การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

ปริญญานิพนธ์
ของ
จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
กรกฎาคม 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๖๑๒.๔๖
จ๖๔๓
๒.๖

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

๑ ส.ค. 2544

บทคัดย่อ

ของ

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
กรกฎาคม 2544

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). *การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู (Hedyotis corymbosa* Lamk.). ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล, ดร. จินดา แต้มบรรจง, ดร.พรทิพา พิชา.

หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) เป็นสมุนไพรไทยที่อยู่ในตำรับยารักษามะเร็งตำรับหนึ่ง โดยใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่น ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัดหยาบจากหญ้าลิ้นงูในชั้น hexane และ ethanol มีค่า ED_{50} เท่ากับ 30 และ > 100 µg/mL ตามลำดับ จากการนำสารสกัดหยาบ hexane และ ethanol มาแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารบริสุทธิ์และสารผสมซึ่งเป็นสารที่ไม่เคยแยกได้ในพืชชนิดนี้มาก่อน จากสารสกัดหยาบ hexane แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือ aurantiamide acetate มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ด้วยค่า ED_{50} > 100 µg/mL และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอีก 3 กลุ่ม ซึ่งมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถแยกต่อให้บริสุทธิ์ได้ มีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 µg/mL ตามลำดับ ในสารสกัดหยาบ ethanol แยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol และ β-sitosterol-β-D-glucoside และสารผสมของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ chondrillasterol ค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารบริสุทธิ์ทั้งสองมีค่า > 100 µg/mL ส่วนสารผสมมีค่า ED_{50} เท่ากับ 21.50 µg/mL นอกจากนี้ยังสามารถแยกกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 µg/mL สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

STUDY OF CYTOTOXICITY ON CANCER CELLS OF SUBSTANCES ISOLATED FROM *HEDYOTIS CORYMBOSA* LAMK.

AN ABSTRACT

BY

CHUNTHIP SAETUN

Presented in partial fulfillment of requirements

for the Master of Education degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

July 2001

Chunthip Saetun. (2001). *Study of Cytotoxicity on Cancer cells of Substances Isolated from Hedyotis corymbosa* Lamk. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Assist. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

Hedyotis corymbosa Lamk. has been used in a Thai traditional medicine with other herbs for anticancer. The crude extracts from hexane, ethanol, the isolated compounds and fractions were tested for cytotoxicity against P388 leukemic cells. The ED_{50} values of the crude extracts from hexane and ethanol were 30 and over 100 μg/mL respectively. With column chromatography technique, pure compounds and a mixture with identified structures which had never been previously found in this plant were isolated. From crude hexane extract, a pure compounds, aurantiamide acetate, with ED_{50} over 100 μg/mL and other three minor toxic fractions with ED_{50} values of 7.20, 17.00 and 21.00 μg/mL were isolated. From crude ethanol extract, two pure ompounds, 1,5-anhydroglucitol and β-sitosterol-β-D-glucoside, and a mixture of 22,23-dihydrochondrillasterol and chondrillasterol were obtains. The ED_{50} values of the two pure compounds were over 100 μg/mL whereas the mixture had higher toxicity with ED_{50} of 21.50 μg/mL. Another highly toxic fraction with ED_{50} of 17.50 μg/mL was found. The structure of the compounds were elucidated by spectroscopy techniques.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้

จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.)

ของ

นางสาวจันทร์ทิพย์ แซ่ตัน

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.เสริมศักดิ์ วิศาลาภรณ์)

วันที่ 24 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2544

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง)

.....กรรมการ

(ดร. พรทิพา พิชา)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พู่พิทยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

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

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พู่พิทยาสถาพร ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยมาตลอด

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย และให้สมุนไพรในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคุณณรงค์ นันทแสน นักวิชาการ กรมป่าไม้ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบพระคุณกลุ่มงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัย พร้อมทั้งขอขอบพระคุณ คุณสุธานุช อ่อนดี และคุณจรัญญา งามขำ นักวิจัยที่กรุณาเตรียมเซลล์มะเร็งและวัสดุอุปกรณ์ ให้คำแนะนำช่วยเหลือและถ่ายทอดวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูลทางสเปกโทร - สโกปี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ นิสิตปริญญาโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าและประโยชน์ใด ๆ ที่เกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
	ความสำคัญของการวิจัย	4
	ขอบเขตของการวิจัย	5
	นิยามศัพท์เฉพาะ	5
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3	วิธีดำเนินการวิจัย	20
	พืชที่ใช้ในการวิจัย	20
	เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย	20
	อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู และทำสารให้บริสุทธิ์	20
	อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	21
	การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์	22
	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	23
4	ผลการวิจัย	32
	ผลการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู	32
	ผลการแยกสารสกัด hexane และทำสารให้บริสุทธิ์	32
	ผลการแยกสารสกัด ethanol และทำสารให้บริสุทธิ์	36
	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	38
	ผลการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์	59
5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	65
	การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์	65
	การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	82
	ข้อเสนอแนะ	84

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	บรรณานุกรม	85
	ภาคผนวก	91
	อภิธานศัพท์	128
	ประวัติย่อผู้วิจัย	131

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตารางแสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	25
2	ผลการแยกสารสกัด hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	32
3	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	33
4	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	33
5	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	34
6	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	35
7	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	35
8	ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	36
9	ผลการแยกสารสกัด ethanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	36
10	ผลการแยกสารกลุ่ม E 1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	37
11	ผลการแยกสารกลุ่ม E 1.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	37
12	ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์	38
13	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของ 5 - fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	39
14	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง	41
15	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 1 ถึง H 9 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	43
16	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.1 ถึง H 8.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	43
17	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.1 ถึง H 8.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	44
18	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.1 ถึง H 8.5.4.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	45
19	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.1 ถึง H 8.5.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	45
20	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.1 ถึง H 8.5.4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	46

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
21	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ถึง H 8.5.5.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	46
22	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	47
23	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 .. H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	47
24	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1 ถึง E 4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	49
25	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1 ถึง E 1.7 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	50
26	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1.1 ถึง E 1.1.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL	50
27	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ B สารประกอบ C และสารประกอบ D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	52
28	ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	53
29	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P388	54
30	ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethanol ต่อเซลล์มะเร็ง P388	55
31	ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A	67
32	ข้อมูล ^{1}H-^{1}H COSY สเปกตรัมของสารประกอบ A	68
33	ข้อมูล HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ A	68
34	ข้อมูล HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ A	69
35	ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	72
36	ข้อมูล ^{1}H-^{1}H COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B	72
37	ข้อมูล HETCOR สเปกตรัมของสารประกอบ B	73
38	ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C	76

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	หญ้าลิ้นงู	6
2	สูตรโครงสร้างของ olean-12-ene-3β,28,29-triol	9
3	สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. diffusa* Willd.	10
4	สูตรโครงสร้างของ asperuloside	11
5	สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม triterpenes ชนิดใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. lawsoniae*	11
6	สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม lignans ชนิดใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. lawsoniae*	12
7	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู	13
8	สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. diffusa* Willd.	14
9	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *M. lucida*	15
10	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *U. guinensis*	16
11	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. chrysotricha*	16
12	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. capitellata var. mollis*	17
13	สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. capitellata*	18
14	สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารพวก anthraquinones	19
15	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู	26
16	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane	26
17	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8	27
18	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5	27
19	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4	28
20	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3	28
21	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5	29
22	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3	29
23	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด ethanol	30
24	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 1	30
25	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 1.1	31
26	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388	38
27	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของ 5 - fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็ง P388	40

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
28	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารสกัด hexan ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	42
29	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 และ H 8.5.5.3.2 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	48
30	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	48
31	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ C ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	52
32	กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 1.1.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	53
33	แผนภูมิแสดงผลของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัด hexane ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	56
34	แผนภูมิแสดงผลของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัด ethanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL.....	57
35	Negative control ของเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 (ขยาย 100 เท่า).....	58
36	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัด hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 40 µg/mL (ขยาย 100 เท่า).....	58
37	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารประกอบ C ของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL (ขยาย 100 เท่า).....	59
38	HMBC ของสารประกอบ A.....	69
39	การแตกพันธะของสารประกอบ A.....	70
40	การแตกพันธะของสารประกอบ C.....	78
41	การแตกพันธะของสารประกอบ D.....	81
42	FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr).....	92
43	^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ($CDCl_3$, 400 MHz).....	93
44	ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A δ 2.00 - 3.30 ppm.....	94
45	ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A δ 3.75 - 7.74 ppm....	95
46	^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ($CDCl_3$, 100 MHz).....	96
47	DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ A.....	97
48	COSY สเปกตรัมของสารประกอบ A.....	98
49	HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ A.....	99
50	HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ A.....	100
51	Mass Spectrum ของสารประกอบ A.....	101

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
52	FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr).....	102
53	^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (DMSO-d_6, 400 MHz).....	103
54	ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B.....	104
55	^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (D_2O/DMSO-d_6, 400 MHz).....	105
56	^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (DMSO-d_6, 100 MHz).....	106
57	DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ B.....	107
58	COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B.....	108
59	HETCOR สเปกตรัมของสารประกอบ B.....	109
60	FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ C (KBr).....	110
61	^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ($CDCl_3$, 400 MHz).....	111
62	ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C δ 0.50 - 0.95 ppm.....	112
63	ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C δ 1.00 - 5.20 ppm.....	113
64	^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ($CDCl_3$, 100MHz).....	114
65	DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ C.....	115
66	Mass Spectrum ของสารประกอบ C.....	116
67	FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ D (KBr).....	117
68	^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ D (DMSO-d_6, 400 MHz).....	118
69	^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ D (DMSO-d_6,+ $CDCl_3$,100 MHz).....	119
70	DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ D.....	120
71	COSY สเปกตรัมของสารประกอบ D.....	121
72	Mass Spectrum ของสารประกอบ D.....	122
73	FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2.....	123
74	FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1.....	124
75	FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.2.....	125
76	FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม E 1.1.3.....	126

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

มะเร็งเป็นโรคร้ายซึ่งนับวันจะคุกคามชีวิตมนุษย์มากขึ้น ประเทศที่กำลังพัฒนาและพัฒนาแล้วต่างประสบปัญหาจากโรคมะเร็ง องค์การอนามัยโลกกล่าวว่ามีประชากรเป็นโรคมะเร็งอย่างน้อยปีละ 9 ล้านคน และเสียชีวิตถึง 5 ล้านคน และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ (World Health Organization. 1993 : 2) สำหรับปัญหาโรคมะเร็งในประเทศไทยนั้นพบว่าหากไม่นับสาเหตุการตายจากอุบัติเหตุแล้ว โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับสองรองจากโรคหัวใจ (สาธารณสุข. 2541) จากสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (Deerasamee, et al. 1999 : 25) พบว่าในประเทศไทย โรคมะเร็งที่เพศชายเป็นกันมาก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ ส่วนโรคมะเร็งที่เพศหญิงเป็นกันมาก ได้แก่ มะเร็งปากมดลูก มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ

โรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายได้เช่นเดียวกับโรคอื่น ๆ ถ้าตรวจพบมะเร็งในระยะเริ่มแรกและทำการรักษาก่อนที่เซลล์มะเร็งจะกระจายไป ผู้ป่วยอาจหายขาดได้ถึง 80% วิธีการรักษามะเร็งโดยทั่วไปทำได้ 4 วิธี (นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา. 2539 : 579) ได้แก่

1. การผ่าตัด (Surgery) นิยมใช้รักษามะเร็งระยะเริ่มต้นเท่านั้น แต่มะเร็งที่อวัยวะบางอย่างไม่สามารถทำการผ่าตัดได้แม้จะเป็นระยะเริ่มต้นก็ตาม ทั้งนี้เพราะอันตรายจากการผ่าตัดจะสูงมาก และผลที่ได้ก็ไม่เป็นที่น่าพอใจ เช่น มะเร็งของโพรงด้านหลังจมูก เป็นต้น

2. รังสีบำบัด (Radiotherapy) รังสีสามารถใช้รักษามะเร็งได้ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะสุดท้ายของโรค แต่ในระยะเริ่มต้นการผ่าตัดทำได้ง่ายและใช้เวลาสั้นกว่า

3. เคมีบำบัด (Chemotherapy) ยาหรือสารเคมีบางอย่างนิยมใช้รักษามะเร็งบางชนิดที่ลุกลามหรือแพร่กระจายไปยังอวัยวะอื่นๆ หรือทั่วร่างกาย เช่น มะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

4. ภูมิคุ้มกันบำบัด (Immunotherapy) เป็นการรักษามะเร็งบางชนิดโดยการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันแก่ร่างกายของผู้เป็นมะเร็ง

ปี ค.ศ. 1940 นักวิทยาศาสตร์เริ่มสนใจศึกษาเกี่ยวกับสารที่อาจจะนำมาใช้เป็นยารักษามะเร็งกันอย่างจริงจังหลังจากที่ได้ค้นพบว่า nitrogen mustards ซึ่งเป็นแก๊สพิษที่ใช้ในการทำสงครามเคมีนั้นมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ หลังจากนั้นจึงมีการสำรวจหาสารต้านเนื้องอกและมะเร็งกันอย่างกว้างขวาง สารที่นำมาทดสอบในระยะแรกนั้นส่วนใหญ่เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้พยายามที่จะดัดแปลงโครงสร้างเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพ

ดีกว่าสารเดิมแต่พบว่ายังไม่มีสารใดให้ผลเป็นที่น่าพอใจ นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มสนใจศึกษาสารจากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นสารต้นแบบ (prototype) ซึ่งอาจนำไปสู่การค้นพบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ (เอมอร โสมนะพันธุ์. 2536 : 203 - 204) จากการค้นพบ vinblastine และ vincristine ซึ่งเป็น dimeric indole alkaloid ที่สกัดได้จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Cartharanthus roseus* G. Don) และใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบัน ทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามสกัดหาสารสำคัญ ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (cancer inhibitor) จากพืชชนิดอื่น (วีณา จิรัจฉริยากูล. 2533 : 207) ในการค้นหาพืชสมุนไพรเหล่านี้นักวิทยาศาสตร์มักศึกษาโดยอาศัยประสบการณ์จากคำบอกเล่าสืบต่อกันมาหรือจากยาพื้นบ้าน (forklore medicine) ซึ่งมีบันทึกไว้ในตำรายาแผนโบราณ (ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. 2526 : 60)

แม้ว่าการค้นหายาต้านมะเร็งจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจะมีมาตั้งแต่สมัยอียิปต์โบราณ โดยมีการจารึกไว้ในตำรา Ebers papyrus เมื่อ 1550 ปีก่อนคริสตกาลแต่การศึกษาสารต้านมะเร็งจากสมุนไพรเริ่มทำกันจริงจังเมื่อประมาณกลางศตวรรษที่ 19 นี้เอง (เอมอร โสมนะพันธุ์. 2536 : 205) เมื่อปี ค.ศ. 1955 สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute) ได้จัดตั้งหน่วยงานขึ้นเพื่อสำรวจหาสารต้านมะเร็งชื่อ Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC) หน่วยงานนี้ดำเนินการทดสอบสารจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อหาสารต้านมะเร็งชนิดใหม่จากธรรมชาติ (Suffness & Douros. 1982 : 1) ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการค้นพบยาชนิดใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง แทกซอล (taxol) เป็นยาที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาใช้ในการรักษามะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) แยกได้ครั้งแรกจากเปลือกต้น Pacific yew (*Taxus brevifolia* Nutt. วงศ์ Taxaceae) และต่อมามีการค้นพบในต้นยิวชนิดอื่น เช่น European yew (T.*baccata* L.) (เอมอร โสมนะพันธุ์. 2536 : 220) แทกซอลถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในวงการแพทย์แผนปัจจุบัน

ปัจจุบันถึงแม้ว่าโลกจะเจริญก้าวหน้าไปด้วยเทคโนโลยีทางการแพทย์ และยาแผนปัจจุบันได้กลายมาเป็นวิธีการหลักในการใช้รักษาโรค คนไทยอีกจำนวนมากยังคงใช้สมุนไพรและยาแผนโบราณในการรักษาและป้องกันโรค แสดงให้เห็นว่าคนไทยยังคงมีความผูกพันกับสมุนไพรและยาไทยอยู่ (เสาวภา พรสิริพงษ์ และวิชิต เปานิล. 2542 : 67) ประกอบกับประเทศไทยจัดเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะพรรณพืชสมุนไพรและความหลากหลายทางวัฒนธรรมและภูมิปัญญาพื้นบ้าน มีการใช้สมุนไพรบำบัดโรคภัยไข้เจ็บสูงที่สุดแห่งหนึ่งของโลก (คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ และสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย ร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ. 2540 : 1) พรรณพืชสมุนไพรที่แพทย์แผนโบราณนำมาใช้ในการรักษามะเร็ง เช่น ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Kurz.) ผักคาวทอง (*Houttuynia cordata* Thunb.) แพงพวยฝรั่ง (*Cartharanthus roseus* G.Don) หญ้าปักกิ่ง

(*Commelina* sp.) (สุนทรี สิงหบุตรา. 2535 : 150 - 157) แกแล (*Maclura cochinchinnensis*) (Lour) Corn.) (ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. 2533 : 70) ราชดัด (*Brucea amarissima* Desv.) คงคาเดือด (*Arfevillea arborescens* Pierre.) พญาสัตบรรณ (*Alstonia scholaris* R.Br.) ดองดึง (*Gloriosa superba* Linn.) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน. 2533 : 3 - 5) และหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) (ดรุณ เพ็ชรพลาย, ณุฉัตรา จันทร์สุวาณิชย์ และชาตรี ชาญประเสริฐ. 2538 : 96) การพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยา เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาเศรษฐกิจของประเทศได้ส่วนหนึ่ง กล่าวคือเมื่อสมุนไพรบางชนิดได้รับการพัฒนาใช้เป็นยาแล้วประชาชนนิยมอย่างแพร่หลายก็จะทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเป็นพืชเศรษฐกิจได้ และสามารถลดการนำเข้ายาบางส่วน (กฤษณา ไกรสินธุ์. 2537 : 11)

หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) เป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยารักษามะเร็งของแพทย์แผนโบราณตำรับหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Ewell) หญ้าปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) และสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เกล็ดนิ่ม (*Manis javanica* Desmarest) ขนเม่น (*Hystrix brachyura* Linn.) กระดองเต่า (*Damonia subtrijuga* Boulenger) เงี่ยงกระเบน (*Dasyatis* spp.) และอกตะพาบน้ำ (*Trionyx cartilagineus* Boulenger) นอกจากนี้ยังมีส่วนของกรุดักน้ำ (a small piece of bamboo bucket) ประกอบอยู่ด้วย มีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของน้ำสกัดจากส่วนประกอบที่ได้จากพืช พบว่าสารสกัดนี้มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลองที่ค่า ED_{50} มากกว่า 30 μg/mL และสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอด และยืดอายุของหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pornsiriprasert. 1986 : abstract) ต่อมามีผู้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับนี้ที่ประกอบด้วยพืชและสัตว์ พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองที่ ED_{50} มากกว่า 100 μg/mL และสามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งในหนูขาว และช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Na Bangchang. 1987 : abstract) ต่อมาก็มีผู้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรที่ประกอบด้วยพืชและสัตว์อีก พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกร่นได้ และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเพิ่มการทำงานของ NK cells ต่อการทำลายเซลล์มะเร็ง Yac-1 (Lymphoma cells) ในหลอดทดลองได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) ต่อมาก็ได้มีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสมุนไพรที่ประกอบด้วยพืชและสัตว์ตำรับนี้อีก โดยทำการทดลองกับผู้ป่วยมะเร็ง

เต้านม พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นความสามารถในการทำงานของ NK cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ Monocytes/Macrophages ในการหลั่ง TNF - α ได้ (Thisoda. 1995 : abstract) ต่อมาสมุนไพรตำรับนี้ได้มีการเปลี่ยนแปลง โดยเพิ่มสมุนไพรอีก 3 ชนิด ได้แก่ หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) หลอดเถื่อน (*Mallutus oblongifolius* Muell. Arg.) และเหงือกปลาหมอ *(Acanthus ebracteatus* Wall.) ลงไป ยาสมุนไพรตำรับนี้เชื่อว่าให้ผลในการรักษามะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับ และมะเร็งหลอดลม และมีแนวโน้มที่จะเป็นที่ยอมรับมากขึ้น ผู้วิจัยคิดว่าน่าจะนำสมุนไพรที่อยู่ในตำรับนี้มาศึกษาหาสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำหญ้าลิ้นงูมาศึกษาหาสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วนการศึกษาทางด้านเคมีของหญ้าลิ้นงูได้มีผู้ศึกษามาบ้างแล้ว สารที่แยกได้เป็นพวก iridoid glucosides (Takagi et al. 1981 : 657 - 659 ; citing chemical abstract. 1981 : 413; Otsuka et al. 1991 : 2049 - 2052) แต่ไม่มีรายงานว่าได้แยกสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจากพืชดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำหญ้าลิ้นงูมาศึกษาหาสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การค้นพบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก (Bioassay directed fractionation)
2. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้ (Cytotoxicity)
3. เพื่อวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ (Structure elucidation)

ความสำคัญของการวิจัย

1. สามารถแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก
2. ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร จะเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์และสารอนุพันธ์ที่ออกฤทธิ์ได้ดีกว่าเดิม เพื่อนำไปสู่การพัฒนายาชนิดใหม่ต่อไป
3. ใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจว่า น่าจะทำการศึกษาต่อไปในเซลล์มะเร็งชนิดอื่นในสัตว์ทดลอง หรือในคนต่อไปหรือไม่
4. เป็นการใช้วิธีการทางวิทยาศาสตร์พิสูจน์ภูมิปัญญาท้องถิ่น ในการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศมาใช้ให้เป็นประโยชน์ เพื่อให้เกิดการพัฒนาที่ถูกต้อง แม่นยำ และนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางเป็นที่ยอมรับมากขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. การวิจัยนี้จะสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู โดยใช้ hexane และ ethanol เป็นตัวทำละลาย

2. การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography) และการตกผลึก (crystallization)

3. วิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy technique)

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells, P388) ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง

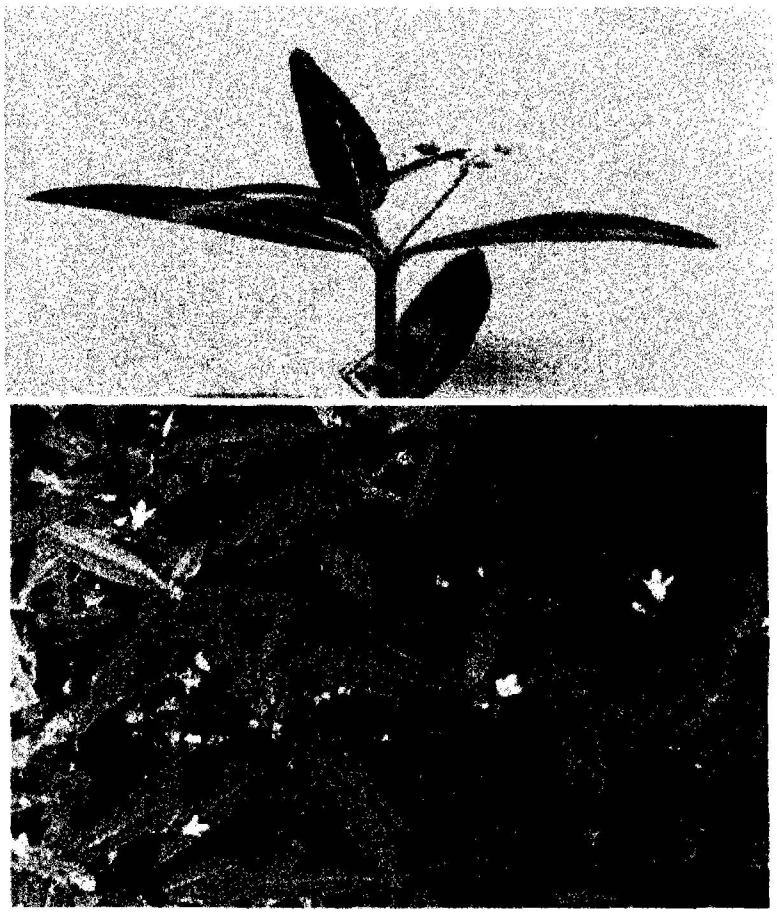
นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P388 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (cell suspension)

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

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หญ้าลิ้นงูเป็นพืชสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hedyotis corymbosa* Lamk. หรือ *Oldenlandia corymbosa* Linn. (เต็ม สมิตินันท์. 2523 : 172 - 173 และ 244) จัดอยู่ในวงศ์ยอ เข็ม กระท่อม (Rubiaceae) มีชื่ออื่นว่า จุ้ยจี้เช่า สุ่ยเฉียบฉ่าว (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531 : 811) หญ้าลิ้นงูเป็นพืชล้มลุกอายุ 1 ปี ลำต้นเลื้อยยาวประมาณ 6 - 20 นิ้ว แตกกิ่งก้านสาขามาก ใบรูปหอกแคบเล็กเรียวแหลม (วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540 : 469) ผลมีลักษณะเป็นสันสี่มุม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 มิลลิเมตร เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุย ขยายพันธุ์ด้วยการใช้เมล็ด มีสรรพคุณเป็นยาแก้ไข้มาลาเรีย แก้ลำไส้อักเสบ ล้างแผลฝีบวม แผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531 : 811)



ภาพประกอบ 1 หญ้าลิ้นงู

ดาลัด พรศิริประเสริฐ (Pornsiriprasert. 1986 : abstrac) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ต้นไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Ewell) หญ้าปีกไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth) และต้นลิ้นงูเห่า (*Clinacanthus siamensis* Brem) โดยนำสมุนไพรตำรับนี้มาสกัดด้วยน้ำ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลอง มีค่า ED_{50} มากกว่า 30 µg/mL ส่วนฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเต้านมในหนูขาว โดยให้หนูขาวกินสารก่อมะเร็ง 7, 12 - Dimethylbenzanthracene (7, 12 - DMBA) จำนวน 130 mg/kg พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพรสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอด ($p = 0.041$) และยืดอายุหนูได้ ($p = 0.025$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพร แต่ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของขนาดมะเร็งได้ทางสถิติ ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษ พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้ไม่มีความเป็นพิษในระดับความเข้มข้นสูงถึง 10000 mg/kg โดยการกิน

เกศรา ณ บางช้าง (Na Bangchang. 1987 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ ไฟเดือนห้า หญ้าปีกไก่ดำ เหง้าพุทธรักษา เหง้าข้าวเย็นเหนือ และต้นลิ้นงูเห่า ส่วนที่ได้จากสัตว์ 5 ชนิด ได้แก่ เกล็ดนิ่ม (*Manis javanica* Desmarest) ขนเม่น (*hystrix brachyura* Linn.) กระดองเต่า (*Damonia subtrijuca* Boulenger) เงี่ยงกระเบน (*Dasyatis* spp.) และอกตะพาบน้ำ (*Trionyx cartilagineus* Boulenger) นอกจากนี้ยังมีส่วนของกรุตักน้ำประกอบอยู่ด้วย จากการศึกษาพบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้ มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง KB ในหลอดทดลองที่ค่า ED_{50} มากกว่า 100 µg/mL ส่วนการทดลองกับหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านมโดยให้หนูกินสารก่อมะเร็ง 7, 12 DMBA พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำสกัดจากสมุนไพร 1500 mg/kg ของน้ำหนักตัว สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 4 สัปดาห์แรก และมีผลช่วยยืดอายุและเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับน้ำสกัดจากสมุนไพร นอกจากนี้การศึกษาพิษวิทยาของน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้ โดยให้สัตว์ทดลองกินน้ำสกัดประมาณ 1500 mg/kg ของน้ำหนักตัว ติดต่อกัน 6 เดือน พบว่าไม่เกิดพิษทางการโลหิตทางพยาธิสภาพของเซลล์ และทางเคมีของเลือด ส่วนการศึกษาพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง พบว่าเมื่อให้สัตว์ทดลองกินน้ำสกัด 15000 mg/kg ของน้ำหนักตัว เพียงครั้งเดียว ไม่มีสัตว์ทดลองตาย ส่วนค่า LD_{50} จากการฉีดน้ำสกัดจากสมุนไพรเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว มีค่าเท่ากับ 1350 mg/kg ของน้ำหนักตัว

สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับหนึ่งที่ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด และสัตว์ 5 ชนิด ตามที่เกศรา ณ บางช้าง ศึกษามา

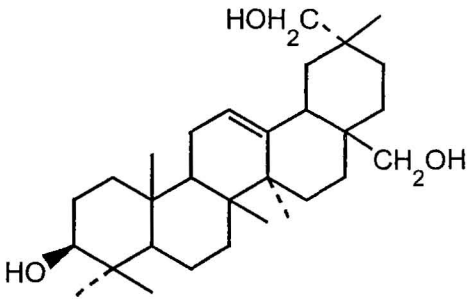
(Na Banchang. 1987 : abstract) พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกร่นได้ และจากการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ามีการเพิ่มความสามารถในการทำงานของ Natual Killer cells (NK cells) ต่อการทำลาย Yac - 1 cell (Lymphoma cells) ในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ NK cells

เพียงเพ็ญ ธิโสดา (Thisoda. 1995 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด และสัตว์ 5 ชนิด ตามที่สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา ศึกษามา (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) โดยนำสมุนไพรตำรับนี้มาศึกษาฤทธิ์การทำงานของ NK cells ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเต้านม โดยให้ผู้ป่วยรับประทานน้ำสกัดจากสมุนไพรนาน 2 สัปดาห์ พบว่าความสามารถ NK cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการศึกษาการทำงานของ Monocyte/Macrophages ในการหลั่ง TNF - α พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของ Monocyte/Macrophages ในการหลั่ง TNF - α ได้

การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในวงศ์ Rubiaceae

นาคานิชิ และคณะ (Nakanishi, et al. 1965 : 882 - 890) ได้สำรวจพืช 40 วงศ์ ที่ใช้เป็นยาพื้นบ้านในประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์ โดยทำการสกัดสารด้วย methanol แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดส่วนใบและต้นแห้งของดูกไก่ยาน (*H. capitellata* Wall.) พบสารประเภท alkaloid และ phenolic แต่ไม่พบสารประเภท steroid และพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* FDA 209P และ *Proteus vulgaris* IFO 0337 ที่ความเข้มข้น 5 - 10 mg/mL ความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูมีค่า LD_{50} เท่ากับ 500 - 1000 mg/kg แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเนื้องอกในหนูชนิด Yoshida sarcoma cells

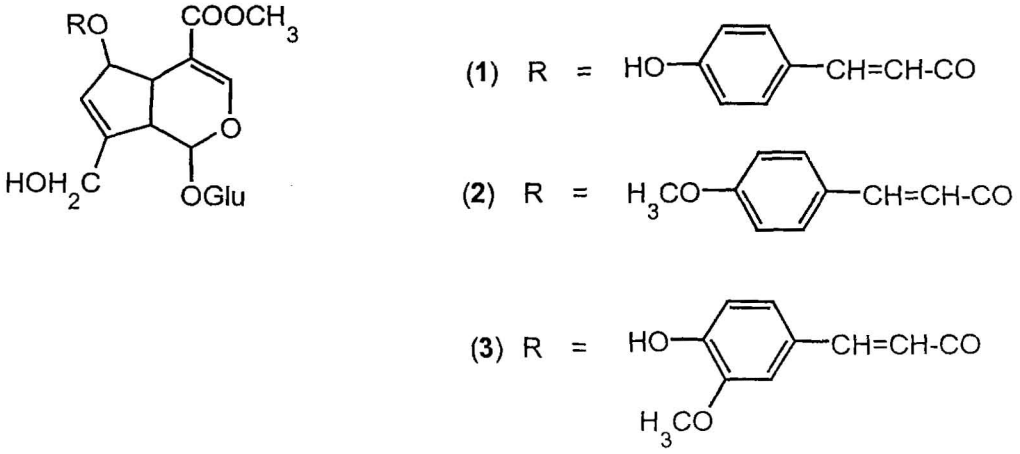
ฮุย และลิ (Hui & Li. 1977 : 1309 - 1310) ได้สกัดแยกสารจากลำต้นแห้งของต้น *H. acutangula* โดยใช้ petroleum ether และ ethanol เป็นตัวทำละลายตามลำดับ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ steroids 2 ชนิด ได้แก่ β-sitosterol และ stigmasterol นอกจากนั้นยังพบ triterpenes อีก 9 ชนิด ได้แก่ isocarborinol acetate arborinone germanicol taraxerol isoarborinol erythrodiol oleanolic acid ursolic acid และ olean-12-ene-3β,28,29-triol ซึ่งเป็นครั้งแรกที่แยก olean-12-ene-3β,28,29-triol ได้จากแหล่งธรรมชาติ สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ olean-12-ene-3β,28,29-triol

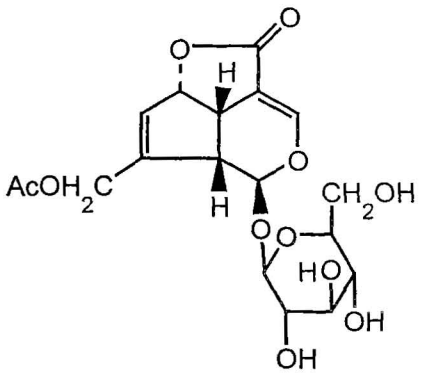
เลียว เชน และเชน (Liao, C.H. Chen & G.C. Chen. 1979 : 658 - 660) ได้สกัดสารจากต้นโหมแจ่วนา (*H. diffusa* Willd.) โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) พบว่าสารสกัดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 0.572 mg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ HeLa cell 47% แต่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA เมื่อนำสารสกัด ethanol ไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลาย hexane ethyl acetate และ methanol พบว่าสารที่ละลายใน hexane ที่ความเข้มข้น 0.59 g/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ HeLa cell 89% สารที่ละลายใน ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL และ 0.61 mg/mL มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ HeLa cell 47% และ 17% ตามลำดับ เมื่อนำสารที่ละลายใน hexane และ ethyl acetate ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด mouse S-180 sarcoma พบว่าสารที่ละลายใน hexane ที่ความเข้มข้น 0.59 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 44% และ 93% หลังจากทำการบ่ม (incubate) เป็นเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ สารที่ละลายใน ethyl acetate ที่ความเข้มข้น 0.50 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 11% และ 23% หลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นว่าสารที่ละลายใน hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกและ mouse S-180 sarcoma

นิชิฮามา และคณะ (Nishihama, et al. 1981 : 28 - 33) ได้สกัดแยกสารจากส่วนที่อยู่เหนือดินของต้นโหมแจ่วนา (*H. diffusa* Willd.) โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบ iridoids glucosides 4 ชนิด ได้แก่ asperuloside ซึ่งเป็นสารที่เคยพบแล้ว ส่วนอีก 3 ชนิด เป็นสารใหม่ ได้แก่ 6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester (**1**) 6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester (**2**) และ 6-*O*-*p*-feruloyl scandoside methyl ester (**3**) สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 3



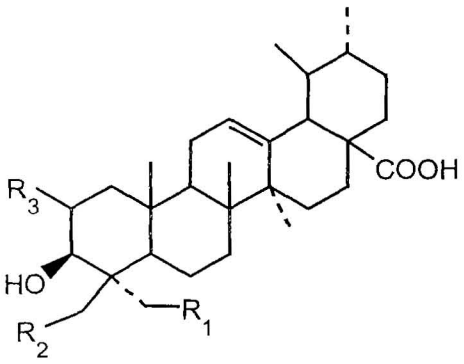
ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. diffusa* Willd.

ทาคาจิ และคณะ (Takagi, et al. 1981 : 657 - 659 ; citing chemical abstract. 1981 : 413) ได้สกัดแยกสารจากหญ้าลิ้นงู (*H. corymbosa* Lamk.) พบ iridoids 6 ชนิด ได้แก่ asperuloside scandoside methyl ester asperrulosidic acid scandoside geniposidic acid และ deacetyl asperulosidic acid สูตรโครงสร้างของ asperuloside แสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของ asperuloside

คิคุชิ และคณะ (Kikuchi, et al. 1984 : 3906 - 3911) ได้สกัดแยกสารจากก้านและใบของต้น *H. lawsoniae* โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ triterpenes 19 ชนิด ในจำนวนนี้มี 16 ชนิด เป็นสารที่เคยพบแล้วได้แก่ ursolic acid 3-epiursolic acid ursonic acid asiatic acid euscaphic acid oleanolic acid oleanonic acid sumaresinolic acid hederagenin arjunolic acid butulinic acid butuline 2α-hydroxyursolic acid 2α-hydroxyepiursolic acid 2α,3α,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid และ benthamic acid ส่วนอีก 3 ชนิด เป็นสารใหม่ ได้แก่ 3β,23-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**4**) 3β,24-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**5**) และ 2α,3β,24-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid (**6**) สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 5



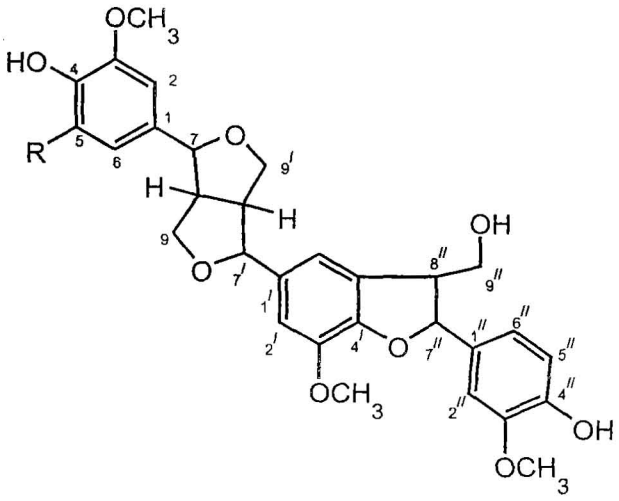
(**4**) R_1 = H ; R_2 = OH ; R_3 = H

(**5**) R_1 = OH ; R_2 = H ; R_3 = H

(**6**) R_1 = OH ; R_2 = H ; R_3 = OH

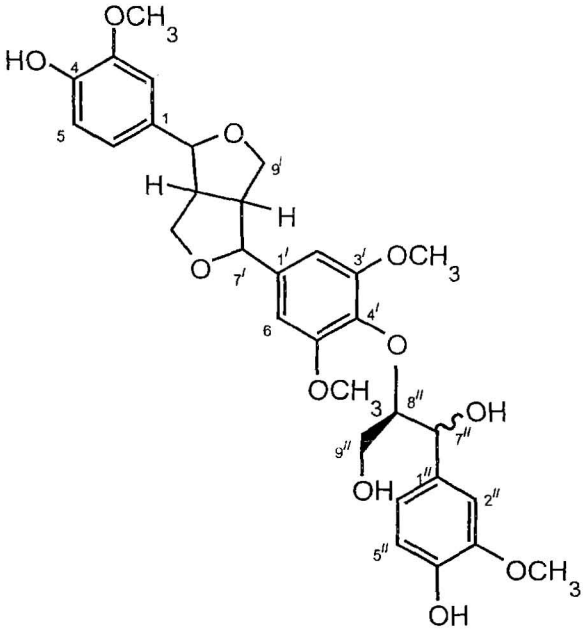
ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม triterpenes ชนิดใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. lawsoniae*

คิคุชิ และคณะ (Kikuchi, et al. 1985 : 1444 - 1451) ได้สกัดแยกสารจากใบแห้งของต้น *H. lawsoniae* โดยใช้ ether และ methanol เป็นตัวทำละลาย ตามลำดับ แล้วนำสารที่สกัดได้มาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ lignans 8 ชนิด ในจำนวนนี้มี 4 ชนิด เป็นสารที่เคยพบแล้ว ได้แก่ (+)-pinoresinol (+)medioresinol (+)-syringaresinol และ (-)-dehydrodiconiferyl alcohol ส่วนอีก 4 ชนิด เป็นสารใหม่ ได้แก่ hedyotal-A (**7**) hedyotal-B (**8**) hedyotal-C (**9**) และ hedyotal-D (**10**) สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 6



(**7**) R = H

(**8**) R = OCH_3

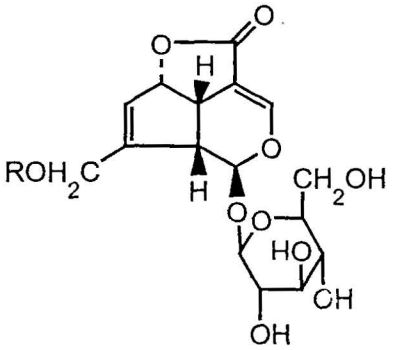


(**9**) $7''$-β-OH

(**10**) $7''$-α-OH

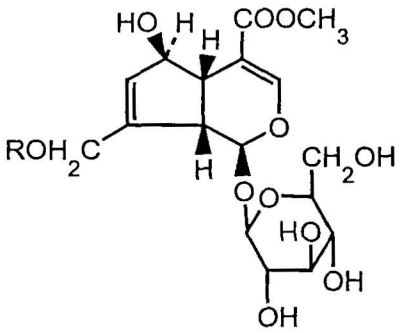
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม lignans ชนิดใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. lawsoniae*

โอทสุกะ และคณะ (Otsuka, et al. 1991 : 2049 - 2052) ได้สกัดแยกสารจากส่วนที่อยู่เหนือดินของหญ้าลิ้นงู (*O. corymbosa* Linn.) โดยใช้ hexane และ methanol เป็นตัวทำละลาย พบอนุพันธ์ของ iridoid glucoside 9 ชนิด ได้แก่ deacetyl asperuloside (**11**) asperuloside(**12**) asperulosidic acid (**13**) deacetyl asperulosidic acid (**14**) และ scandoside methyl ester (**15**) ส่วนอีก 4 ชนิดเป็นสารใหม่ ได้แก่ 10-*O*-benzoyl deacetyl asperulosidic acid methyl ester (**16**) 10-*O*-benzoyl scandoside methyl ester (**17**), 10-*O-p*-hydroxybenzoyl scandoside methyl ester (**18**) และ 10-*O-p-trans, cis*-benzoyl deacetyl scandoside methyl ester (**19**) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 7



(**11**) R = H

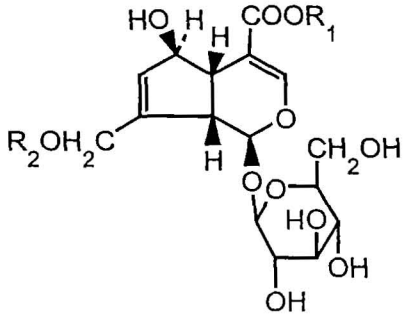
(**12**) R = CH_3CO-



(**13**) R_1 = H ; R_2 = CH_3CO-

(**14**) R_1 = H ; R_2 = H

(**15**) R_1 = CH_3 ; R_2 = Bz

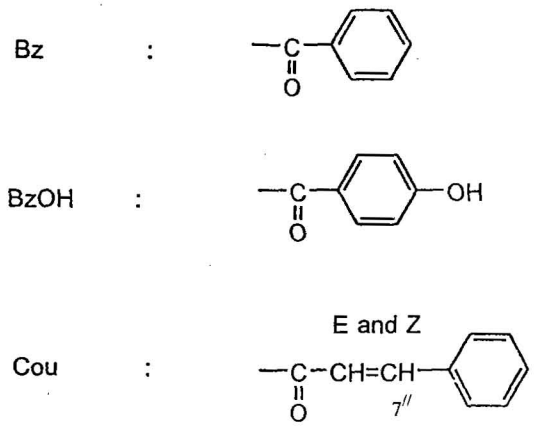


(**16**) R = H

(**17**) R = Bz

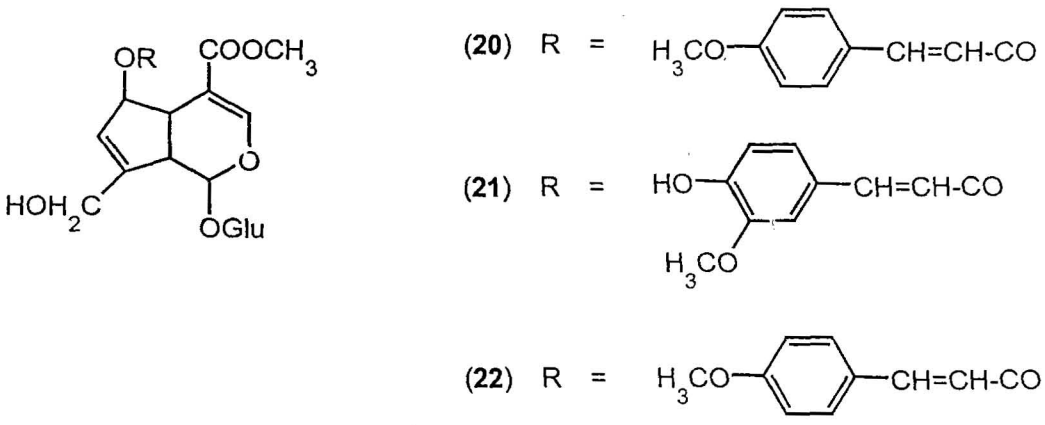
(**18**) R = BzOH

(**19**) R = Cou



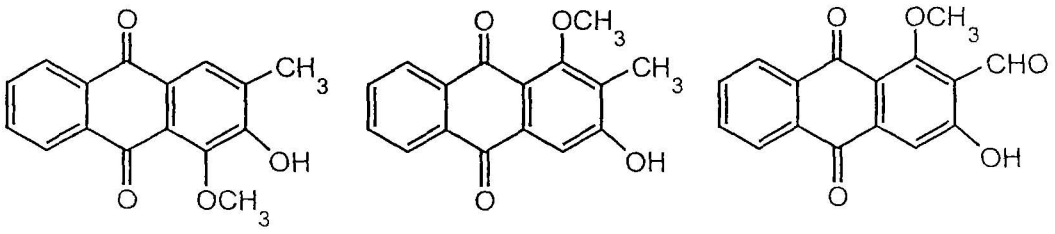
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู

วู และคณะ (Wu, et al. 1991 : 254 - 256) ได้สกัดแยกสารจากส่วนที่อยู่เหนือดินของต้นโหมแจ่วนา (*H. diffusa* Willd.) โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ iridoids glucoside 6 ชนิด สาร 3 ชนิด เป็นสารที่เคยพบแล้ว ได้แก่ *E*-6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester *E*-6-*O*-feruloyl scandoside methyl ester และ *E*-6-*O*-*p*-coumaroyl scandoside methyl ester ส่วนอีก 3 ชนิด เป็นสารใหม่ ได้แก่ *Z*-6-*O*-*p*-methoxycinnamoyl scandoside methyl ester (**20**) *Z*-6-*O*-*p*- feruloyl scandoside methyl ester (**21**) และ *Z*-6-*O*-*p*- coumaroyl scandoside methyl ester (**22**) สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของสารใหม่ที่แยกได้จากต้น *H. diffusa* Willd.

เคอมาโกล และคณะ (Koumaglo, et al. 1992 : 533 - 534) ได้สกัดแยกสารจากราก และเปลือกของต้น *Morinda lucida* โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดที่ได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบ anthaquinones 3 ชนิด ได้แก่ digitolutein (**23**) rubiadin 1-methyl ether (**24**) และ damnacanthal (**25**) (สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 9) เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย (antimalarial) โดยใช้เชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* พบว่าสาร ดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรียที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 12.92 8.10 และ 9.20 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่า chloroquin ที่ใช้เป็นยารักษามาลาเรีย



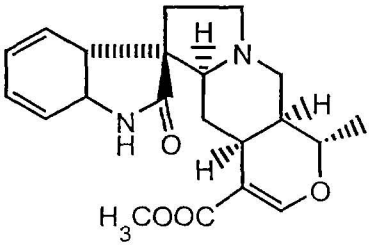
(**23**) (**24**) (**25**)

ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *M. lucida*

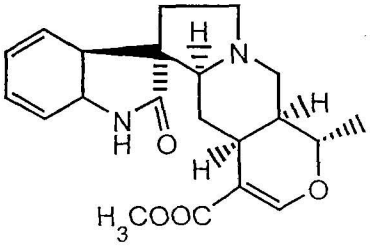
ฮามซาฮ์ ลาจิส และสาร์เจนท์ (Hamzah, Lajis & Sargent. 1994 : 388 - 389) ได้สกัดแยกสารจากใบสดของต้นดองแห้งหิน (*H. verticillata* Lamk.) โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร flavonoids คือ 3,7-bis-(α-6-deoxymannopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-chromen-4-one (kaemferitrin) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองสด จุดหลอมเหลว 217 - 219 ^{o}C ซึ่งสารประกอบชนิดนี้แสดงความเป็นพิษต่อไรกุ้ง (brine shimp) ที่ค่า LC_{50} 21.9 µg/mL

ลี และคณะ (Lee, et al. 1999 : 759 - 760) ได้สกัดแยกสารจากเปลือกของต้น *Uncaria guinensis* โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reversed phase preparative chromatography พบ indole alkaloids 2 ชนิด ได้แก่ uncarine C (**26**) และ uncarine E (**27**) (สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 10) เมื่อนำสารดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด

3T3 H460 ME180 DU145 LSR และ C678 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับปานกลางด้วยค่า IC_{50} 17 - 51 µg/mL นอกจากนี้สารดังกล่าวยังมีฤทธิ์อ่อน ๆ ในการต้านยีสต์สายพันธุ์ RS321N และ RS322 ด้วยค่า IC_{50} 120 - 680 µg/mL แต่สารทั้งสองชนิดไม่มีฤทธิ์ในการต้านยีสต์สายพันธุ์ RS188N



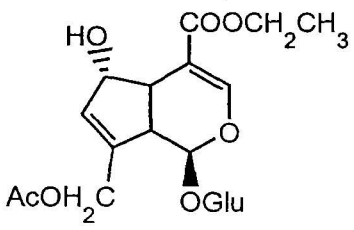
(26)



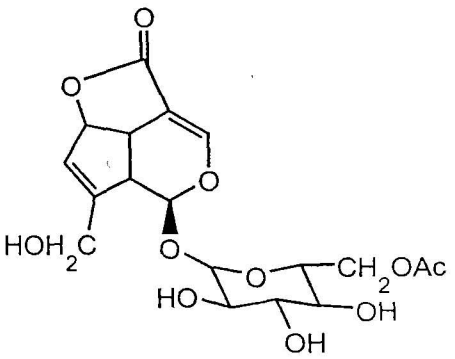
(27)

ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *U. guinensis*

เป็ง เฟ็ง และเหลียง (Peng, Feng & Liang. 1999 : 611 - 612) ได้สกัดแยกสารจากต้น *H. chrysotricha* โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย แล้วนำสารสกัดที่ได้มาละลายน้ำ นำส่วนที่ละลายในน้ำมาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ iridoids glucosides 2 ชนิด ได้แก่ asperusidic acid ethyl ester (**28**) และ 6′-acetyl deacetyl asperuloside (**29**) สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 11



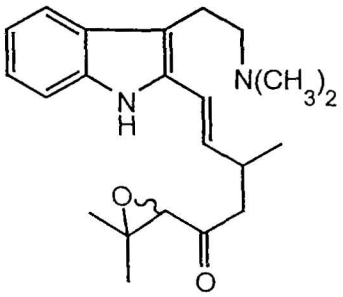
(28)



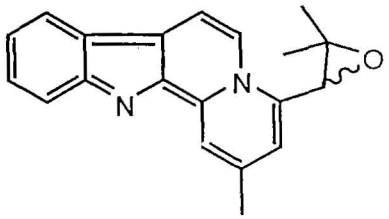
(29)

ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. chrysotricha*

เฟือง และคณะ (Phuong, et al. 1999 : 761 - 762) ได้สกัดแยกสารจากต้น *H. capitellata* var. *mollis* โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบ β-carboline alkaloids 2 ชนิด ซึ่งเป็นสารใหม่ ได้แก่ hedyocapitelline (**30**) และ hedyocapitine (**31**) สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 12



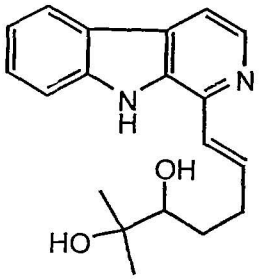
(**30**)



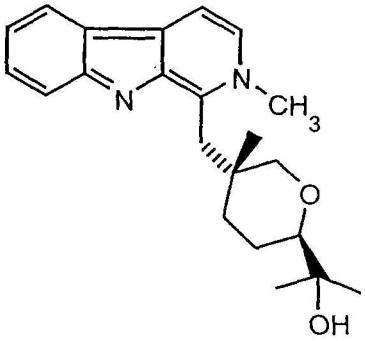
(**31**)

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. capitellata* var. *mollis*

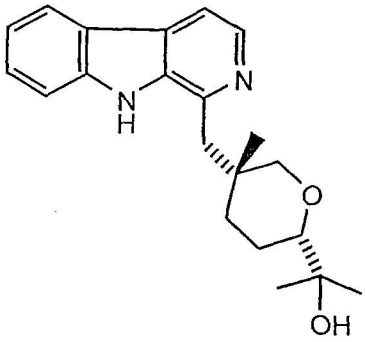
เฟือง และคณะ (Phuong, et al. 1999 : 1725 - 1729) ได้สกัดแยกสารจากต้น *H. capitellata* โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย นำสารที่สกัดได้มาทำ solvent partition แล้วนำมาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบ β-carboline alkaloids 5 ชนิด ในจำนวนนี้มี 2 ชนิด เป็นสารที่เคยพบแล้ว ได้แก่ capitelline (**32**) และ chrysotricine (**33**) ส่วนอีก 3 ชนิด เป็นสารใหม่ ได้แก่ (-)-isocyclocapitelline (**34**) (+)-cyclocapitelline (**35**) และ (-)-isochrysotricine (**36**) สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้แสดงในภาพประกอบ 13



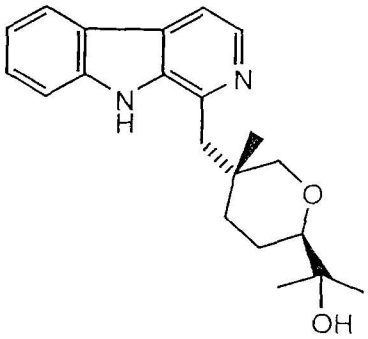
(32)



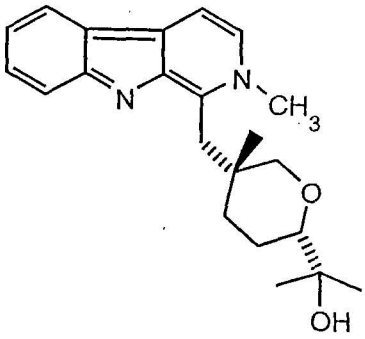
(33)



(34)



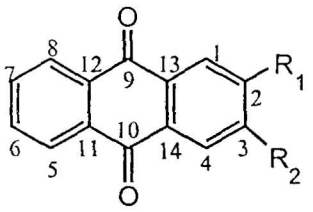
(35)



(36)

ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากต้น *H. capitellata*

ซิทที และคณะ (Sittie, et al. 1999 : 259 - 261) ได้สกัดแยกสารจากรากของต้น *M. lucida* โดยใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย แล้วนำสารที่สกัดได้มาแยกต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบอนุพันธ์ของ anthraquinones เมื่อนำสารดังกล่าวไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร โดยนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์ *Plasmodium falciparum* ชนิดอ่อนแอต่อยา chloroquine (chloroquine-susceptible (3D7)) และชนิดดื้อต่อยา chloroquine (chloroquine-resistant (Dd2)) และฤทธิ์ในการต้านเชื้อลิชมาเนียล (antileishmanial) ซึ่งใช้เชื้อสายพันธุ์ *Leishmanial major* พบว่าฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว จะเพิ่มขึ้นถ้าโครงสร้างของสารที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 เป็นหมู่ aldehyde และคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็นหมู่ hydroxy สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารพวก anthraquinones แสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 สูตรโครงสร้างทั่วไปของสารพวก anthraquinones

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือหญ้าลิ้นงูทั้งต้นได้จากนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี ซึ่งซื้อมาจากอำเภอวิเชียรบุรี จังหวัดเพชรบูรณ์ เมื่อ พ.ศ. 2539 ได้ผ่านการตรวจสอบเอกลักษณ์โดยคุณณรงค์ นันทแสน นักวิชาการกรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนพหลโยธิน กรุงเทพมหานคร

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

เซลล์มะเร็งที่ใช้สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ใช้เซลล์มะเร็ง P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู ได้จากงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู และทำสารให้บริสุทธิ์

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 2.50 5 และ 10 cm
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
3. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
4. หลอดอัลตราไวโอเลต (Spectroline ENF - 260 C/F)
5. Freeze - Dryer (FTS System FD - 3 - 55D - MP)
6. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT - IR Spectrum BX)
7. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
8. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AM 400, 400 MHz)
9. Rotary Evaporator (Buchi Rotavapor R - 114)

สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ hexane chloroform ethanol ethyl acetate และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
2. Anisaldehyde (E. Merck, AR grade)
3. conc. Sulfuric acid (E. Merck, AR grade)
4. Glacial acetic acid (E. Merck, AR grade)
5. Silica gel สำหรับโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
   - Silica gel 60 (< 0.063 mm, E.Merck, AR grade)
   - Silica gel 60 (0.063 - 0.200 mm, E.Merck, AR grade)
6. silica gel 60 GF_{254} สำหรับโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (E.Merck, AR grade)

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

อุปกรณ์/เครื่องมือ

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

สารเคมี

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

วิธีดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

- สกัดสารจากหญ้าลิ้นงูโดยใช้ hexane และ ethanol เป็นตัวทำละลาย
- นำสารสกัดหยาบจาก hexane และ ethanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง
- นำสารสกัดหยาบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มาแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี bioassay directed fractionation
- การแยกสารใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
- การตรวจสอบส่วนที่แยกได้ใช้เทคนิค TLC การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้แสง UV และ spray reagent
- นำสารบริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์

1. การสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู

1.1 การสกัดสารด้วย hexane

นำหญ้าลิ้นงูที่อบแห้งและบดละเอียด 1.62 kg แช่ใน hexane 12 L นาน 2 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้มากรอง ส่วนกากที่เหลือนำมาแช่ใน hexane อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 12 L รวมสารสกัดทั้งหมด ทำให้เข้มข้นโดยระเหย hexane ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ hexane (crude hexane extract) หนัก 47 g นำสารบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 15)

1.2 การสกัดสารด้วย ethanol

กากที่เหลือจากการสกัดด้วย hexane แล้วนำมาผึ่งให้แห้งแล้วสกัดด้วย ethanol 12 L นาน 2 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้มากรอง ส่วนกากที่เหลือนำมาแช่ใน ethanol อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 12 L รวมสารสกัดทั้งหมด ทำให้เข้มข้นโดยระเหย ethanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ ethanol (crude ethanol extract) หนัก 223 g นำสารบางส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 15)

2. การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดทั้ง hexane และ ethanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจลประมาณ 1 : 25 โดยน้ำหนัก (Pavia, et al. 1995 : 732) ใช้วิธีบรรจุซิลิกาเจลแบบเปียก แล้วชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนไประเหย

ตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้แสง UV ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm หรือใช้ anisaldehyde - sulfuric acid พ่นบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อนที่ 80 - 100 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารแต่ละกลุ่มที่มีขั้วใกล้เคียงกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำส่วนที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมาแยกต่อด้วยโครมาโท - กราฟีแบบคอลัมน์ จากนั้นนำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารบริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 16 - 25)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (Murine lymphocytic leukemia cells, P388) เป็น cell suspension เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 mL พื้นที่ผิว 25 cm^{2} โดยใช้ RPMI 1640 ผสมกับ NCS 10% เป็นอาหารเลี้ยง ปรับค่า pH 7.00 - 7.20 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C ในตู้บ่มที่มี CO_2 5% และ subculture 2 ครั้ง/สัปดาห์ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 3 - 4 วัน มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) ดังนี้

1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่วขวด แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มา 0.20 mL ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.40% trypan blue dye ลงไป 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5 - 10 นาที

1.2 การนับเซลล์

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

ตัวอย่างการคำนวณเซลล์ที่นับได้

ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 5 ช่องเล็ก = 125 เซลล์

ปริมาตรเซลล์ suspension ใน 1 ช่องเล็ก = ความกว้าง x ความยาว x ความลึก

= 0.10 cm x 0.10 cm x 0.01 cm

= 0.0001 mL

= 10^{-4} mL

แต่เซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue dye เป็น 2 เท่า

ดังนั้น จำนวนเซลล์ใน 5 ช่องเล็ก = 125 x 2 เซลล์

จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก (10^{-4} mL) = 125 x 2/5 เซลล์

ปริมาตร 10^{-4} mL มีเซลล์ = 125 x 2/5 เซลล์

ปริมาตร 1 mL มีเซลล์ = 125 x 2/5 x 10^{4} เซลล์

= 5 x 10^{5} เซลล์

ถ้าต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ปริมาณ 5 x 10^{4} เซลล์/mL

dilution number (D.N.) = 5 x 10^{5} / 5 x 10^{4}

= 10

นั่นคือ จะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 10 เท่า ดังนั้น ถ้าต้องการใช้เซลล์ปริมาณ 5 x 10^{4} เซลล์/mL จะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 9 mL ก็จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบ 4 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO 0.10 mL ละลายสารตัวอย่างให้หมดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ในปริมาตร 4 mL

3. การเตรียมสารละลาย negative control

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

4. การเตรียมสารละลาย positive control

ใช้ micropipette ดูดสารละลาย 5 - Fluorouracil (5 - FU) ที่มีความเข้มข้น 250 mg/5 mL มา 5 µL ซึ่งมีเนื้อสารเท่ากับ 250 µg ใส่ในหลอดทดลอง เติม 2.50% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 mL ได้สารที่มีความเข้มข้น 50 µg/mL เจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 4 µg/mL

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เติมสารตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2 หรือ positive control ที่เตรียมในข้อ 4 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี สารละลาย negative control ให้ได้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบตามความต้องการ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 4 วัน โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 1 ตารางแสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

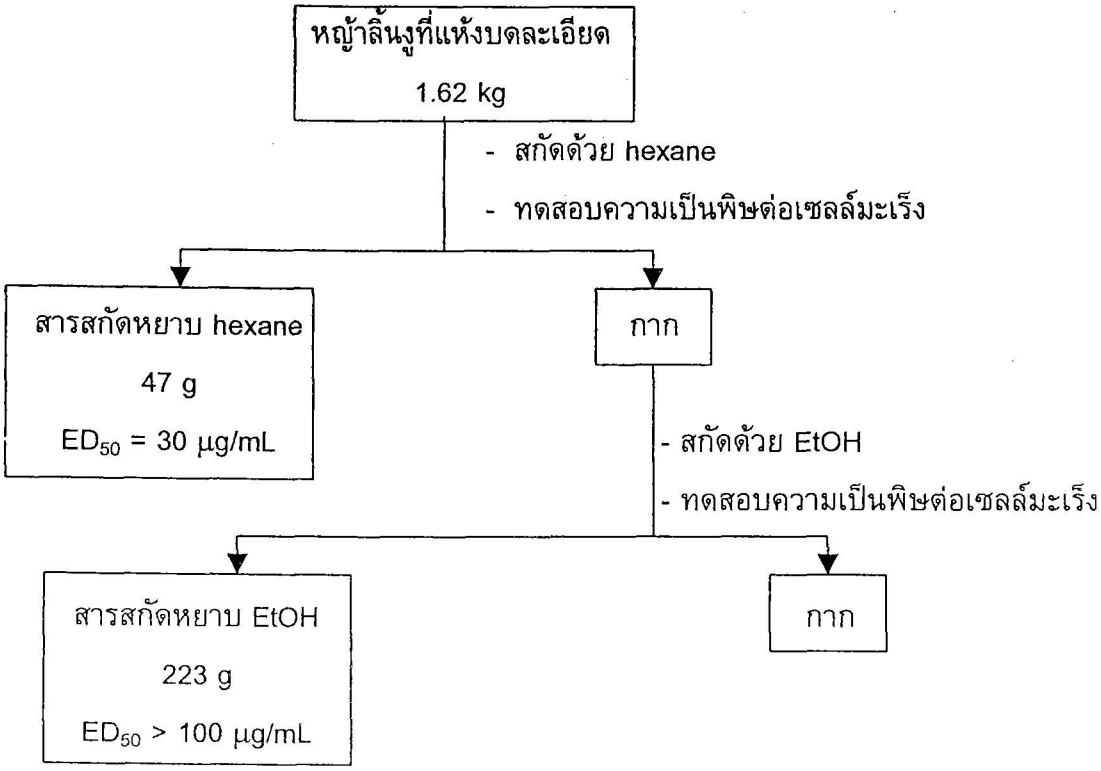
ความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (µg/mL)	อาหารเลี้ยงเซลล์ (mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volume (mL)	DMSO (%)
0	3	0.00	1.00	1	5	0.50
10	3	0.05	0.95	1	5	0.50
30	3	0.15	0.85	1	5	0.50
50	3	0.25	0.75	1	5	0.50
100	3	0.50	0.50	1	5	0.50

6. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

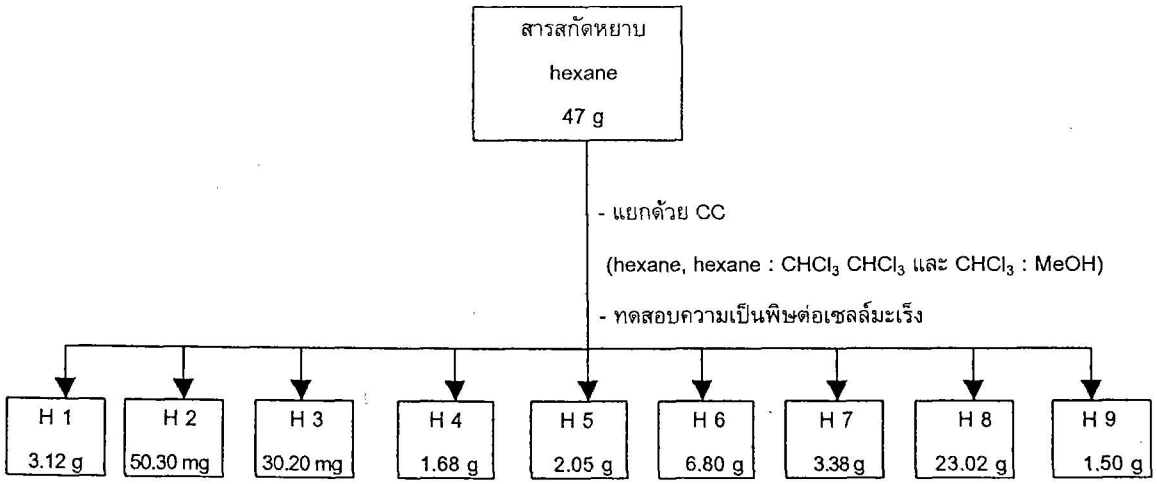
นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 และ 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากผลที่นับได้นำมาหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1) ดังนี้

$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}} \times 100 \quad (1)$$

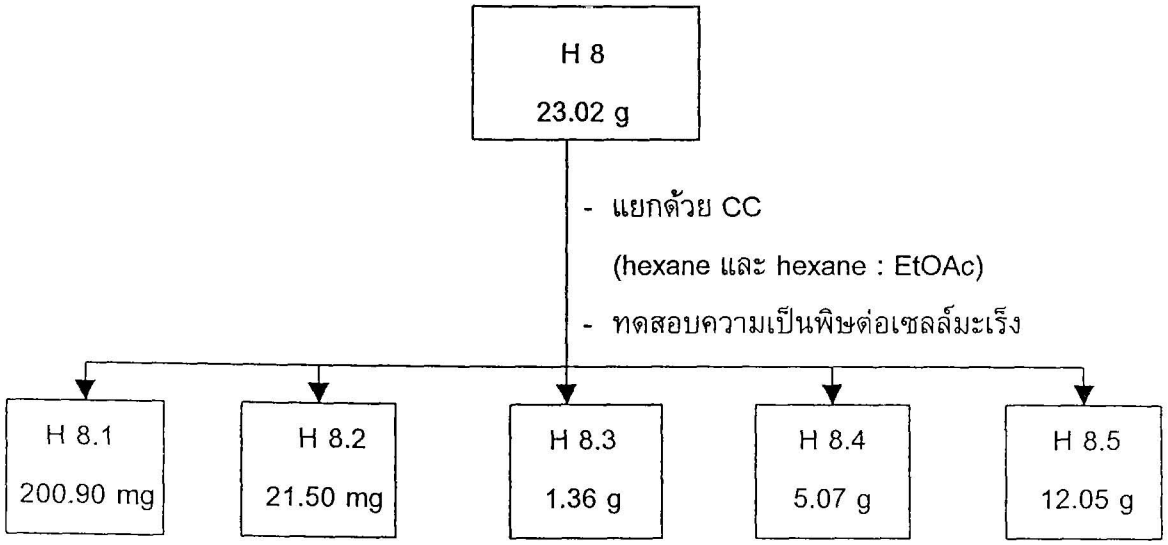
7. การหาค่า ED_{50} หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 (แกน Y) ซึ่งคำนวณจากสมการ (1) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่าง (แกน X) บนกระดาษกราฟปกติ จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งเป็นค่า ED_{50} มีหน่วยเป็น µg/mL



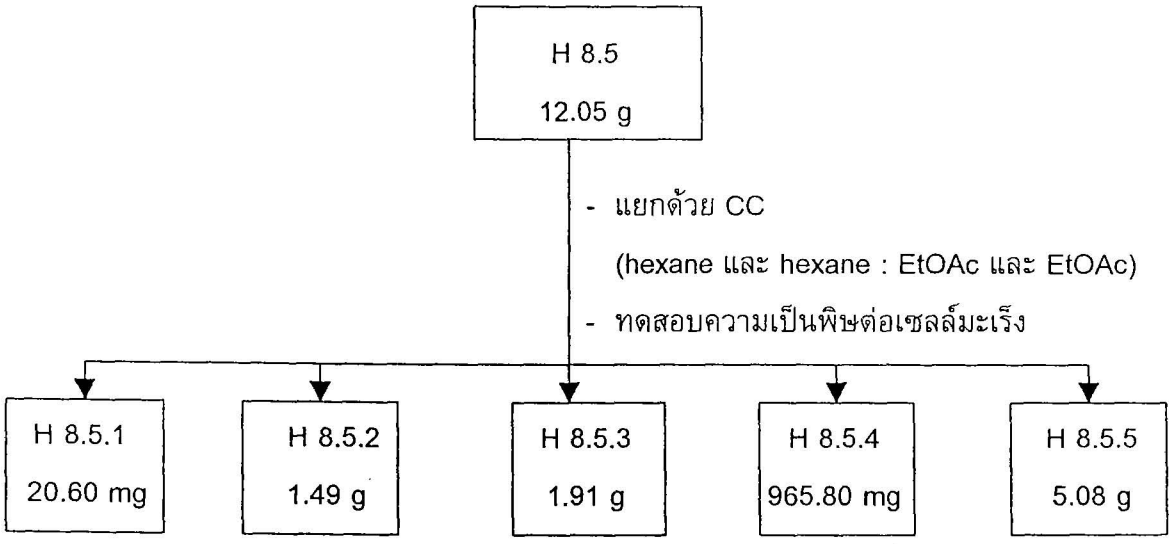
ภาพประกอบ 15 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู



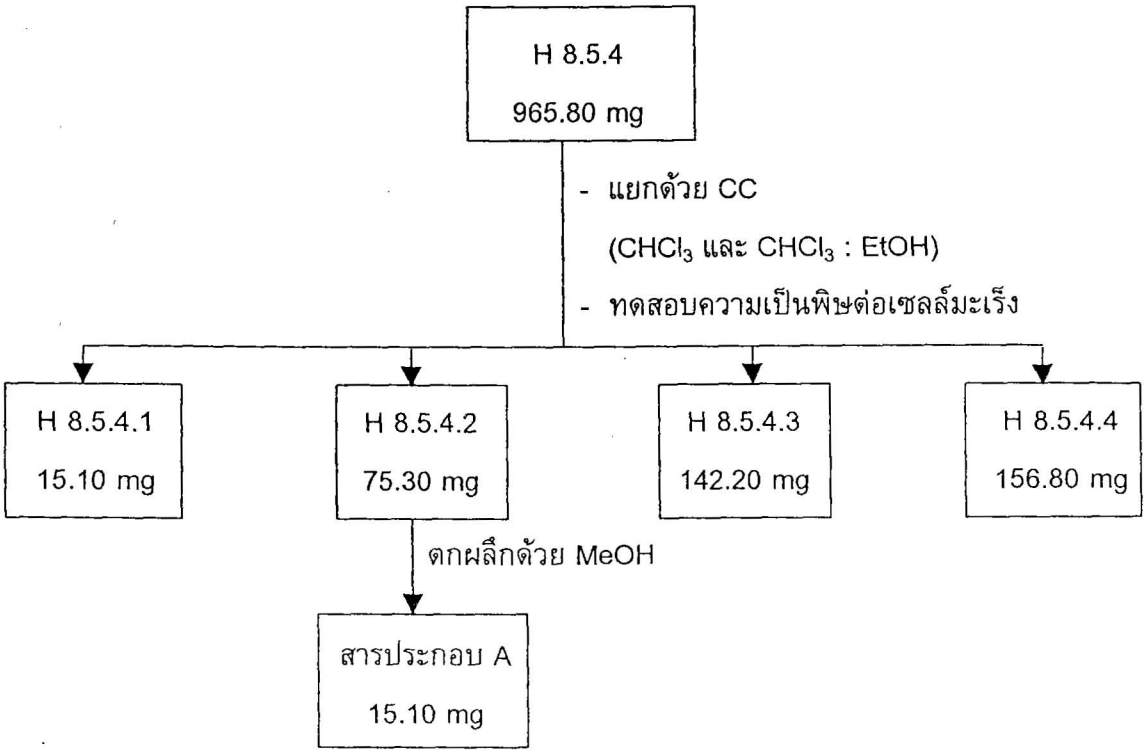
ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane



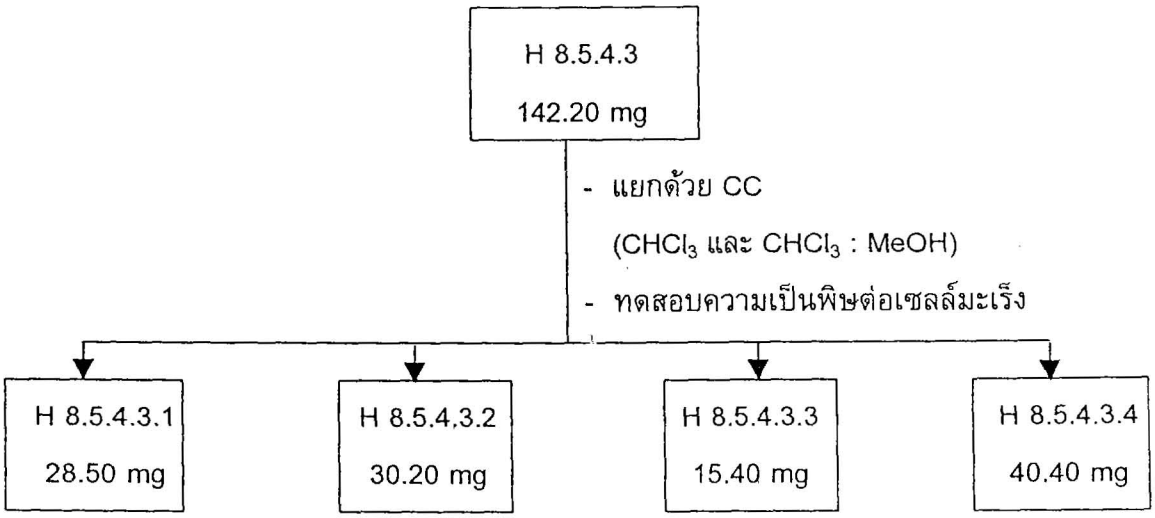
ภาพประกอบ 17 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8



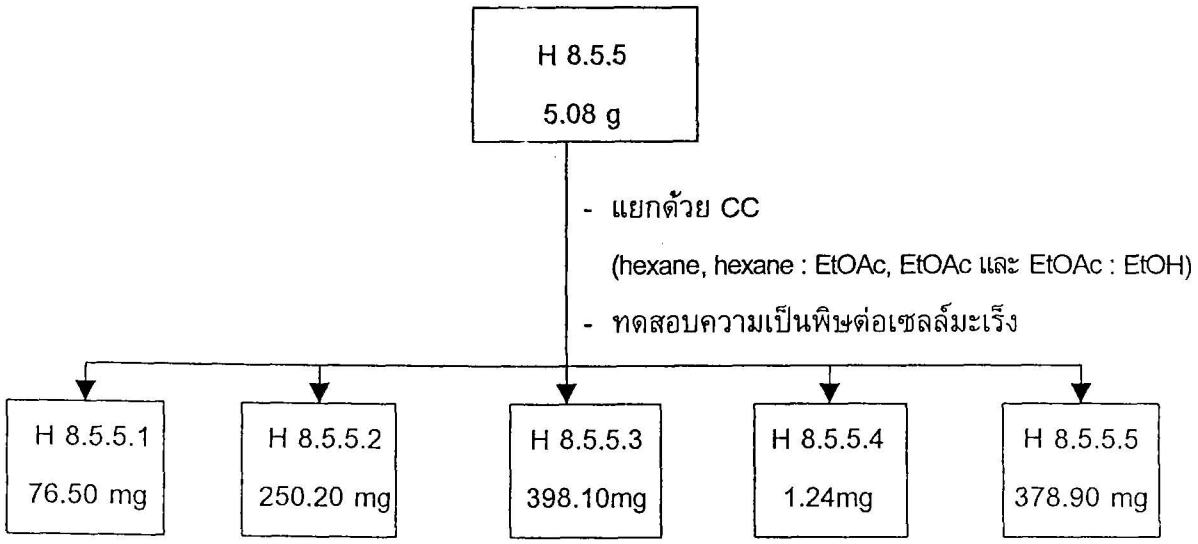
ภาพประกอบ 18 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5



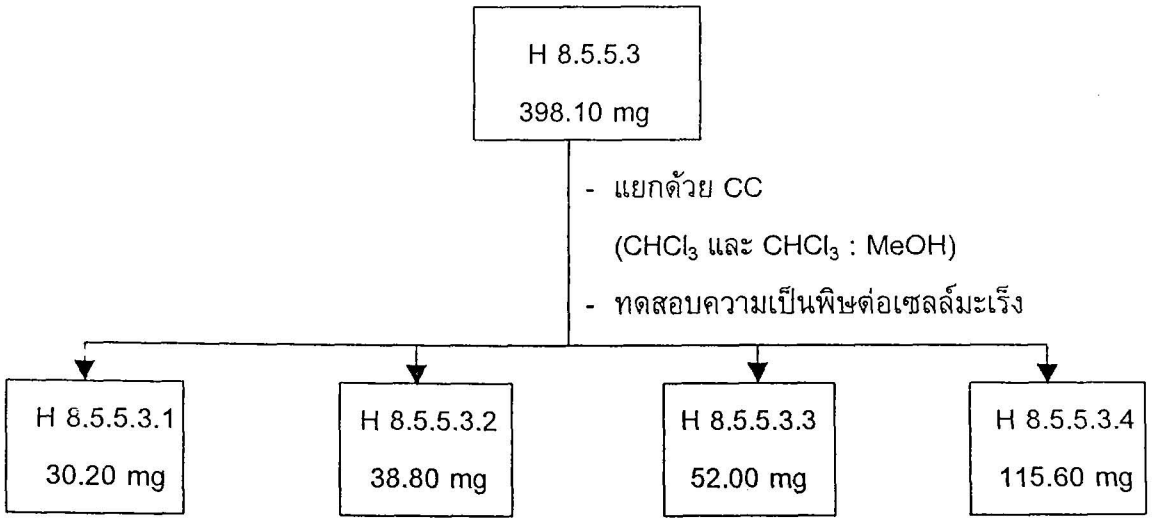
ภาพประกอบ 19 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4



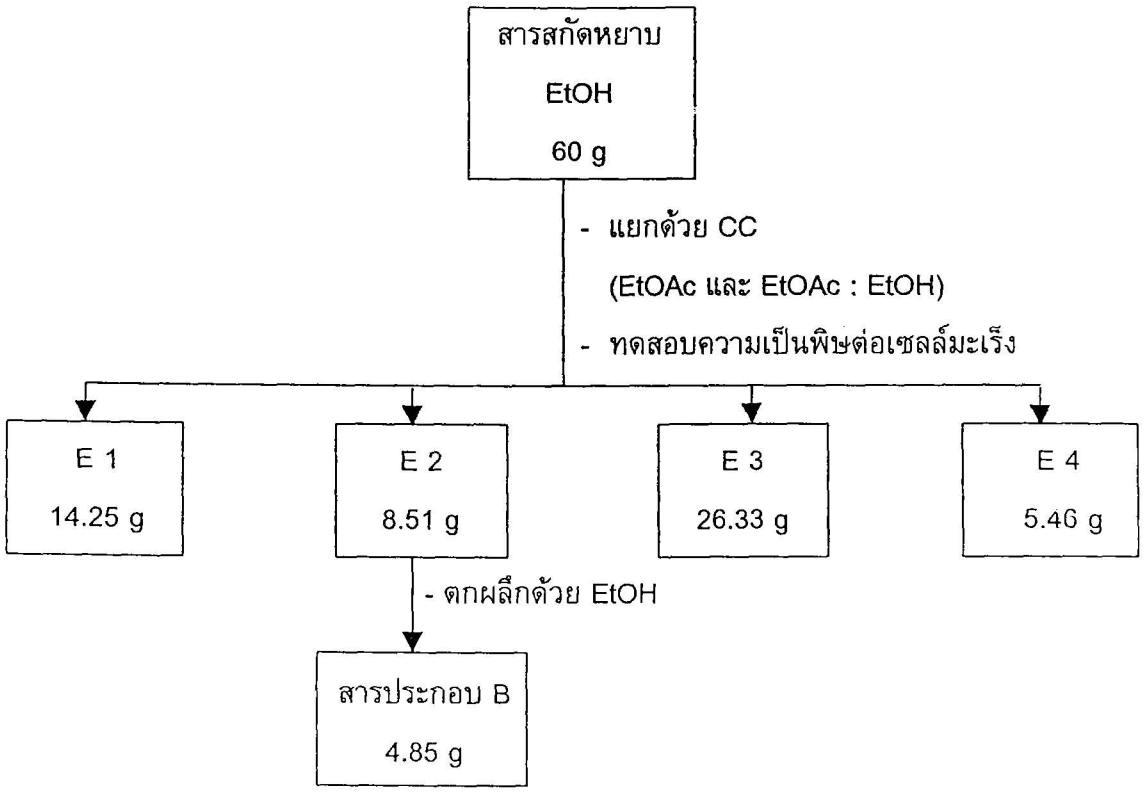
ภาพประกอบ 20 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3



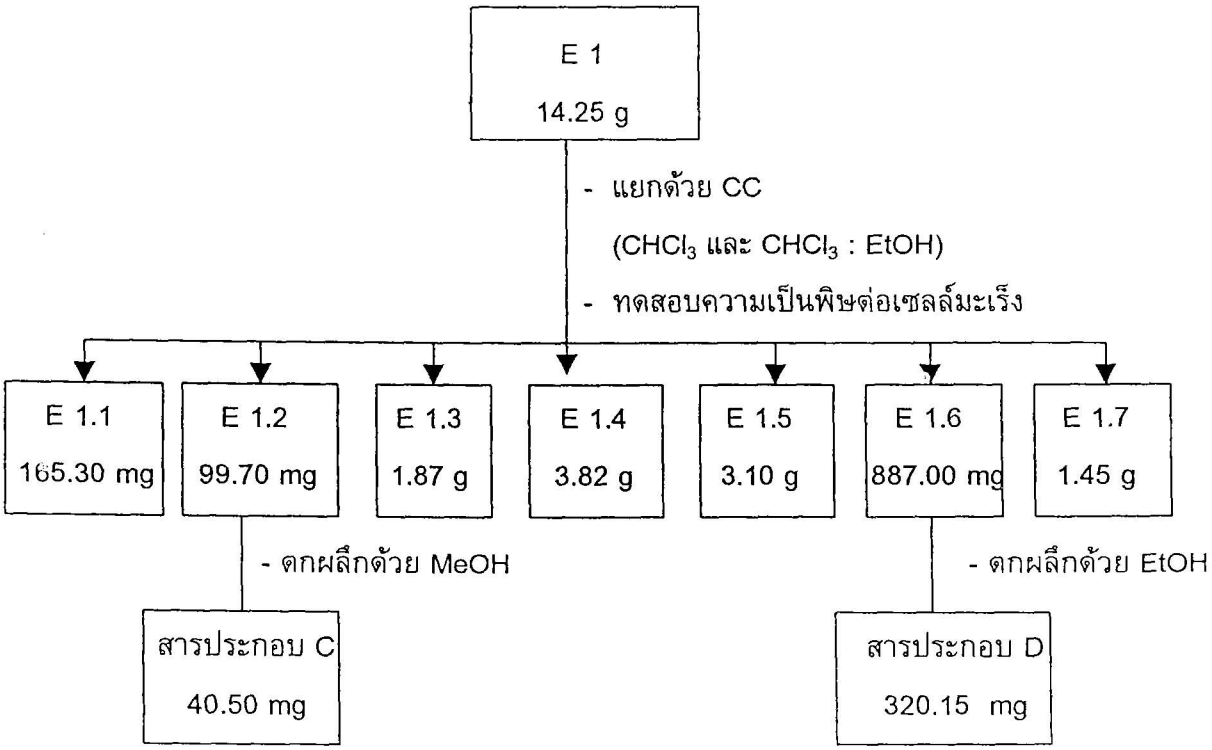
ภาพประกอบ 21 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5



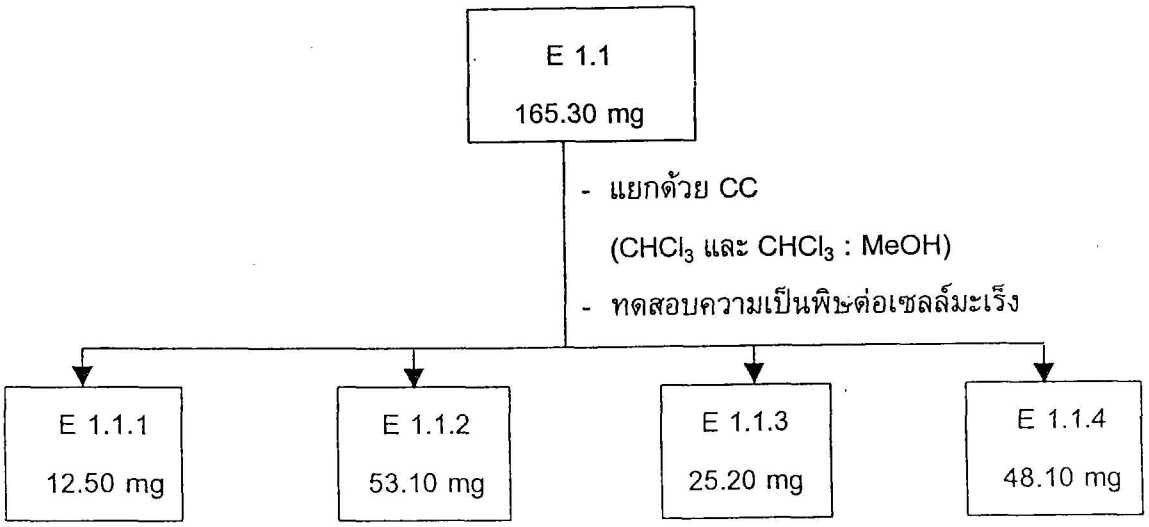
ภาพประกอบ 22 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3



ภาพประกอบ 23 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด ethanol



ภาพประกอบ 24 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 1



ภาพประกอบ 25 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E 1.1

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการสกัดสารจากหญ้าลิ้นงู

นำหญ้าลิ้นงู 1.62 kg มาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane เป็นสารเหนียวหนืดสีเขียวเข้มหนัก 47 g และสารสกัด ethanol เป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้มหนัก 223 g

ผลการแยกสารสกัด Hexane และทำสารให้บริสุทธิ์

1. นำสารสกัด hexane หนัก 47 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane : chloroform chloroform และ chloroform : methanol โดยค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 200 - 250 mL นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สาร 9 กลุ่ม (ตาราง 2) นำแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 15) จึงนำสารกลุ่ม H 8 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์

ตาราง 2 ผลการแยกสารสกัด hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : $CHCl_3$	(90 : 10)	H 1	3.12 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(80 : 20)	H 2	50.30 mg	คราบสีขาว
	(60 : 40)	H 3	30.20 mg	คราบสีขาว
	(50 : 50)	H 4	1.68 g	สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
	(30 : 70)	H 5	2.05 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(10 : 90)	H 6	6.80 g	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลือง
	(00 : 100)	H 7	3.38 g	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเขียว
$CHCl_3$: MeOH	(96 : 4)	H 8	23.02 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(80 : 20)	H 9	1.50 g	สารเหนียวสีเขียว

2. นำสารกลุ่ม H 8 หนัก 23.02 g มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane และ hexane :ethyl acetate เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 - 150 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 3) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 16) จึงนำสารกลุ่ม H 8.5 มาแยกต่อ

ตาราง 3 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(95 : 5)	H 8.1	200.90 mg	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(80 : 20)	H 8.2	21.50 mg	สารเหนียวสีเขียว
	(60 : 40)	H 8.3	1.36 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(40 : 60)	H 8.4	5.07 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(20 : 80)	H 8.5	12.05 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม

3. นำสารกลุ่ม H 8.5 หนัก 12.05 g มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane :ethyl acetate และ ethyl acetate เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 70 - 100 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 4) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4 และ H 8.5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 17) จึงนำสารกลุ่ม H 8.5.4 และ H 8.5.5 มาแยกต่อ

ตาราง 4 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(90 : 10)	H 8.5.1	20.60 mg	คราบสีเหลือง
	(80 : 20)	H 8.5.2	1.49 g	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
	(60 : 40)	H 8.5.3	1.91 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(40 : 60)	H 8.5.4	965.80 mg	สารเหนียวสีเขียวอ่อน
	(00 : 100)	H 8.5.5	5.08 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม

4. นำสารกลุ่ม H 8.5.4 หนัก 965.80 mg มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ chloroform และ chloroform : ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 20 - 30 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 5) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 18) จึงนำสารกลุ่ม H 8.5.4.3 มาแยกต่อ

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOH	(100 : 00)	H 8.5.4.1	15.10 mg	คราบสีเหลือง
	(96 : 4)	H 8.5.4.2	75.30 mg	ของแข็งสีขาว
	(92 : 8)	H 8.5.4.3	142.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(80 : 20)	H 8.5.4.4	156.80 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

5. สารกลุ่ม H 8.5.4.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาว หนัก 15.10 mg เรียกว่าสารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

6. นำสารกลุ่ม H 8.5.4.3 หนัก 142.20 mg มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวละลายดังนี้ chloroform และ chloroform : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 5 - 10 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 6) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 20) เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ายังมีสารอีกหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.4.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: MeOH	(98 : 2)	H 8.5.4.3.1	28.50 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(94 : 6)	H 8.5.4.3.2	30.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(90 : 10)	H 8.5.4.3.3	15.40 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(85 : 15)	H 8.5.4.3.4	40.40 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

7. นำสารกลุ่ม H 8.5.5 หนัก 5.08 g แยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane : ethyl acetate ethyl acetate และ ethyl acetate : ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 - 70 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 7) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.5.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 19) จึงนำสารกลุ่ม H 8.5.5.3 มาแยกต่อ

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(80 : 20)	H 8.5.5.1	76.50 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(50 : 50)	H 8.5.5.2	250.20 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(30 : 70)	H 8.5.5.3	398.10 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(00 : 100)	H 8.5.5.4	1.24 g	สารเหนียวสีเขียว
EtOAc : EtOH	(90 : 10)	H 8.5.5.5	378.90 mg	สารเหนียวสีเขียว

8. นำสารกลุ่ม H 8.5.5.3 หนัก 398.10 mg มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ chloroform และ chloroform : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 20 - 30 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 8) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 21) เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ายังมีสารอีกหลายชนิดจึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม H 8.5.5.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: MeOH	(98 : 2)	H 8.5.5.3.1	30.20 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(94 : 6)	H 8.5.5.3.2	38.80 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(90 : 10)	H 8.5.5.3.3	52.00 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม
	(80 : 20)	H 8.5.5.3.4	115.60 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

ผลการแยกสารสกัด ethanol และทำสารให้บริสุทธิ์

1. นำสารสกัด ethanol หนัก 60 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ ethyl acetate และ ethyl acetate : ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 200 - 300 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 9) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 24) จึงนำสารกลุ่ม E 1 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์

ตาราง 9 ผลการแยกสารสกัด ethanol ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
EtOAc : EtOH	(100 : 00)	E 1	14.25 g	สารเหนียวสีเขียวเข้ม
	(90 : 10)	E 2	8.51 g	ของแข็งไม่มีสีปนสารเหนียวสีเขียว
	(80 : 20)	E 3	26.33 g	สารเหนียวสีเขียว
	(70 : 30)	E 4	5.46 g	สารเหนียวสีน้ำตาลอ่อน

2. สารกลุ่ม E 2 มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสีปนสารเหนียวสีเขียว จึงนำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้ผลึกสีขาว หนัก 4.85 g เรียกว่าสารประกอบ B นำสารประกอบ B ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

3. นำสารกลุ่ม E 1 หนัก 14.25 g มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ chloroform และ chloroform : ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 - 150 mL ได้สาร 7 กลุ่ม (ตาราง 10) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 1.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 25) จึงนำสารกลุ่ม E 1.1 มาแยกต่อ

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม E 1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOH	(98 : 2)	E 1.1	165.30 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(96 : 4)	E 1.2	99.70 mg	ของแข็งสีขาว
	(94 : 6)	E 1.3	1.87 g	สารเหนียวสีเขียว
	(92 : 8)	E 1.4	3.82 g	สารเหนียวสีเขียว
	(90 : 10)	E 1.5	3.10 g	สารเหนียวสีน้ำตาล
	(85 : 15)	E 1.6	887.00 mg	ของแข็งสีขาวปนสารเหนียวสีเขียว
	(70 : 30)	E 1.7	1.45 g	สารเหนียวสีน้ำตาล

4. สารกลุ่ม E 1.2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาว หนัก 40.50 mg เรียกว่าสารประกอบ C นำสารประกอบ C ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

5. สารกลุ่ม E 1.6 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนสารเหนียวสีเขียว จึงนำมาตกผลึกด้วย ethanol ได้ผลึกสีขาว หนัก 320.15 mg เรียกว่า สารประกอบ D นำสารประกอบ D ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

6. นำสารกลุ่ม E 1.1 หนัก 165.30 mg มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ chloroform และ chloroform : ethanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 10 - 15 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 11) แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม E 1.1.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่ากลุ่มอื่น (ตาราง 26) เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC พบว่ายังมีสารอีกหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ แต่นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED_{50}

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม E 1.1 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะสาร
$CHCl_3$: EtOH	(100 : 0)	E 1.1.1	12.50 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(98 : 2)	E 1.1.2	53.10 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(94 : 6)	E 1.1.3	25.20 mg	สารเหนียวสีเหลือง
	(85 : 15)	E 1.1.4	48.10 mg	สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

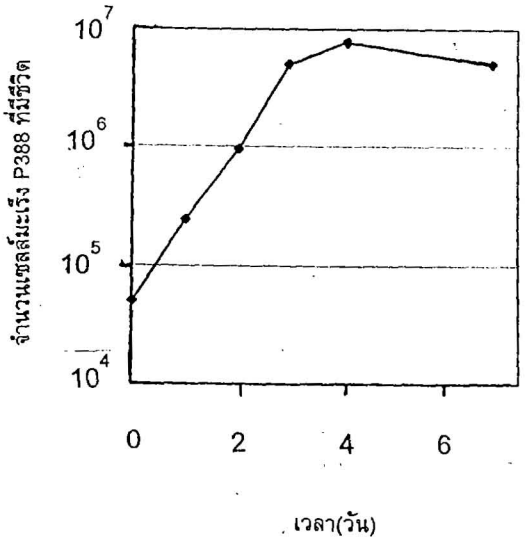
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

1. การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ ผลที่ได้แสดงในตาราง 12 นำข้อมูลมาเขียน growth curve บนกระดาษกราฟแบบ semi - logalithm ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกน X)กับจำนวนวันที่ทำการทดลอง (แกน Y) แสดงในภาพประกอบ 26

ตาราง 12 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด (5 mL)		
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย
0	5.05×10^4	5.05×10^4	5.05×10^4
1	2.20×10^5	2.60×10^5	2.40×10^5
2	9.40×10^5	9.80×10^5	9.60×10^5
3	5.30×10^6	4.62×10^6	4.96×10^6
4	7.58×10^6	7.88×10^6	7.73×10^6
7	5.78×10^6	4.32×10^6	5.05×10^6



ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P388 เจริญเติบโตได้ดีในระยะ 4 วันแรกที่ทำการทดลอง โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตสูงสุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

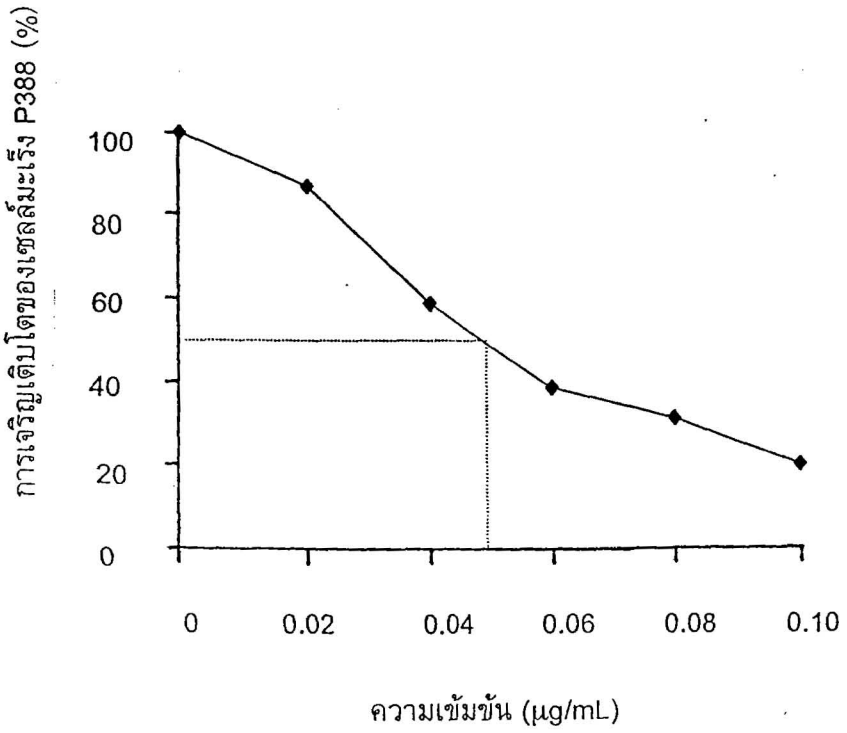
ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้ DMSO 0.50% เป็น negative control ซึ่งไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และใช้ 5 - fluorouracil เป็น positive control เพื่อยืนยันว่าเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบนี้ สามารถตอบสนองต่อสารต้านมะเร็งได้ เนื่องจากปัจจุบันสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ใช้ 5 - fluorouracil ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเป็นจำนวนมาก และจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้ 5 - fluorouracil เป็น positive control ก็ให้ผลดีมาตลอด

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ 5 - fluorouracil

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 โดยการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 ของการทดลอง ด้วยการนำ 5 - fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง แสดงในตาราง 13 และได้ค่า ED_{50} ของ 5 - fluorouracil เท่ากับ 0.048 μg/mL แสดงในภาพประกอบ 27

ตาราง 13 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของ 5 - fluorouracil ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (μg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			ของเซลล์มะเร็ง P388			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.52×10^6	5.08×10^6	5.30×10^6	100.00
0.02	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.60×10^6	4.64×10^6	4.62×10^6	87.17
0.04	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	3.24×10^6	2.96×10^6	3.10×10^6	58.49
0.06	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	2.12×10^6	1.94×10^6	2.03×10^6	38.30
0.08	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	1.86×10^6	1.42×10^6	1.64×10^6	30.94
0.10	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	9.80×10^5	1.16×10^6	1.07×10^6	20.19



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของ 5 - fluorouracil ต่อเซลล์มะเร็ง P388

เกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกากำหนดค่าความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งดังนี้ (Geran, et al. 7 - 17)

	First test	Average (first and second test)
Sequential :		
Synthetics	ED50 $\leq$ 6 µg/mL	ED50 $\leq$ 4 µg/mL
Plant extracts	ED50 $\leq$ 30 µg/mL	ED50 $\leq$ 20 µg/mL
Fermentation products	ED50 $>$ 1 : 100 dilution	ED50 $>$ 1 : 100 dilution
Confirmation :		
Synthetics		ED50 $\leq$ 6 µg/mL
Plant and animal extracts		ED50 $\leq$ 30 µg/mL
Fermentation products		ED50 $>$ 1 : 100 it known classes of cytotoxic agents are excluded

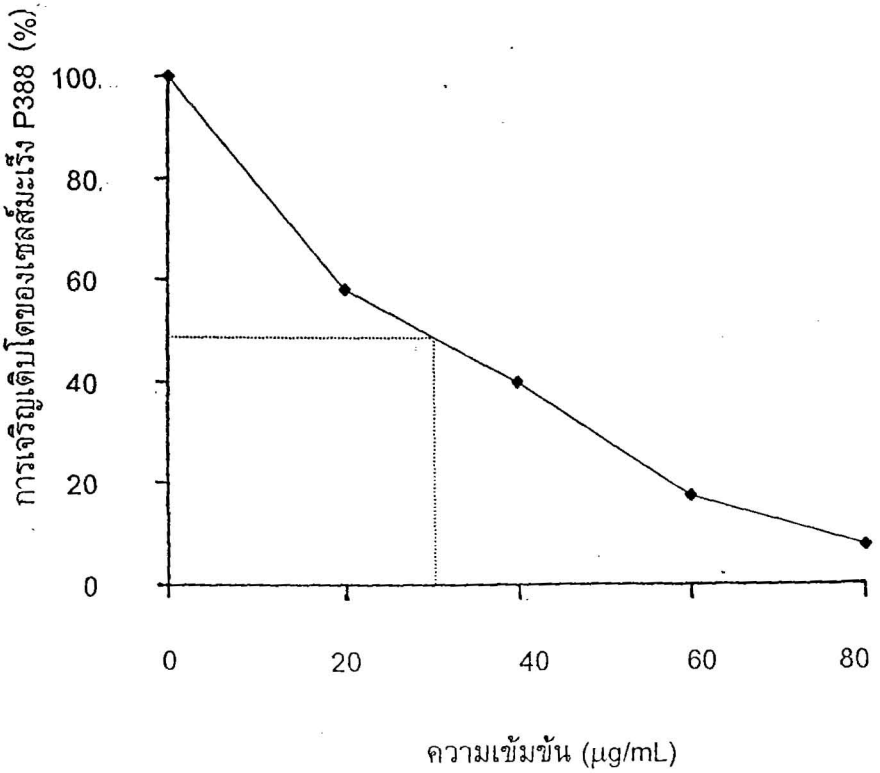
สำหรับงานวิจัยนี้การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู ใช้ความเข้มข้น 30 µg/mL ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และ ethanol

นำสารสกัด hexane และ ethanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane และ ethanol เท่ากับ 30 และ > 100 µg/mL ตามลำดับ แสดงในตาราง 14 และภาพประกอบ 28

ตาราง 14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
		วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	(µg/mL)	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	(%)
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.74×10^6	5.30×10^6	5.02×10^6	100.00
สารสกัด hexane	20	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	2.84×10^6	3.00×10^6	2.92×10^6	58.17
	40	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	1.84×10^6	2.16×10^6	2.00×10^6	39.849
	60	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	8.60×10^6	9.00×10^6	8.80×10^6	17.53
	80	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.00×10^6	3.60×10^6	3.80×10^6	7.57
กลุ่มควบคุม	-	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	6.98×10^6	6.38×10^6	6.18×10^6	100.00
สารสกัด EtOH	30	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	4.98×10^6	5.80×10^6	5.39×10^6	87.22
	60	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.42×10^6	5.74×10^6	5.58×10^6	90.29
	100	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.60×10^6	6.58×10^6	6.09×10^6	98.54



ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P388

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

4.1 นำสารสกัด hexane มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 9 กลุ่ม (ตาราง 2) นำสารทั้ง 9 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 15

ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 1 ถึง H 9 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.28×10^6	5.74×10^6	5.51×10^6	100.00
H 1	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	6.28×10^6	5.24×10^6	5.76×10^6	104.54
H 2	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.50×10^6	5.72×10^6	5.61×10^6	101.81
H 3	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.00×10^6	4.80×10^6	4.90×10^6	88.93
H 4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.92×10^6	5.04×10^6	5.48×10^6	99.46
H 5	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	6.12×10^6	5.88×10^6	6.00×10^6	108.89
H 6	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	6.32×10^6	5.42×10^6	5.87×10^6	106.53
H 7	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	3.70×10^6	4.04×10^6	3.87×10^6	70.24
H 8	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	1.24×10^6	8.60×10^5	1.05×10^6	19.06
H 9	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	2.46×10^6	4.52×10^6	3.49×10^6	63.34

4.2 จากตาราง 15 สารกลุ่ม H 8 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม H 8 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 3) นำสารทั้ง 5 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 16

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.1 ถึง H 8.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	7.72×10^6	6.78×10^6	7.25×10^6	100.00
H 8.1	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	7.46×10^6	7.24×10^6	7.35×10^6	101.38
H 8.2	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	7.24×10^6	7.16×10^6	7.20×10^6	99.31
H 8.3	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	8.02×10^6	6.84×10^6	7.43×10^6	102.48
H 8.4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	6.56×10^6	6.78×10^6	6.67×10^6	92.00
H 8.5	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	3.10×10^6	3.30×10^6	3.20×10^6	44.14

4.3 จากตาราง 16 สารกลุ่ม H 8.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม H 8.5 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 4) นำสารทั้ง 5 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 17

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.1 ถึง H 8.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			ของเซลล์มะเร็ง P388			
	ขวด 1	(%)	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	5.90×10^6	5.28×10^6	5.59×10^6	100.00
H 8.5.1	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	5.88×10^6	5.28×10^6	5.58×10^6	99.82
H 8.5.2	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	5.50×10^6	5.96×10^6	5.73×10^6	102.56
H 8.5.3	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	5.64×10^6	5.12×10^6	5.38×10^6	96.24
H 8.5.4	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	1.18×10^5	2.40×10^5	1.79×10^5	3.20
H 8.5.5	5.16×10^4	5.16×10^4	5.16×10^4	1.20×10^5	1.18×10^5	1.19×10^5	2.13

4.4 จากตาราง 17 สารกลุ่ม H 8.5.4 และ H 8.5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารดังกล่าวมาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H 8.5.4 แยกได้ 4 กลุ่ม (ตาราง 5) และสารกลุ่ม H 8.5.5 แยกได้ 5 กลุ่ม (ตาราง 7) นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 18 และ 19

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.1 ถึง H 8.5.4.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.02×10^6	5.38×10^6	5.20×10^6	100.00
H 8.5.4.1	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.14×10^6	4.62×10^6	4.88×10^6	93.85
H 8.5.4.2	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.18×10^6	3.82×10^6	4.00×10^6	76.92
H 8.5.4.3	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	2.00×10^4	4.00×10^4	3.00×10^4	0.60
H 8.5.4.4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.16×10^6	4.30×10^6	4.38×10^6	84.23

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.1 ถึง H 8.5.5.5 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	6.70×10^6	6.24×10^6	6.47×10^6	100.00
H 8.5.5.1	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	6.04×10^6	6.22×10^6	6.13×10^6	94.74
H 8.5.5.2	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	3.96×10^6	3.76×10^6	3.86×10^6	59.66
H 8.5.5.3	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
H 8.5.5.4	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	6.44×10^6	6.10×10^6	6.24×10^6	96.45
H 8.5.5.5	5.04×10^4	5.04×10^4	5.04×10^4	6.76×10^6	6.54×10^6	6.65×10^6	102.78

4.5 จากตาราง 18 และ 19 สารกลุ่ม H 8.5.4.3 และ H 8.5.5.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารดังกล่าวมาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H 8.5.4.3 แยกได้ 4 กลุ่ม (ตาราง 6) และสารกลุ่ม H 8.5.5.3 แยกได้ 4 กลุ่ม (ตาราง 8) นำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 20 และ 21

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.1 ถึง H 8.5.4.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.78×10^6	5.86×10^6	5.82×10^6	100.00
H 8.5.4.3.1	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	3.00×10^6	3.26×10^6	3.13×10^6	53.78
H 8.5.4.3.2	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
H 8.5.4.3.3	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.70×10^6	4.76×10^6	4.73×10^6	81.27
H 8.5.4.3.4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.12×10^6	5.94×10^6	5.53×10^6	95.02

ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ถึง H 8.5.5.3.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	7.46×10^6	7.34×10^6	7.40×10^6	100.00
H 8.5.5.3.1	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
H 8.5.5.3.2	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.20×10^5	4.60×10^5	4.40×10^5	5.95
H 8.5.5.3.3	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	3.78×10^6	3.92×10^6	3.85×10^6	52.03
H 8.5.5.3.4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.76×10^6	4.64×10^6	4.70×10^6	63.51

4.6 นำสารประกอบ A ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/mL สารประกอบ A ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตาราง 22

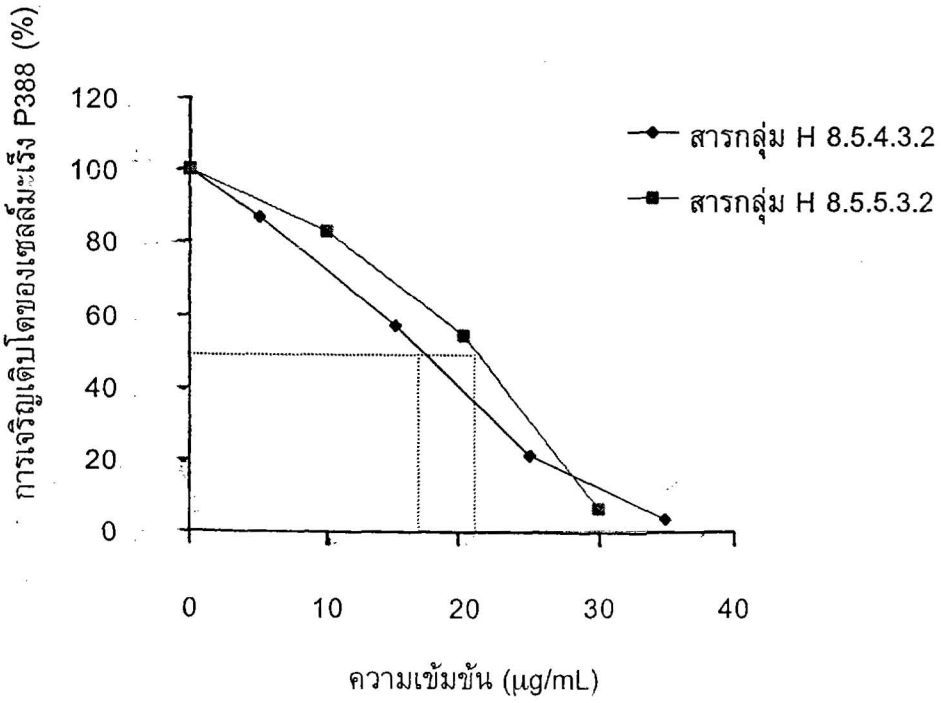
ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.36×10^6	5.44×10^6	5.40×10^6	100.00
30	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.52×10^6	5.70×10^6	5.61×10^6	103.70
60	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.40×10^6	5.82×10^6	5.60×10^6	103.70
100	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.64×10^6	5.30×10^6	5.47×10^6	101.30

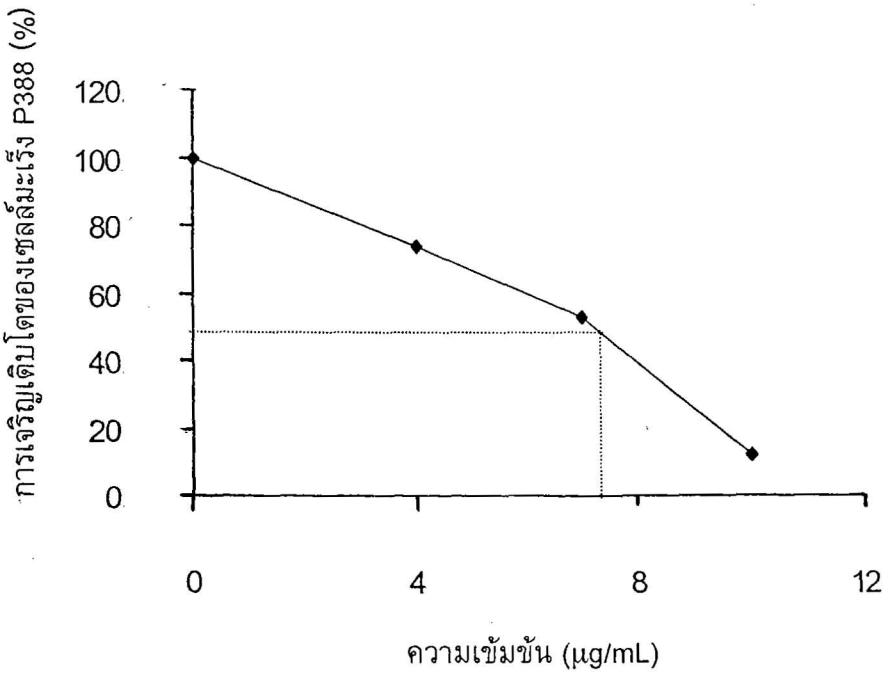
4.7 เนื่องจากสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ แต่เนื่องจากมีสารปริมาณน้อย ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้ จึงนำสารทั้ง 3 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 µg/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 23 และภาพประกอบ 29 - 30

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารกลุ่ม	ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
		วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
		ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	6.64×10^6	7.00×10^6	6.82×10^6	100.00
H 8.5.4.3.2	5	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.98×10^6	5.88×10^6	5.93×10^6	86.95
	15	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	3.84×10^6	3.94×10^6	3.89×10^6	57.04
	25	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	1.40×10^6	1.46×10^6	1.43×10^6	20.97
	35	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	2.16×10^5	2.64×10^5	2.40×10^5	3.52
กลุ่มควบคุม	-	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	7.46×10^6	7.34×10^6	7.40×10^6	100.00
H 8.5.5.3.1	4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.46×10^6	5.50×10^6	5.48×10^6	74.05
	7	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	3.96×10^6	3.88×10^6	3.92×10^6	52.97
	10	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	8.94×10^5	8.82×10^5	8.88×10^5	12.00
H 8.5.5.3.2	10	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	6.10×10^6	6.18×10^6	6.14×10^6	82.97
	20	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.02×10^6	3.98×10^6	4.00×10^6	54.05
	30	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.40×10^5	4.48×10^5	4.44×10^5	6.00



ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 และ H 8.5.5.3.2 ต่อเซลล์มะเร็ง P388



ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethanol

5.1 นำสารสกัด ethanol มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 9) นำสารทั้ง 4 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 24

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1 ถึง E 4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.56×10^6	5.22×10^6	5.39×10^6	100.00
E 1	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
E 2	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	6.84×10^6	6.64×10^6	6.74×10^6	125.05
E 3	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.16×10^6	5.42×10^6	5.29×10^6	98.14
E 4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.07×10^4	5.38×10^6	5.46×10^6	5.42×10^6	100.56

5.2 จากตาราง 24 สารกลุ่ม E 1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม E 1 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์แยกได้สาร 7 กลุ่ม (ตาราง 10) นำสารทั้ง 7 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 25

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1 ถึง E 1.7 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.80×10^6	5.88×10^6	5.84×10^6	100.00
E 1.1	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
E 1.2	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	4.84×10^6	4.96×10^6	4.90×10^6	83.90
E 1.3	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.56×10^6	5.78×10^6	5.67×10^6	97.09
E 1.4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.84×10^6	5.76×10^6	5.80×10^6	99.32
E 1.5	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.92×10^6	5.84×10^6	5.88×10^6	100.68
E 1.6	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	5.98×10^6	5.74×10^6	5.86×10^6	100.34
E 1.7	5.00×10^4	5.00×10^4	5.00×10^4	6.00×10^6	5.86×10^6	5.93×10^6	101.54

5.3 จากตาราง 25 สารกลุ่ม E 1.1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม E 1.1 มาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 11) นำสารทั้ง 4 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 μg/mL ผลการทดสอบแสดงในตาราง 26

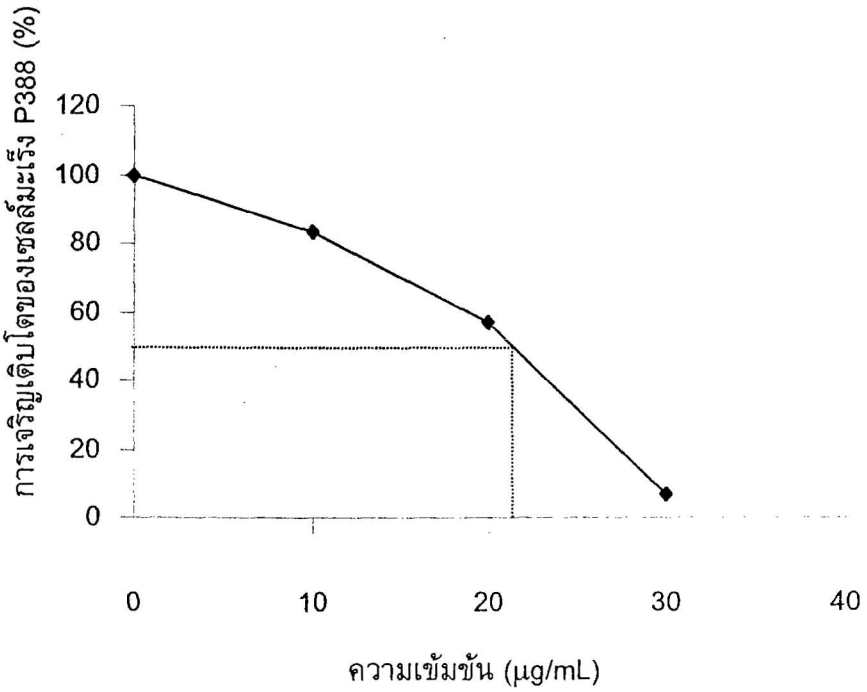
ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1.1 ถึง E 1.1.4 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	6.08×10^6	6.16×10^6	6.18×10^6	100.00
E 1.1.1	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	6.04×10^6	6.22×10^6	6.13×10^6	99.19
E 1.1.2	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.56×10^6	5.78×10^6	5.67×10^6	92.65
E 1.1.3	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	0.00	0.00	0.00	0.00
E 1.1.4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.64×10^6	5.72×10^6	5.68×10^6	92.81

5.4 นำสารประกอบ B สารประกอบ C และสารประกอบ D ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารประกอบ C เท่ากับ 21.50 µg/mL และที่ความเข้มข้น 100 µg/mL สารประกอบ B และ D ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตาราง 27 และภาพประกอบ 31

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ B สารประกอบ C และสารประกอบ D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารประกอบ	ความเข้มข้น	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388
		วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	(µg/mL)	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	(%)
กลุ่มควบคุม	-	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.36×10^6	5.44×10^6	5.40×10^6	100.00
สารประกอบ B	30	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.50×10^4	5.76×10^4	5.63×10^4	104.26
	60	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.62×10^6	5.80×10^6	5.71×10^6	105.74
	100	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.86×10^6	5.60×10^6	5.73×10^6	106.11
สารประกอบ C	10	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	4.52×10^6	4.60×10^6	4.56×10^6	83.33
	20	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	3.06×10^6	3.10×10^6	3.08×10^6	57.04
	30	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	3.50×10^6	3.58×10^6	3.54×10^6	6.56
สารประกอบ D	30	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.38×10^6	5.32×10^6	5.35×10^6	99.07
	60	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.14×10^6	5.26×10^6	5.20×10^6	96.30
	100	4.99×10^4	4.99×10^4	4.99×10^4	5.38×10^6	5.46×10^6	5.42×10^6	100.37

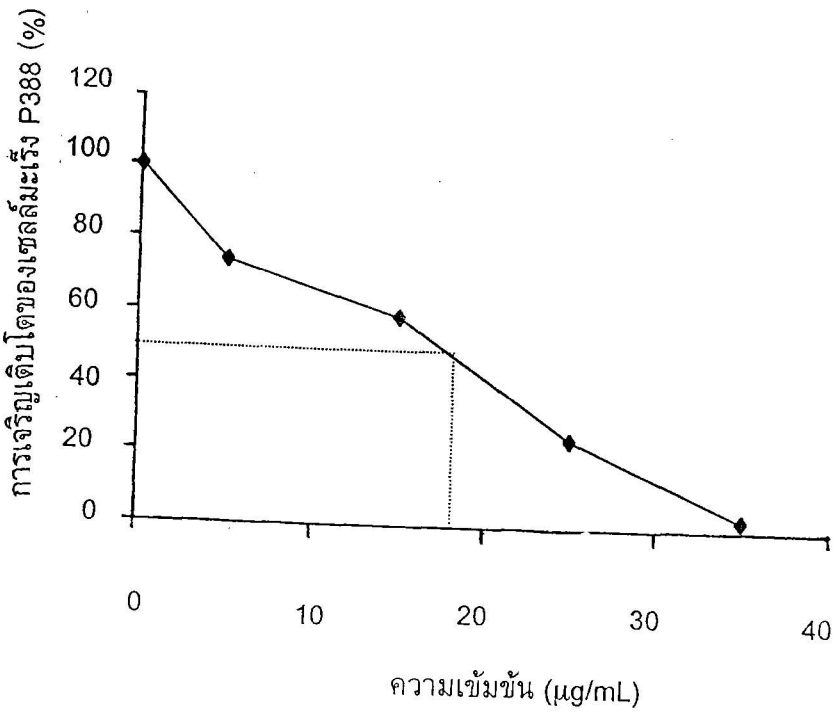


ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงว่า ED_{50} ของสารประกอบ C ต่อเซลล์มะเร็ง P388

5.5 เนื่องจากสารกลุ่ม E 1.1.3 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารกลุ่ม E 1.1.3 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 1.1.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 17.50 µg/mL ดังแสดงในตาราง 28 และภาพประกอบ 32

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E 1.1.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	6.64×10^6	7.00×10^6	6.82×10^6	100.00
5	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	5.08×10^6	5.02×10^6	5.05×10^6	74.05
15	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	3.96×10^6	4.08×10^6	4.02×10^6	58.94
25	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	1.74×10^6	1.66×10^6	1.70×10^6	24.93
35	5.02×10^4	5.02×10^4	5.02×10^4	2.00×10^5	1.68×10^5	1.84×10^5	2.70



ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 1.1.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ตาราง 29 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane ต่อเซลล์มะเร็ง P388

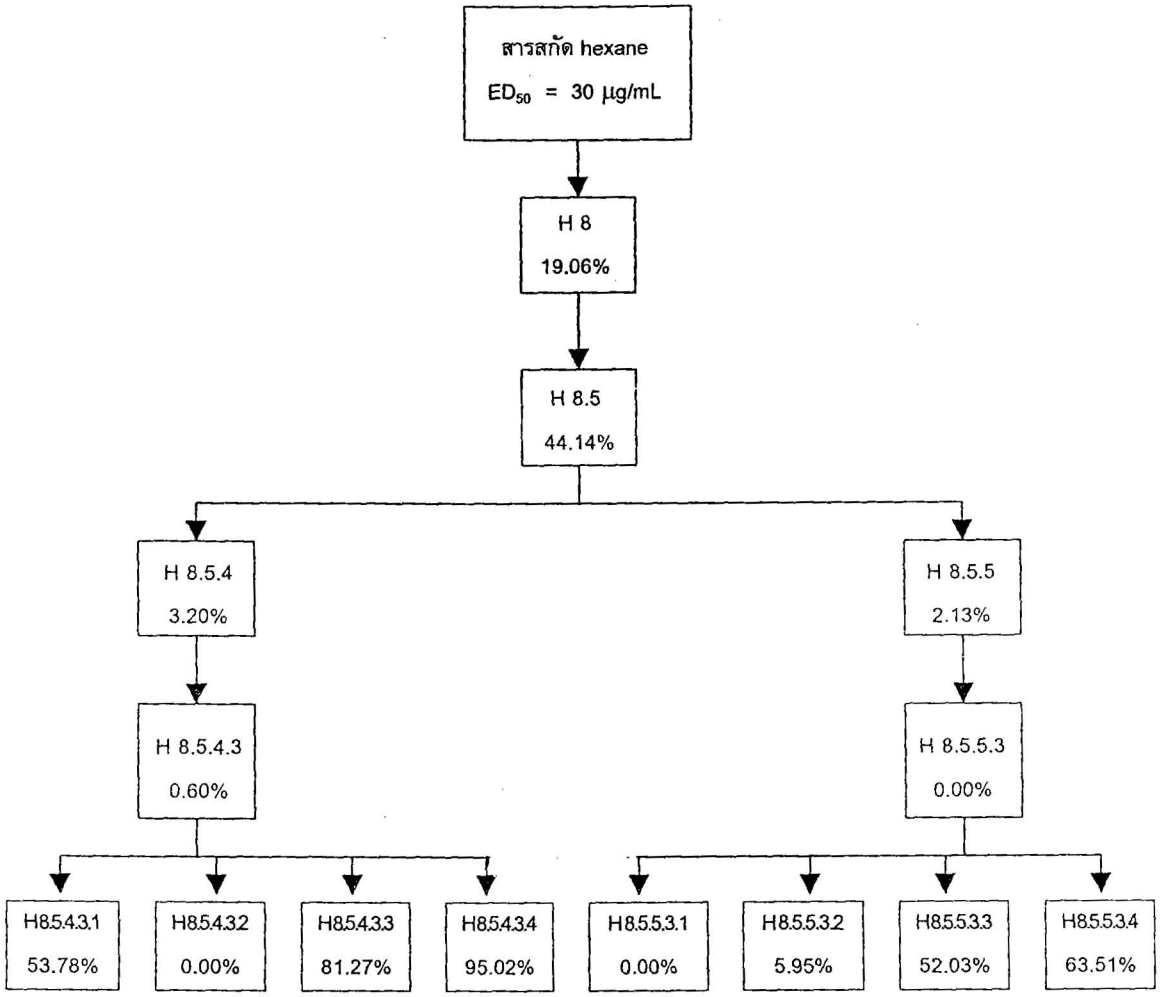
สารประกอบ/สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)	ED_{50} (µg/mL)	สารประกอบ/สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)	ED_{50} (µg/mL)
สารสกัด hexane	50.00	30.00	H 1	104.54	>30
H 2	101.81	>30	H 3	88.93	>30
H 4	99.46	>30	H 5	108.89	>30
H 6	106.53	>30	H 7	70.24	>30
H 8	19.06	<30	H 9	63.34	>30
H 8.1	101.38	>30	H 8.2	99.31	>30
H 8.3	102.48	>30	H 8.4	92.00	>30
H 8.5	44.14	<30	H 8.5.1	99.82	>30
H 8.5.2	102.50	>30	H 8.5.3	96.24	>30
H 8.5.4	3.20	<30	H 8.5.5	2.13	<30
H 8.5.4.1	93.85	>30	H 8.5.4.2	76.92	>30
H 8.5.4.3	0.60	<30	H 8.5.4.4	84.23	>30
H 8.5.4.3.1	53.78	~30	H 8.5.4.3.2	0.00	17.00
H 8.5.4.3.3	81.27	>30	H 8.5.4.3.4	95.02	>30
H 8.5.5.1	94.74	>30	H 8.5.5.2	59.66	>30
H 8.5.5.3	0.00	<30	H 8.5.5.4	96.45	>30
H 8.5.5.5	102.78	>30	H 8.5.5.3.1	0.00	7.20
H 8.5.5.3.2	5.95	21.00	H 8.5.5.3.3	52.03	~30
H 8.5.5.3.4	63.51	>30	สารประกอบ A	103.74	>100

หมายเหตุ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ใช้สารที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

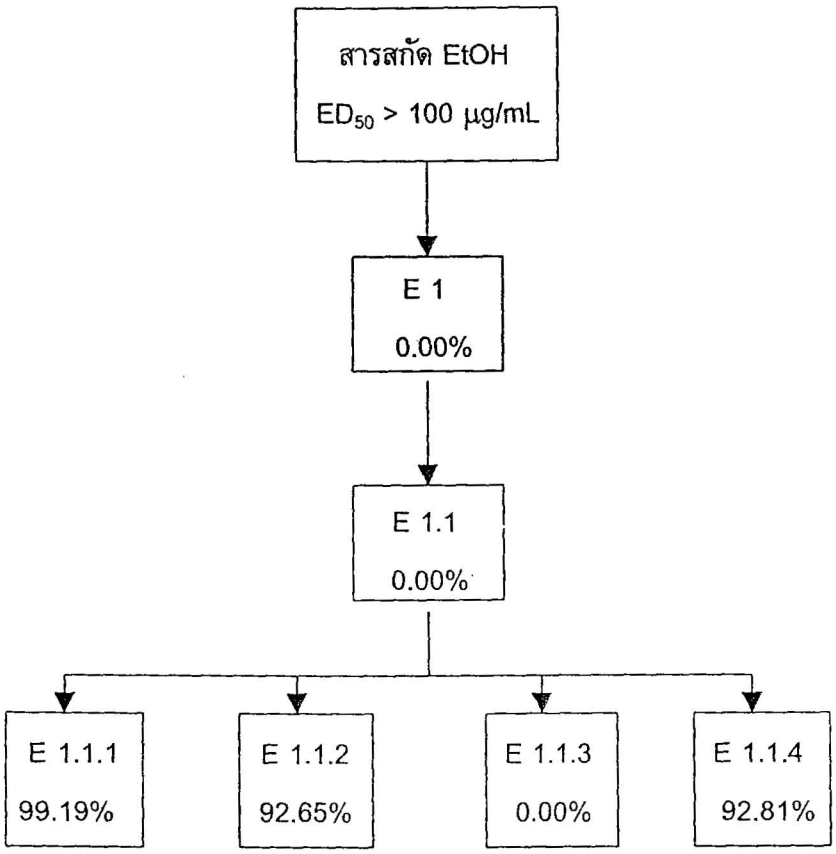
ตาราง 30 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากสาร ethanol ต่อเซลล์มะเร็ง P388

สารประกอบ/สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)	ED_{50} (µg/mL)	สารประกอบ/สารกลุ่ม	การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 (%)	ED_{50} (µg/mL)
สารสกัด EtOH	87.00	>30	E 1	0.00	<30
E 2	125.05	>30	E 3	98.14	>30
E 4	100.56	>30	E 1.1	0.00	<30
E 1.2	83.90	>30	E 1.3	97.09	>30
E 1.4	99.32	>30	E 1.5	100.68	>30
E 1.6	100.34	>30	E 1.7	101.54	>30
E 1.1.1	99.19	>30	E 1.1.2	92.65	>30
E 1.1.3	0.00	17.50	E 1.1.4	92.81	>30
สารประกอบ B	104.26	>30	สารประกอบ C	6.56	21.50
สารประกอบ D	99.07	>30			

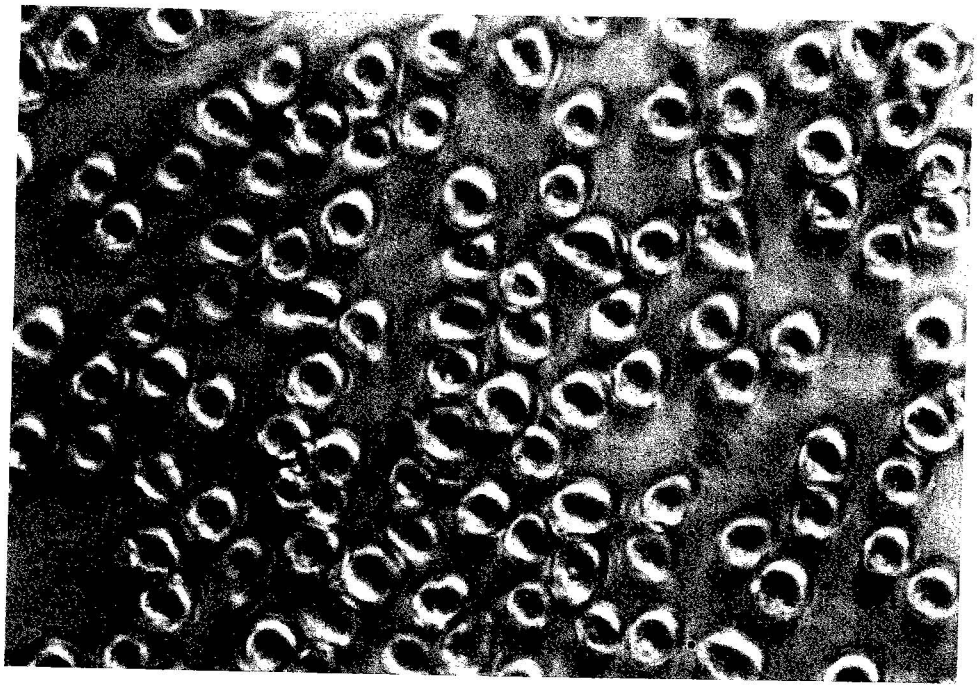
หมายเหตุ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ใช้สารที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



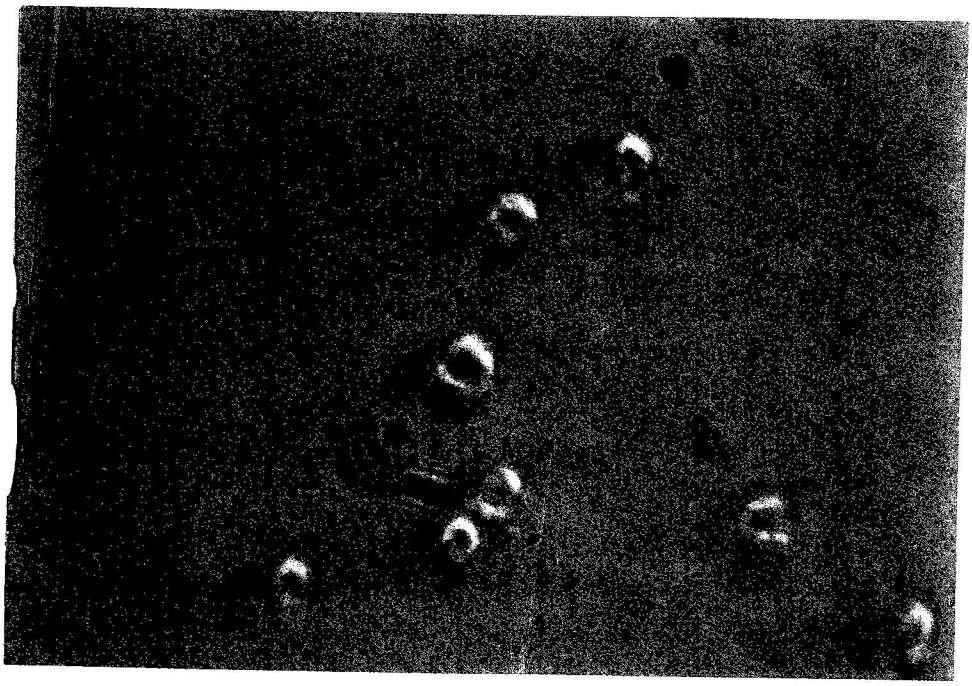
ภาพประกอบ 33 แผนภูมิแสดงผลของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัด hexane ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



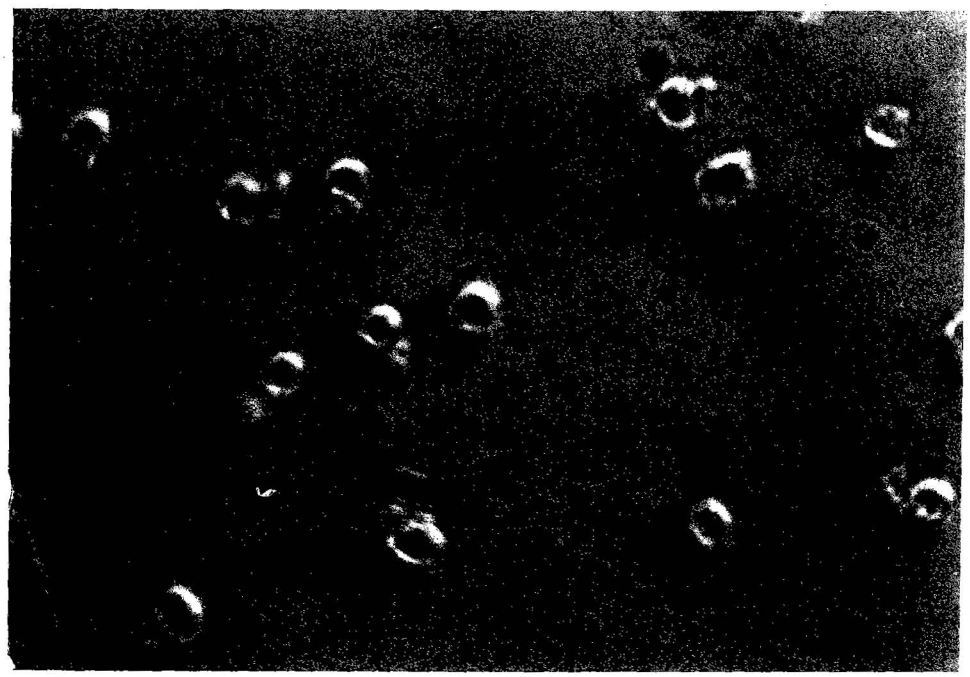
ภาพประกอบ 34 แผนภูมิแสดงผลของสารสกัดที่แยกได้จากสารสกัด ethanol ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



ภาพประกอบ 35 negative control ของเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 (ขยาย 100 เท่า)



ภาพประกอบ 36 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัด hexane ของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 40 μg/mL (ขยาย 100 เท่า)



ภาพประกอบ 37 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารประกอบ C ของเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL (ขยาย 100 เท่า)

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 15.10 mg จุดหลอมเหลวเท่ากับ 183 - 184 ^{0}C ค่า R_f = 0.68 ($CHCl_3$: EtOH 96 : 4)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 42)

3313	NH
1726	C=O (ester)
1662, 1632	-C(=O)-N
1261	C-O
746, 698	=C-H (monosubstituted phenyl)

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 43)

2.03	s	3H (H-1)
2.75	m	2H (H-11)
3.07	dd	1H (H-10a, *J* = 13.63, 8.45 Hz)
3.22	dd	1H (H-10b, *J* = 13.63, 8.45 Hz)
3.82	dd	1H (H-3a, *J* = 11.35, 4.89 Hz)
3.93	dd	1H (H-3b, *J* = 11.35, 4.89 Hz)
4.35	m	1H (H-4)
4.77	m	1H (H-7)
5.98	d	1H (NH-5, *J* = 8.45 Hz)
6.76	d	1H (NH-8, *J* = 7.56 Hz)
7.07	m	2H (H-2', H-6')
7.15	m	2H (H-4', H-4'')
7.25	m	6H (H-3', H-5', H-3'', H-5'', H-2'', H-6'')
7.44	m	2H (H-3''', H-5''')
7.53	m	1H (H-4''')
7.72	m	2H (H-2''', H-6''')

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 46)

20.79 (C-1)	37.42 (C-11)
38.41 (C-10)	49.42 (C-4)
54.97 (C-7)	64.56 (C-3)
126.74 (C-4'')	127.03 (C-2''', C-6''')
127.13 (C-4')	128.57 (C-3''', C-5''')
128.63 (C-2', C-6')	128.75 (C-2'', C-6'')
129.12 (C-3', C-5')	129.23 (C-3'', C-5'')
131.91 (C-4''')	133.63 (C-1''')
136.59 (C-1'')	136.67 (C-1')
167.09 (C-9)	170.22 (C-2, C-6)

EI MS (% relative intensity) : (ภาพประกอบ 51)

444 (3)	323 (1)	252 (61)	224 (28)
105 (100)	91 (9)	77 (38)	51 (10)

สารประกอบ B

สารประกอบ B เป็นผลึกไม่มีสี น้ำหนัก 4.85 g จุดหลอมเหลวเท่ากับ 139 - 141 ^{0}C

ค่า R_f = 0.46 ($CHCl_3$: EtOH 60 : 40)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 52)

3329	OH
2936	CH
1105, 1077	C-O

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 53)

2.95	m	3H (H-1a, H-4, H-5)
3.05	m	1H (H-3)
3.20	m	1H (H-2)
3.35	dd	1H (H-6a, *J* = 11.45, 5.91 Hz)
3.62	dd	1H (H-6b, *J* = 11.45, 5.91 Hz)
3.68	dd	1H (H-1b, *J* = 10.87, 5.30 Hz)
4.47	t	1H (OH-6, *J* = 5.91 Hz)
4.85	d	1H (OH-4, *J* = 4.68 Hz)
4.88	d	1H (OH-3, *J* = 4.88 Hz)
4.90	d	1H (OH-2 *J* = 5.69 Hz)

^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 56)

62.50 (C-6)	70.57 (C-1)	70.93 (C-2)	71.35 (C-4)
79.53 (C-3)	82.66 (C-5)		

สารประกอบ C

สารประกอบ C เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 40.50 mg จุดหลอมเหลวเท่ากับ 157 - 159 ^{0}C ค่า R_f = 0.52 ($CHCl_3$: MeOH 98 : 2)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 60)

3422	OH
2958	CH
1459	CH_2
1383	CH_3

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 61)

0.55 – 1.03		18H (6 x CH_3)
1.03 – 2.03		25H (9 x CH_2, 7 x CH)
3.60	m	1H (H-3)
5.10	m	2H (บางส่วน H-22 และ H-23)
5.17	br s	1H (H-7)

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 64, ตาราง 38)

EI MS (% relative intensity) : (ภาพประกอบ 66)

444 (72)	412 (17)	399 (33)	397 (10)
273 (43)	271 (100)	255 (52)	231 (41)
213 (36)			

สารประกอบ D

สารประกอบ D เป็นผลึกสีขาว น้ำหนัก 320.15 mg จุดหลอมเหลวเท่ากับ 278 - 280 ^{0}C (decomposed) ค่า R_f = 0.44 ($CHCl_3$: EtOH 80 : 20)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 67)

3385	OH
2938	CH
1458	CH_2
1368	CH_3
1030	C-O

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 68)

0.40 - 1.00		18H (6 x CH_3)
1.05 - 2.00		29H (11 x CH_2 และ 7 x CH)
2.80	m	1H (H-6'a)
3.00	m	2H (H-4' และ H-6'b)
3.55	m	1H (H-3)
4.15	d	1H (H-5', *J* = 7.75 Hz)
4.40	t	1H (H-2', *J* = 5.72 Hz)
4.85	m	2H (H-1' และ H-3')
5.05	br s	1H (H-6)

^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz) δ (ppm) : (ภาพประกอบ 70)

EI MS (% relative intensity) : (ภาพประกอบ 72)

576 (5)	414 (40)	399 (15)	397 (100)
396 (60)	273 (15)	271 (30)	255 (55)
231 (15)	299 (30)	213 (10)	

สารกลุ่ม H 8.5.4.3.2

สารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 เป็นสารเหนียวสีเหลืองเข้ม ข้อมูล FT IR แสดงใน ภาพประกอบ 73

สารกลุ่ม H 8.5.5.3.1

สารกลุ่ม H 8.5.5.3.1 เป็นสารเหนียวสีเหลืองเข้ม ข้อมูล FT IR แสดงใน ภาพประกอบ 74

สารกลุ่ม H 8.5.5.3.2

สารกลุ่ม H 8.5.5.3.2 เป็นสารเหนียวสีเหลืองเข้ม ข้อมูล FT IR แสดงใน ภาพประกอบ 75

สารกลุ่ม E 1.1.3

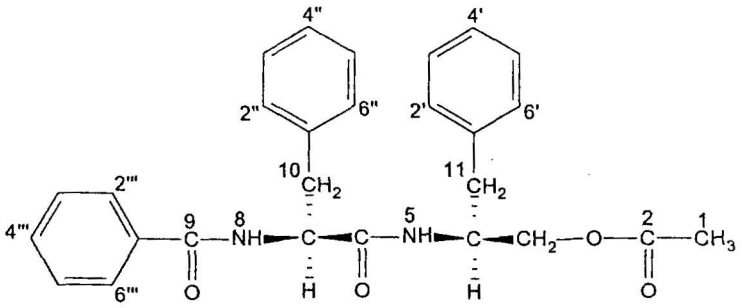
สารกลุ่ม E 1.1.3 เป็นสารเหนียวสีเหลือง ข้อมูล FT IR แสดงในภาพประกอบ 76

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงู โดยนำมาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารสกัด ethanol แต่ก็ได้นำสารสกัดทั้ง hexane และ ethanol มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งสารสกัด hexane แยกได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม ส่วนสารสกัด ethanol แยกได้สาร 3 ชนิด และสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม เมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้ข้อมูลดังนี้

สารประกอบ A



สารประกอบ A เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 183 - 184 ^{0}C (185 - 186 ^{0}C Maiti &Thomson. 1976 :1106 - 1107) ค่า R_f = 0.68 ($CHCl_3$: EtOH 96 : 4)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3313 cm^{-1} (NH) 1726 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ ester 1662 cm^{-1} และ 1632 cm^{-1} เป็นหมู่ carbonyl ของ amide สำหรับการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 746 cm^{-1} และ 698 cm^{-1} เป็นของ =CH ที่แสดง monosubstituted phenyl (ภาพประกอบ 42)

^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 1 หมู่ ที่ δ 2.03 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.75 เป็นของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 11 ซึ่งต่อกับหมู่ phenyl ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.07 และ 3.22 มีลักษณะเป็น doublet of doublet (dd) เป็นสัญญาณของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 10 ซึ่งต่อกับหมู่ phenyl มีค่า *J* เท่ากับ 13.63 และ 8.45 Hz ที่ δ 3.82 และ 3.93 ปรากฏเป็น dd เป็นสัญญาณของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 3 มีค่า *J* เท่ากับ 11.35 และ 4.89 Hz ที่ δ 4.35 และ 4.77 เป็นสัญญาณของหมู่ CH ที่ตำแหน่ง 4 และ 7 ตามลำดับ ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.98 และ 6.76 มีลักษณะเป็น doublet (d) เป็นสัญญาณของหมู่ NH ที่ตำแหน่ง 5 และ 8 ซึ่งมีค่า *J* เท่ากับ 8.54 และ 7.56 Hz ตามลำดับ ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ปรากฏในช่วง δ 7.07 - 7.72 เป็นของหมู่ CH ของหมู่ phenyl ทั้ง 3 หมู่ (ภาพประกอบ 43)

จาก ^{1}H-^{1}H COSY spectrum (ภาพประกอบ 48) จะเห็นการ coupling ระหว่าง H-4 ที่ δ 4.35 กับ H-3 (δ 3.82 และ δ 3.93) และ H-11 (δ 2.75) ดังตาราง 32

^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 20 พีค เป็นของคาร์บอน 27 คาร์บอนในโมเลกุล เนื่องจากบางสัญญาณปรากฏที่ค่า δ ตำแหน่งเดียวกัน (ภาพประกอบ 46) จาก DEPT-90 และ DEPT-135 spectra (ภาพประกอบ 47) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 17 หมู่ ที่ δ 49.42 (C-4) 54.97 (C-7) 128.63 (C-2', C-6') 129.12 (C-3', C-5') 127.13 (C-4') 128.75 (C-2'', C-6'') 129.27 (C-3'', C-5'') 126.74 (C-4'') 127.03 (C-2''', C-6''') 128.57 (C-3''', C-5''') และ 131.91 (C-4''') ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 3 หมู่ ปรากฏที่ δ 64.56 (C-3) 38.41 (C-10) และ 37.42 (C-11) สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 1 หมู่ ปรากฏที่ δ 20.79 (C-1) และมีสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ δ 170.22 (C=O ของ C-2 และ C-6) 167.09 (C=O ของ C-9) 136.67 (C-1') 136.59 (C-1'') และ 133.63 (C-1''') ดังตาราง 31

ตาราง 31 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δc (ppm)	DEPT-90 δc (ppm)	DEPT-135 δc (ppm)
1	20.79 (CH_3)		20.79
2	170.22 (C=O)		
3	64.56 (CH_2)		64.56
4	49.42 (CH)	49.42	49.42
5			
6	170.22 (C=O)		
7	54.97 (CH)	54.97	54.97
8			
9	167.09 (C=O)		
10	38.41 (CH_2)		38.41
11	37.42 (CH_2)		37.42
1'	136.67 (C)		
2'	128.63 (CH)	128.63	128.63
3'	129.12 (CH)	129.12	129.12
4'	127.13 (CH)	127.13	127.13
5'	129.12 (CH)	129.12	129.12
6'	128.63 (CH)	128.63	128.63
1"	136.59 (C)		
2"	128.75 (CH)	128.75	128.75
3"	129.27 (CH)	129.27	129.27
4"	126.74 (CH)	126.74	126.74
5"	129.27 (CH)	129.27	129.27
6"	128.75 (CH)	128.75	128.75
1"'	133.63 (C)		
2"'	127.03 (CH)	127.03	127.03
3"'	128.57 (CH)	128.57	128.57
4"'	131.91 (CH)	131.91	131.91
5"'	128.57 (CH)	128.57	128.57
6"'	127.03 (CH)	127.03	127.03

ตาราง 32 ข้อมูล ^{1}H-^{1}H COSY สเปกตรัมของสารประกอบ A

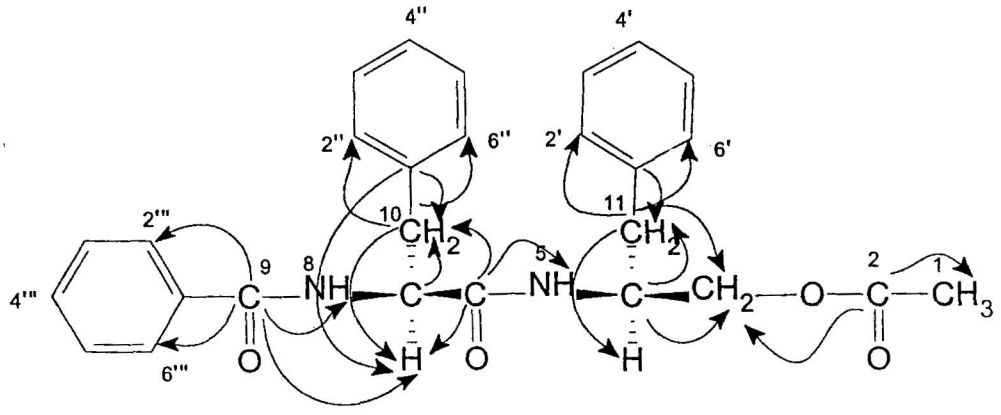
δ_H (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)
2.75 (H-11)	↔	4.35 (H-4)
3.07 (H-10a)	↔	3.22 (H-10b) 4.77 (H-7)
3.22 (H-10b)	↔	3.07 (H-10a) 4.77 (H-7)
3.82 (H-3a)	↔	3.93 (H-3b) 4.35 (H-4)
3.93 (H-3b)	↔	3.82 (H-3a) 4.35 (H-4)
4.35 (H-4)	↔	2.75 (H-11) 3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b) 5.98 (NH-5)
4.77 (H-7)	↔	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b) 6.67 (NH-8)
5.98 (NH-5)	↔	4.35 (H-4)
6.76 (NH-8)	↔	4.77 (H-7)

ตาราง 33 ข้อมูล HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ A

δ_C (ppm)		δ_H (ppm)	ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^{1}H
64.56 (C-3)	↔	3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b)	CH_2-3
54.97 (C-7)	↔	4.77 (H-7)	CH-7
49.42 (C-4)	↔	4.35 (H-4)	CH-4
38.41 (C-10)	↔	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b)	CH_2-10
37.42 (C-11)	↔	2.75 (H-11)	CH_2-11
20.79 (C-1)	↔	2.03 (H-1)	CH_3-1

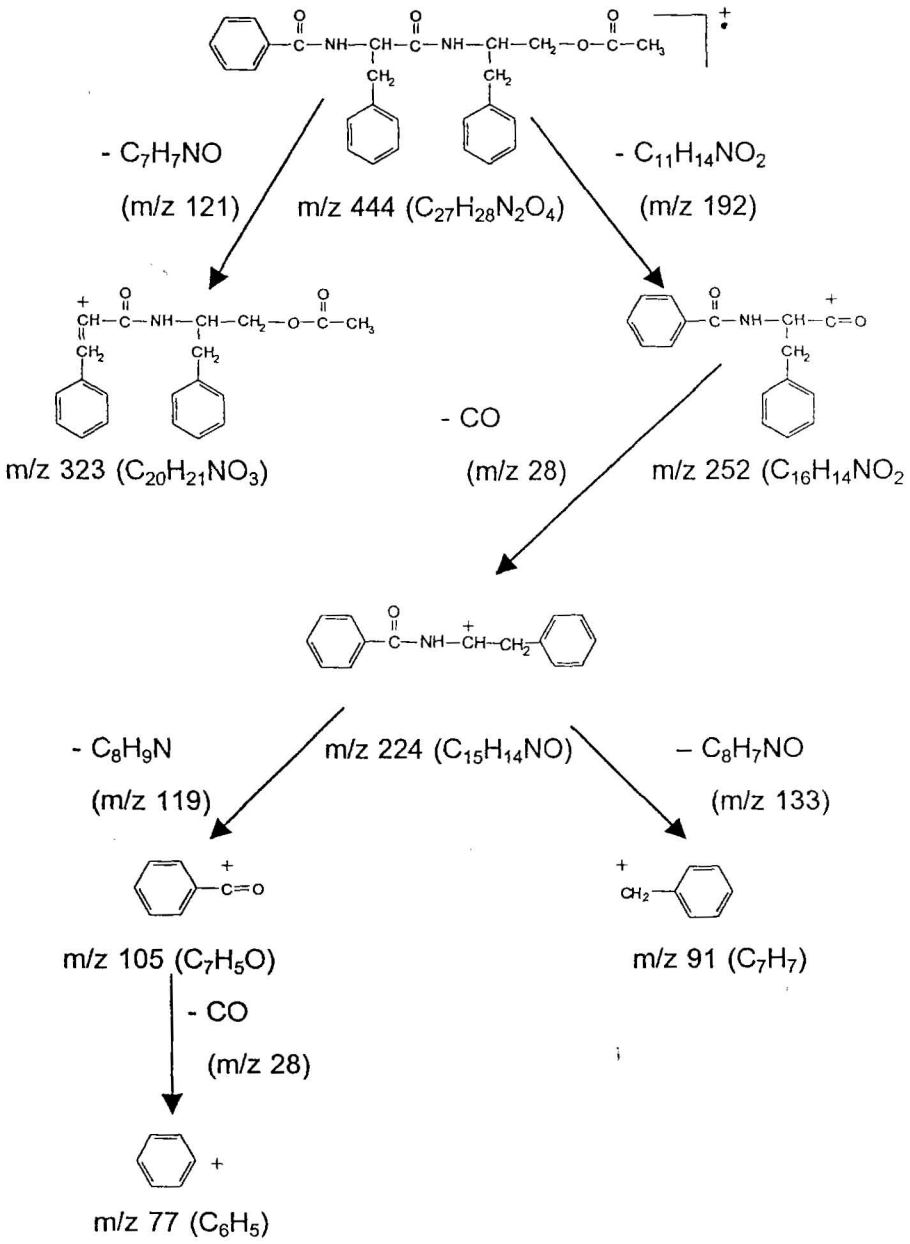
ตาราง 34 ข้อมูล HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ A

δ_C (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)
170.22 (C-2)	↔	2.03 (H-1) 3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b)
170.22 (C-6)	↔	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b) 4.77 (H-7) 5.98 (NH-5)
167.09 (C-9)	↔	4.77 (H-7) 6.67 (NH-8) 7.72 (H-2''') (H-6''')
136.67 (C-1')	↔	2.75 (H-11)
136.59 (C-1'')	↔	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b) 4.77 (H-7)
54.97 (C-7)	↔	3.07 (H-10a) 3.22 (H-10b)
49.42 (C-4)	↔	2.75 (H-11) 3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b)
38.41 (C-10)	↔	4.77 (H-7) 7.25 (H-2'') (H-6'')
37.42 (C-11)	↔	3.82 (H-3a) 3.93 (H-3b) 4.35 (H-4) 7.07 (H-2') (H-6')



ภาพประกอบ 38 HMBC ของสารประกอบ A

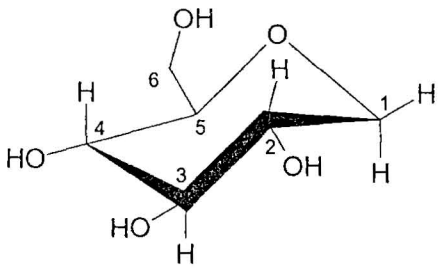
EI MS spectrum ของสารประกอบ A (ภาพประกอบ 51) ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity)ที่ 444 (3) ($M^{+\bullet}$, $C_{27}H_{28}N_2O_4$) 323 (1) $[M - C_7H_7NO]^+$ 252 (61) $[M - C_{11}H_{14}NO_2]^+$ 224 (28) $[M - C_{12}H_{14}NO_3]^+$ 105 (100) $[M - C_{20}H_{23}N_2O_3]^+$ 91 (9) $[M - C_{20}H_{21}N_2O_4]^+$ 77 (38) $[M - C_{21}H_{23}N_2O_4]^+$ ภาพประกอบ 39



ภาพประกอบ 39 การแตกพันธะของสารประกอบ A

จากข้อมูลของสารประกอบ A เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ aurantiamide acetate (Wahidulla, D'Souza & Kamat. 1991 : 3323 - 3325) สรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ aurantiamide acetate หรือ asperglaucide ซึ่งเป็นครั้งแรกที่แยก aurantiamide acetate ได้จากพืชสกุลนี้ สารประกอบชนิดนี้เคยแยกได้จาก *Piper aurantiacum* Wall. (Banerji & Das. 1975 : 1234 - 236) *Aspergillus glaucus* (Cox, Chexal & Holker. 1976 : 578 - 580) *Cystoseira corniculata* Hauck. (Maiti &Thomson. 1976 : 1106 - 1107) และจากการรายงานของซายและคณะ (Tsai, et al. 1998 : 1663 - 1666) พบว่า aurantiamide acetate ที่แยกได้จาก *Polygonum chinensis* เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีกว่า trifluoperazine

สารประกอบ B



สารประกอบ B เป็นผลึกไม่มีสี จุดหลอมเหลวเท่ากับ 139 - 141 ^{0}C (142 - 143 ^{0}C Ham, Cooper & Ohtake. 1992 : 31) ค่า R_f = 0.46 ($CHCl_3$: EtOH 60 : 40)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3329 cm^{-1} (OH) 2936 cm^{-1} (CH) 1105 cm^{-1} และ 1070 cm^{-1} (C-O) (ภาพประกอบ 52)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6, 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 1 ที่ δ 2.95 และ 3.68 มีลักษณะเป็น dd มีค่า *J* เท่ากับ 10.87 และ 5.30 Hz ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.35 และ 3.62 มีลักษณะเป็น dd เป็นสัญญาณของหมู่ CH_2 ที่ตำแหน่ง 6 มีค่า *J* เท่ากับ 11.45 และ 5.91 Hz นอกจากนั้นที่ δ 2.95 ยังเป็นสัญญาณของ H-4 และ H-5 ส่วนสัญญาณของ H-2 และ H-3 ปรากฏที่ 3.20 และ 3.05 ตามลำดับ ส่วนสัญญาณของหมู่ hydroxy (OH) 4 หมู่ ปรากฏที่ δ 4.47 4.85 4.88 และ 4.90 ซึ่งเป็นสัญญาณของ

OH-6 OH-4 OH-3 และ OH-2 ตามลำดับ (ภาพประกอบ 53) เพื่อยืนยันสัญญาณของหมู่ OH จึงใส่ D_2O ลงในสารตัวอย่าง แล้วนำไปวัด ^1H NMR sprectrum สัญญาณของหมู่ OH ทั้ง 4 หมู่ หายไป เนื่องจากเกิด D_2O exchange (ภาพประกอบ 55)

^{13}C NMR spectrum (DMSO-d_6,100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 6 พีค เป็นของคาร์บอน 6 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 56) จาก DEPT-90 และ DEPT-135 spectra (ภาพประกอบ 57) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 4 หมู่ ที่ δ 70.93 (C-2) 79.53 (C-3) 71.35 (C-4) และ 82.66 (C-5) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ C-1 และ C-6 ปรากฏที่ δ 70.57 และ 62.50 ตามลำดับ ดังตาราง 35

ตาราง 35 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	^{13}C NMR δ_C (ppm)	DEPT-90 δ_C (ppm)	DEPT-135 δ_C (ppm)
1	70.57 (CH_2)		70.57
2	70.93 (CH)	70.93	70.93
3	79.53 (CH)	79.53	79.53
4	71.35 (CH)	71.35	71.35
5	82.66 (CH)	82.66	82.66
6	62.50 (CH_2)		62.50

ตาราง 36 ข้อมูล ^1H-^1H COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B

δ_H (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)
3.05 (H-3)	↔	2.95 (H-4) 4.88 (OH-3)
3.20 (H-2)	↔	2.95 (H-1a) 3.68 (H-1b) 4.90 (OH-2)
3.35 (H-6a)	↔	2.95 (H-4) 3.62 (H-6b) 4.47 (OH-6)
3.62 (H-6b)	↔	3.35 (H-6a) 4.47 (OH-6)
3.68 (H-1b)	↔	3.20 (H-2) 2.95 (H-1a)
4.47 (OH-6)	↔	3.35 (H-6a) 3.62 (H-6b)

ตาราง 36 (ต่อ)

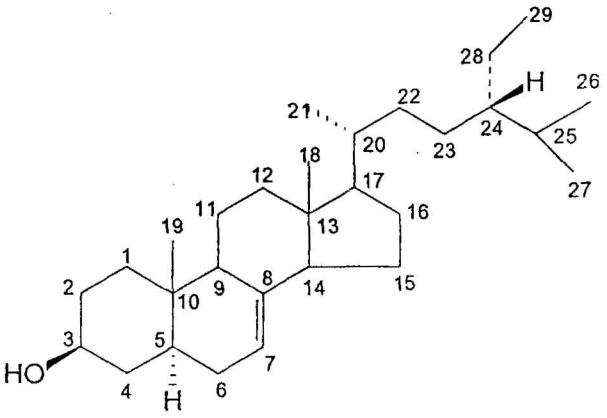
δ_H (ppm)		ความสัมพันธ์กับ δ_H (ppm)
4.85 (OH-4)	↔	2.95 (H-4)
4.88 (OH-3)	↔	3.05 (H-3)
4.90 (OH-2)	↔	3.20 (H-2)

ตาราง 37 ข้อมูล HETCOR สเปกตรัมของสารประกอบ B

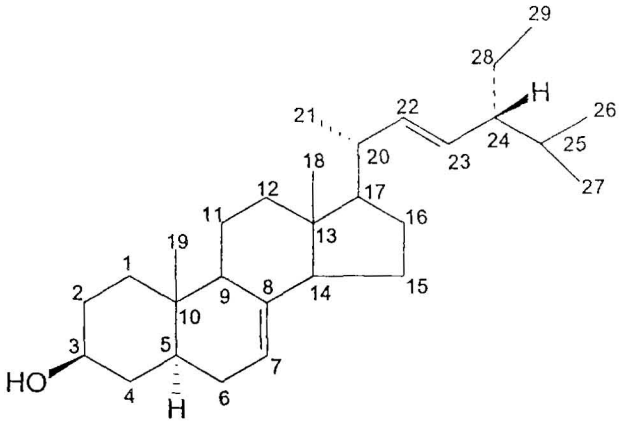
δ_C (ppm)		δ_H (ppm)		ตำแหน่งของ ^{13}C และ ^{1}H
82.66 (C-5)	↔	2.95 (H-5)		CH-5
79.53 (C-3)	↔	3.05 (H-3)		CH-3
71.35 (C-4)	↔	2.95 (H-4)		CH-4
70.93 (C-2)	↔	3.20 (H-2)		CH-2
70.57 (C-1)	↔	2.95 (H-1a)	3.70 (H-1b)	CH_2-1
62.50 (C-6)	↔	3.35 (H-6a)	3.65 (H-6b)	CH_2-6

จากข้อมูลของสารประกอบ B เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 1,5-anhydroglucitol (Bock, et al. 1980 : 2033) สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ 1,5-anhydroglucitol สารประกอบชนิดนี้เคยแยกได้จาก *Polygala tenuifolia* *P. vulgaris* *P. amara* และ *P. senega* (Ham, Cooper & Ohtake. 1992 : 31)

สารประกอบ C



22,23-dihydrochondrillasterol (C1)



chondrillasterol (C2)

สารประกอบ C เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 157 - 159 ^{0}C ค่า R_f = 0.52 ($CHCl_3$: MeOH 98 : 2)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3422 cm^{-1} (OH) 2958 cm^{-1} (CH) 1459 cm^{-1} (CH_2) และ 1383 cm^{-1} (CH_3) (ภาพประกอบ 60)

^{1}H NMR spectrum ($CDCl_3$, 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.55 - 1.03 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 11 หมู่ และหมู่ CH 7 หมู่ ที่ δ 1.03 - 2.03 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.60 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.17 มีลักษณะเป็น

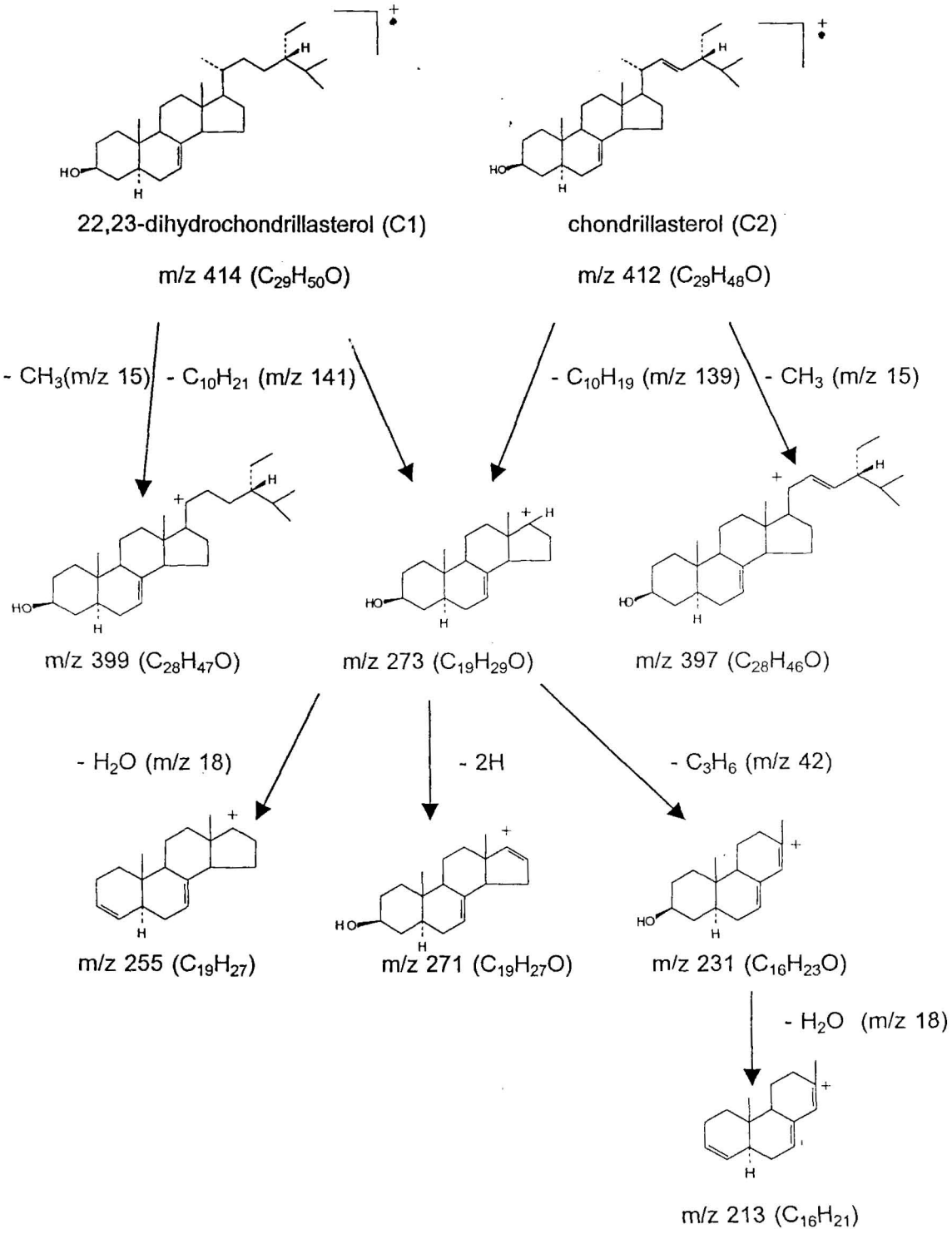
broad singlet (br s) เป็นสัญญาณของ H-7 ที่ δ 5.10 มีลักษณะเป็น multiplet (m) แสดงให้เห็นบางส่วนของ olefinic protons ที่ H-22 และ H-23 ของสารประกอบ C2 (ภาพประกอบ 61)

^{13}C NMR spectrum ($CDCl_3$, 100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 33 พีค เป็นของคาร์บอน 33 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 64) จาก DEPT-90 และ DEPT-135 spectra (ภาพประกอบ 65) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 13 หมู่ CH_2 11 หมู่ และ CH_3 6 หมู่ ดังตาราง 38

ตาราง 38 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C

ตำแหน่ง	22,23-dihydrochondrillasterol (C1)			chondrillasterol (C2)		
	^{13}C NMR δc (ppm)	DEPT-90 δc (ppm)	DEPT-135 δc (ppm)	^{13}C NMR δc (ppm)	DEPT-90 δc (ppm)	DEPT-135 δc (ppm)
1	37.14 (CH_2)		37.14	37.14 (CH_2)		37.14
2	37.47 (CH_2)		37.47	37.47 (CH_2)		37.47
3	71.06 (CH)	71.06	71.06	71.06 (CH)	71.06	71.06
4	37.98 (CH_2)		37.98	37.98 (CH_2)		37.98
5	40.25 (CH)	40.25	40.25	40.25 (CH)	40.25	40.25
6	29.64 (CH_2)		29.64	29.64 (CH_2)		29.64
7	117.45 (CH)	117.45	117.45	117.45 (CH)		117.45
8	139.62 (C)			139.62 (C)		
9	49.44 (CH)	49.44	49.44	49.44 (CH)	49.44	49.44
10	34.20 (C)			34.20 (C)		
11	21.54 (CH_2)		21.54	21.54 (CH_2)		21.54
12	39.56 (CH_2)		39.56	39.56 (CH_2)		39.56
13	43.28 (C)			43.28 (C)		
14	55.12 (CH)	55.12	55.12	55.12 (CH)	55.12	55.12
15	23.06 (CH_2)		23.06	23.06 (CH_2)		23.06
16	28.50 (CH_2)		28.50	28.50 (CH_2)		28.50
17	56.08 (CH)	56.08	56.08	56.08 (CH)	56.08	56.08
18	12.04 (CH_3)		12.04	12.04 (CH_3)		12.04
19	13.03 (CH_3)		13.03	13.03 (CH_3)		13.03
20	36.58 (CH_2)	36.58	36.58	40.82 (CH_2)	40.82	40.82
21	21.08 (CH_3)		21.08	21.08 (CH_3)		21.08
22	34.20 (CH_2)		34.20	138.16 (CH)	138.16	138.16
23	26.19 (CH_2)		26.19	129.43 (CH)	129.43	129.43
24	45.83 (CH)	45.83	45.83	51.24 (CH)	51.24	51.24
25	31.87 (CH)	31.87	31.87	31.87 (CH)	31.87	31.87
26	19.03 (CH_3)		19.03	19.03 (CH_3)		19.03
27	21.37 (CH_3)		21.37	21.37 (CH_3)		21.37
28	25.39 (CH_2)		25.39	25.39 (CH_2)		25.39
29	12.24 (CH_3)		12.24	12.24 (CH_3)		12.24

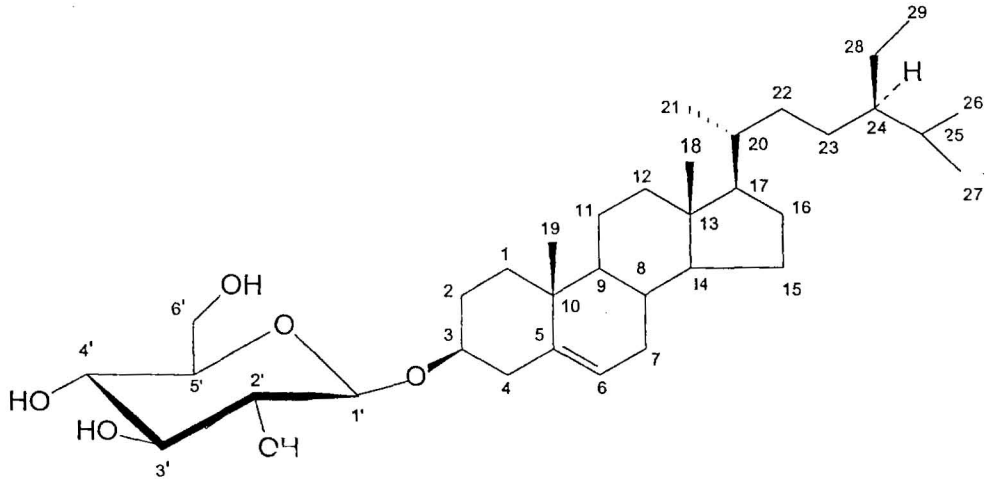
EI MS spectrum ของสารประกอบ C (ภาพประกอบ 66) ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity) ที่ 414 (72) ($M_1^{+\bullet}$, $C_{29}H_{50}O$) เป็น molecular ion ของสารประกอบ C1 และสัญญาณ m/z 412 (17) ($M_2^{+\bullet}$, $C_{29}H_{48}O$) เป็น molecular ion ของสารประกอบ C2 และแสดงสัญญาณการแตกพันธะที่ m/z 399 (33) $[M_1 - CH_3]^+$ 397 (10) $[M_2 - CH_3]^+$ 273 (43) $[M_1 - C_{10}H_{21}]^+$ หรือ $[M_2 - C_{10}H_{19}]^+$ 271 (100) $[M_1 - C_{10}H_{21} - 2H]^+$ หรือ $[M_2 - C_{10}H_{19} - 2H]^+$ 255 (52) $[M_1 - C_{10}H_{21} - H_2O]^+$ หรือ $[M_2 - C_{10}H_{19} - H_2O]^+$ 231 (41) $[M_1 - C_{10}H_{21} - C_3H_5]^+$ หรือ $[M_2 - C_{10}H_{19} - C_3H_5]^+$ ดังภาพประกอบ 40



ภาพประกอบ 40 การแตกพันธะของสารประกอบ C

จากข้อมูลของสารประกอบ C เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 22,23-dihydrochondrillasterol (Itoh, et al. 1981 : 761 - 764 ; Matsumoto, Shigemoto & Itoh. 1983 : 2622 – 2624) และ chondrillasterol (Garg & Nes. 1984 : 2919 - 2923) สรุปได้ว่าสารประกอบ C คือ 22,23-dihydrochondrillasterol (24β-ethyl-5α-cholest-7-en-3β-ol) และมี chondrillasterol (24β-ethyl-5α-cholesta-7,*trans*-22-diene-3-ol) ผสมอยู่เล็กน้อย โดยดูจากสัญญาณ ^{1}H NMR spectrum (ภาพประกอบ 61) ที่ δ 5.10 มีลักษณะเป็น m เป็นสัญญาณของ olefinic protons ที่ H-22 และ H-23 และจาก ^{13}C NMR spectrum (ภาพประกอบ 64) ที่ δ 138.16 และ 129.43 เป็นสัญญาณของ C-22 และ C-23 ของ chondrillasterol ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบส่วนของ H-18 และ H-21 แต่ละ proton ปรากฏเป็น 2 พีค ที่ δ 0.54 (H-18) และ δ 0.93 (H-21) เป็นของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ δ 0.56 (H-18) และ δ 1.03 (H-21) เป็นของ chondrillasterol ข้อมูลจาก EI MS spectrum (ภาพประกอบ 66) แสดง molecular ion ที่ 414 เป็นของ 22,23-dihydrochondrillasterol และ 412 เป็นของ chondrillasterol

สารประกอบ D

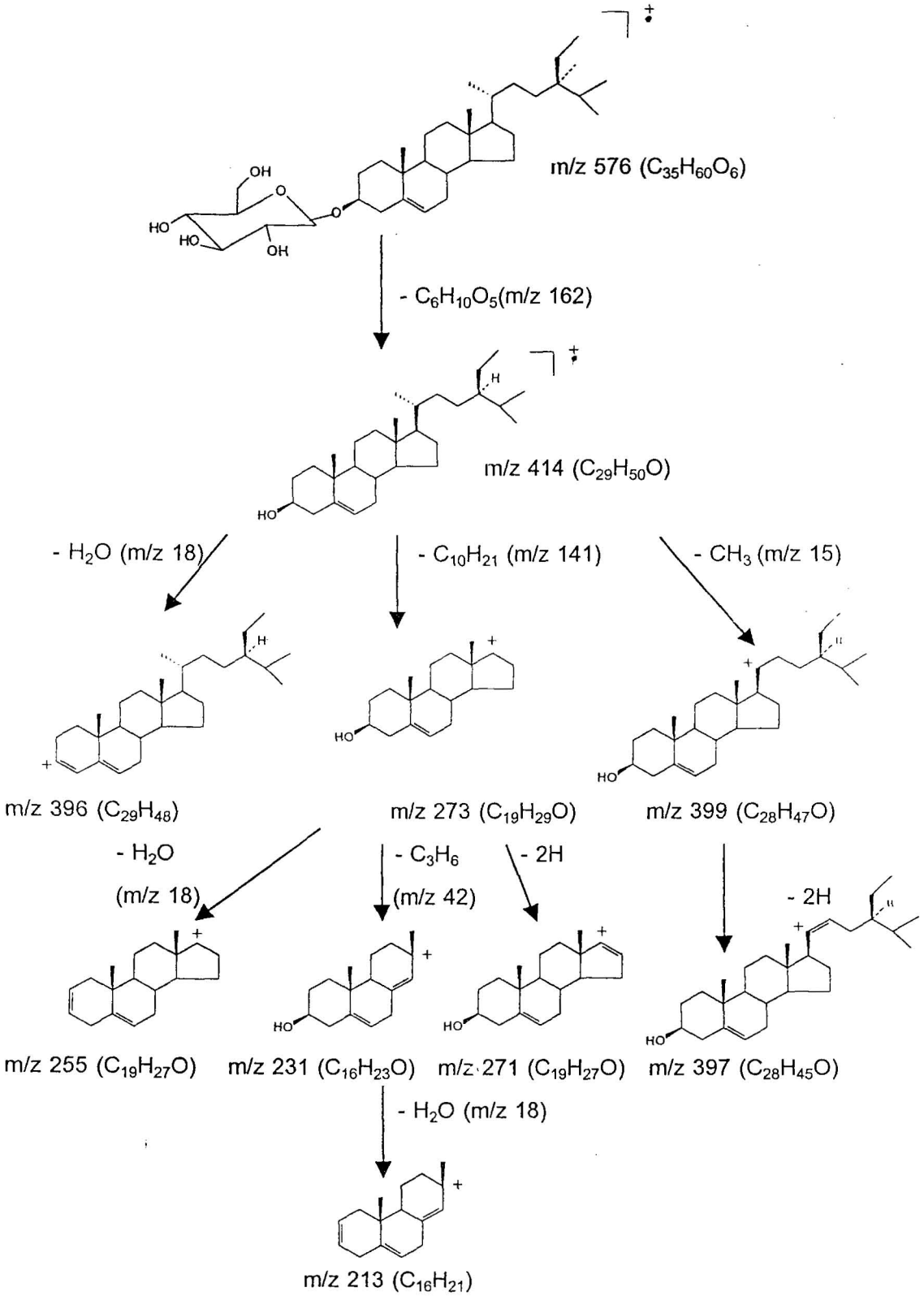


สารประกอบ D เป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 278 - 280 ^{0}C (decompose) (290 ^{0}C decompose Mitra & Misra. 1965 : 345 - 348) ค่า R_f = 0.44 ($CHCl_3$: EtOH 80 : 20)

FT IR spectrum ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 3385 cm^{-1} (OH) 2938 cm^{-1} (CH) 1458 cm^{-1} (CH_2) 1436 cm^{-1} (CH_3) และ 1030 cm^{-1} (C-O) (ภาพประกอบ 67)

^{1}H NMR spectrum (DMSO-d_6, 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ ที่ δ 0.40 - 1.00 สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_2 11 หมู่ และหมู่ CH 7 หมู่ ที่ δ 1.05 - 2.00 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.55 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 2.75 - 4.90 เป็นสัญญาณของ glucosidic protons สำหรับ H-6 ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.05 (ภาพประกอบ 68)

EI MS spectrum ของสารประกอบ D (ภาพประกอบ 72) ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity) ที่ 576 (5) ($M^{+\bullet}$, $C_{35}H_{60}O_6$) 414 (40) $[M - C_6H_{10}O_5]^+$ 399 (15) $[M - C_6H_{10}O_5 - CH_3]^+$ 397 (100) $[M - C_6H_{10}O_5 - CH_3 - 2H]^+$ 396 (60) $[M-C_6H_{10}O_5 - H_2O]^+$ 273 (15) $[M-C_6H_{10}O_5 - C_{10}H_{21}]^+$ 271 (30) $[M - C_6H_{10}O_5-C_{10}H_{21}-2H]^+$ 255 (55) $[M - C_6H_{10}O_5 - C_{10}H_{21} - H_2O]^+$ 231 (15) $[M - C_6H_{10}O_5 - C_{10}H_{21} - C_3H_6]^+$ 229 (30) $[M - C_6H_{10}O_5-C_{10}H_{21} - C_3H_6-2H]^+$ 213 (10) $[M - C_6H_{10}O_5 - C_{10}H_{21} - C_3H_6 - H_2O]^+$ ภาพประกอบ 41



ภาพประกอบ 41 การแตกพันธะของสารประกอบ D

จากข้อมูลของสารประกอบ D เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ β-sitosterol-β-D-glucoside (Sakakibara, et al. 1983 : 2553 - 2555 ; Garg & Nes. 1984 : 2925 - 2929) สรุปได้ว่าสารประกอบ D คือ β-sitosterol-β-D-glucoside สารประกอบชนิดนี้พบในพืชหลายชนิด เช่น *Mimusops hexandra* (Mitra & Misra. 1965 : 345 - 348) *Caraipa densifolia* (Sarath, et al. 1983 : 118 - 122) และ *Trichosanthes* sp. (Kanaoka, Yoshizaki & Fujino. 1983 : 2570 - 2574)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงูต่อเซลล์มะเร็ง P388 ในหลอดทดลอง โดยนำเซลล์มะเร็ง P388 ซึ่งเป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเซลล์มานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยวิธีการย้อม dye exclusion viability staining โดยใช้สี trypan blue เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue ผลที่ได้จากการนับเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มที่ใส่สารตัวอย่างเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นำมาหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และสารสกัด ethanol

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และสารสกัด ethanol พบว่าค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane เท่ากับ 30 μg/mL ส่วนสารสกัด ethanol > 100 μg/mL (ตาราง 14 ภาพประกอบ 28) จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอยู่ในระดับที่น่าสนใจ ส่วนสารสกัด ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานของ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนดว่า สารสกัดหยาบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า $ED_{50} \leq 30$ μg/mL

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

เมื่อนำสารสกัด hexane 60 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 กลุ่ม คือ H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 น้ำหนัก 30.20 30.20 และ 38.80 mg ตามลำดับ และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิด ซึ่งเป็นสารที่ไม่เคยพบจากพืชชนิดนี้มาก่อน คือ aurantiamide acetate น้ำหนัก 15.10 mg

เมื่อนำสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 H 8.5.5.3.2 และ aurantiamide acetate ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่าค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 21.00 และ >100 μg/mL ตามลำดับ (ตาราง 22 - 23 ภาพประกอบ 29 - 30) แสดงให้เห็นว่า

สารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด เนื่องจากสารทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาณน้อยและมีสารผสมอยู่หลายชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ส่วน aurantiamide acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ว่า สารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า $ED_{50} \leq 4$ µg/mL จากการรายงานของซายและคณะ (Tsai, et al. 1998 : 1663 - 1666) พบว่า aurantiamide acetate ที่แยกได้จากต้น *Polygonum chinensis* เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดีกว่า trifluoperazine

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethanol

เมื่อนำสารสกัด ethanol 60 g มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 1 กลุ่ม คือ E 1.1.3 น้ำหนัก 25.20 mg และสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol และ β-sitosterol-β-D-glucoside น้ำหนัก 4.85 g และ 320.15 mg ตามลำดับ และสารผสมระหว่าง 22,23-dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol น้ำหนัก 40.50 mg

เมื่อนำสารกลุ่ม E 1.1.3 1,5-anhydroglucitol β-sitosterol-β-D-glucoside และสารผสมระหว่าง 22,23-dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่าค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E 1.1.3 และสารผสมระหว่าง 22,23-dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol เท่ากับ 17.50 และ 21.50 µg/mL ตามลำดับ ส่วน 1,5-anhydroglucitol และ β-sitosterol-β-D-glucoside ทั้ง 2 สารมีค่า ED_{50} >100 µg/mL (ตาราง 27 - 28 ภาพประกอบ 31 - 32) แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม E 1.1.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด เนื่องจากสารกลุ่มดังกล่าวมีปริมาณน้อยและมีสารผสมอยู่หลายชนิดจึงไม่ได้นำมาแยกต่อ ส่วนสารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ 1,5-anhydroglucitol และ β-sitosterol-β-D-glucoside และสารผสมระหว่าง 22,23-dihydrochondrillasterol กับ chondrillasterol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด

จากการที่สารสกัดหยาบ hexane แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเท่ากับเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด เมื่อนำมาแยกแล้วพบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด ได้แก่ สารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 และ H 8.5.5.3.2 ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 µg/mL ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการแยกและการทำให้สารบริสุทธิ์ขึ้น ได้กำจัดสารไม่แสดงฤทธิ์ออกไป ทำให้สารที่บริสุทธิ์แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งมากขึ้น ได้ค่า ED_{50}

ลดลง ส่วนสารสกัดหยาบ ethanol แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้น พบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนด ได้แก่ สารกลุ่ม E 1.1.3 ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 µg/mL แสดงให้เห็นว่าเมื่อยังเป็นสารสกัดหยาบซึ่งเกิดจากสารผสมหลายชนิด มีทั้งสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงทำให้ค่า ED_{50} มาก แต่เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้นทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น เพราะได้แยกสารที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และ/หรือสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งออกไปแล้ว

จากการนำสมุนไพรตำรับที่มีหญ้าลิ้นงูประกอบอยู่ ไปรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งของนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ซึ่งเชื่อว่าให้ผลการรักษามะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งตับ และมะเร็งหลอดลม ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จากหญ้าลิ้นงูที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง อาจเป็นข้อมูลสนับสนุนการรักษาในคลินิกได้ว่า หญ้าลิ้นงูมีสารสำคัญยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จึงช่วยให้ผลการรักษาทางคลินิกได้ผลในระดับหนึ่ง เพื่อหาข้อมูลสนับสนุนให้มากและชัดเจนขึ้น สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการศึกษาทางคลินิกต่อไปจนสามารถพัฒนาเป็นยารักษามะเร็งได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2 H 8.5.5.3.1 H 8.5.5.3.2 และ E 1.1.3 พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง ค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 21.00 และ 17.50 µg/mL ตามลำดับจึงควรนำไปศึกษาต่อเพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 หรือนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

2. สารบริสุทธิ์ และ/หรือสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น เช่น การต้านการอักเสบ การต้านมาลาเรีย การต้านเชื้อ HIV หรือการต้านเชื้อรา

3. ควรเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชั่นของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ แล้วนำไปศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสารกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

4. ควรศึกษาองค์ประกอบหลัก และ/หรือสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในชั้น ethyl acetate เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ และ/หรือสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากขึ้น

5. ควรใช้เครื่องมือที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการแยกสารกลุ่มที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่เป็นเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กฤษณา ไกรสินธุ์. (2537). "การอภิปรายเรื่องทรรศนะที่เกี่ยวกับทิศทางการวิจัย : การพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยา," ใน *รายงานการประชุม การวิจัยเพื่อพัฒนาการแพทย์แผนไทย.* หน้า 11. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทยร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. (2540). *รายงานการสัมมนาทางวิชาการเรื่องสมุนไพรไทย เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงครองสิริราชสมบัติ ครบ 50 ปี.* กรุงเทพฯ : บุญศิริการพิมพ์.

ดรุณ เพ็ชรพลาย, ณุฉัตรา จันทร์สุวาณิชย์ และชาตรี ชาญประเสริฐ. (2538). *พืชสมุนไพรในประเทศไทย ตอนที่ 1.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

เต็ม สมิตินันท์. (2523). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ - ชื่อพื้นเมือง).* กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา. (2539). "ยารักษามะเร็ง," ใน *เภสัชวิทยา.* ยุพิน สังวรินทะ. หน้า 579. ภาควิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (2526). "ทองพันชั่ง," *วารสารโรคมะเร็ง.* 9(2) : 60.

_____. (2533). "พืชสมุนไพรแกแลกับโรคมะเร็ง," *วารสารโรคมะเร็ง.* 16(2) : 70.

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

วีณา จิรัจฉริยากูล. (2533). "สมุนไพรกับโรคมะเร็ง," ใน *ยาจากสมุนไพร.* เอมอร โสมนะพันธุ์. หน้า 207. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

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

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และการพลังงาน. (2533). *อุทยานสมุนไพรพุทธมณฑล.* กรุงเทพฯ : ฟันนี่พับบลิชชิ่ง.

สาธารณสุข, กระทรวง. (2541). *สถิติสาธารณสุข พ.ศ. 2540.* กรุงเทพฯ " กองสถิติสาธารณสุข.

สุนทรี สิงหบุตรา. (2535). *สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด.* กรุงเทพฯ : ม.ป.พ.

เสาวภา พรสิริพงษ์ และวิชิต เปานิล. (2542). "การพัฒนาการผลิตสมุนไพรเพื่อเป็นยาในประเทศไทย สถานภาพ ปัญหา อุปสรรค และแนวทางแก้ไข," *วารสารภาษาและวัฒนธรรม.* 18(1) : 67 - 86.

เอมอร โสมนะพันธุ์. (2536). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 2.* วันดี กฤษณพันธ์. หน้า 203 - 204. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

_____. (2536). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 2.* วันดี กฤษณพันธ์. หน้า 205. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

_____. (2536). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน *ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เล่ม 2.* วันดี กฤษณพันธ์. หน้า 220. พิมพ์ครั้งที่ 2. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Banerji, A. & Das, R. (1975). "Aurantiamide & Aurantiamide Acetate : New Amide from *Piper aurantiacum* Wall," *Indian J. Chem.* 13 : 1234 - 1236.

Bock, K., et al. (1980). "The Stucture of Acertaminin," *Phytochemistry.* 19 : 2033.

Cox, R.E., Chexal, K.K & Holker, S.E. (1976). "The Biosynthesis of Fungal Metabolites. Part VIII. Identification of N-Benzoyl-L-Phenylalanyl -L-Phenylalaninol Acetate, a Metabolite of *Aspergillus glaucus*," *J. Chem. Soc .Perkin. Trans I.* 578.

Deerasamee, S. et al. (1999). *Cancer in Thailand.* Bangkok : Bangkokwatchasan.

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

_____. (1984). "Codisterol and other Δ^5-Sterol in Seeds of *Cucurbita maxima*," *Phytochemistry.* 22(12) : 2925 - 2929.

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

Hamzah, A.A., Lajis, N.H. & Sargent, M.V. (1994). "Kaemferitrin from the Leaves of *Hedyotis verticillata* and its Biological Activity," *Planta Med.* 60 : 388 - 389.

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

Hui, W.H. & Li, M.M. (1977). "Triterpenoids and Sterols from the Stems of *Hedyotis acutangula*," *Phytochemistry.* 16 : 1309 - 1310.

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

Jork, H., Funk, W. & Wimme, H. (1990). *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods Vol 10a.* Germany : VCH-Verlag, Weinheim.

Kanaoka, M., Yoshizaki, M. & Fujino, H. (1982). "Studies on the Constituents of *Trichosanthes* Species. I. On the Neutral Ether Extracts of the Dried Roots of *Trichosanthes japonica* Regel, *Trichosanthes kirilowii* Maxim and *Trichosanthes cucumeroides* Maxim," *Chem. Pharm. Bull.* 30(7) : 2570 - 2574.

Kikuchi, T., et al. (1984). "Studies on the Constituents of Medicinal and Related Plants in Sri Lanka. I. New Triterpene from *Hedyotis lowsoniae*," *Chem. Pharm. Bull.* 32(10) : 3906 - 3911.

Kikuchi, T., et al. (1985). "Studies on the Constituents of Medicinal and Related Plants in Sri Lanka. III. Novel Sesquilignans from *Hedyotis lowsoniae*," *Chem. Pharm. Bull.* 33(4) : 1444 - 1451.

Koumaglo, K., et al. (1992). "Effects of Three Compounds Extracted from *Morinda lucida* on *Plasmodium falciparum*," *Planta Med.* 58 : 533 - 534.

Lee, K.K., et al. (1999). "Bioactive Indole Alkaloids from the Bark of *Uncaria guiansis*," *Planta Med.* 65 : 759 - 760.

Liao, L.L.H., Chen, C.H. & Chen, C.H. (1979). "Formosan Medicinal Herb, *Hedyotis diffusa* Willd. As an Antitumor Agent," *J. Formosan Med. Assoc.* 78 : 658 - 660.

Matsumoto, T., Shigemoto, T.& Itoh, T. (1983). "Occurrence of 24-Ethyl-$\Delta^5$and 24-Ethyl-Δ^7-Sterols as C-24 Epimeric Mixtures in Seeds of *Cucumis sativus*," *Phytochemistry.* 22(11) : 2622 - 2624.

Maiti, B.C. & Thomson, R.H. (1976). "A Modified Dipeptide from the Alga *Cystoseira corniculata* Hauck," *Experientia.* 32 : 1106 - 1107.

Mitra, C.R. & Misra, G. (1965). "*Mimusops hexandra* I. Constituents of Fruit and Seeds," *Phytochemistry.* 4 : 345 - 348.

Na Bangchang, K. (1987). *Study on Anticancer Activity of a Well - Know Thai Remedy.* Thesis, M.Sc. (Phamacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.

Nakanishi, K., et al. (1965). "Phytochemical Servey of Malaysian Plants, Preliminary Chemical and Pharmacological Screening," *Chem. Pharm. Bull.* 13(7) : 882 - 890.

Nishihama, Y., et al. (1981). "Three New Iridoid Glucoside from *Hedyotis diffusa*," *Planta Med.* 43 : 28 - 33.

Otsuka, H., et al (1991). "Isolation of 10-*O*-Acyl Iridoid Glucoside from a Philippine Medicinal Plant, *Oldenlandia corymbosa* Linn. (Rubiaceae)," *Chem. Pharm. Bull.* 39(8) : 2049 - 2052.

Pavia, D.L., et al. (1995). *Organic Laboratory Techniques.* 2nd Philadelphia : Saunders College Publishing.

Peng, J.N., Feng, X.Z. & Liang, X.T. (1999). "Two New Iridoids from *Hedyotis chrysotricha*," *J. Nat. Prod.* 62 : 611 - 612.

Phuong, N.M., et al. (1999). "Two New-β-Carboline Alkaloids from *Hedyotis capitellata* var mollis," *Planta Med.* 65 : 761 - 762.

_____. (1999). "β-Carboline Alkaloids from *Hedyotis capitellata*," *Phytochemistry.* 52 : 1725 - 1729.

Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of A Well - Know Thai Folkloric Remedy.* Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.

Sakakibara, J., et al. (1983). "6β-Hydroxyursolic Acid and others Triterpenoids of *Enkianthus cernuus*," *Phytochemistry.* 22(11) : 2553 - 2555.

Sarath, P., et al (1983). "3β-Hydroxy-28-*p*-Coumaroyloxy-Lup-20(29)-En-27-Oic Acid from *Caraipa densifolia*," *J. Nat. Prod..* 46 : 118 - 122.

Sittie, A.A., et al. (1999). "Structure-Activity Studies : *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activity of Anthraquinones from *Morinda lucida*," *Planta Med.* 65 : 259 - 261.

Suffness, M. & Douros, J. (1982). "Current Status of the NCI Plant and Animal Product Program," *J. Nat. Prod.* 45(1) : 1.

Takagi, S., et al. (1981). "Studies on the Herb Medical Used for some Tumors. II. On the Constituents of *Hedyotis corymbosa* Lamk," *Chem. Abstr.* (1981). 5 : 413.

Tsai, P.L. et al. (1998). "Constituents and Bioactive Principles of *Polygonum chinensis*," *Phytochemistry.* 49(6) : 1663 - 1666.

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

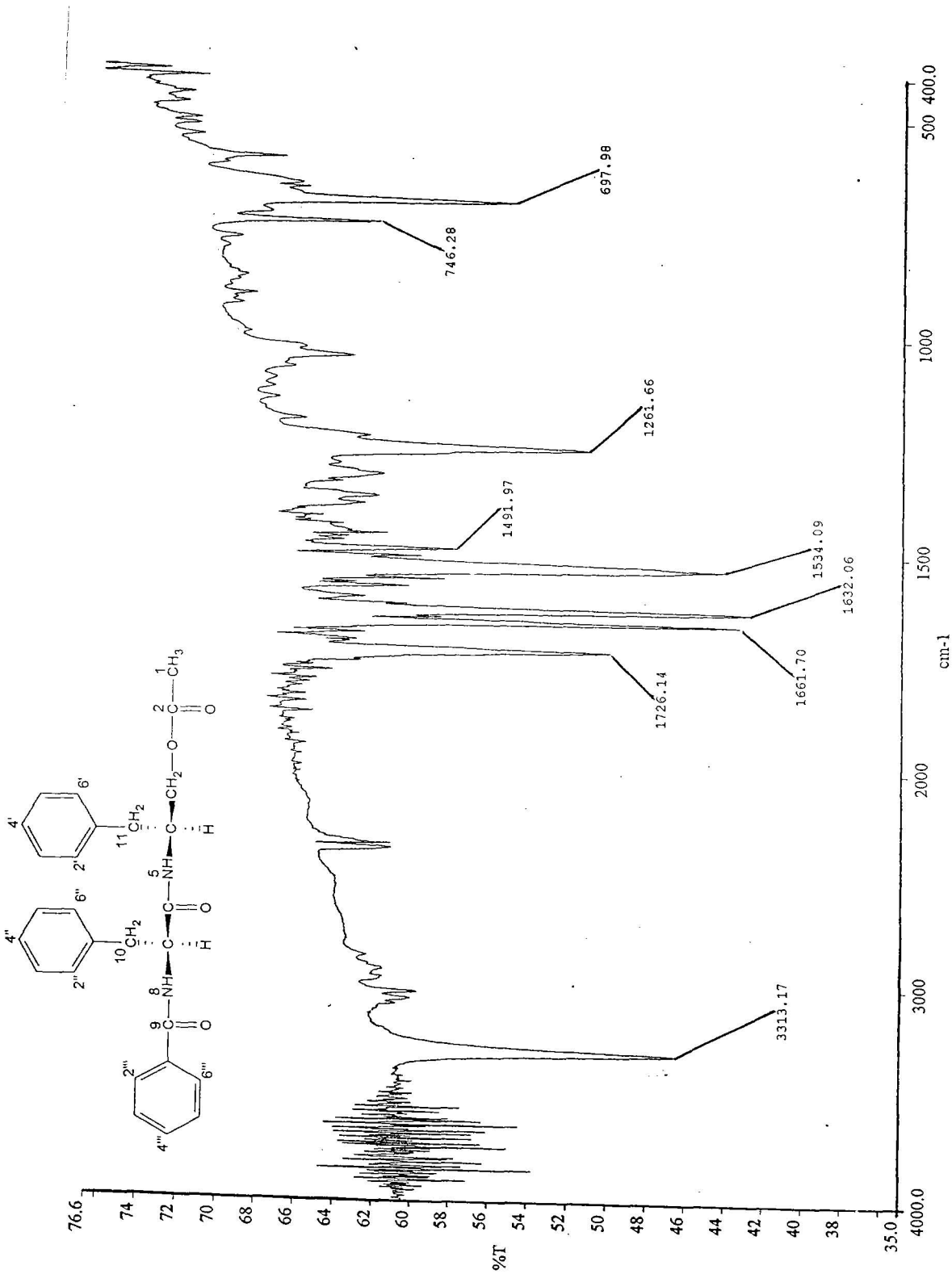
Wahidulla, S., D' Souza, L. & Kamat, S.Y. (1991). "Dipeptides from the *Acantophora spicifera*," *Phytochemistry.* 30(10) : 3323 - 3325

Wiwatwithaya, S. (1992). The *Study of Anticancer Activity and the Immunostimulating Effect of A Well - Known Thai Folkloric Remedy.* Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.

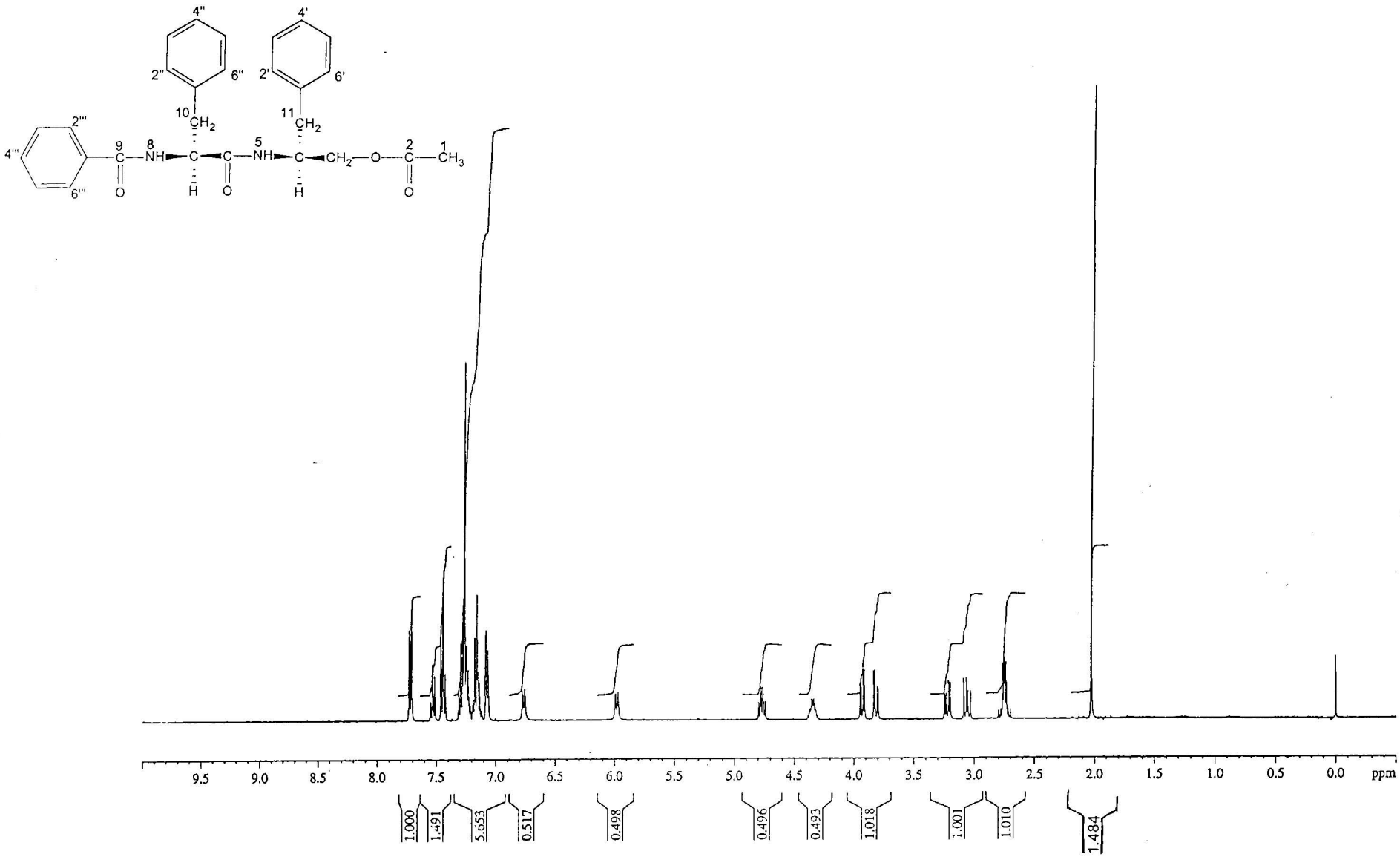
Wold Health Organization. (1993). *National Cancer Control Programes.* India : Vision.

Wu., H. et al. (1991). "Iridoids from *Hedyotis diffusa*," *J. Nat. Prod.* 54(1) : 254 -256.

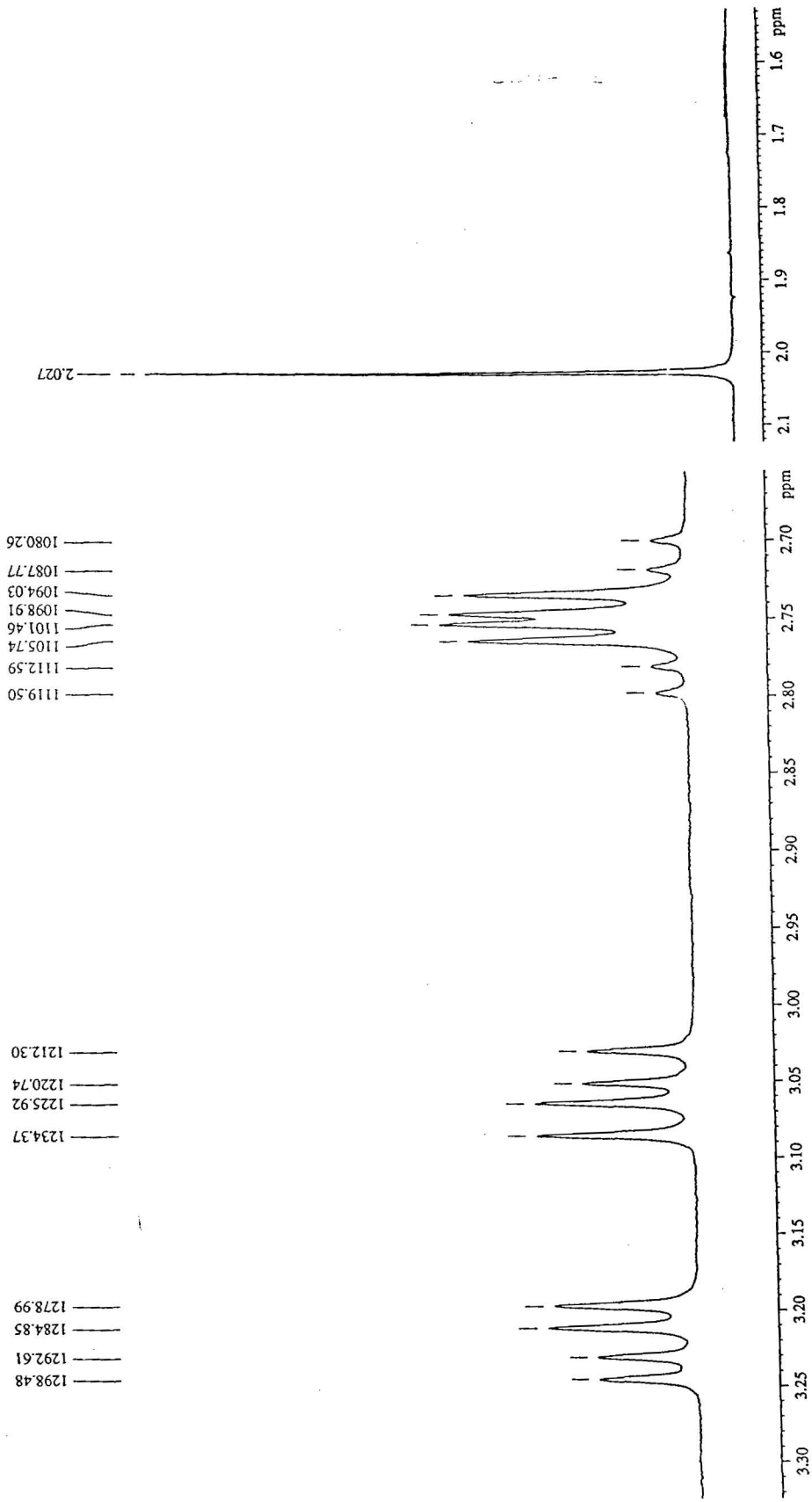
ภาคผนวก



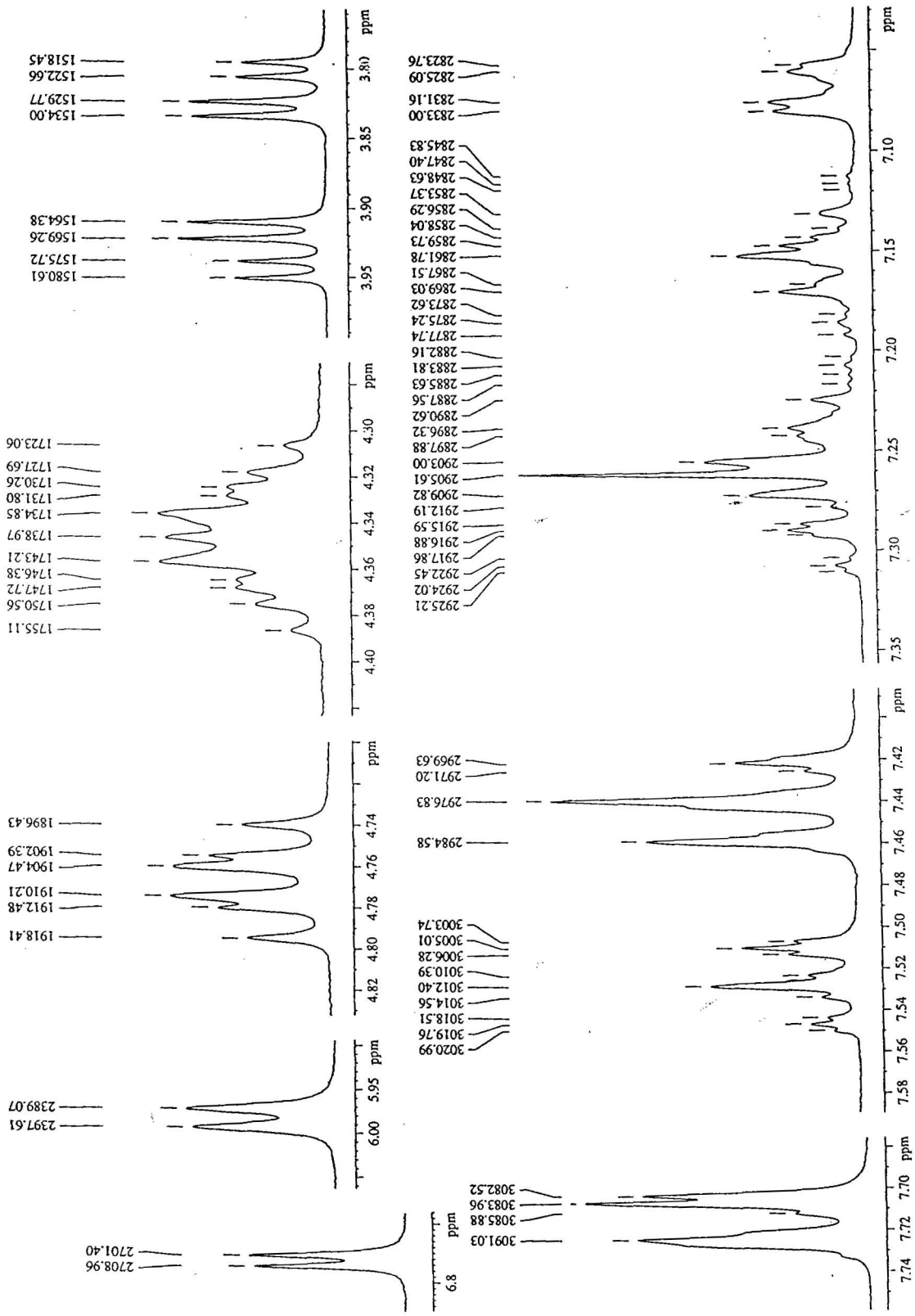
ภาพประกอบ 42 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr)



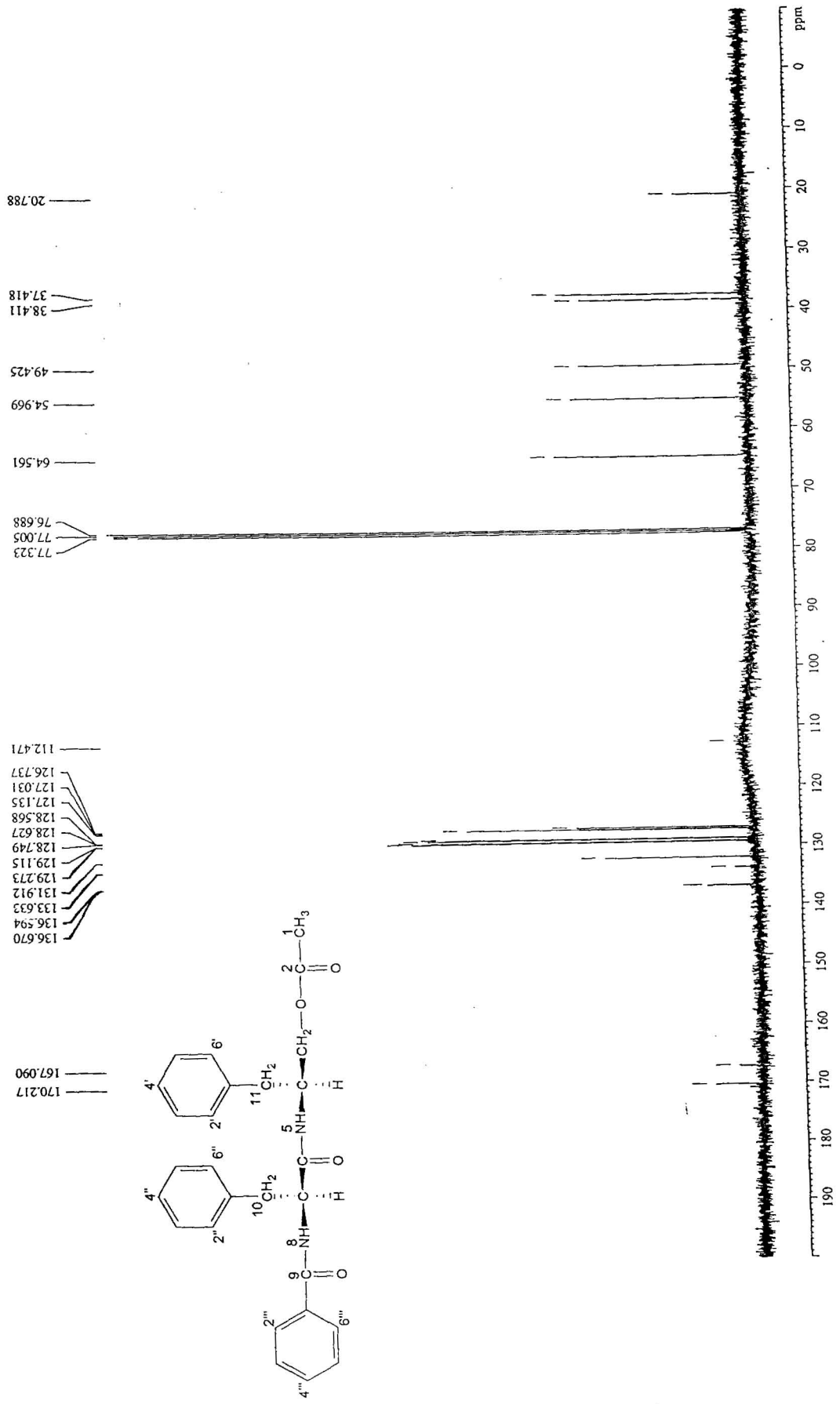
ภาพประกอบ 43 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ($CDCl_3$, 400 MHz)



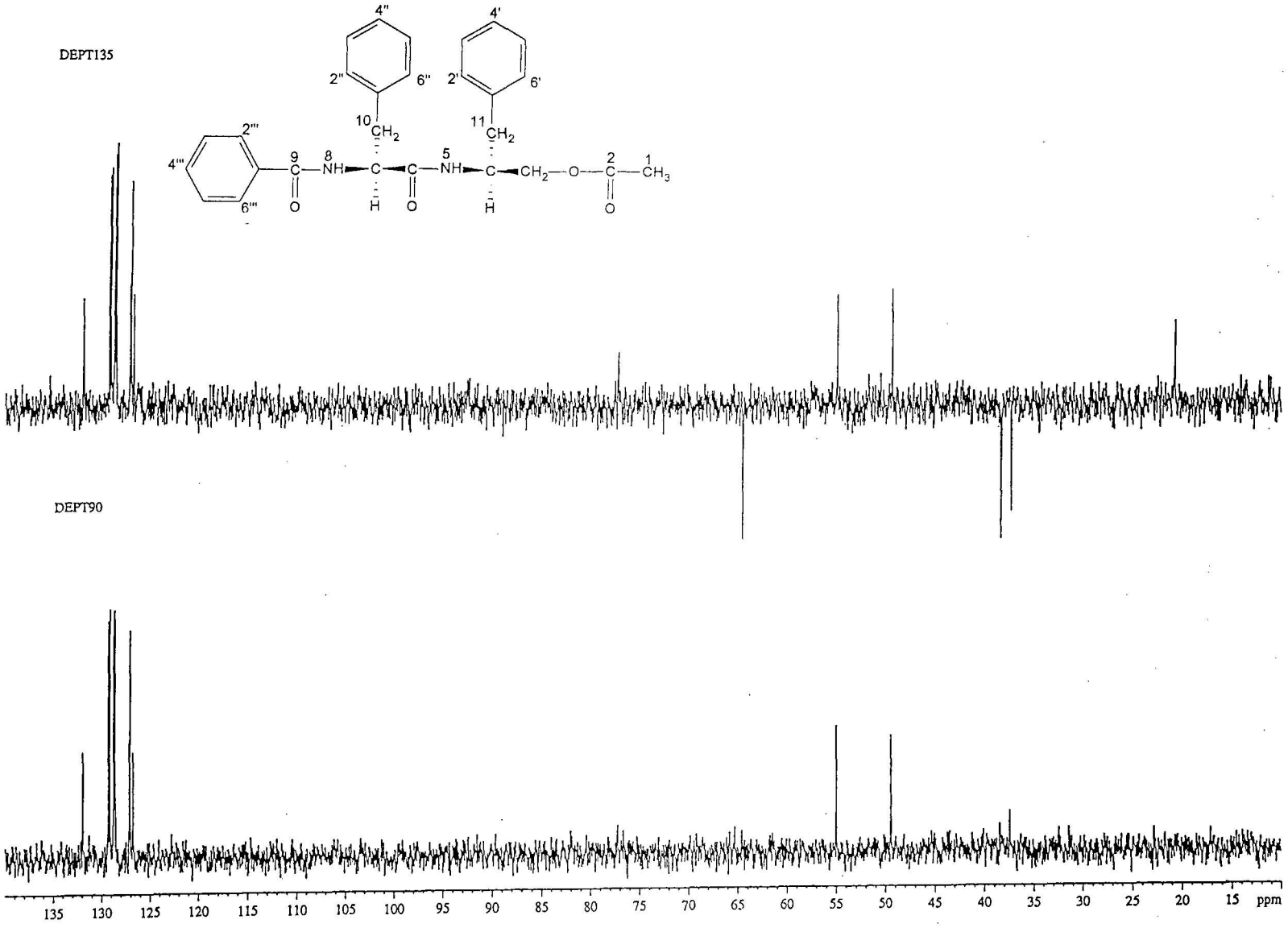
ภาพประกอบ 44 ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ที่ δ 2.00 - 3.30



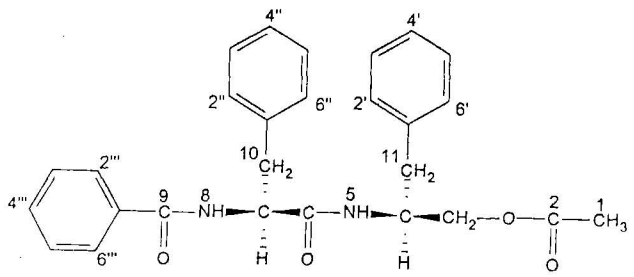
ภาพประกอบ 45 ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ที่ δ 3.75 - 7.74

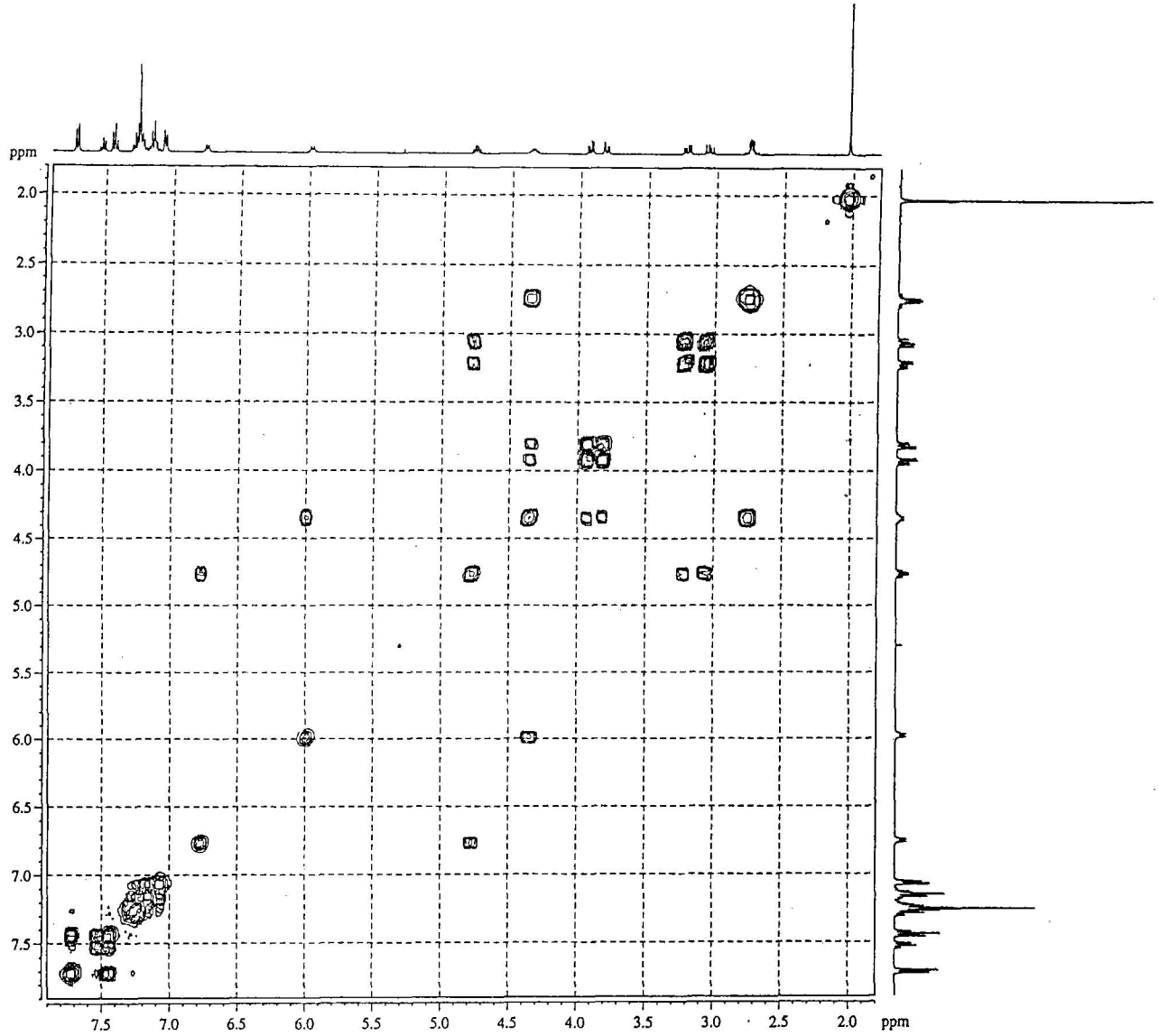


ภาพประกอบ 46 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A ($CDCl_3$, 100 MHz)

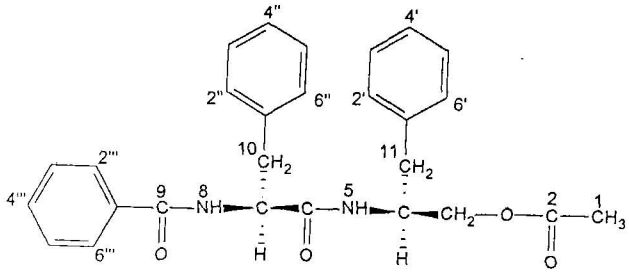


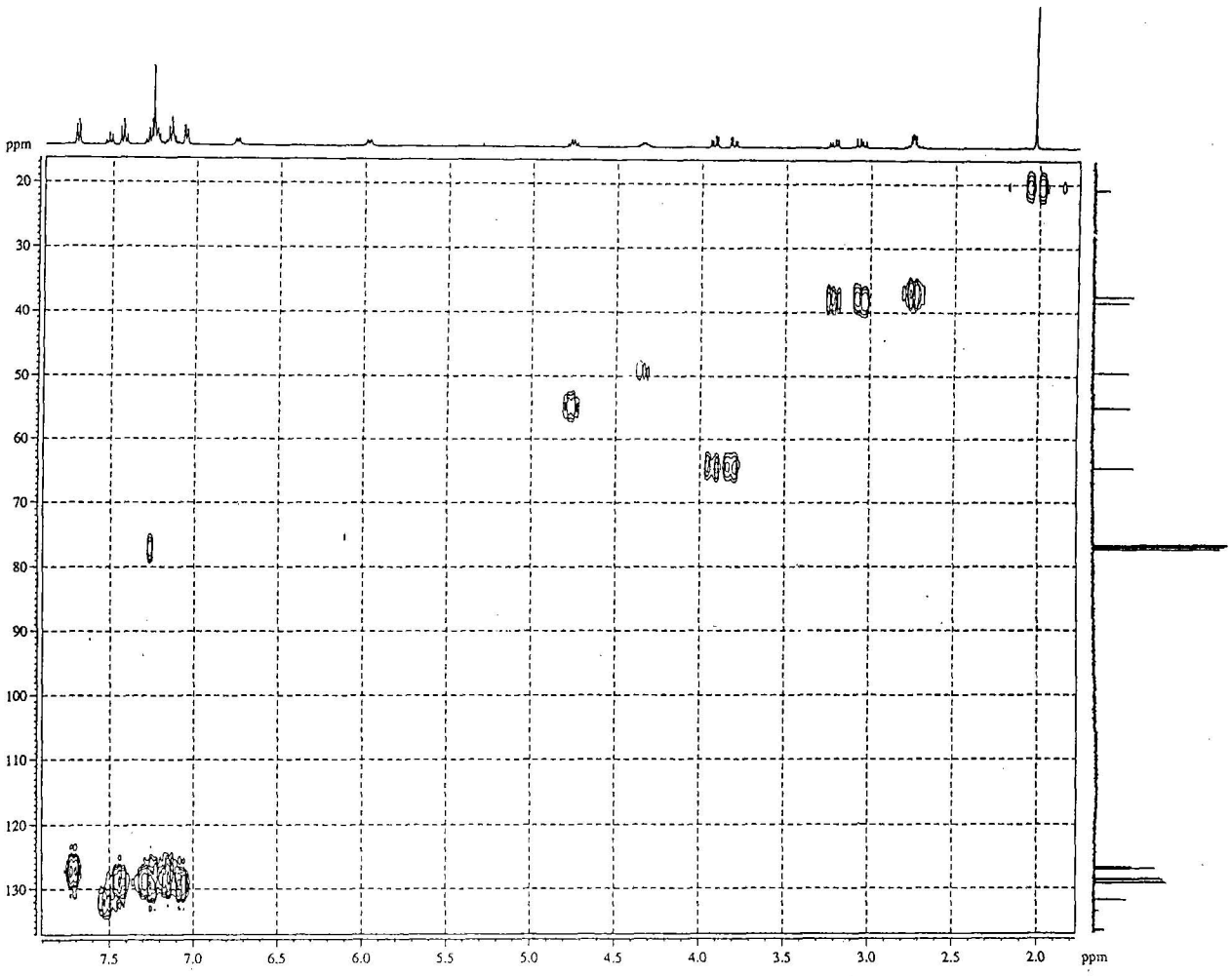
ภาพประกอบ 47 DEPT-90 และ DEPT-135 องศาของสารประกอบ A



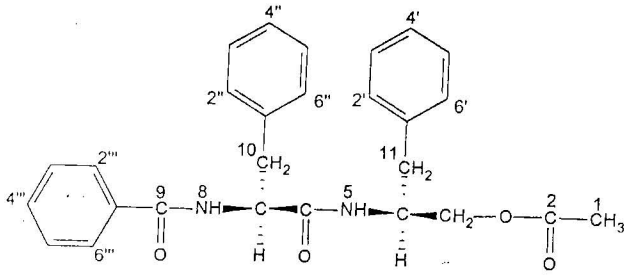


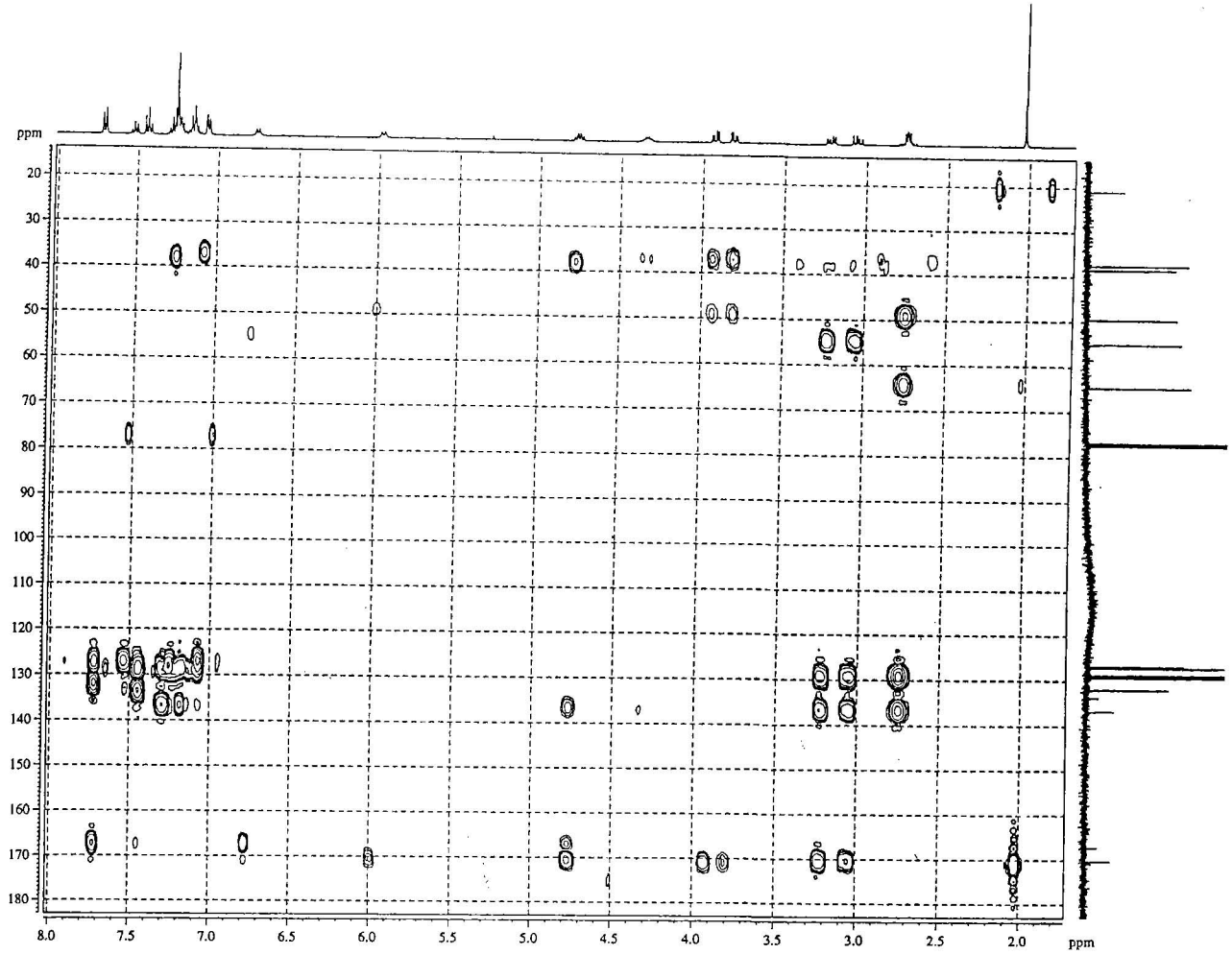
ภาพประกอบ 48 COSY สเปกตรัมของสารประกอบ A



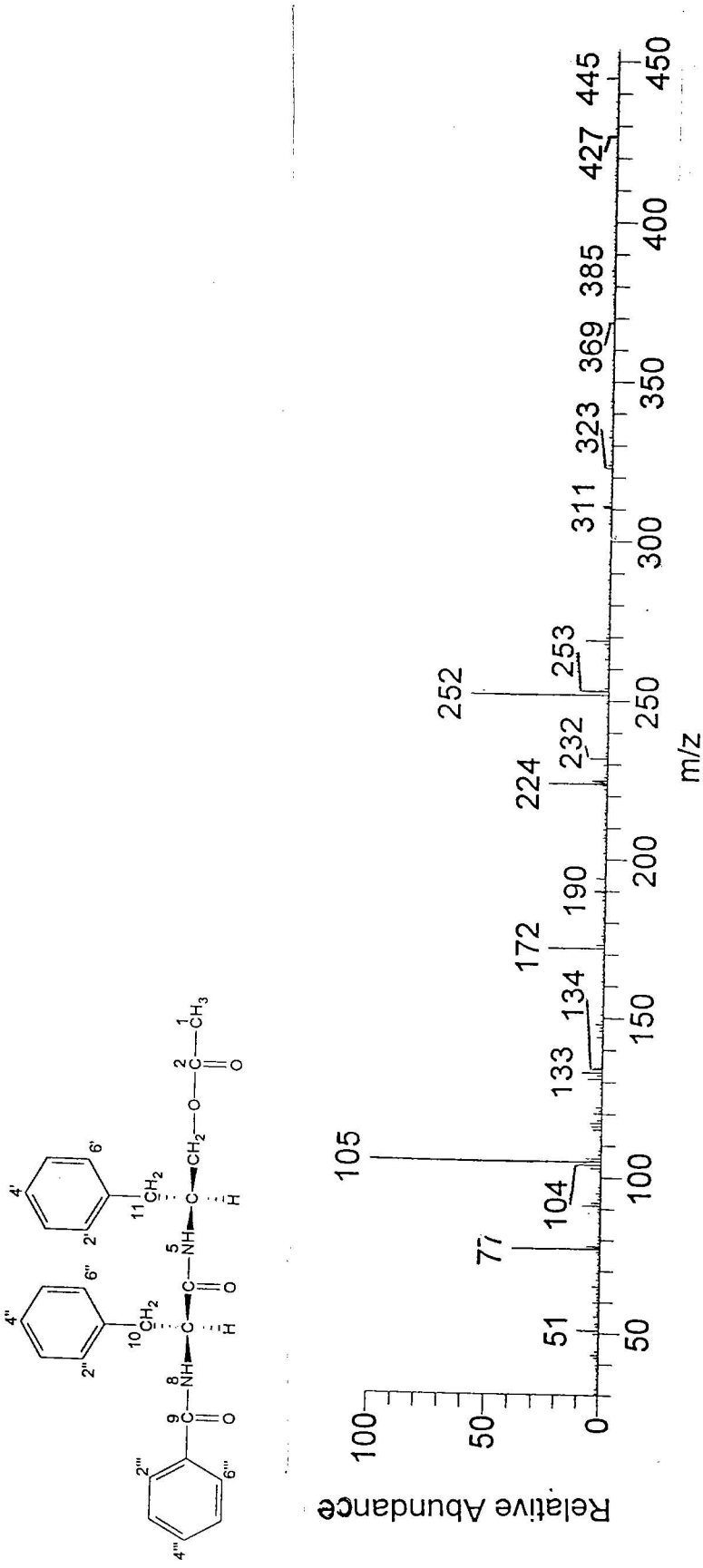


ภาพประกอบ 49 HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ A

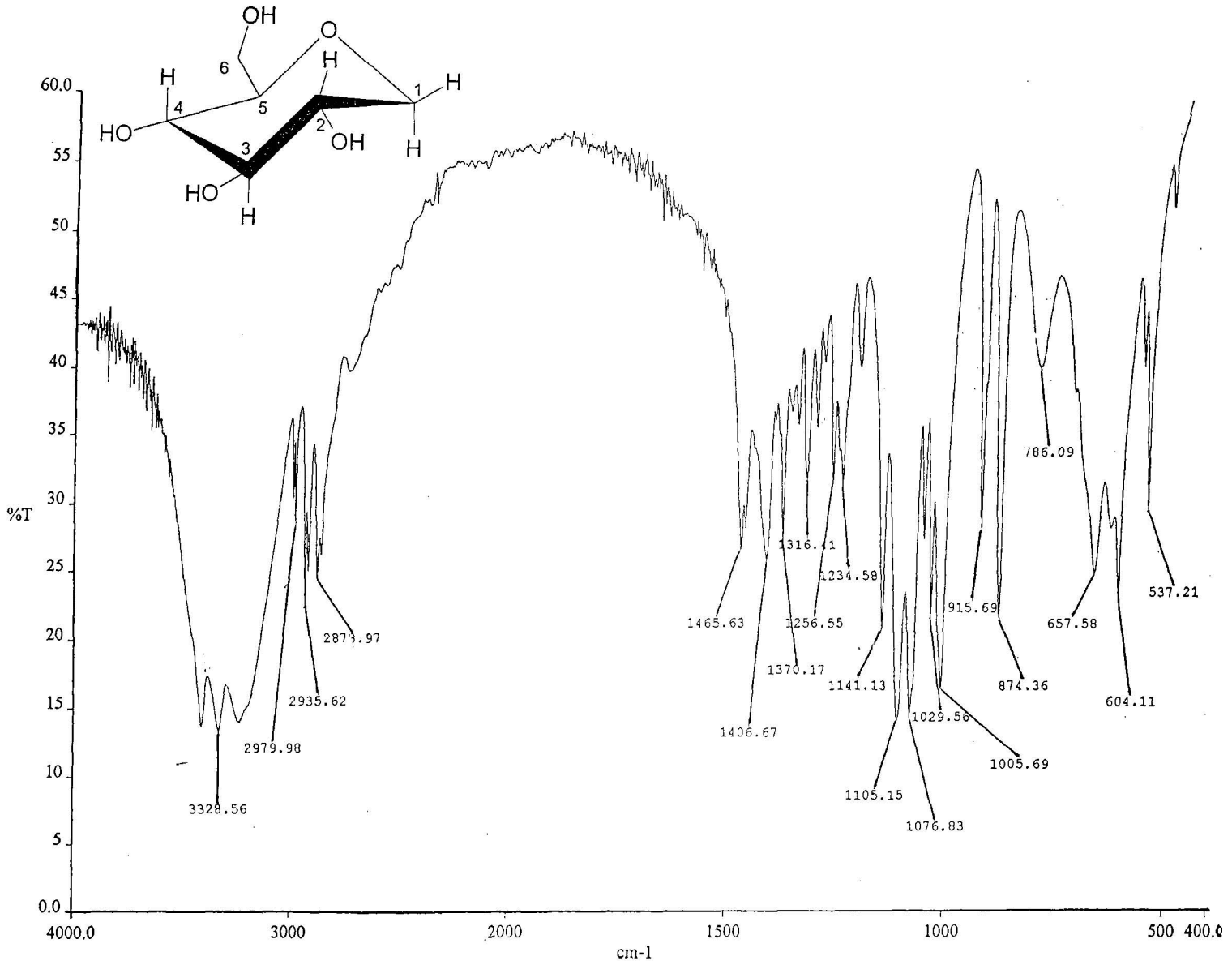




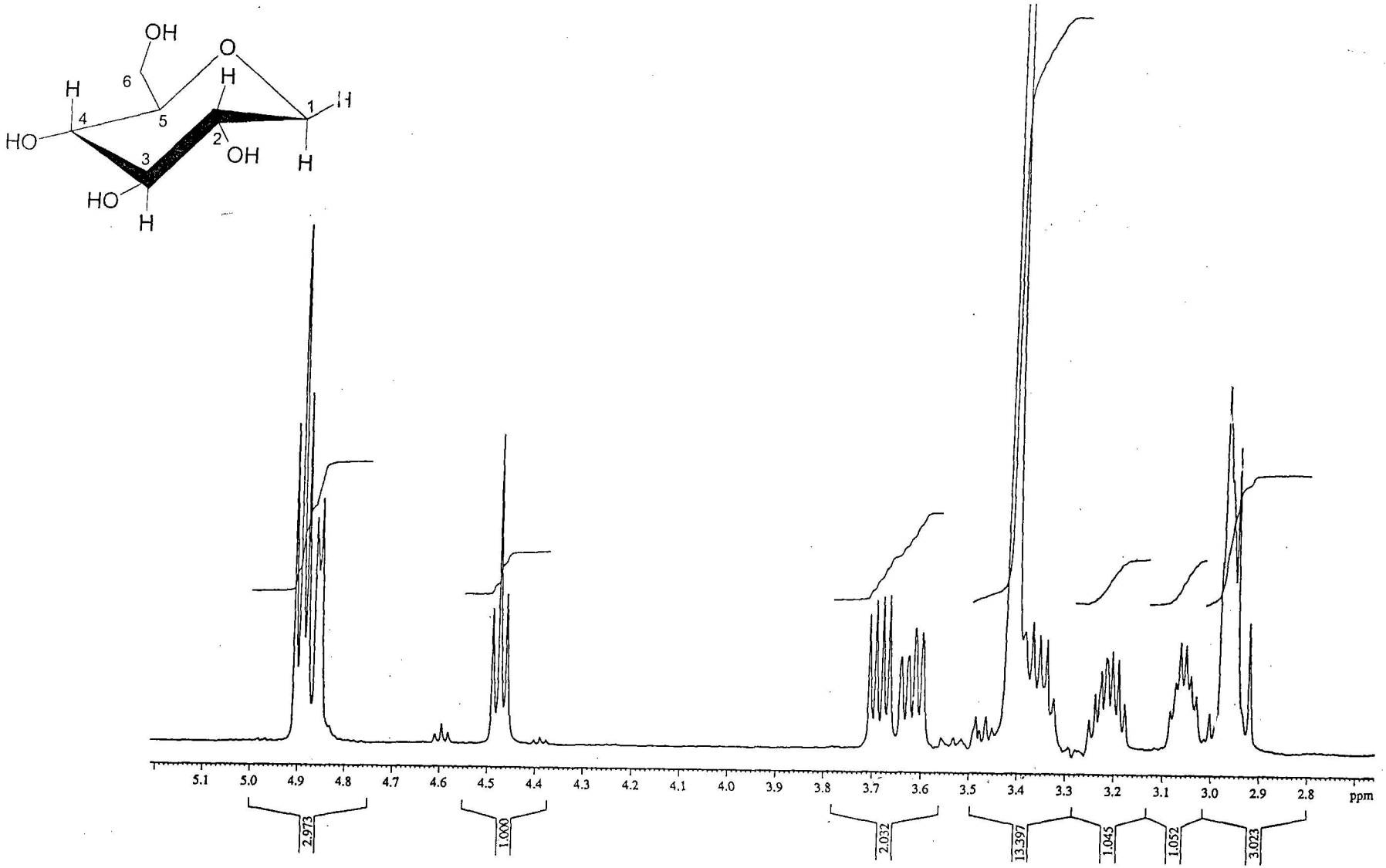
ภาพประกอบ 50 HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ A



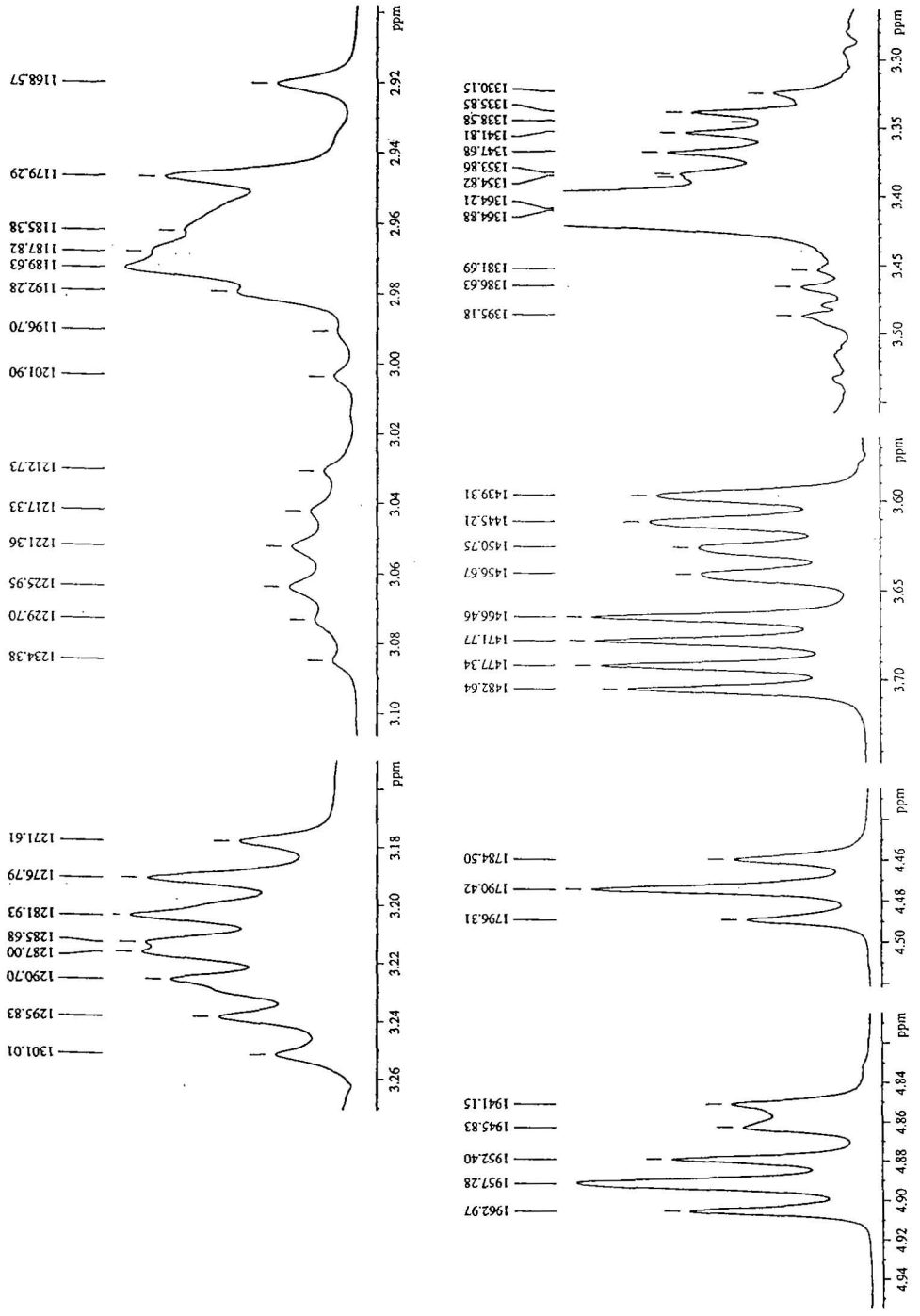
ภาพประกอบ 51 Mass Spectrum ของสารประกอบ A



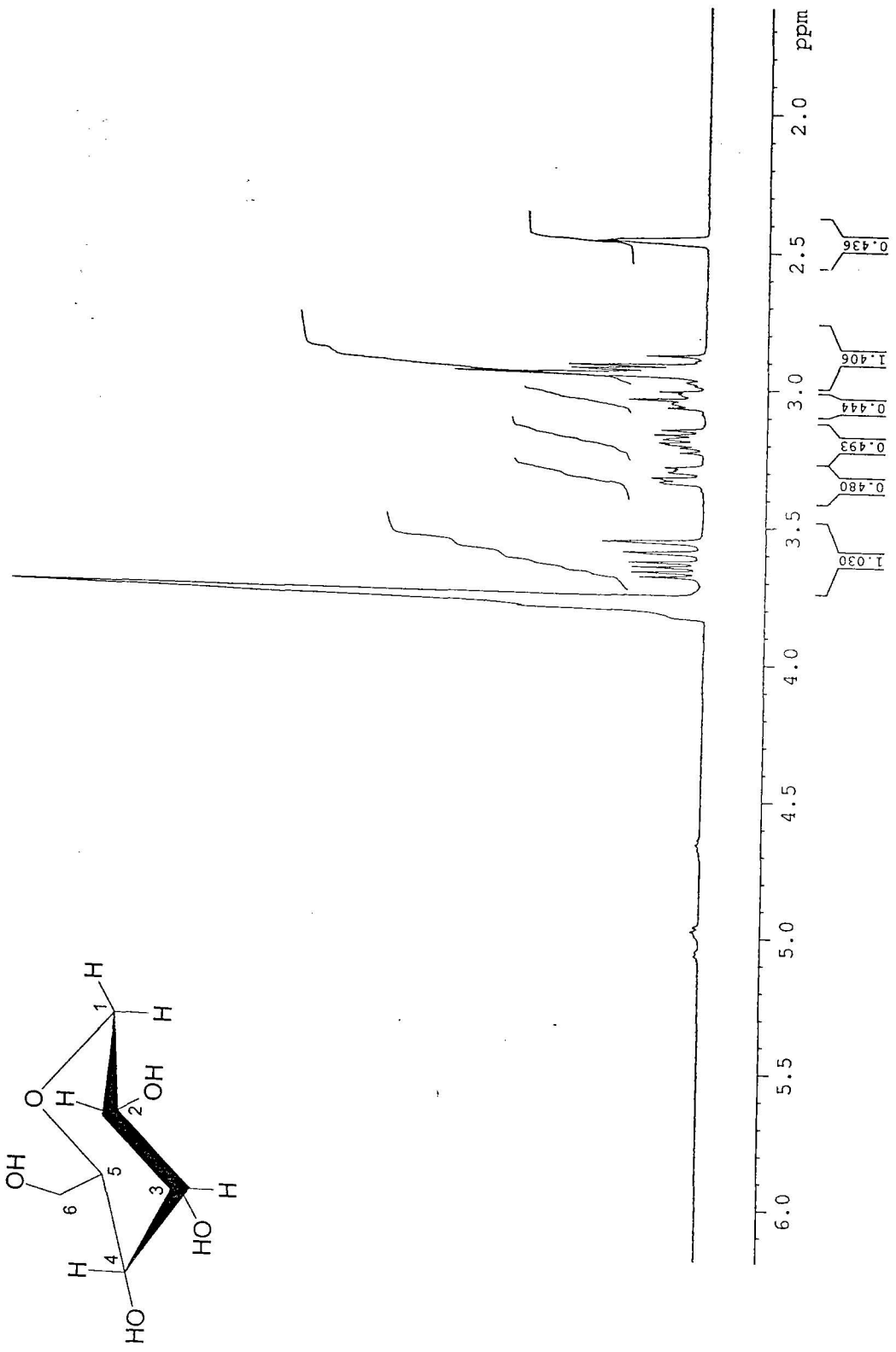
ภาพประกอบ 52 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr)



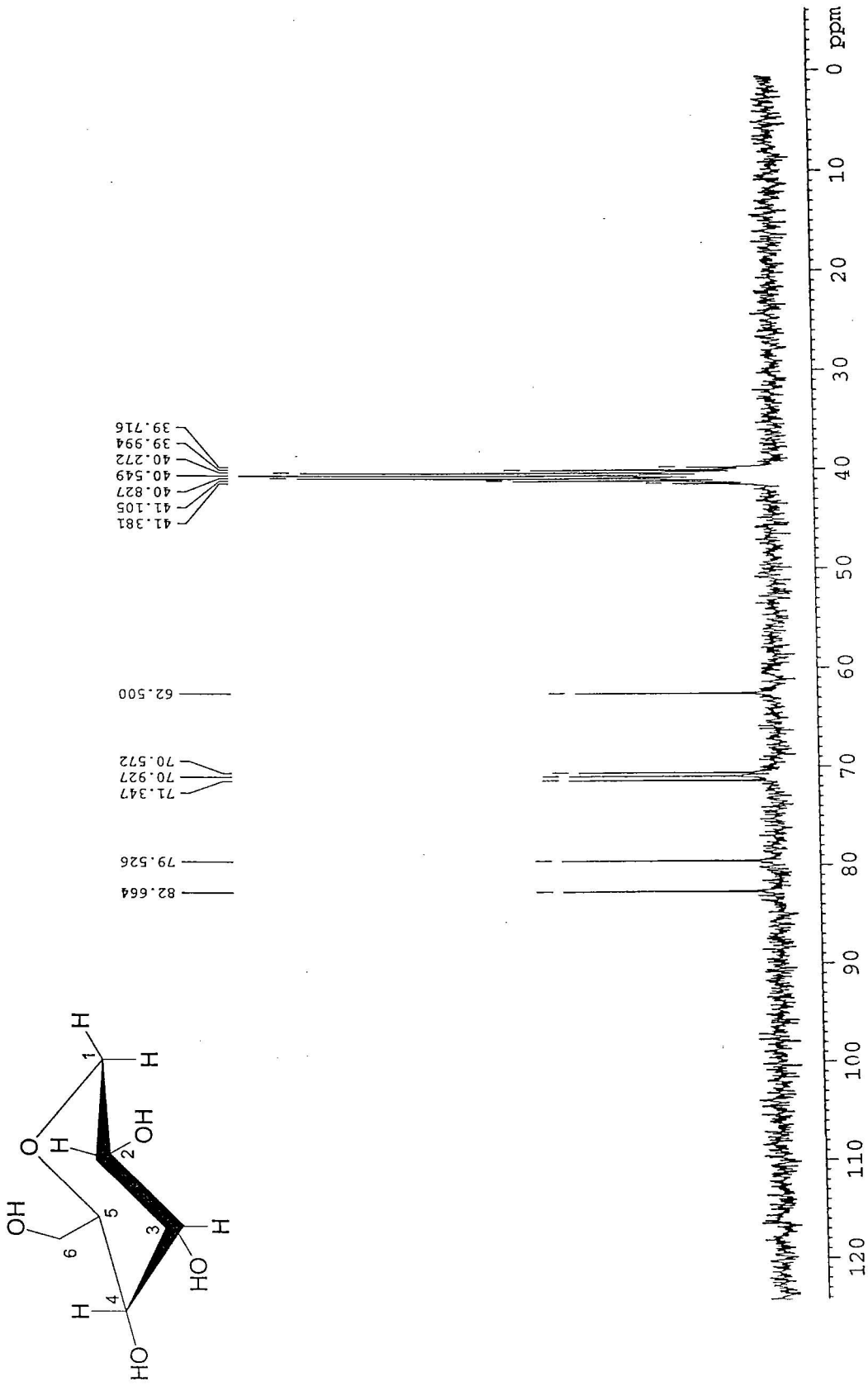
ภาพประกอบ 53 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (DMSO-d_6, 400 MHz)



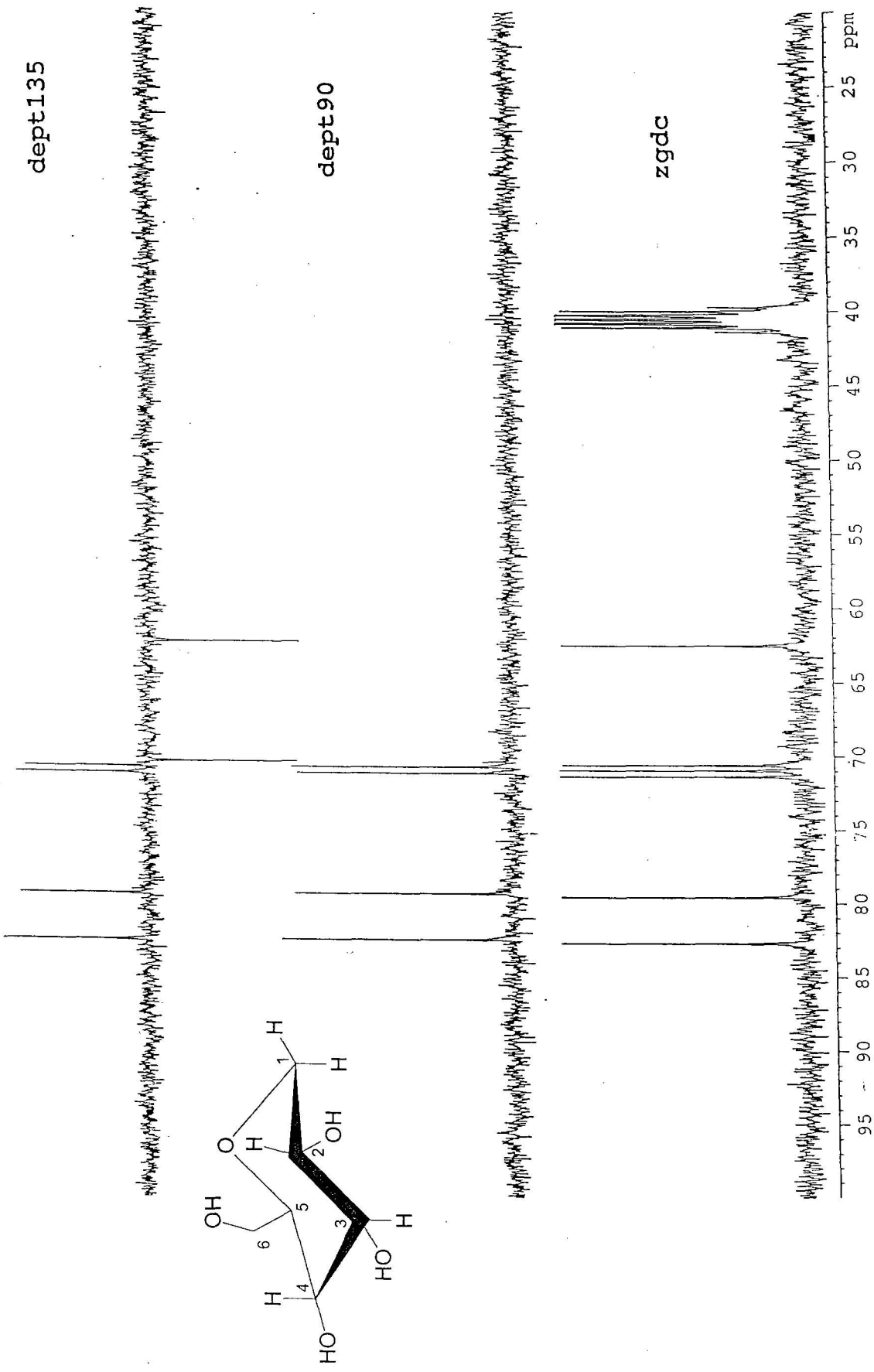
ภาพประกอบ 54 ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B



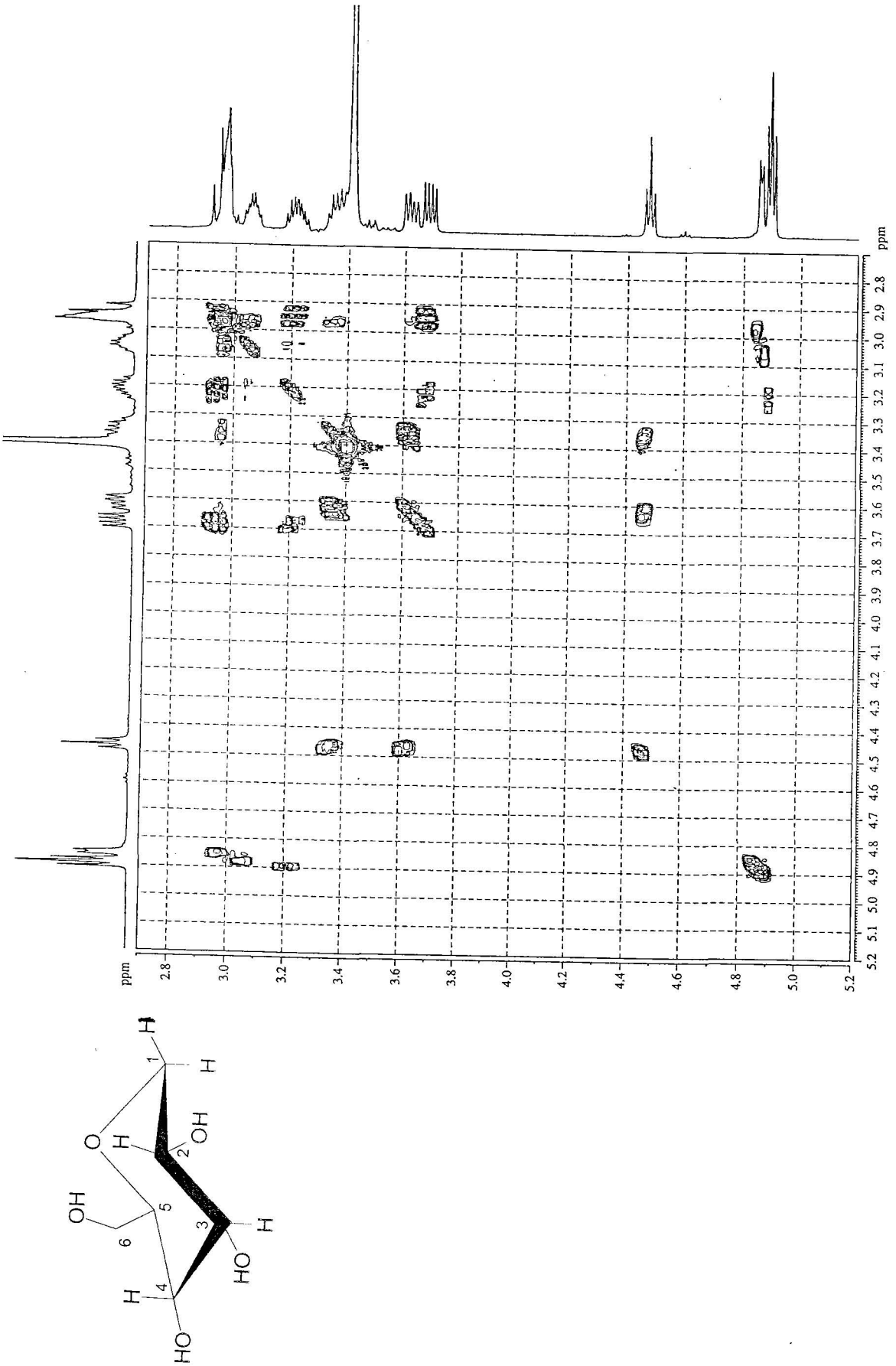
ภาพประกอบ 55 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (D_2O/DMSO-d_6, 400 MHz)



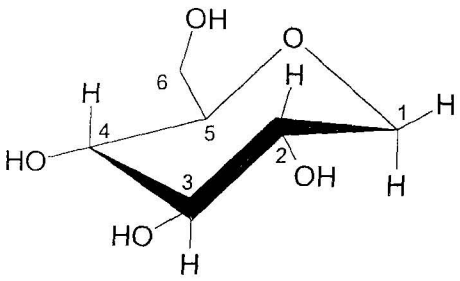
ภาพประกอบ 56 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (DMSO-d_6, 100 MHz)

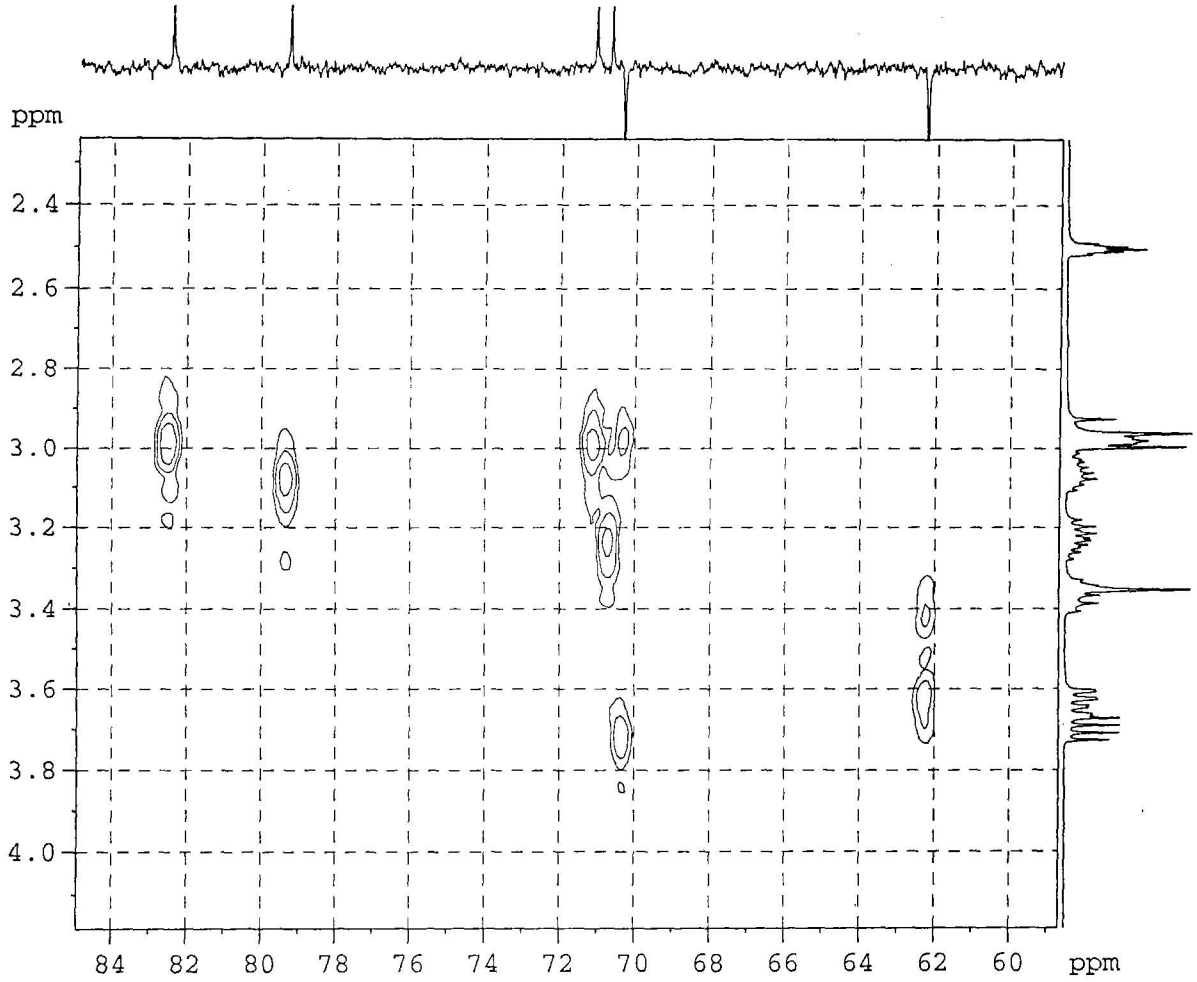


ภาพประกอบ 57 DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ B

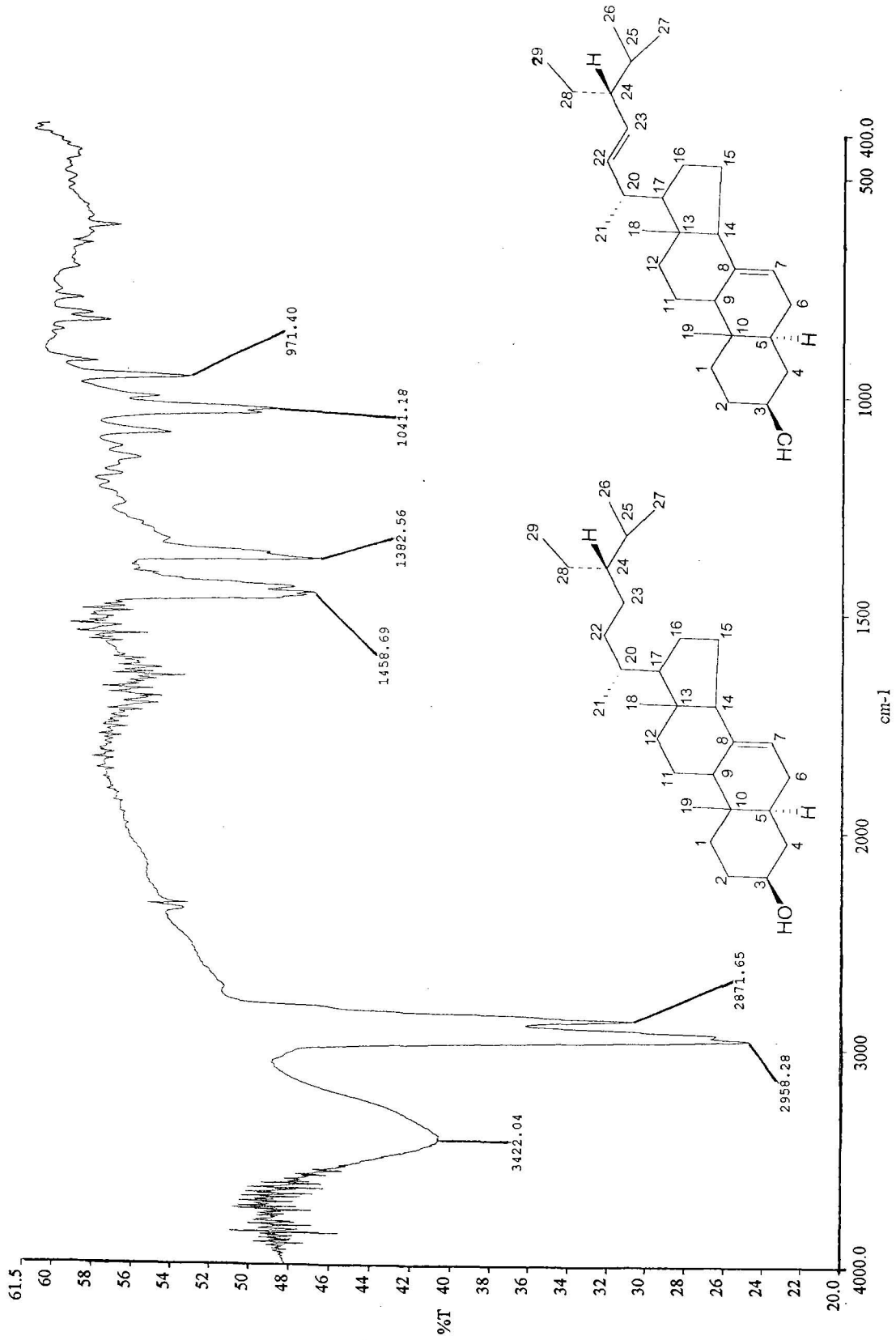


ภาพประกอบ 58 COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B

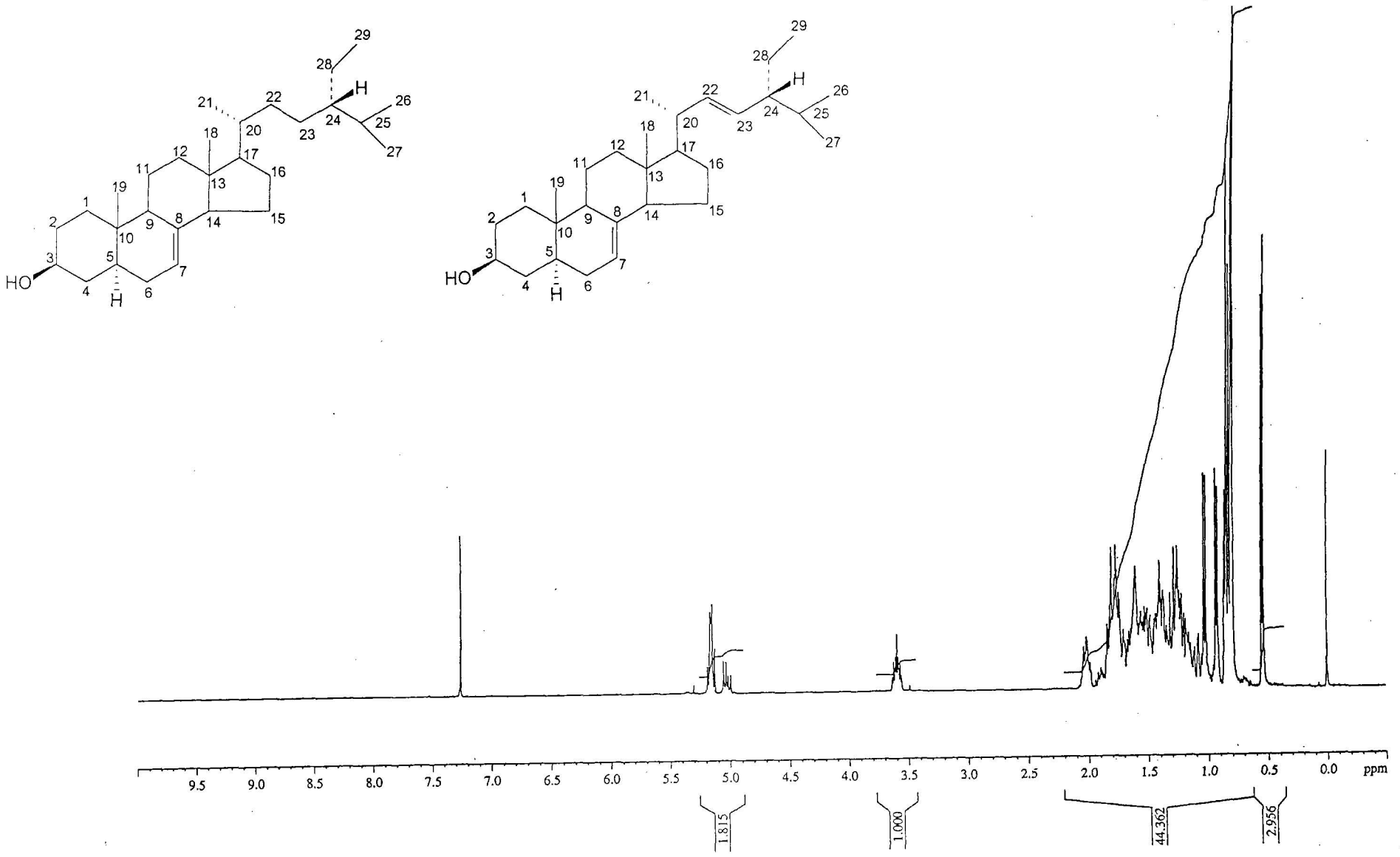




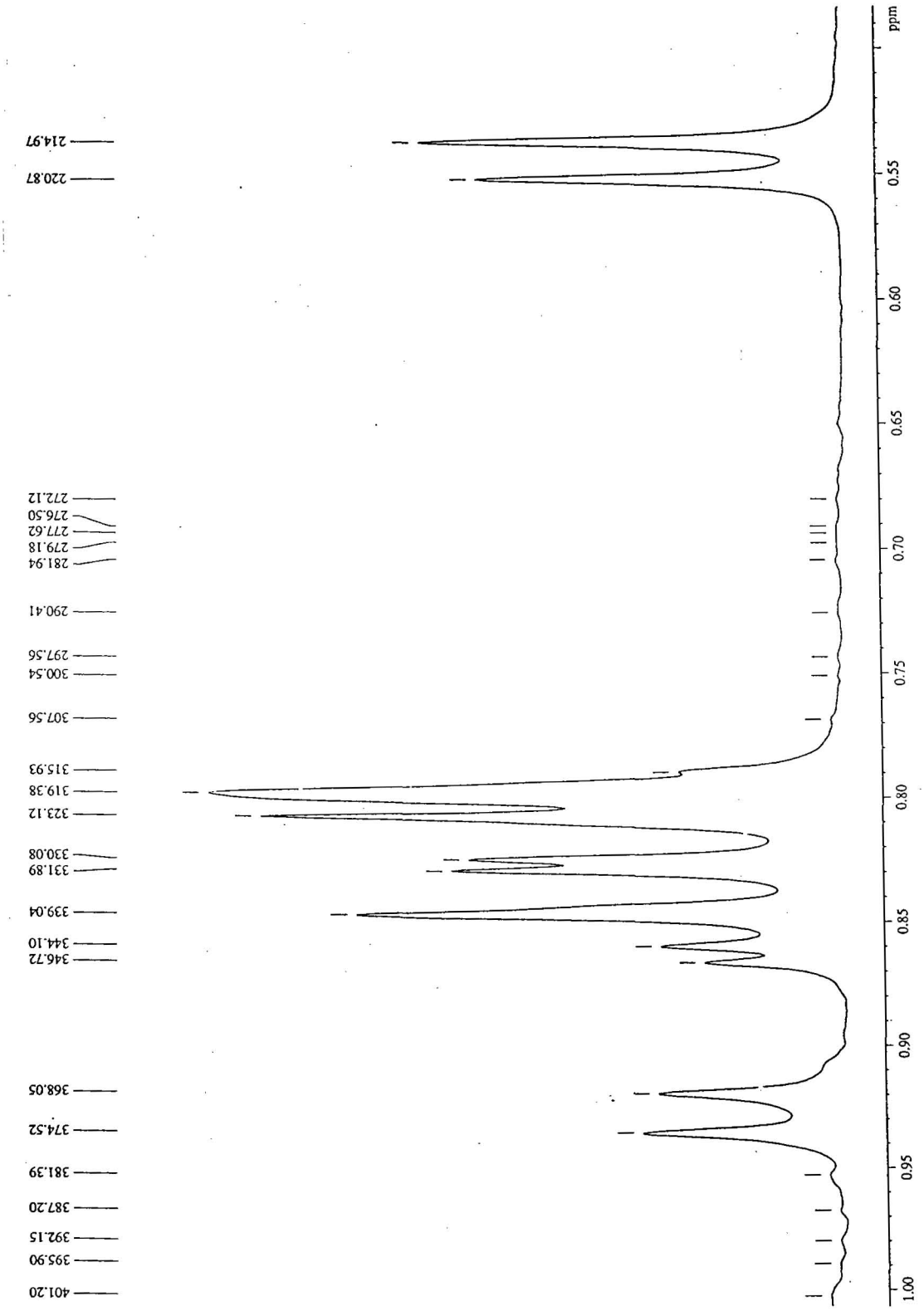
ภาพประกอบ 59 HETCOR สเปกตรัมของสารประกอบ B



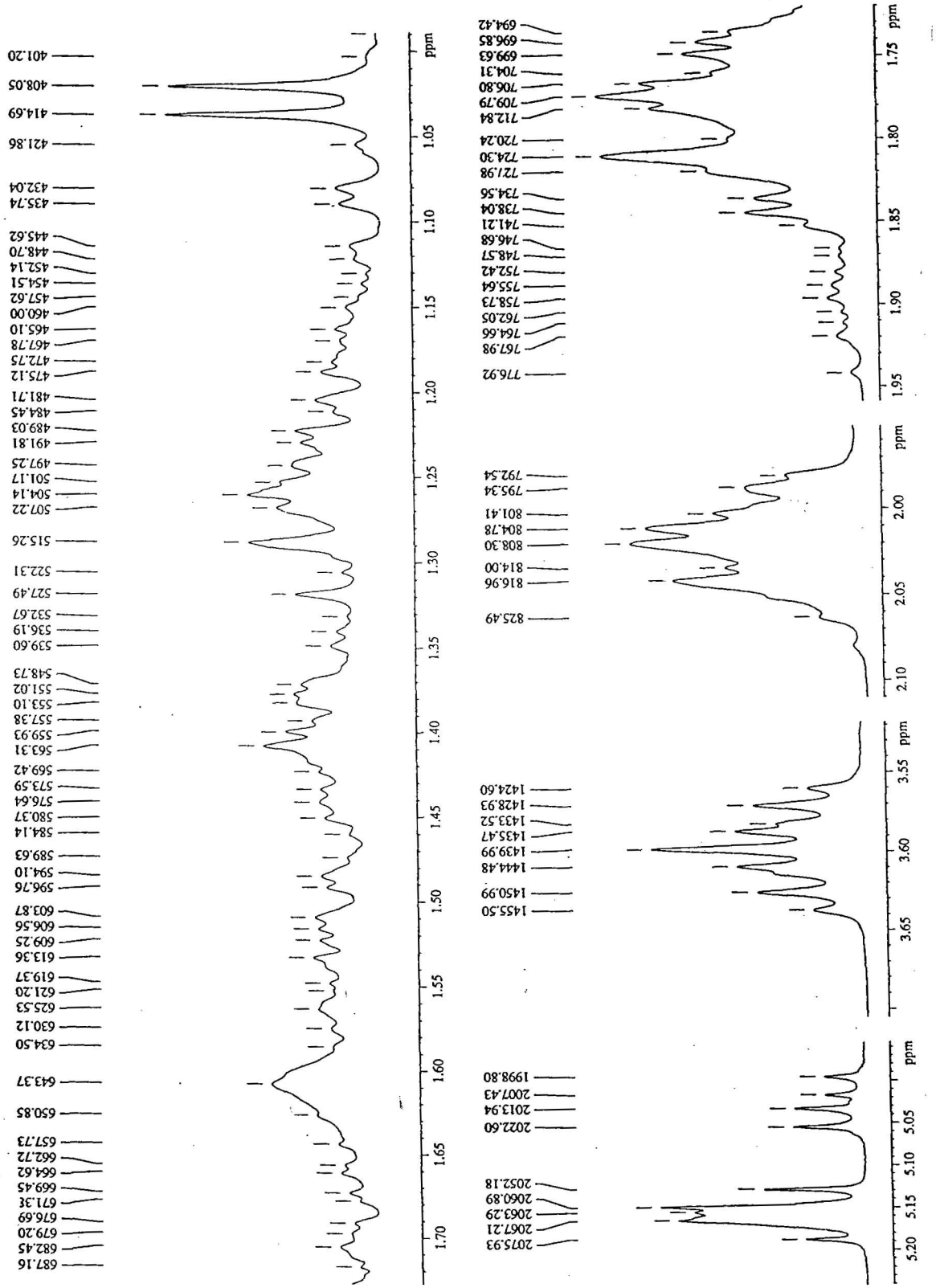
ภาพแสดง 60 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ C (KBr)



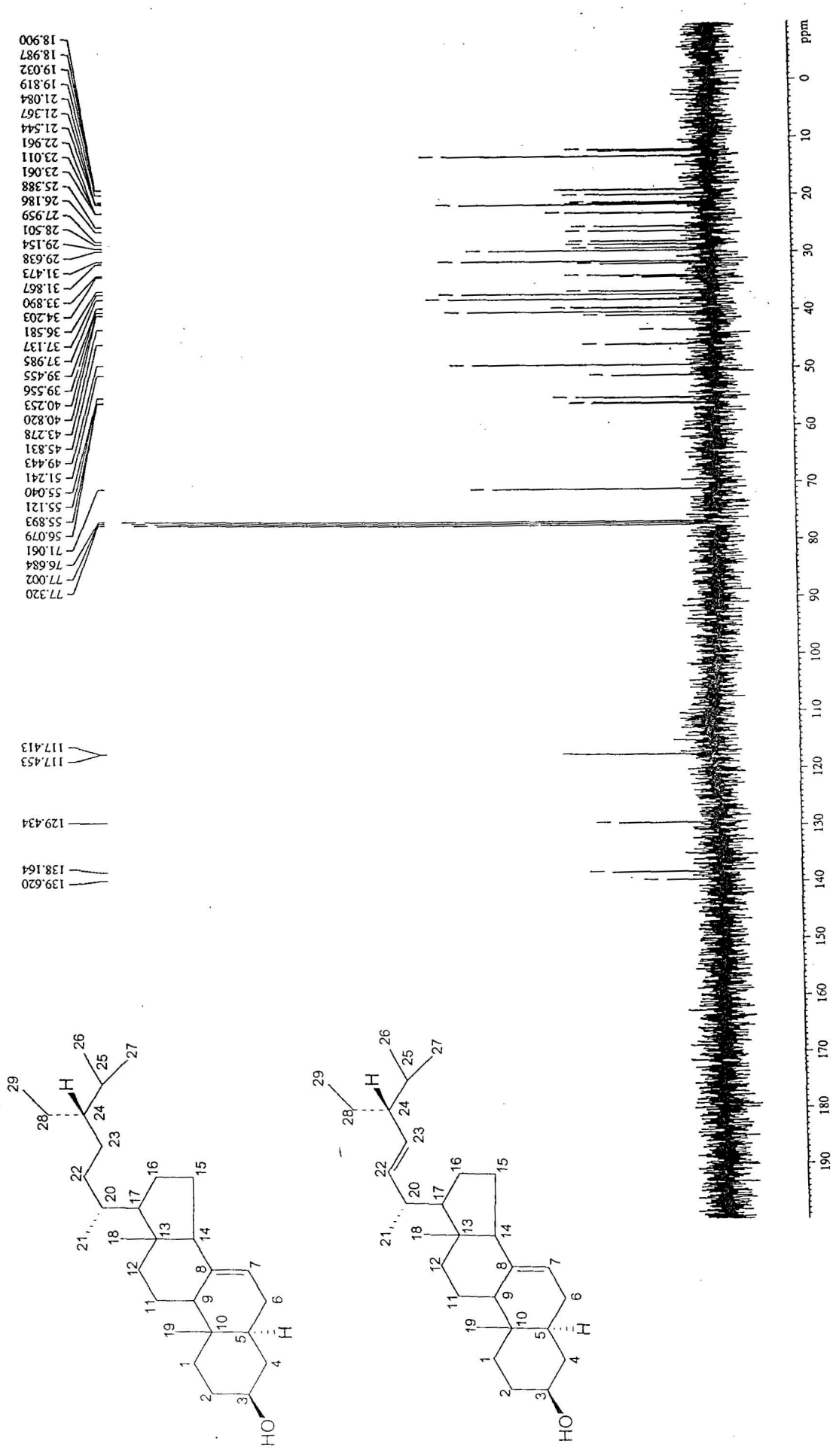
ภาพประกอบ 61 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ($CDCl_3$, 400 MHz)



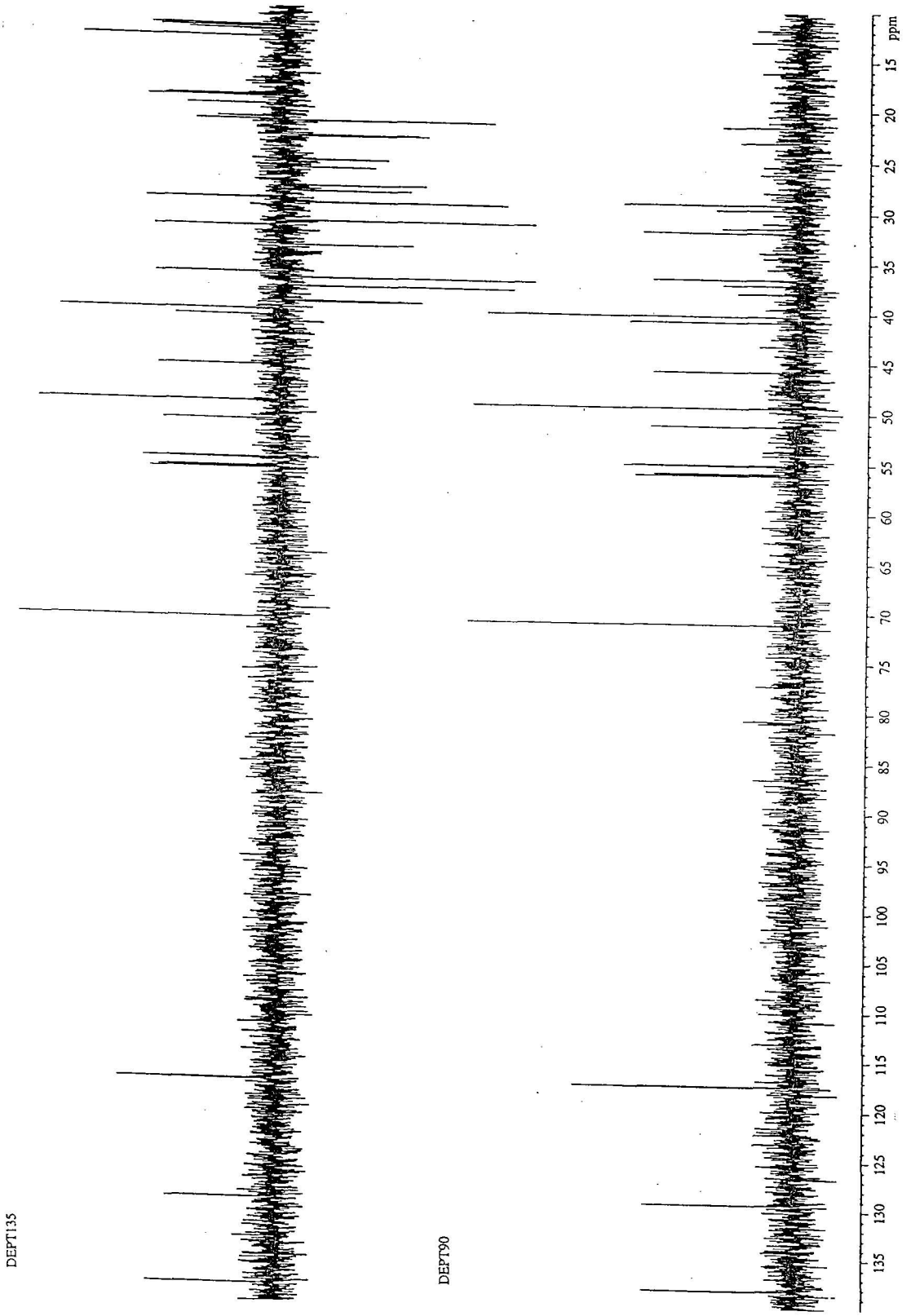
ภาพประกอบ 62 ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ที่ δ 0.50 - 0.95



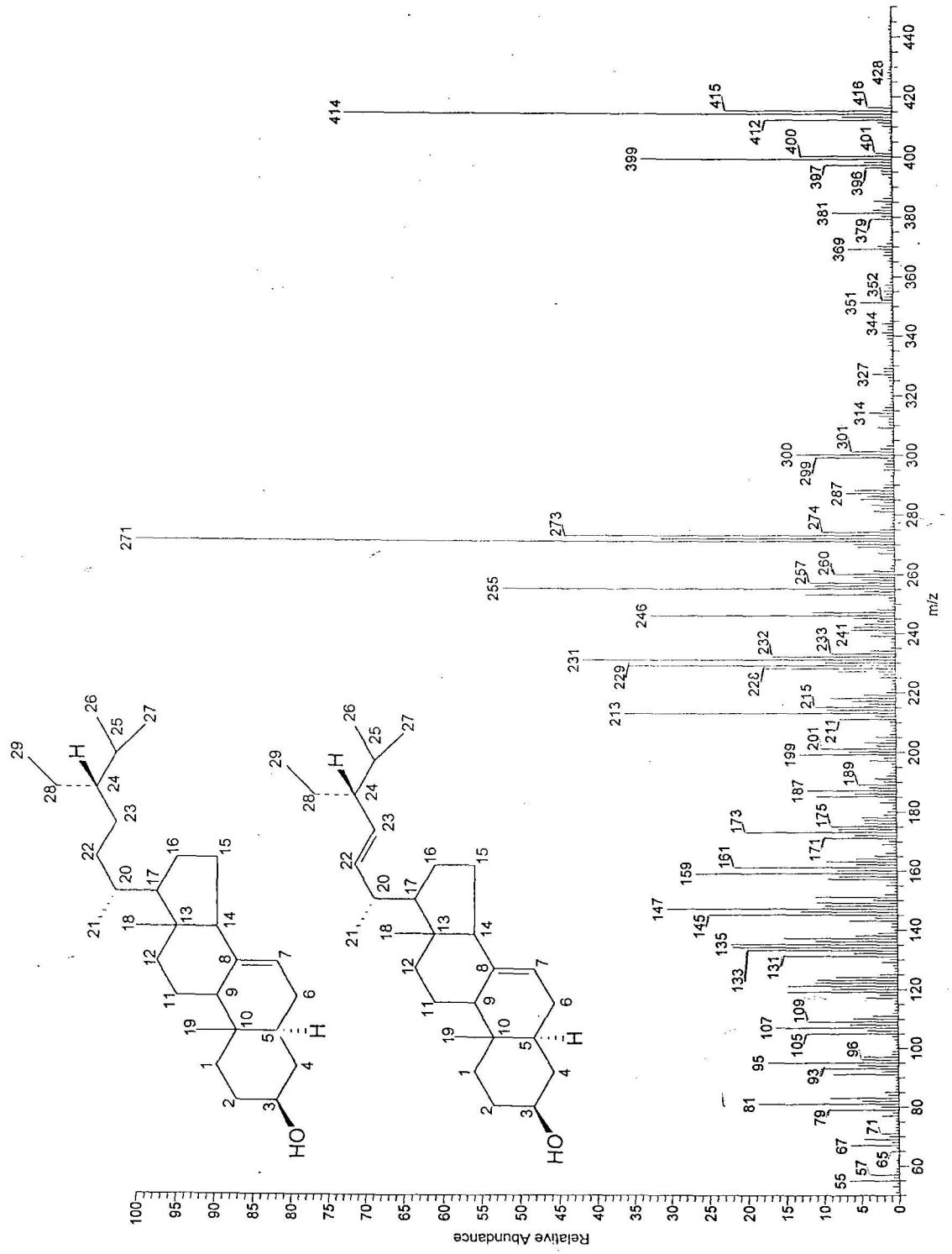
ภาพประกอบ 63 ขยายสัญญาณ ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ที่ δ 1.00 - 5.20



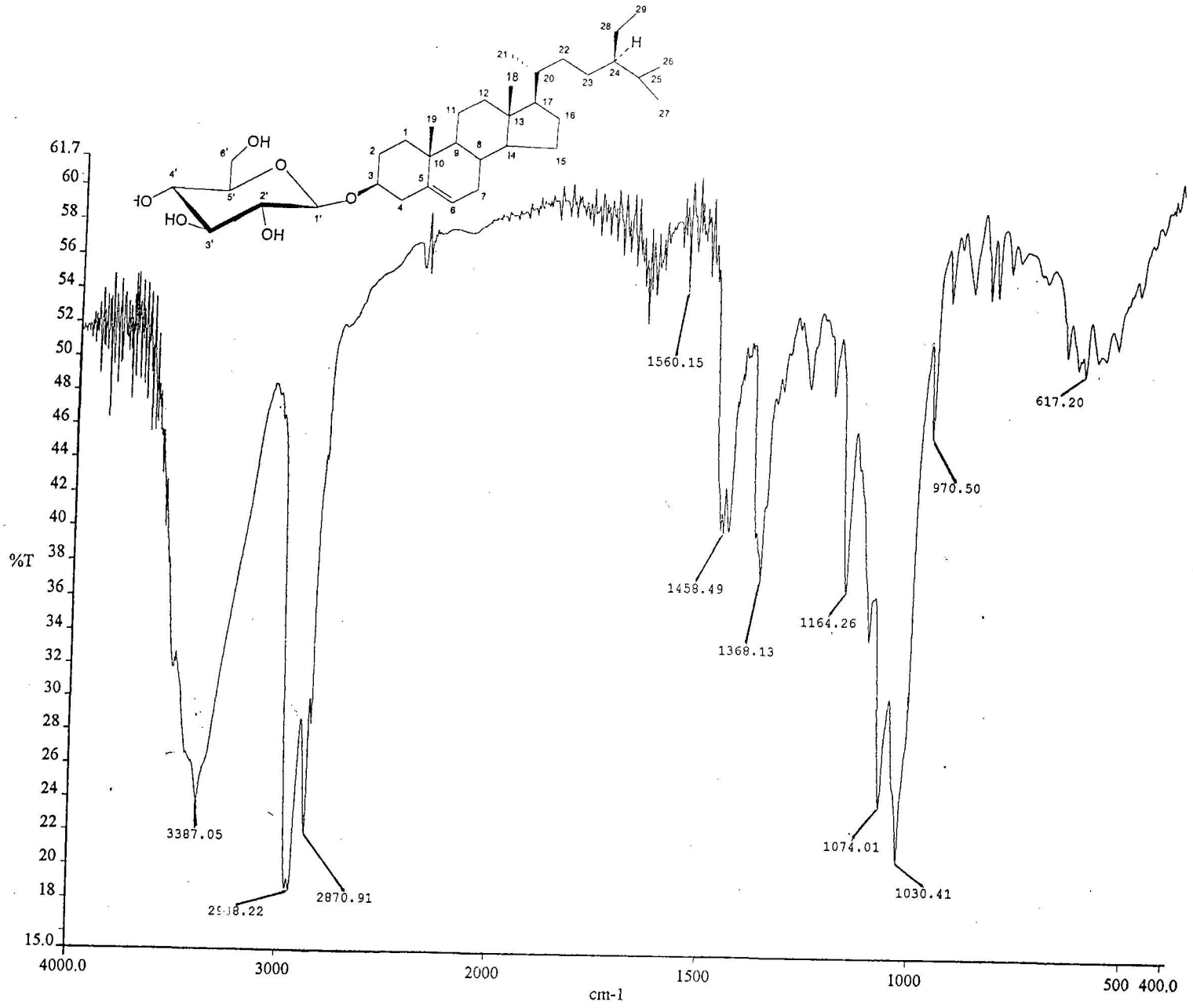
ภาพประกอบ 64 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ C ($CDCl_3$, 100 MHz)



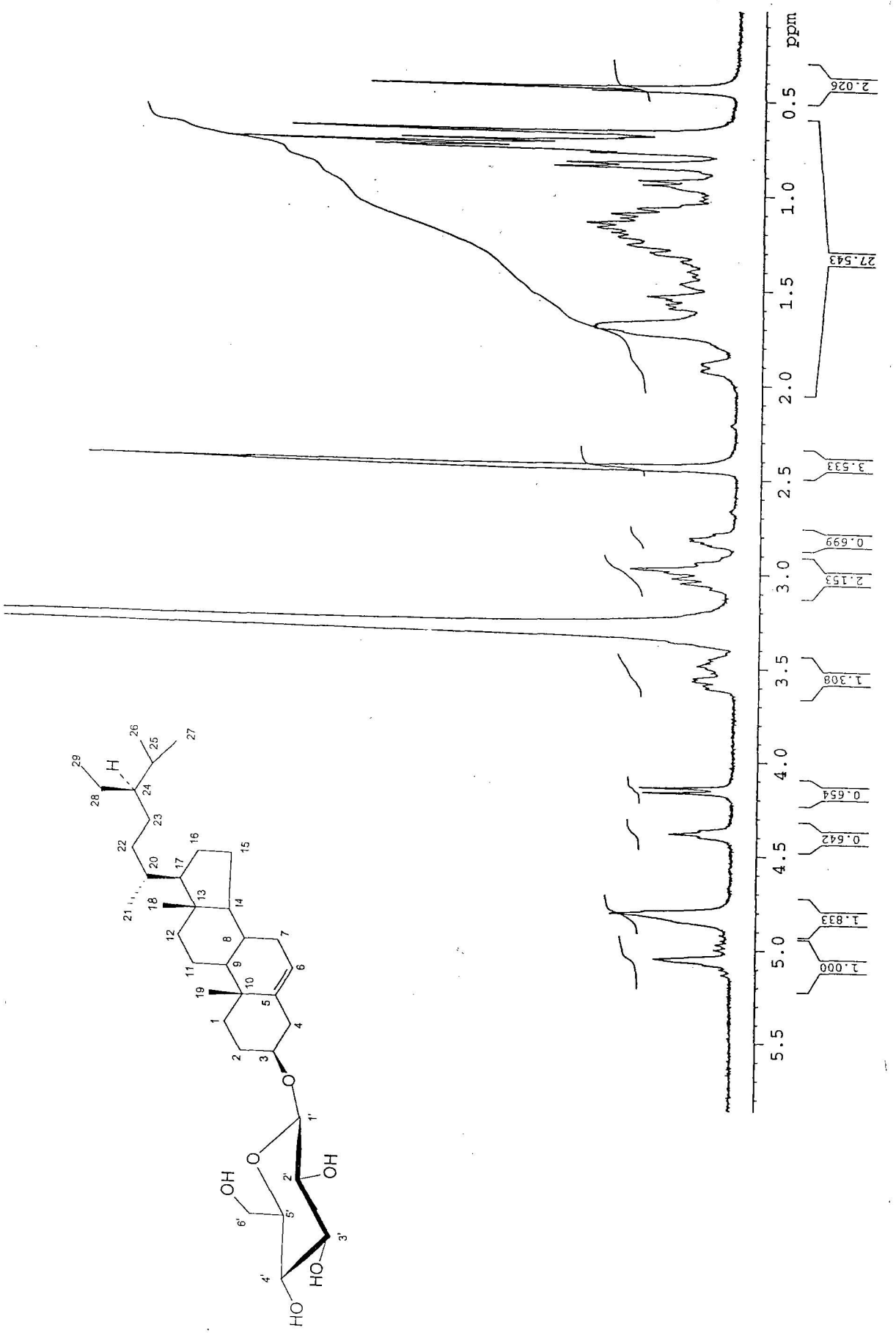
ภาพประกอบ 65 DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ C



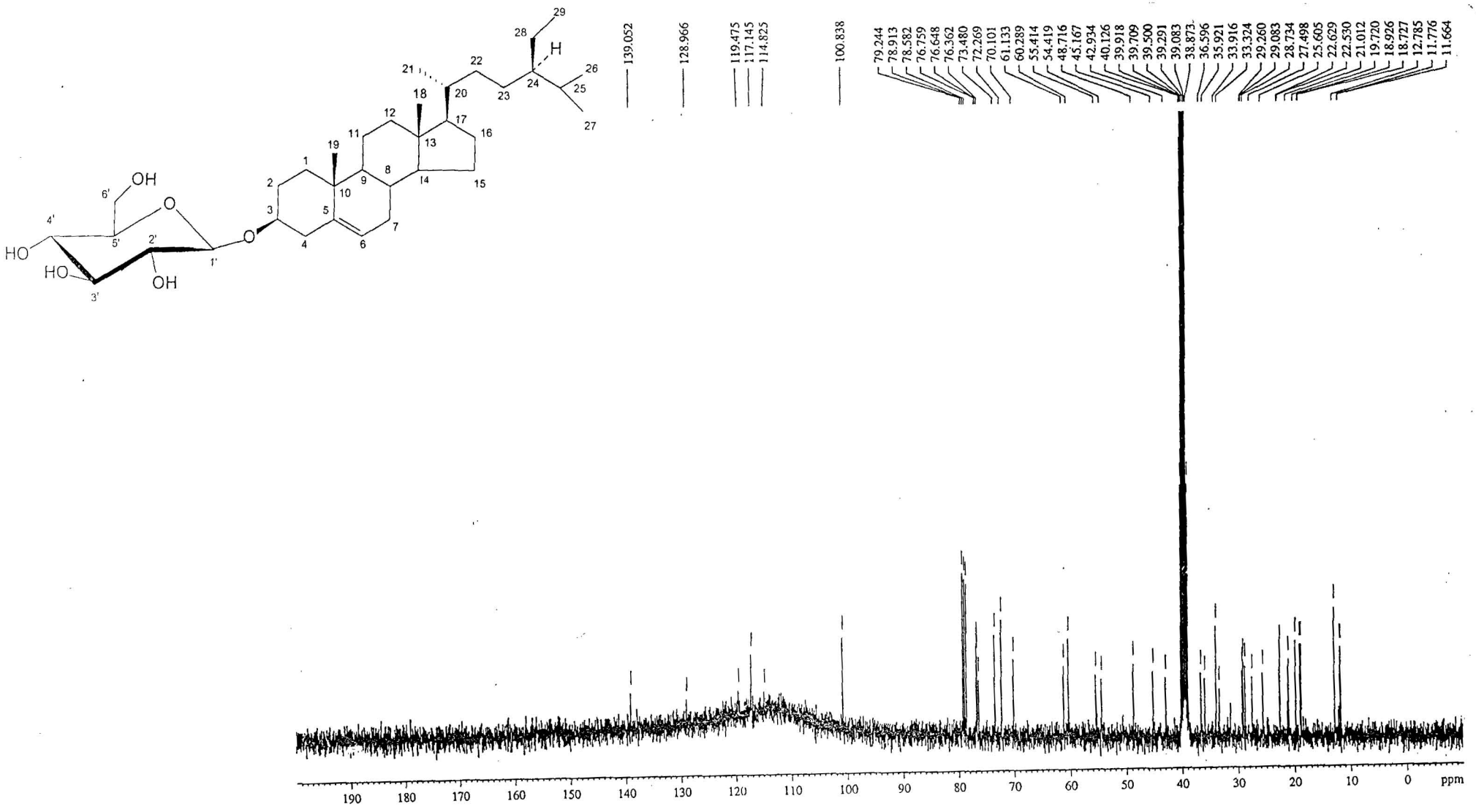
ภาพประกอบ 66 Mass Spectrum ของสารประกอบ C



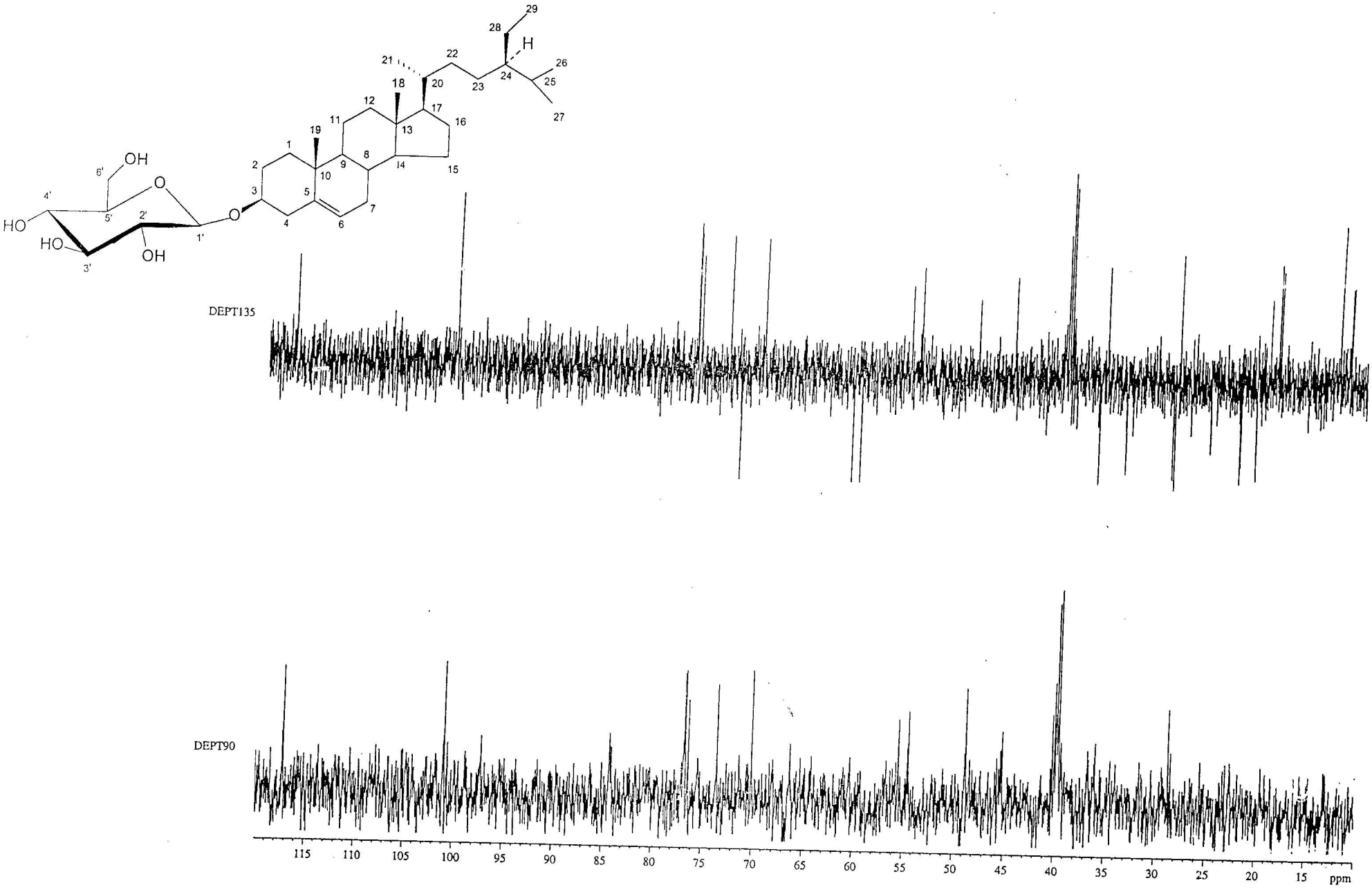
ภาพประกอบ 67 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ D (KBr)



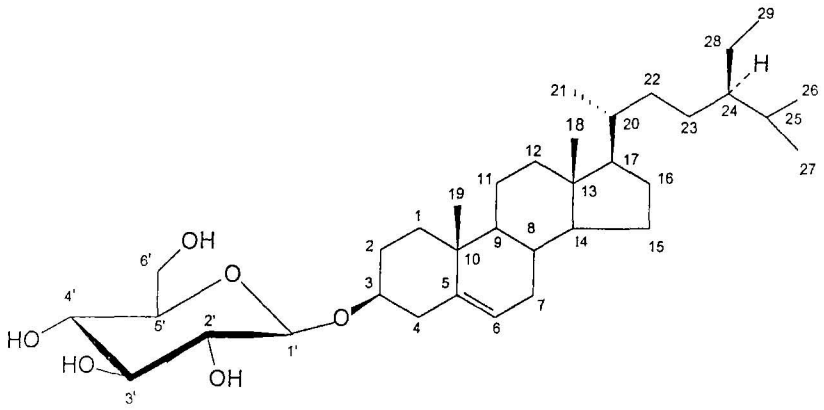
ภาพประกอบ 68 ^{1}H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ D (DMSO-d_6, 400 MHz)

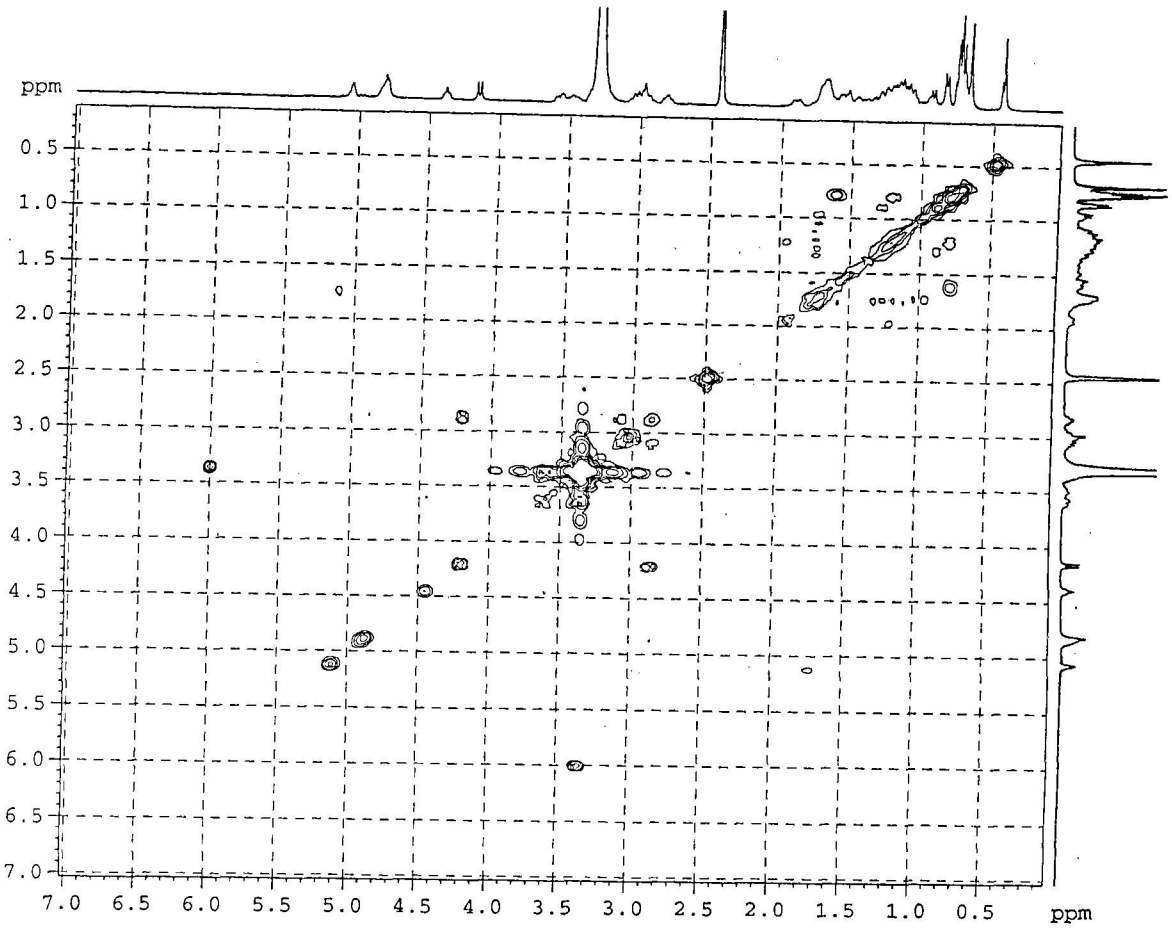


ภาพประกอบ 69 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ D (DMSO-d_6 +$CDCl_3$, 100 MHz)

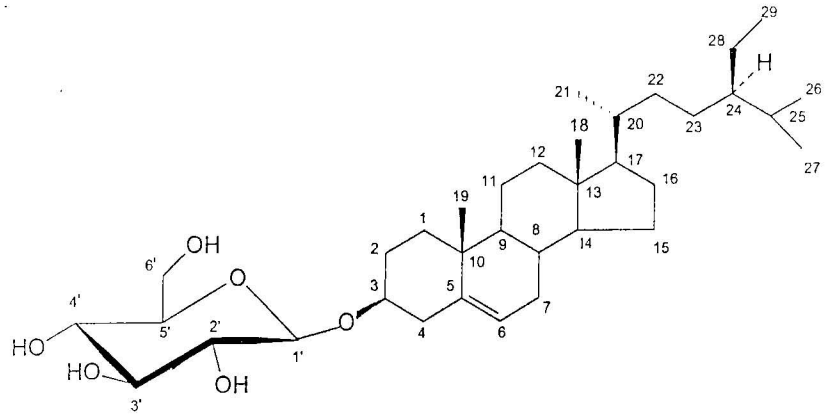


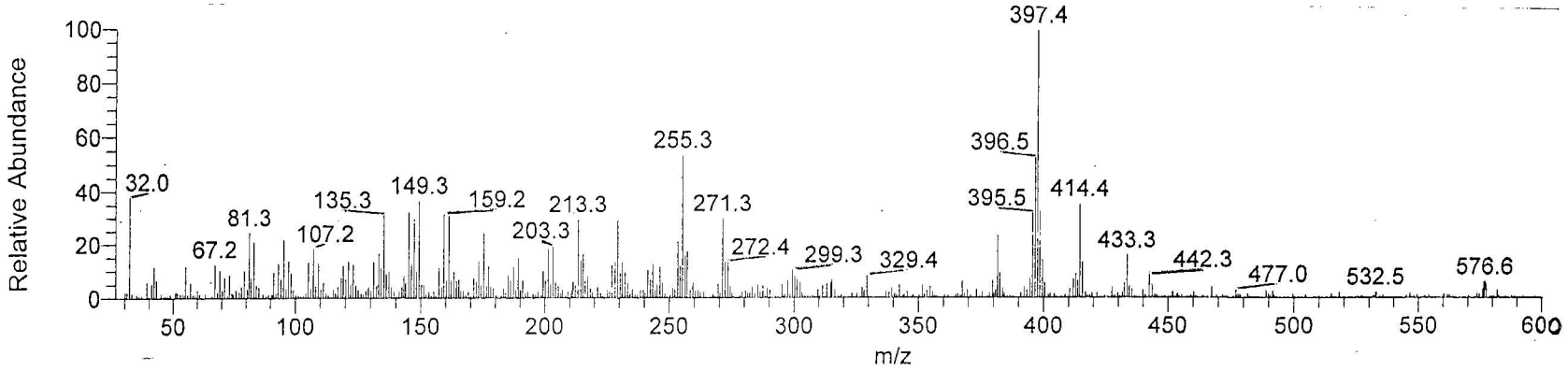
ภาพประกอบ 70 DEPT-90 และ DEPT-135 ของสารประกอบ D



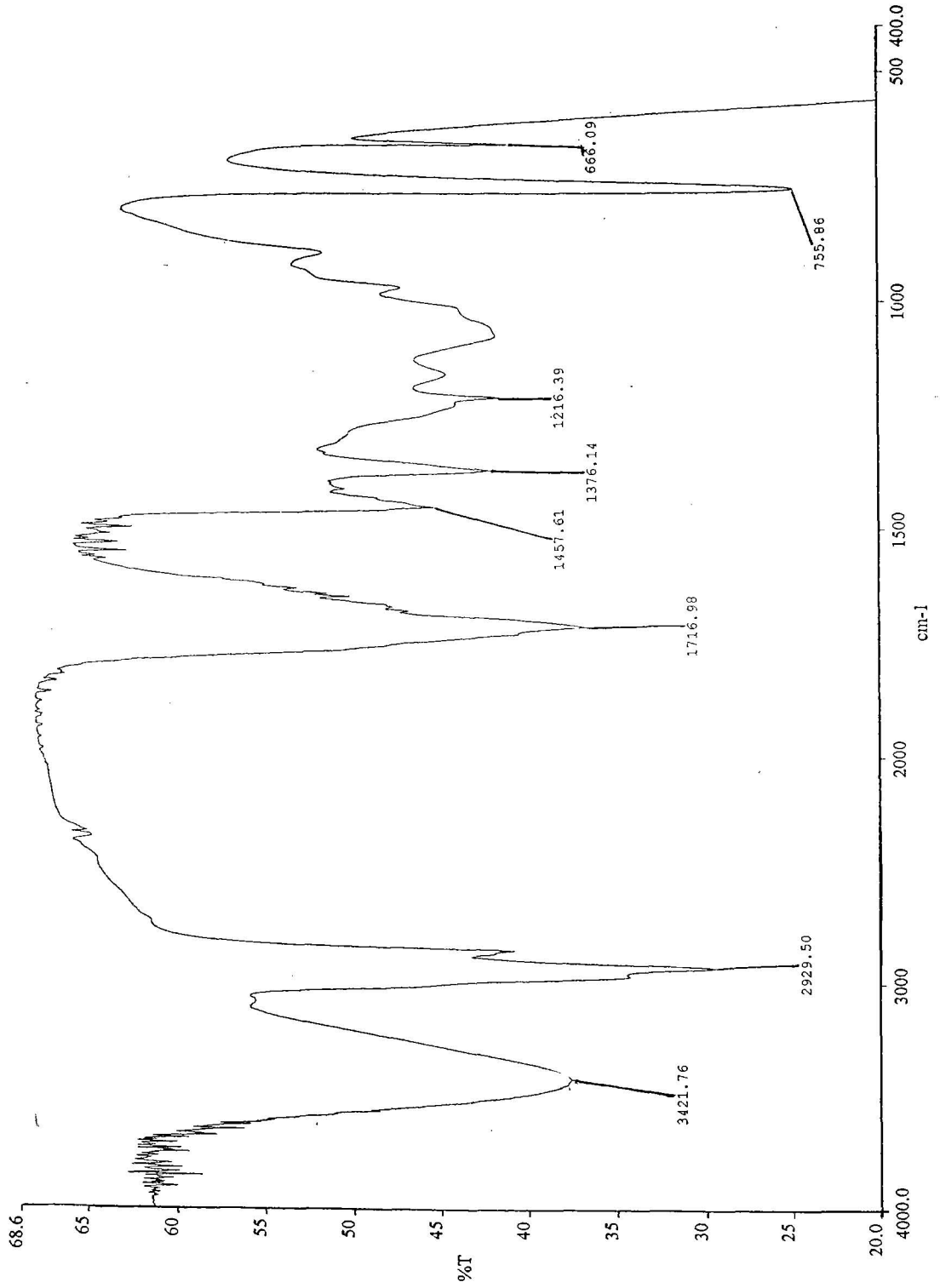


ภาพประกอบ 71 COSY สเปกตรัมของสารประกอบ D

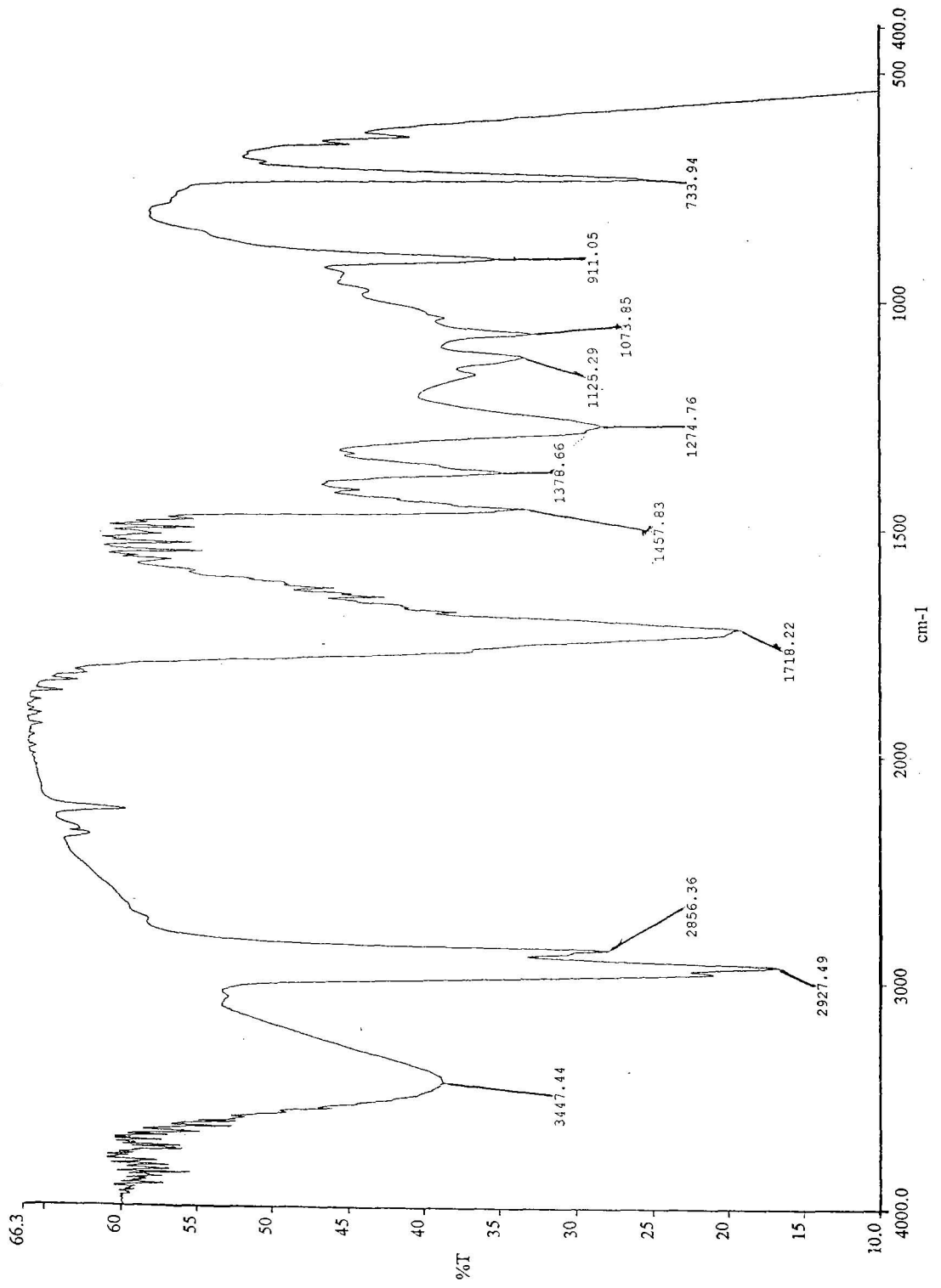




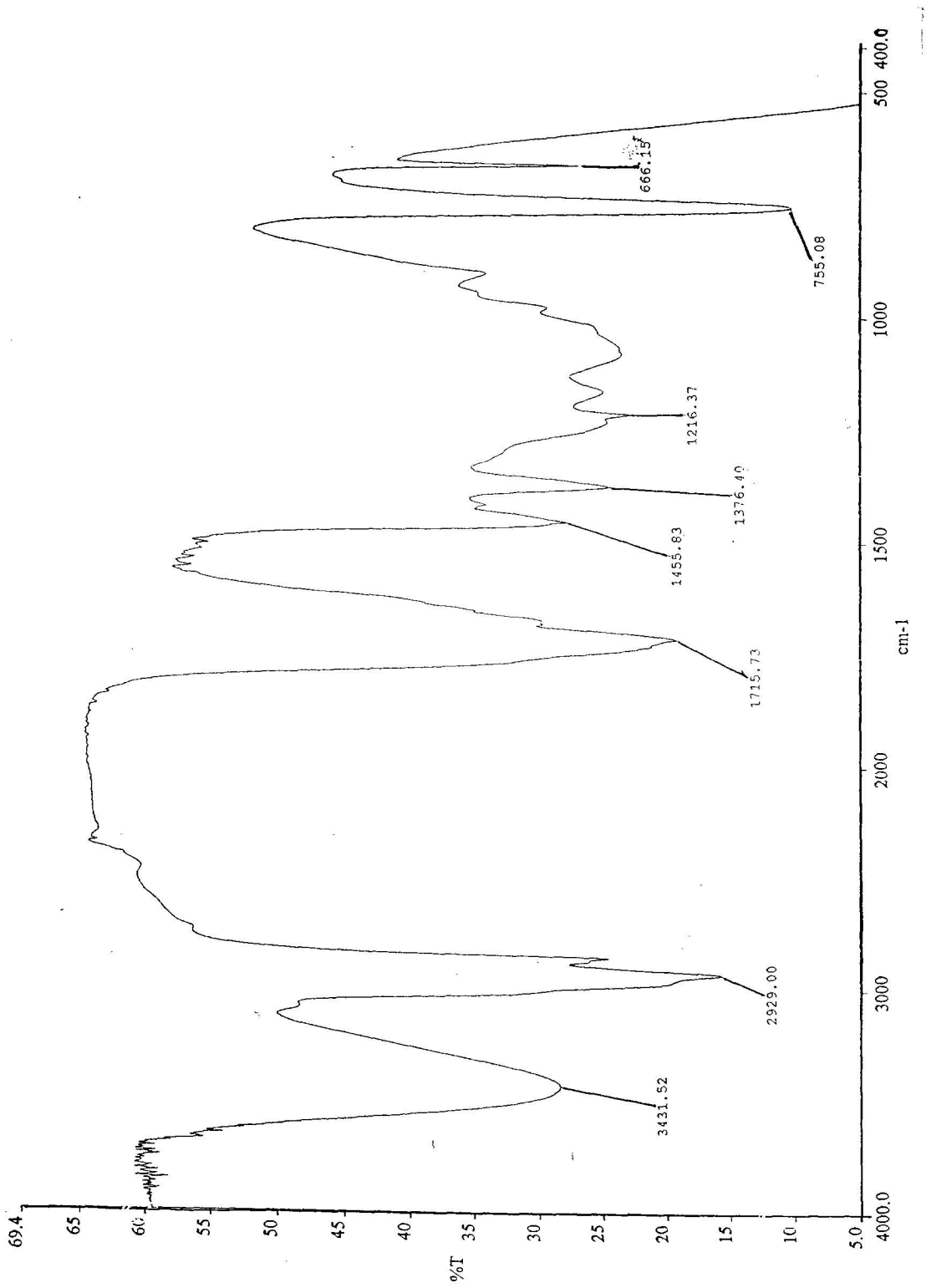
ภาพประกอบ 72 Mass Spectrum ของสารประกอบ D



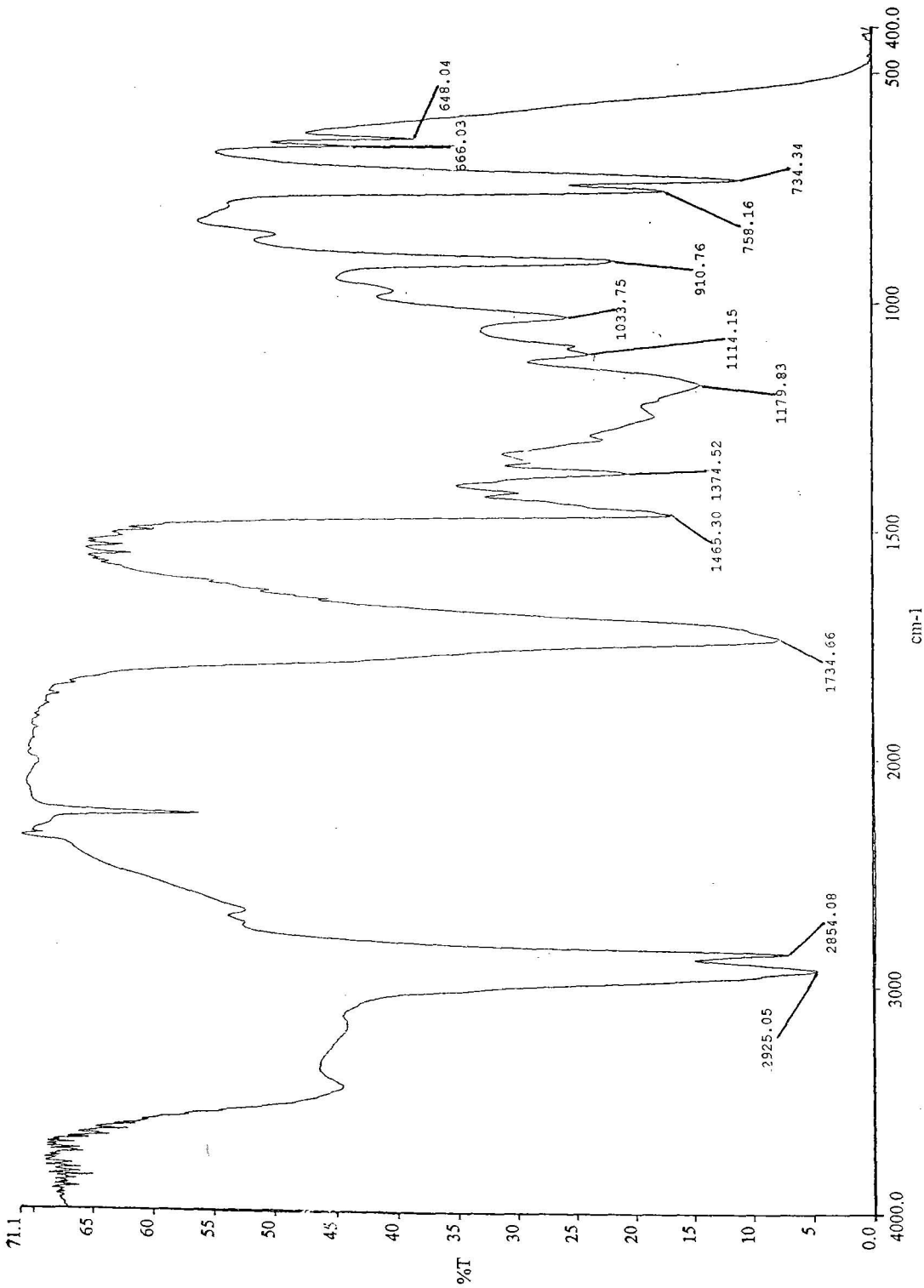
ภาพประกอบ 73 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.4.3.2



ภาพประกอบ 74 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.1



ภาพประกอบ 75 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H 8.5.5.3.2



ภาพประกอบ 76 FT IR สเปกตรัมของสารเคลือบ E 1.1.3

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent (Jork, Funk & Wimmer. 1990 : 195 - 198)

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

ผสมสารดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกันในอ่างน้ำแข็ง เก็บ reagent ที่เตรียมได้ในตู้เย็น

2. การเตรียม 0.4% trypan blue dye

trypan blule	0.40	g
sodium chloride	0.81	g
potassium phosphate	0.06	g
methyl-*p*-hydroxybenzoate	0.05	g

ละลายสารดังกล่าวข้างต้นในน้ำกลั่น 90 mL นำไปต้มให้เดือดและคนด้วยแท่งคนแม่เหล็กตลอดเวลา เมื่อละลายดีแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.20 - 7.30 ด้วย 1 M NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม RPMI 1640 media

RPMI medium 1640 powder	20.90	g
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	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 คนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายใส เติม $NaHCO_3$ และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.20 - 7.40 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1M HCl และปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปกรองด้วย millipore filter เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อ เติม sodium penicillin G และ Streptomycin เก็บสารละลายที่เตรียมได้ในตู้เย็น และก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้แล้วนำมาเก็บในตู้เย็น

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

s	singlet
d	doublet
dd	doublet of doublet
t	triplet
m	multiplet
br s	*broad singlet*
J	coupling constant
ppm	parts per million
cm^{-1}	wave number
^{0}C	degree celcius
mL	millilitre
μg	microgram
g	gram
$CDCl_3$	deuterochloroform
DMSO-d_6	dimethyl sulfoxide-d_6
UV	Ultra Violet
FT IR	Fourier Transform Infrared Spectra
^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
EI MS	Electron Impact Mass Spectra
M^{+}	molecular ion
m/z	mass to charge ratio
MHz	Mega Hertz
^{1}H-^{1}H COSY	H-relayed correlated spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	^{1}H-detected Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Conectivity
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy

CC	Column Chromatography
TLC	Thin Layer Chromatography
EtOAC	ethyl acetate
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
5 - FU	5 - Fluorouracil
ED_{50}	A concentration of a compound which show 50% killing effect on cells when compared to that of a control

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวจันทร์ทิพย์ แซ่ตัน
วันเดือนปีเกิด	20 พฤศจิกายน 2514
สถานที่เกิด	อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	โรงเรียนเบญจมราชูทิศ ตำบลโพธิ์เสด็จ อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80000 โทรศัพท์ (075) 348005-6 ต่อ 114-115
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์ 1 ระดับ 3 โรงเรียนเบญจมราชูทิศ อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาปีที่ 3 โรงเรียนตะกั่วป่า "เสนานุกูล" จังหวัดพังงา
พ.ศ. 2534	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (วิทยาศาสตร์ - คณิตศาสตร์) โรงเรียนตะกั่วป่า "เสนานุกูล" จังหวัดพังงา
พ.ศ. 2538	กศ.บ. เคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้
พ.ศ. 2544	กศ.ม. เคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร