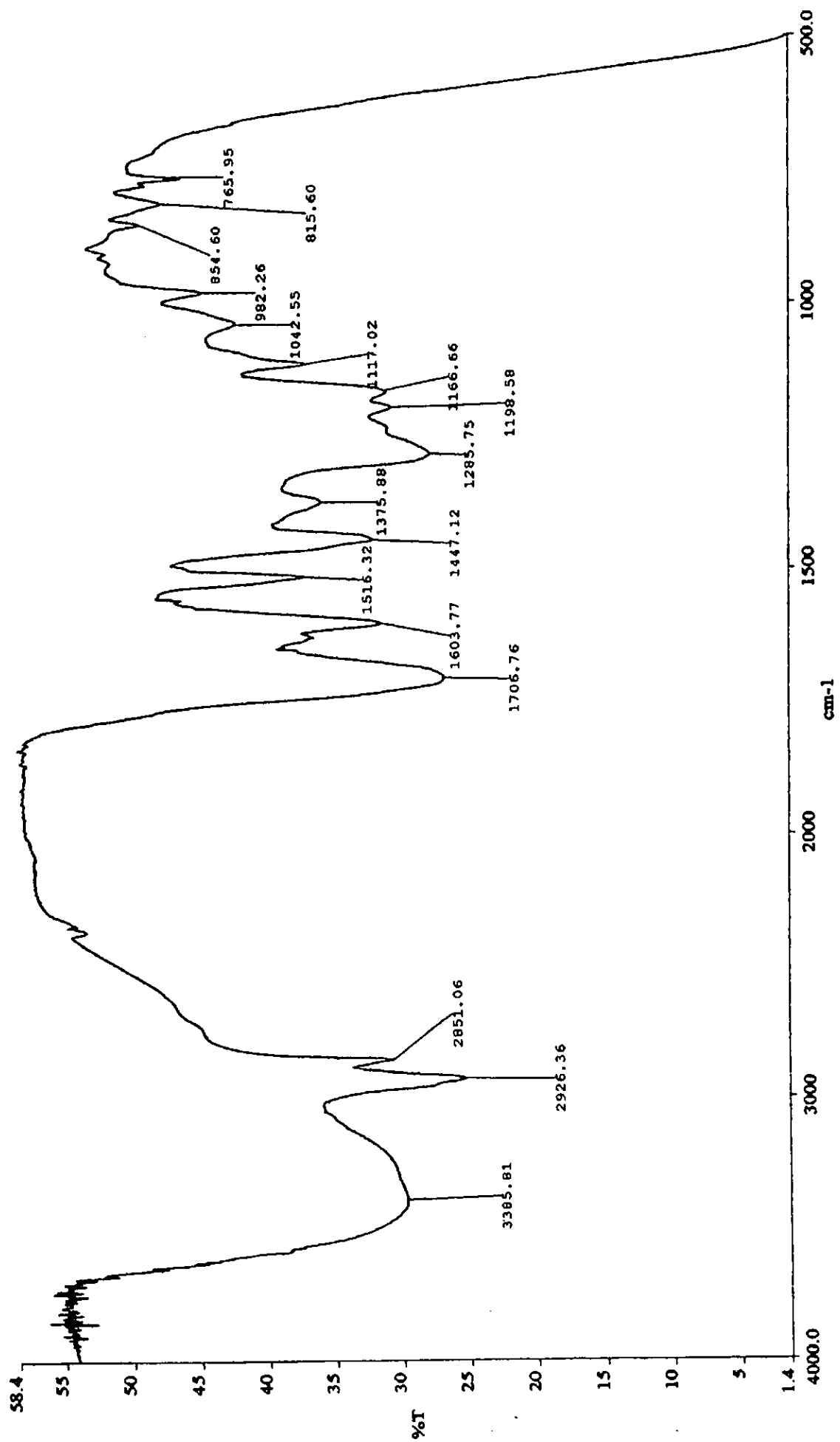
ภาพประกอบ 33 <sup>1</sup>H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)



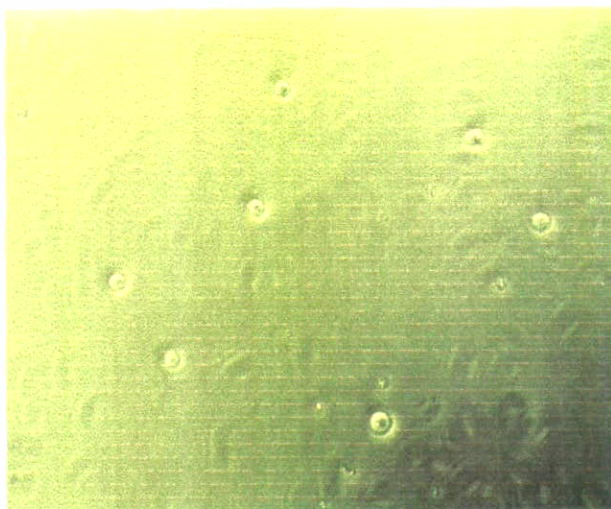
ภาพประกอบ 34  $^{13}\text{C}$  NMR DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ C ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)



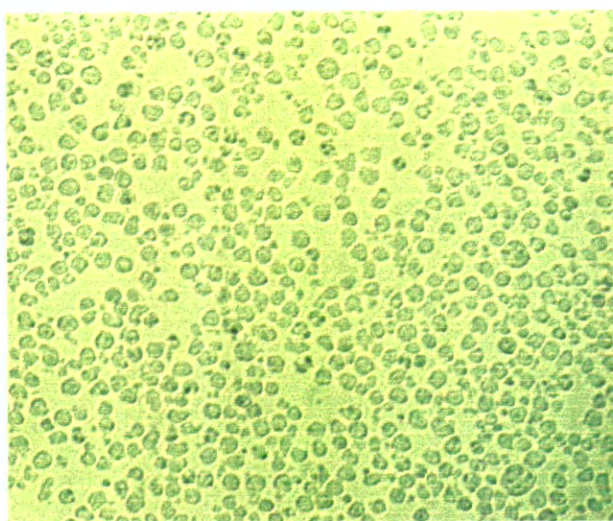
ภาพประกอบ 35 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม C-2.3.3 (CHCl<sub>3</sub>)



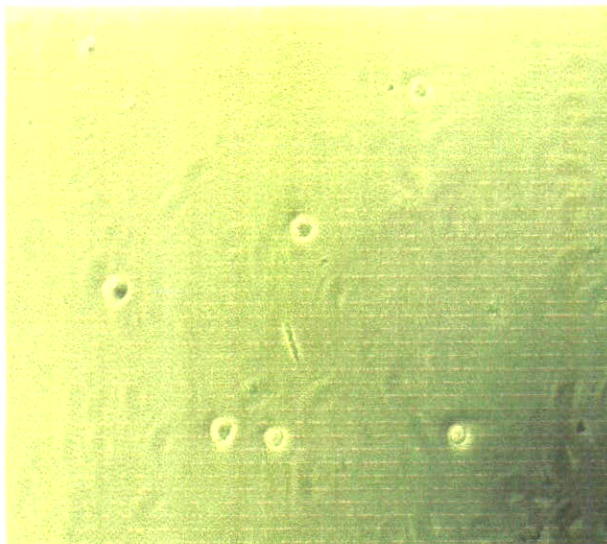
ภาพประกอบ 36 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม M-5.1 (CHCl<sub>3</sub>)



ภาพประกอบ 37 แสดงเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มควบคุมเมื่อเริ่มทดลอง

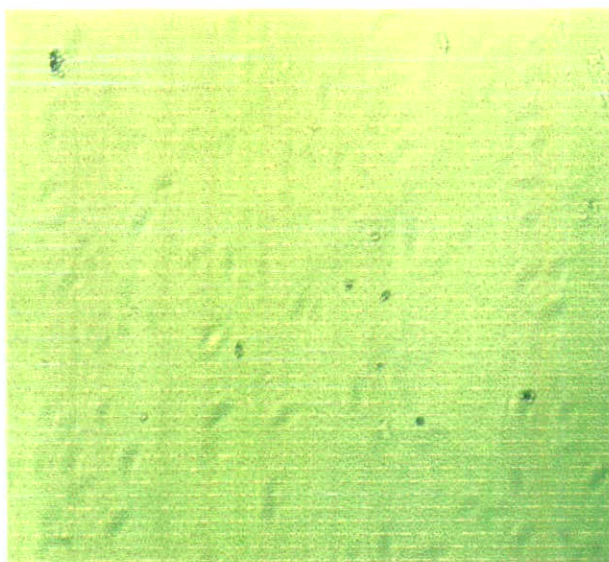


ภาพประกอบ 38 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4



ภาพประกอบ 39 แสดงเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

เมื่อเริ่มทดลอง



ภาพประกอบ 40 แสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P-388 ของสารกลุ่ม C-2.3.3

ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ในวันที่ 4

## การเตรียมสารเคมี

### 1. การเตรียม Anisaldehyde-Sulfuric Acid Spray Reagent (Jork, et al. 1990 : 196)

conc. Sulfuric acid	8.00	mL
Anisaldehyde	0.50	mL
Methanol	85.00	mL
Glacial acetic acid	10.00	mL

ผสมดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกันในอ่างน้ำแข็ง เก็บ reagent ที่เตรียมไว้ในตู้เย็น

### 2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 media

RPMI 1640 medium powder	20.90	g
Sodium hydrogencarbonate( $\text{NaHCO}_3$ )	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 คนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม sodium hydrogencarbonate และ HEPES คนต่อจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย 7.5 %  $\text{NaHCO}_3$  หรือ 1 % HCl จนกระทั่ง pH อยู่ในช่วง 7.0 - 7.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่นนำไปกรองด้วย Millipore filter เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อเติม Sodium penicillin G และ Streptomycin เก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น ก่อนใช้ให้เติม Newborn Calf Serum (NCS) โดยใช้ Newborn Calf Serum (NCS) : สารละลาย ในอัตราส่วน 1 : 9 โดยปริมาตรเมื่อใช้แล้วนำมาเก็บในตู้เย็น

### 3. การเตรียม Trypan Blue Dye 4 %

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

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

อภิธานศัพท์

## อภิธานศัพท์

s	singlet
d	doublet
dd	doublet of doublet
t	triplet
m	multiplet
br s	broad singlet
J	coupling constant
$\delta$	chemical shift
ppm	part per million
$\text{cm}^{-1}$	wave number
$\text{CDCl}_3$	deuteriochloroform
$\text{CD}_3\text{OD}$	methanol- $d_4$
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectra
$^1\text{H}$ NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
$^{13}\text{C}$ NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
MHz	Mega Hertz
$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	H-relayed correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	$^1\text{H}$ -detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Conectivity
EtOAc	ethyl acetate
MeOH	methanol
5 - FU	5 - Fluorouracil

## ประวัติย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวกัญญาณัฐ กกแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	13 ธันวาคม 2516
สถานที่เกิด	อำเภอป่าติ้ว จังหวัดยโสธร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	35/199 ถนนนาคนิवास แขวงลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร 10230
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 4 โรงเรียนปทุมคงคา แขวงคลองเตย เขตคลองเตย กรุงเทพมหานคร 10110
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนศรีฐานกระจายศึกษา จังหวัดยโสธร
พ.ศ. 2534	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (วิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์) โรงเรียนยโสธรพิทยาคม จังหวัดยโสธร
พ.ศ. 2538	กศ.บ. เคมี่ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
พ.ศ. 2547	กศ.ม. เคมี่ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร