

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ(*Smilax corbularia* Kunth.)
ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วติเมีย (P388) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

ปริญญานิพนธ์

ของ

เจลิยว สุภาพ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

มีนาคม 2548

๕๘๔.๓๕๖
๗๔๔๙๗
ร.๖

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ(*Smilax corbularia* Kunth.)
ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีเมีย (P388) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

- 6 พ.ค. 2548

บทคัดย่อ
ของ
เจลิยว สุภาพ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
มีนาคม 2548

h 265441

เฉลียว สุภาพ (2548). การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีเมีย (P388) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล อาจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา.

เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใช้ร่วมกับสมุนไพรอื่นในตำรายารักษามะเร็ง จากการนำเหง้าข้าวเย็นเหนือมาสกัดด้วย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ และนำไปศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่า สารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูงกว่า สารสกัด hexane และ methanol เมื่อนำสารสกัด ethyl acetate มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ resveratrol engletin และ astilbin มีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 3.5 มากกว่า 100 และ 75 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สารผสม 1 ชนิดซึ่งประกอบด้วย β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside มีค่า ED_{50} ต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ และพบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 7 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสารที่มีขั้วใกล้เคียงกันยังไม่สามารถแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ กลุ่มสารดังกล่าวมีค่า ED_{50} เท่ากับ 13.8 14.1 15.8 15.9 15.8 19 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อนำ resveratrol และกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่า resveratrol และสารกลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 สูงที่สุด มีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.4 และ 25.4 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ การพิสูจน์โครงสร้างของสารใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

IN VITRO CYTOTOXICITY STUDY OF SUBSTANCES ISOLATED FROM
SMILAX CORBULARIA KUNTH ON LEUKEMIC (P388) AND
BREAST CARCINOMA (MCF-7) CELLS

AN ABSTRACT
BY
CHALIEW SUPAP

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in chemistry
at Srinakharinwirot University
March 2005

Chaliew Supap. (2005). *In Vitro Cytotoxicity Study of Substances Isolated from Smilax corbularia Kunth. on Leukemic (P388) and Breast Carcinoma (MCF-7) Cells.* Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee : Asst. Prof. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

Smilax corbularia Kunth. has been used in a Thai traditional medicine with other herbs for anticancer. The rhizome of *Smilax corbularia* Kunth. was extracted with hexane, ethyl acetate and methanol respectively. The crude extracts from hexane, ethyl acetate and methanol were tested for cytotoxicity against P388. The ethyl acetate extract showed cytotoxicity against P388 higher than hexane and methanol extracts. Isolation of the ethyl acetate extract by column chromatography technique, three pure compounds, resveratrol, engeletin, astilbin and a mixture compound of β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside and stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside were isolated. The ED_{50} against P388 leukemic cells of three pure compounds were 3.5 >100 and 75 μ g/mL respectively where as the mixture compound had ED_{50} over 100 μ g/mL. Beside that, other seven fractions of mixture which could not be purified due to the similarity in polarity were obtained, these groups of mixture had ED_{50} against P388 leukemic cells equal to 13.8 14.1 15.8 15.9 15.8 19 and 16 μ g/mL respectively. Resveratrol and fractions of mixture which highest toxic to P388 leukemic cells were tested for cytotoxicity against MCF-7 cells. The resveratrol and the toxic fraction showed ED_{50} equal to 9.4 and 25.4 μ g/mL respectively. The structures of compounds were elucidated by the spectroscopy technique.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)
ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วคีเมีย (P388) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง

ของ
เจลิยว สุภาพ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเอกเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

/๗๕๓๕

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)

วันที่ 30 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2548

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. จินดา แด้มบรรจง)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พรทิพา พิชา)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชชญาสิทธิกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พุทธิยาสถาพร)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับคำแนะนำและความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ อาจารย์ ดร.จินดา แด้มบรรจง และอาจารย์ ดร.พรทิพา พิชา กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการทำปริญญานิพนธ์ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัย และการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภาลักษณ์ ปรัชญาลิทธิกุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พุทธิยาสถาพร ที่ได้ให้ความกรุณาร่วมเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในการแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา และคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางด้านเคมีแก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมีที่ให้บริการเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สมหมาย ทองประเสริฐ ที่ให้การสนับสนุนให้สมุนไพรร่วมใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุชานุช อ่อนดี นักวิจัยของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือ ในด้านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเป็นอย่างดี ขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ ในการบันทึกข้อมูลทาง mass spectroscopy ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเคมี และคุณเชิดชัย มูลสุวรรณ อาจารย์โรงเรียนเทพศิรินทร์คลองสิบสาม ปทุมธานี ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และ พี่ๆน้องๆ ในครอบครัวทุกท่าน ที่ให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครู อาจารย์ และทุกๆคนที่เป็นแรงผลักดัน เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำปริญญานิพนธ์ ด้วยดีตลอดมา

เจลิยา สุภาพ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	15
การสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ.....	17
การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์.....	17
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7.....	18
การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ ที่แยกได้.....	23
4 ผลการวิจัย.....	28
ผลการสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ.....	28
ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์.....	28
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	32
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	46
การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	51
5 สรุปผล อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ.....	63
บรรณานุกรม.....	66
ภาคผนวก.....	72
อภิธานศัพท์.....	102

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

ประวัติย่อผู้วิจัย.....	105
-------------------------	-----

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	19
2 แสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	21
3 แสดงปริมาณของสารเพื่อหาปริมาณโปรตีนของ NC-0 NC-4 PC-4 และ TS-4	22
4 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	28
5 ผลการแยกสารกลุ่ม E5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	29
6 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	29
7 ผลการแยกสารกลุ่ม E6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	30
8 ผลการแยกสารกลุ่ม E6.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
9 ผลการแยกสารกลุ่ม E6.3.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	31
10 ผลการแยกสารกลุ่ม E7 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์.....	32
11 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	33
12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	34
13 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1 ถึง E8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	34
14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.1 ถึง E5.8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	35
15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.4.1 และ E5.4.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	35
16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	36
17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	37
18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	38
19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.1 ถึง E6.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	39

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.1 ถึง E6.3.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	39
21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ถึง E6.3.4.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	40
22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	41
23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	42
24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	43
25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	44
26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ B C และ D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	45
27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E5.5 E6.3.3 E6.3.4 และ E6.3.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	46
28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 และสารประกอบ A ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	47
29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	47
30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E6.3.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	48
31 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED ₅₀ ของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ ต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7.....	50
32 ข้อมูล ¹ H NMR ของ resveratrol และ สารประกอบ A.....	52
33 ข้อมูล ¹ H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ A.....	53
34 ข้อมูล ¹³ C NMR ของ resveratrol และ สารประกอบ A.....	53

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
35	ข้อมูล ^1H NMR ของ engeletin และ สารประกอบ B.....	55
36	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ B.....	55
37	ข้อมูล ^{13}C NMR ของ engeletin และสารประกอบ B.....	56
38	ข้อมูล ^1H NMR ของ astilbin และ สารประกอบ C.....	58
39	ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ C.....	58
40	ข้อมูล ^{13}C NMR ของ astilbin และสารประกอบ C.....	59
41	ข้อมูล ^{13}C NMR ของ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -D- glucopyranoside กับ สารประกอบ D.....	61

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ต้นข้าวเย็นเหนือ (<i>Smilax corbularia</i> Kunth.).....	5
2 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax menispermoides</i>	6
3 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax riparia</i>	6
4 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax china</i>	7
5 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax sieboldii</i>	7
6 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax lebrunii</i>	9
7 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax macrophylla</i>	9
8 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก <i>Smilax officinalis</i> Kunth.....	11
9 สูตรโครงสร้างของสาร 7, 6'-dihydroxy 3'-methoxy isoflavone.....	12
10 สูตรโครงสร้างที่แยกได้จาก <i>Smilax glabra</i> Roxb.	12
11 สูตรโครงสร้างที่แยกได้จาก <i>Smilax glabra</i>	13
12 สูตรโครงสร้างที่แยกได้จาก <i>Smilax bracteata</i>	14
13 ขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	24
14 ขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบ ethyl acetate สารกลุ่ม E5 ค่าร้อยละ การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED ₅₀ ของสารที่มีความเป็นพิษสูง.....	25
15 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E6 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED ₅₀ ของสาร ที่มีความเป็นพิษสูง.....	26
16 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E7 และค่า ED ₅₀ ของสารประกอบที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง P388	27
17 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388.....	33
18 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ A ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	36
19 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E5.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	37
20 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E5.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	38
21 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	41
22 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388...	42
23 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	43

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
24 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	44
25 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ C ต่อเซลล์มะเร็ง P388.....	45
26 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ A ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	48
27 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.4 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7.....	49
28 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A.....	52
29 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B.....	54
30 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ C.....	57
31 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ D.....	60
32 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ A.....	76
33 ¹ H NMR spectrum (acetone-d ₆ , 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	77
34 ¹³ C NMR spectrum (acetone-d ₆ , 75 MHz) ของสารประกอบ A.....	78
35 ¹³ C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ A.....	79
36 COSY spectrum ของสารประกอบ A.....	80
37 HMQC spectrum ของสารประกอบ A.....	81
38 HMBC spectrum ของสารประกอบ A.....	82
39 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ B.....	83
40 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	84
41 ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃ -CD ₃ OD, 75 MHz) ของสารประกอบ B.....	85
42 ¹³ C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B.....	86
43 COSY spectrum ของสารประกอบ B.....	87
44 HMBC spectrum ของสารประกอบ B.....	88
45 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ C.....	89
46 ¹ H NMR spectrum (DMSO-d ₆ , 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	90
47 ¹³ C NMR spectrum (DMSO-d ₆ , 75 MHz) ของสารประกอบ C.....	91
48 ¹³ C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C.....	92
49 COSY spectrum ของสารประกอบ C.....	93
50 HMQC spectrum ของสารประกอบ C.....	94
51 HMBC spectrum ของสารประกอบ C.....	95

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
52 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ D.....	96
53 ^1H NMR Spectrum (Pyridine- d_5 , 300 MHz) ของสารประกอบ D.....	97
54 ^{13}C NMR spectrum (Pyridine- d_5 , 75 MHz) ของสารประกอบ D.....	98
55 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D.....	99
56 ลักษณะของเซลล์ P388.....	100
57 ลักษณะของเซลล์ MCF-7.....	101

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยพืชสมุนไพรมากมายหลายชนิดที่มีประโยชน์นานับประการต่อมวลมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประโยชน์ในด้านการนำมาใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ เช่น วัณโรค มาลาเรีย โรคเบาหวาน ฯลฯ ซึ่งการเลือกใช้สมุนไพรในการรักษาโรคนั้นมักอาศัยคำบอกเล่าและจดจำถ่ายทอดสืบต่อกันมาจนกลายเป็นยาในตำรับยาแผนโบราณ

มะเร็งเป็นอีกโรคหนึ่งที่แพทย์แผนโบราณใช้สมุนไพรมากมายหลายชนิดในการรักษา ด้วยเหตุนี้นักวิทยาศาสตร์และวงการแพทย์จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ได้สมุนไพรที่มีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็ง อันจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาสำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งต่อไป ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา เช่น

ใบว่านหางจระเข้ (*Aloe vera* Linne) พบสาร di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ลิวคิเมีย ชนิด K562 HL60 และ U937 ของคนในหลอดทดลอง (Lee, et al. 2000 : 593-598) ใบปีแป๊ะ (*Eriobotrya japonica*) พบสารพวก polyphenols มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในช่องปากของคน ชนิด HSC-2 และ HSG ในหลอดทดลอง (Ito, et al. 2000 : 687-693) โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) พบ panaxytriol ซึ่งเป็นสารจำพวก polyacetylenic มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองหลายชนิด ได้แก่ P388D1 NIH3T3 SNUC2A U937 K562 Jurkat PC3 SNU1 และสามารถยับยั้งการสร้าง DNA ของเซลล์ P388D1 และ SNUC2A (Kim, et al. 2002 : 119-122)

ใบเหืองอกปลาหม้อ (*Acanthus ilicifolius*) พบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด L-929 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 18 $\mu\text{g/mL}$ และพบว่าการให้สารสกัดทางปาก (500 mg/kg ของน้ำหนักตัวหนู) พร้อมกับการปลูกถ่ายเนื้องอก DLA เซลล์ในหนูทดลอง สามารถลดขนาดของก้อนเนื้องอกในหนูทดลองได้ดีกว่าการให้สารสกัดหลังจากปลูกถ่ายเนื้องอกในหนูทดลองแล้วเป็นเวลา 10 วัน และสามารถเพิ่มระยะเวลาการอยู่รอดของหนูทดลอง (Babu, Shylesh & Padikkala. 2002 : 27-33) ลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus*) พบสารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นมะเร็งที่เนื้อเยื่อโดย 20-methylcholanthrene (20-MC) และ มะเร็งที่เนื้อเยื่อบุผิวโดย DLA เซลล์ และ EAC เซลล์ ช่วยยืดอายุของหนูทดลองและสามารถลดขนาดของก้อนมะเร็ง (Rajeshkumar, et al. 2002 : 17-22)

ผลสมอไทย (*Terminalia chebula*) พบสารสกัดที่สามารถลดอัตราการอยู่รอดและยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก และเซลล์มะเร็งกระดุกของคนในหลอดทดลอง (Saleem, et al. 2002 : 327-336) เปลือกมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) พบ garcinone E ซึ่งเป็นสารประกอบพวก xanthone มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HCC) เซลล์มะเร็ง

กระเพาะอาหาร และ เซลล์มะเร็งปอด ของคนในหลอดทดลอง (Ho, Huang & Chen. 2002 : 975-979)

ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยารักษาโรคมะเร็งของแพทย์แผนโบราณตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิดได้แก่ ดันไฟเดือนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell.) ดันหญ้าปักไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เหง้าข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) ดันลิ้นงูเห่า (*Climacanthus siamensis* Brem.) ต่อมาสมุนไพรตำรับนี้ได้มีการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มสมุนไพรอีก 4 ชนิดเข้าไปในตำรับได้แก่เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Wall.) หญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) หลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.) และหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.) ได้มีนักวิจัยนำสมุนไพรที่ประกอบด้วย พืช 5 ชนิดดังกล่าวมาศึกษาการต้านมะเร็ง พบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB ในหลอดทดลองที่ค่า $ED_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอด และยืดอายุของหนูขาวที่ทำให้เป็นมะเร็งได้เป็นอย่างดีมีนัยสำคัญทางสถิติ (Pornsiriprasert. 1986)

จากการนำสมุนไพรแต่ละชนิดในตำรับนี้มาศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารสกัด hexane จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) มีกลุ่มสาร 2 กลุ่มที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 19.00 และ 21.50 $\mu\text{g/mL}$ (วินัย สุขราช. 2544) ในสารสกัด chloroform และ methanol พบกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อย่างละ 1 กลุ่ม โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 12.50 และ 19.00 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (กัญญาณัฐ กกแก้ว. 2547) การศึกษาสารสกัด hexane จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymbosa* Lamk.) พบกลุ่มสาร 3 กลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.00 7.20 และ 21.00 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารสกัด ethanol พบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 1 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 $\mu\text{g/mL}$ (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544) และในสารสกัด ethyl acetate พบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 5 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 9.00 5.50 11.50 12.00 และ 8.50 $\mu\text{g/mL}$ (กมลวรรณ อนันต์. 2547) นอกจากนี้ยังได้มีผู้ศึกษาสารสกัด hexane จากต้นหลอดเถื่อน (*Mallotus oblongifolius* Muell.) พบกลุ่มสาร 1 กลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 17.50 $\mu\text{g/mL}$ (อนันต์ คงชุม. 2544) ส่วนสารสกัด dichloromethane พบกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 12 กลุ่ม มีค่า ED_{50} เท่ากับ 22 27 13 11 18 15 13 11 22 12 21 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ (ทวัฒน์ ชูชนะกิจ. 2547) การศึกษาสารสกัด ethyl acetate จากหญ้าสาบกา (*Hygrophila incana* Nees.) พบกลุ่มสาร 10 กลุ่มที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 5.81 4.00 2.50 2.50 3.00 16.82 10.49 5.71 23.37 และ 4.67 $\mu\text{g/mL}$ (นันทรัตน์ รุ่งสกุล. 2547)

เนื่องจากข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยารักษาโรคมะเร็งของแพทย์แผนโบราณ ที่ยังไม่มีผู้ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเหง้าข้าวเย็นเหนือมาสกัดแยกเพื่อหาสาร

สารที่สำคัญและสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงเกี่ยวกับศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็งของเหง้าข้าวเย็นเหนือและจะนำไปสู่การพัฒนาต้านมะเร็งในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและการทำสารให้บริสุทธิ์
2. เพื่อวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

ความสำคัญของการวิจัย

ผลการวิจัยจะให้ข้อมูลพื้นฐานดังนี้

1. สูตรโครงสร้างของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก จากสารสกัดของเหง้าข้าวเย็นเหนือ
2. ข้อมูลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ของสารประกอบบางชนิดที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ เพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ส่วนของพืชที่นำมาสกัดคือ เหง้าข้าวเย็นเหนือที่นำมาจากคลินิกนายแพทย์สมหมายทองประเสริฐ
2. การสกัดสารจากพืช ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ
3. การแยกและทำให้สารบริสุทธิ์จะทำเฉพาะกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่มีค่าร้อยละการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ตั้งแต่ 0-10 และต้องเป็นกลุ่มสารที่เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TLC แล้วพบว่ามีการเป็นองค์ประกอบมีขั้วต่างกัน และ/หรือสารที่มีของแข็งผสมอยู่โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography techniques) และการตกผลึก
4. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ใช้วิธีการทางสเปกโทรสโกปี
5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จะทดสอบกับเซลล์มะเร็ง P388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 จะนำเฉพาะกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 เมื่อมีค่าร้อยละการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ เท่ากับ 0 เนื่องจากกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ($\text{ED}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$) มีหลายกลุ่มสาร จึงนำบางกลุ่มสารมาทดสอบเท่านั้น

7. การหาค่า ED_{50} จะศึกษาเฉพาะสารบริสุทธิ์หรือกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 มากกว่ากลุ่มอื่น

8. เซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการของงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง กลุ่มงานวิจัยและศึกษาค้นคว้า สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. P388 เป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (mouse lymphocytic leukemia cells) มีลักษณะเป็นเซลล์ที่กระจายเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (suspension cell)
2. MCF-7 เป็นเซลล์มะเร็งเต้านมของคน (human mammary carcinoma cells) มีลักษณะของเซลล์ติดแก้วเป็นแผ่นชั้นเดียว (monolayer cell) มีการเจริญติดผิวแก้วจนเต็มแล้วจะตายหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์
3. ED_{50} (Effective Dose 50) หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองที่ทำให้เซลล์ที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$)
4. สารสกัดส่วนที่เป็นพิษ หมายถึงกลุ่มของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 มีค่า $\text{ED}_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ และ $\text{ED}_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ สำหรับสารบริสุทธิ์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้าวเย็นเหนือมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Smilax corbularia* Kunth. อยู่ในวงศ์ Smilacaceae มีชื่ออื่นว่า ข้าวเย็นวอก หัวข้าวเย็นเหนือ (เต็ม สมิตินันท์. 2544 : 486) ข้าวเย็นเหนือเป็นไม้เถาเลื้อยยาวประมาณ 2-4 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับรูปรียาว กว้าง 1.5-5 ซม. ยาว 3-10 ซม. เส้นใบออกจากโคนใบจรดปลายใบ 5 เส้น ก้านใบโค้งขึ้นยาว 0.7-1.5 มม. ดอกเป็นดอกช่อ แยกเพศอยู่คนละต้น ช่อดอกตัวผู้มีดอกย่อย 10-40 ดอก กลีบดอกสีแดงเรื่อ ช่อดอกตัวเมียมีดอกย่อย 8-20 ดอก กลีบดอกสีเหลืองแกมเขียว ผลสดรูปทรงกลม สีม่วงดำ มี 1-3 เมล็ด (วนิดา จันทรเทพเทวัญ. 2533)

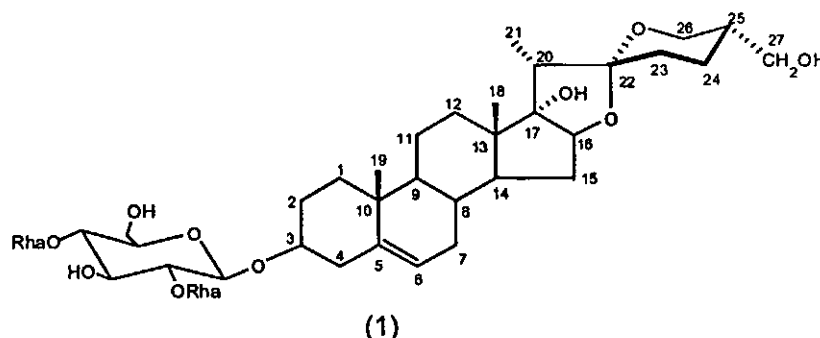
ข้าวเย็นเหนือมีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น ราก ใช้แก้กามโรค เส้นเอ็นพิการ น้ำเหลืองเสีย พุพองผื่นคัน ลำต้น ใช้แก้ไข้เรื้อรัง ไข้ตัวร้อน ใบ ใช้แก้ไข้เหนือ ใช้สันนิบาต ดอก ใช้แก้พิษงูเห่า ผล ใช้แก้ลมริดสีดวง หัว ใช้แก้พยาธิในท้อง น้ำเหลืองเสีย มะเร็งคุดทะราด (นันทวัน บุญยะประกาศ. 2539 : 483)



ภาพประกอบ 1. ต้นข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.)

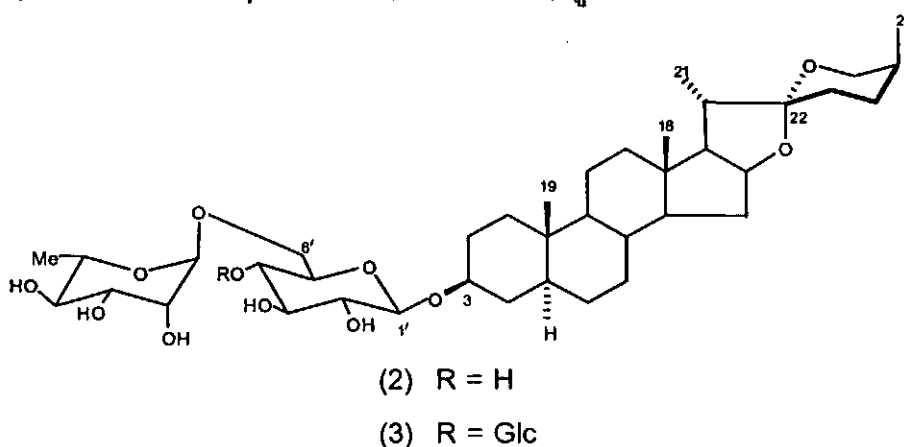
การวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชในสกุล *Smilax*

จู และเจีย (Ju & Jia. 1992 : 1349-1351) ได้สกัดแยกสารจากเหง้าแห้งของ *Smilax menispermoides* โดยสกัดด้วย 70% EtOH นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบ steroidal saponins ชนิดใหม่ ได้แก่ (25S)spirost-5-en-3 β , 17 α , 27-triol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)] [α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopyranoside (1) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 2

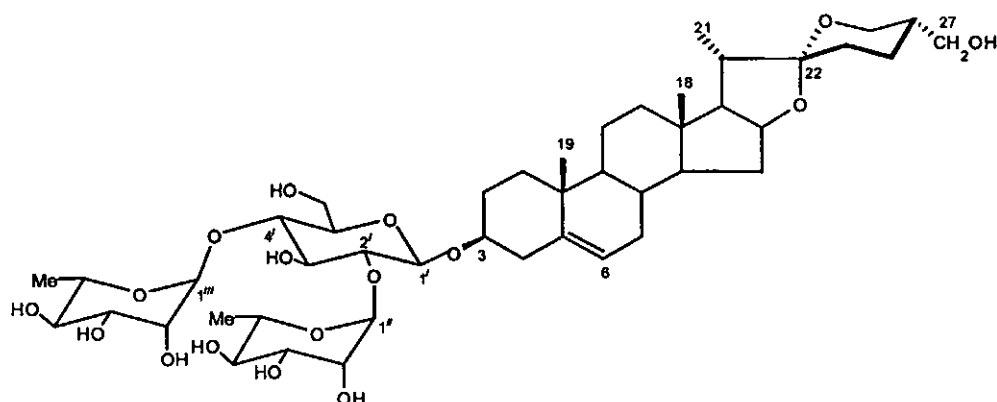


ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax menispermoides*

ซาซิดะ และคณะ (Sashida, et al. 1992 : 2439-2443) ได้แยกสารจากรากและเหง้าแห้งของ *Smilax riparia* โดยสกัดด้วย MeOH ที่ร้อน และนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์พบ neotigogenin glycosides ชนิดใหม่ 2 ชนิด ได้แก่ neotigogenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (2) และ neotigogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (3) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 3 ส่วนสารสกัด MeOH จากรากและเหง้าแห้งของ *Smilax china* เมื่อนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ isonarthogenin glycoside ชนิดใหม่ คือ isonarthogenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopyranoside (4) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 4



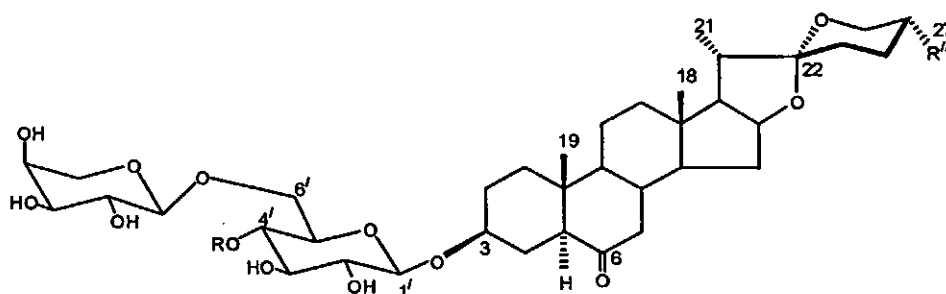
ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax riparia*



(4)

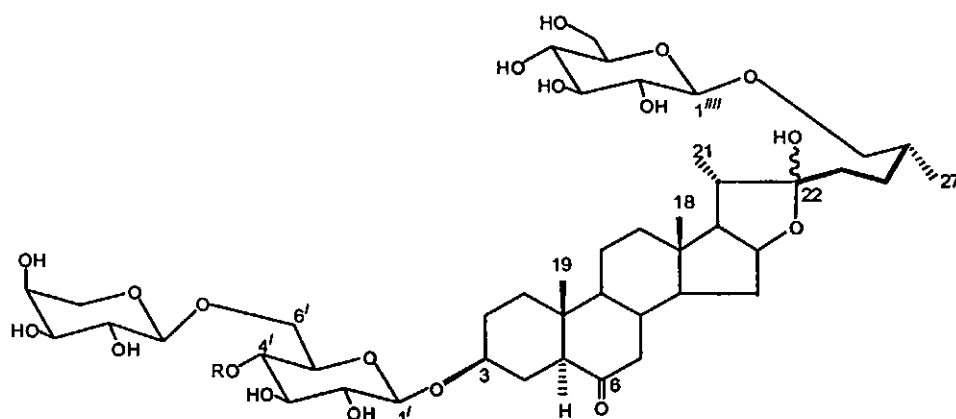
ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax china*

คูโบ และคณะ (Kubo, et al. 1992 : 2445-2450) ได้สกัดแยกสารจากเหง้าแห้งของ *Smilax sieboldii* โดยสกัดด้วย MeOH นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ steroidal saponin ชนิดใหม่ 6 ชนิด ดังแสดงในภาพประกอบ 5



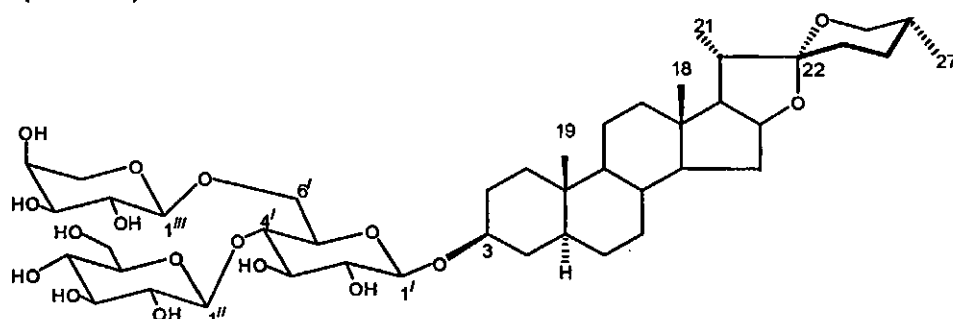
- (5) 3β -hydroxy-(25*R*)-5 α -spirostan-6-one (laxogenin) 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (R = Glc , R''= CH₃)
- (6) laxogenin 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (R = H , R''= CH₃)
- (7) 3β ,27-dihydroxy-(25*S*)-5 α -spirostan-6-one 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (R = Glc , R''= CH₂OH)

ภาพประกอบ 5 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax sieboldii*



(8) 26-O-β-D-glucopyranosyl-3β,22ξ,26-trihydroxy-(25R)-5α-furostan-6-one 3-O-α-L-arabinopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (R = H)

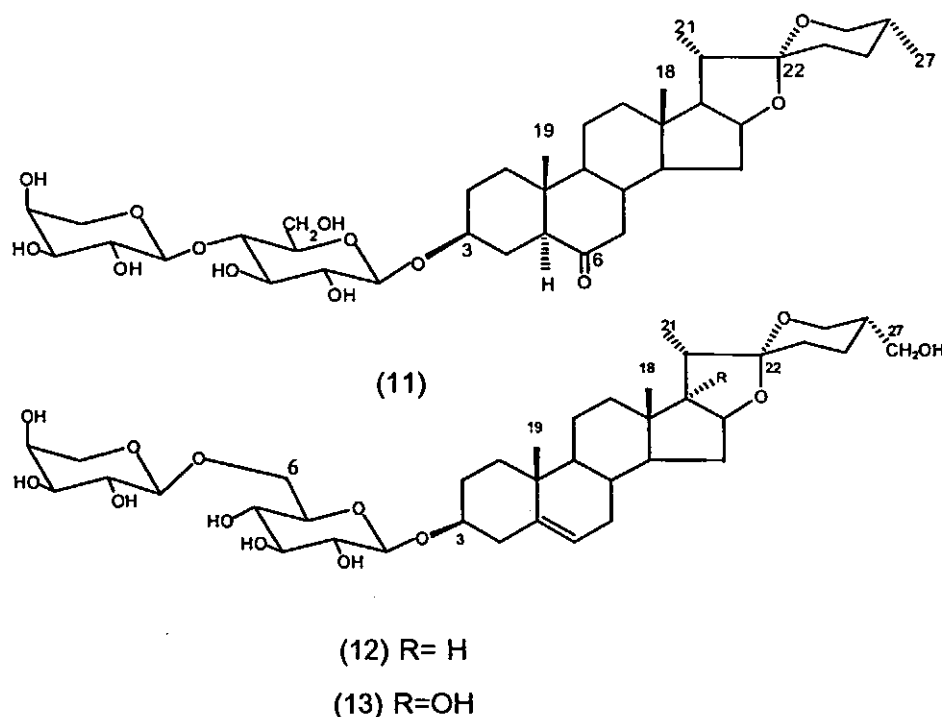
(9) 26-O-β-D-glucopyranosyl-3β,22ξ,26-trihydroxy-(25R)-5α-furostan-6-one 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside , (R = Glc)



(10) (25R)-5α-spirostan-3β-ol (tigogenin) 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-[α-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside

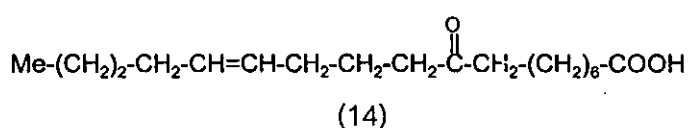
ภาพประกอบ 5 (ต่อ) สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax sieboldii*

จู และเจีย (Ju & Jia. 1993 : 1193-1195) ได้สกัดแยกสารจากรากของ *Smilax lebrunii* โดยสกัดด้วย EtOH เมื่อนำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบสาร 3 ชนิดได้แก่ (25R) 5 α -spirostan-3 β -ol-6-one-3-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopyranoside (11), (25S) spirost-5-en-3 β , 27-diol-3-O-[α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (12) และ (25S) spirost-5-en-3 β , 17 α , 27-triol-3-O-[α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (13) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 6



ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax lebrunii*

ดอลาตะบัด แบ็ท และ จามคานดิ (Daulatabad, Bhat & Jamkhandi. 1996 : 889-890) ได้สกัดแยกสารจากเมล็ดแห้งของ *Smilax macrophylla* โดยสกัดด้วย petrol นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค thin layer chromatography ได้ keto fatty acid ชนิดใหม่คือ 9-keto-octadec-cis-13-enoic acid (14) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 7

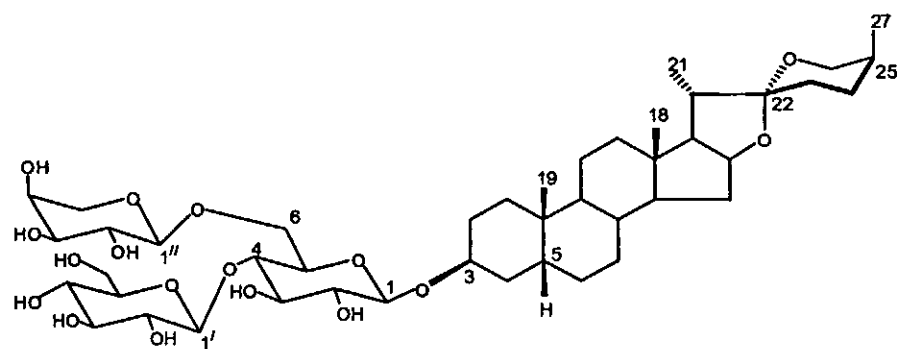


ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax macrophylla*

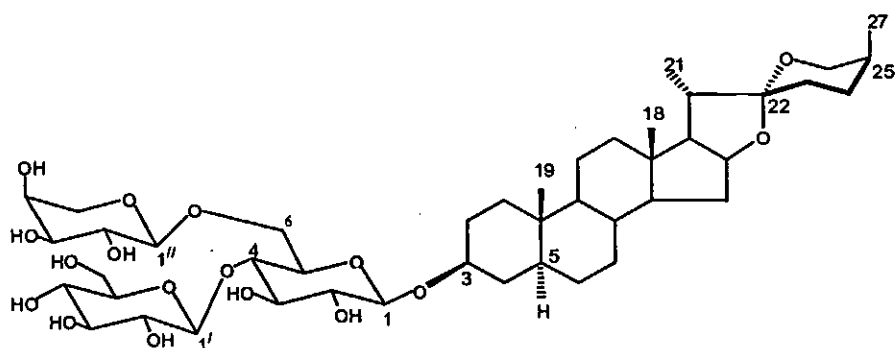
เบอนาร์โด ฟินโต และ พาเรนเต (Bernardo, Pinto & Parente. 1996 : 465-469) ได้สกัดแยกสารจากรากสดของ *Smilax officinalis* Kunth. โดยสกัดด้วย MeOH นำสารสกัดที่ได้มาแบ่งส่วนการละลาย (partition) ระหว่างน้ำและ *n*-butanol แล้วนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์พบ steroidal saponins ชนิดใหม่ 3 ชนิดได้แก่ sarsasapogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (15), neotigogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (16) และ (25S)-spirostan-6 β -ol 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-glucopyranoside (17) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 8

ฟูคุนาเกะ และคณะ (Fukunaga, et al. 1997 : 44-46) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัด MeOH จากเหง้า *Smilax glabra* Roxb. พบว่า สารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติหลังจากที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และในขณะเดียวกันก็สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน (KK-Ay) ได้ต่ำกว่าในหนูปกติ ($p < 0.001$)

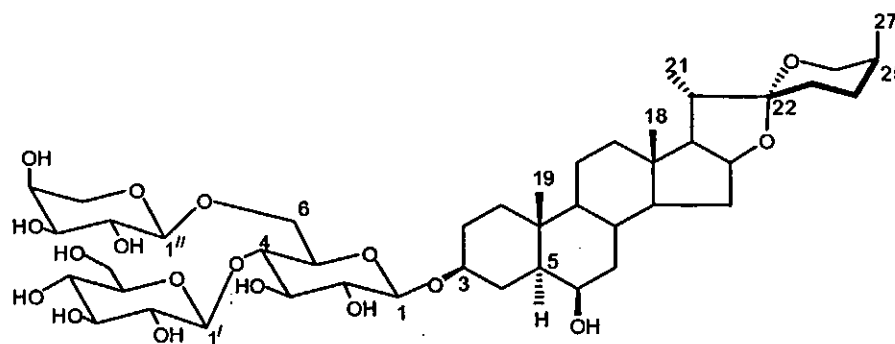
จอง-โฮ และคณะ (Jong-Ho, et al. 1998 : 574-584) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจาก *Smilax china* root. พบว่า สารสกัด MeOH CHCl_3 EtOAc และ BuOH มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิด *B. Megaterium* และ *B. subtilis* และสารสกัด MeOH EtOAc และ BuOH มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิด *A. rhizogenes* นอกจากนี้สารสกัด CHCl_3 และ EtOAc ยังมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ชนิด *A. tumefaciens*



(15)



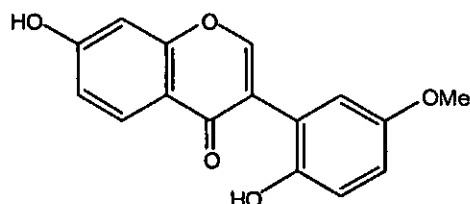
(16)



(17)

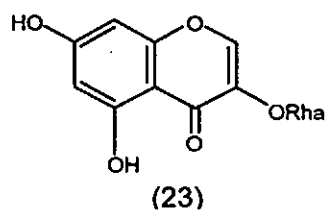
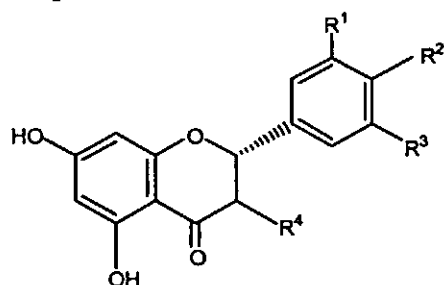
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax officinalis* Kunth.

ยิจัน และคณะ (Yijun, et al. 1998 : 873-875) ได้สกัดแยกสารจากรากของ *Smilax glabra* Roxb. ซึ่งเป็นยาสมุนไพรแผนโบราณของจีนที่ใช้ป้องกัน leptospirosis ใช้รักษาโรคซิฟิลิส และโรคบิด สารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งและต้านการแข็งตัวของผนังเส้นเลือดแดงใหญ่ นำสารสกัดที่ได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ isoflavone ชนิดใหม่ได้แก่ 7,6'-dihydroxy 3'-methoxy isoflavone (18) และสารที่เคยถูกค้นพบแล้ว 2 ชนิด ได้แก่ taxifolin และ astilbin สูตรโครงสร้างของสาร (18) แสดงในภาพประกอบ 9

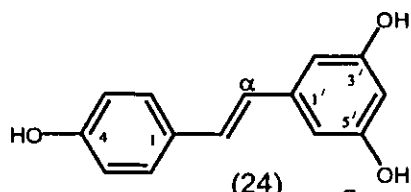
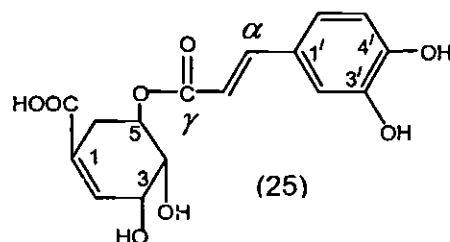


ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของสาร 7,6'-dihydroxy 3'-methoxy isoflavone

เชน และคณะ (Chen, et al. 1999 : 56-59) ได้สกัดแยกสารจากเหง้าแห้งของ *Smilax glabra* Roxb. โดยสกัดด้วย MeOH นำสารสกัดที่ได้มาแบ่งส่วนการละลายด้วย petroleum ether กับ EtOAc แล้วนำสารสกัดในชั้นของ EtOAc มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบ flavanone ชนิดใหม่คือ smitilbin (19) และได้สารที่เคยถูกค้นพบแล้ว 6 ชนิดได้แก่ engeletin (20), astilbin (21), dihydroquercetin (22), eurythrin (23), resveratrol (24), และ 5-O-caffeoylshikimic acid (25) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 10



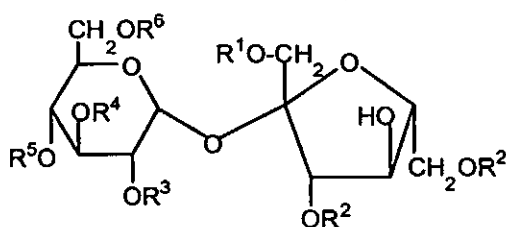
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
(19)	OH	H	OH	 ORha (Rhamnose)
(20)	H	OH	H	——— ORha (Rhamnose)
(21)	OH	OH	H	——— ORha (Rhamnose)
(22)	OH	OH	H	——— OH



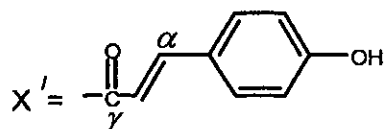
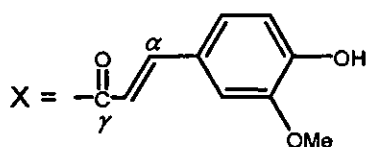
ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax glabra* Roxb.

ดองเซง ยงนิง และ จีอี (Dongsheng, Yongning & Jie. 2000 : 544-545) ได้ศึกษาฤทธิ์การต่อต้านการอักเสบของสารสกัดจาก *Smilax china* L. พบว่า สารสกัดสามารถบรรเทาอาการอักเสบชนิดธรรมดาและชนิดเรื้อรังในหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เชน ลี และ ชู (Chen, Li & Xu. 2000 : 1051-1055) ได้นำสารสกัดจากเหง้าแห้งของ *Smilax glabra* ในชั้น EtOAc ที่เหลือจากงานวิจัยในปี ค.ศ. 1999 (Chen, et al. 1999 : 56-59) มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ phenylpropanoid esters 5 ชนิด ได้แก่ smiglasides A-E (26)-(30) ตามลำดับ สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 11

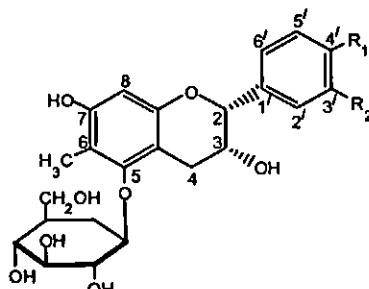


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
(26)	X	X	Ac	H	Ac	Ac
(27)	X	X	Ac	H	H	Ac
(28)	H	X	Ac	H	Ac	Ac
(29)	X'	X	Ac	H	Ac	Ac
(30)	X'	X	Ac	H	H	Ac



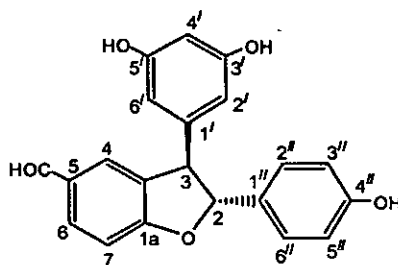
ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax glabra*

ลิ และคณะ (Li, et al. 2000 : 262-266) ได้สกัดแยกสารจากเหง้าแห้งของ *Smilax bracteata* โดยสกัดด้วย MeOH ที่อุณหภูมิห้อง นำสารสกัดที่ได้ไปแบ่งส่วนการละลายด้วย CH_2Cl_2 , EtOAc และ BuOH แล้วนำสารสกัดในชั้นของ BuOH มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารประกอบ phenolic ชนิดใหม่ 6 ชนิดดังแสดงในภาพประกอบ 12

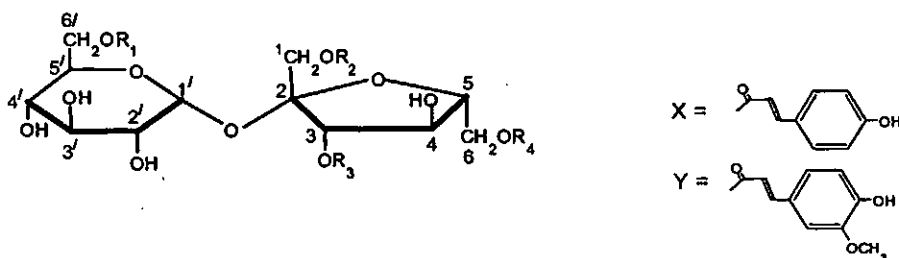


(31) (2S,3S)-5-O- β -D-glucopyranosyloxy-6-methyl-3'-methoxy-3,7,4'-trihydroxyflavan
($\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{OCH}_3$)

(32) (2S,3S)-5-O- β -D-glucopyranosyloxy-6-methyl-4'-methoxy-3,7,3'-trihydroxyflavan
($\text{R}_1=\text{OCH}_3$, $\text{R}_2=\text{OH}$)



(33) 3 β -(3',5'-dihydroxyphenyl)-2 α -(4''-hydroxyphenyl)-dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde



(34) (1-*p*-O-coumaroyl-6-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside
($\text{R}_1=\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{X}$, $\text{R}_4=\text{Y}$)

(35) (1-*p*-O-coumaroyl-3,6-di-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside
($\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{X}$, $\text{R}_3=\text{R}_4=\text{Y}$)

(36) (6-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl-(6-O-acetyl)- α -D-glucopyranoside
($\text{R}_1=\text{CH}_3\text{CO}$, $\text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$, $\text{R}_4=\text{Y}$)

ภาพประกอบ 12 สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จาก *Smilax bracteata*

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วย 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ
2. การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์
3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7
4. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. การสกัดสาร การแยกสาร การทำสารให้บริสุทธิ์ และการศึกษาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

วัสดุและสารเคมี

1. เหง้าข้าวเย็นเหนือที่แห้งบดละเอียด
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ acetone dichloromethane ethyl acetate hexane และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
3. Anisaldehyde (Merck, AR grade)
4. conc. Sulfuric acid (Merck, AR grade)
5. Glacial acetic acid (Merck, AR grade)
6. Silica gel สำหรับ column chromatography (0.0063 - 0.200 mm, Merck, AR grade)
7. Silica gel สำหรับ thin-layer chromatography (Silica gel 60 GF₂₅₄ , Merck, AR grade)

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
2. เครื่องบดสมุนไพร
3. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
4. คอลัมน์ขนาด 2 2.5 3 3.5 และ 10 cm
5. หลอดกำเนิดแสงยูวี (Spectroline ENF-260 C/F)
6. Fourier Transform Infrared Spectrometer (Perkin Elmer FT-IR spectrum BX)
7. Glass Drying Oven (Buchi B-580)

8. Hot plate (Framo M21/1)
9. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)
10. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance 300)
11. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

สารเคมี

1. Bovine Serum Albumin (BSA)
2. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (E.Merck, AR grade)
3. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Biowhittaker, AR grade)*
4. Folin-Ciocalteu reagent (F-C)
5. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)*
6. Newborn Calf Serum (NCS) (Biowhittaker , AR grade)
7. Phosphate Buffer Saline Solution (PBS)*
8. Roswell Park Memorial Institute medium number 1640 (RPMI 1640 Medium) (Biowhittaker , AR grade)*
9. Trypan blue dye (AR grade)*
10. 0.25% Trypsin solution ใน HEPES buffer solution*
11. solution A (Na_2CO_3 40.0 g , NaOH 8.0 g , sodium potassium tartrate 0.4 g , น้ำกลั่น 2,000 ml)
12. solution B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g , น้ำกลั่น 100 ml)
13. solution C (ส่วนผสมระหว่าง solution A และ B ในอัตราส่วน 50:1 โดยปริมาตร)

หมายเหตุ * การเตรียมแสดงในภาคผนวก

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
2. ขวดเลี้ยงเซลล์ (aseptic flask) ขนาด 40 ml
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler AE 240)
4. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (centrifuge) (Kubota-KC-70)
5. ปิเปตขนาดต่างๆ
6. ตู้บ่ม (Incubator) (Shel-Lab. TC 2323)
7. หลอดทดลองขนาดเล็ก
8. Haematocytometer

9. Pasteur pipette (Boeco)
10. Spectrophotometer (Spectronic Genesys 5, Milton Roy)
11. Vortex mixer (Genie Model K.550-GE)

ขั้นตอนการวิจัยมีดังนี้

1. การสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ

1.1 การเตรียมสารสกัด hexane

นำเหง้าข้าวเย็นเหนือที่แห้งและบดละเอียด 2.90 kg มาแช่ด้วย hexane 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำไปแช่ใน hexane อีก 2 ครั้ง รวมสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดแล้วระเหย hexane ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ได้สารสกัด hexane 9.99 g (ภาพประกอบ 13)

1.2 การเตรียมสารสกัด ethyl acetate

นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วย hexane มาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปแช่ใน ethyl acetate จากนั้นทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัด ethyl acetate 184.63 g

1.3 การเตรียมสารสกัด methanol

นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วย ethyl acetate มาผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปแช่ใน methanol จากนั้นทำเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัด methanol 622.41 g

1.4 แบ่งสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

2. การแยกสารจากสารสกัดหยาบ ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์

เนื่องจากสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารสกัด hexane และ methanol จึงนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจล 1 : 25 โดยน้ำหนัก (Pavia, et al. 1995 : 732) ใช้วิธีบรรจุซิลิกาเจลแบบเปียก แล้วชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ออกมาเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC การหาตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC ใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm และ/หรือใช้ anisaldehyde-sulfuric acid พ่นบนแผ่น TLC และนำไปให้ความร้อนที่ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้สารแต่ละกลุ่มที่มีข้อใกล้เคียงกัน แล้วนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL (ภาพประกอบที่ 13-16)

3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7

3.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (mouse lymphocytic leukemia cells, P388) เป็น cell suspension เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 mL พื้นที่ผิว 25 cm² โดยใช้ RPMI ผสมกับ NCS 10 % แล้วปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.00-7.20 เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มที่มี CO₂ 5 % ความชื้น 50 % และเปลี่ยนถ่ายเซลล์มะเร็ง (subculture) 2 ครั้ง/สัปดาห์

3.1.1 การเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (stock cell suspension)

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

3.1.1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ ให้เซลล์กระจายทั่วขวด แล้วใช้ปิเปตดูดเซลล์จากขวดเลี้ยงเซลล์มา 0.20 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม 0.4 % trypan blue dye 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pasteur pipette ตูดขึ้นลงเบาๆ ปลอยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

3.1.1.2 นำเซลล์ที่ย้อมสีแล้วหยดลงบน Haematocytometer แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue dye) นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ไปคำนวณค่า dilution number เพื่อเป็นข้อมูลในการเจือจาง cell suspension ให้ได้ stock cell suspension จำนวน 5×10^4 cell/mL

ตัวอย่างการคำนวณค่า dilution number

ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 chamber = 250 เซลล์

(1 chamber = 5 ช่องเล็ก)

ปริมาตร 1 ช่องเล็ก = ความยาว x ความกว้าง x ความลึก
 = 0.10 cm x 0.10 cm x 0.01 cm
 = 0.0001 cm³
 = 1×10^{-4} mL

แต่เซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue เป็น 2 เท่า

ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 1 chamber = 250 x 2 เซลล์

จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก (1×10^{-4} mL) = 250 x 2/5 เซลล์

= 100 เซลล์

ปริมาตร 1 mL มีเซลล์ = 100 x 10⁴ เซลล์

dilution number (D.N.) = $100 \times 10^4 / 5 \times 10^4$

= 20

นั่นคือจะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 20 เท่า ดังนั้นถ้าต้องการให้ได้เซลล์ ปริมาตร 5×10^4 เซลล์ จะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 19 mL จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ

3.1.2 การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบ 4.00 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO 0.1 mL เขย่าให้สารตัวอย่างละลายจนหมด แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้ สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 4 mL

3.1.3 การเตรียมสารละลาย solvent control

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

3.1.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง)

3.1.4.1 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์

3.1.4.2 เติมสารละลาย solvent control และสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ

3.1.2 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบตามต้องการ

3.1.4.3 เติม stock cell suspension ปริมาตร 1 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์

3.1.4.4 นำขวดเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO_2 5 % ความชื้น 50 % ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน

ตาราง 1 แสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

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

3.1.5. การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์มานับเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน เพื่อคำนวณหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยถือว่าจำนวนเซลล์มะเร็งของกลุ่มควบคุมในวันที่ 4 มีร้อยละการอยู่รอดเป็น 100

3.1.6. การหาค่า ED₅₀

การหาค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกนนอน) จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นค่า ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/mL

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

นำกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่มีร้อยละการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 30 µg/mL = 0 และเป็นกลุ่มสารที่มีปริมาณมากพอ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

3.2.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ชั่งสารตัวอย่างหนัก 2.00 mg ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO 0.04 mL เขย่าให้สารตัวอย่างละลายให้หมดแล้วเติม 10% NCS ใน EMEM 1.96 mL ลงไปผสมให้เข้ากัน สารตัวอย่างที่เตรียมได้มีความเข้มข้น 1,000 µg/mL ปริมาตร 2 mL

3.2.2 การเตรียมสารละลาย solvent control

ละลาย DMSO 0.20 mL ใน 10% NCS ใน EMEM 9.80 mL ได้สารละลาย solvent control ที่มีความเข้มข้น 2.0 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 mL

3.2.3 การเตรียมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (stock cell suspension)

การเตรียม cell suspension โดยการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้อายุประมาณ 4 วันจนหมดแล้วล้างเซลล์ด้วย HBSS ย่อยเซลล์ด้วย 0.25% trypsin ใน HEPES buffer solution ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จนสังเกตเห็นว่าเซลล์เริ่มจะหลุดออกจากผิวขวดเลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นดูด trypsin ทิ้ง แล้วเติม 10% NCS ใน EMEM 3 mL ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อชะเซลล์ให้หลุดออกจากผิวขวดเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เติมอาหารลงไปอีก 7 mL เขย่าเพื่อให้เซลล์กระจายสม่ำเสมอ จากนั้นนำ cell suspension ที่ได้ไปนับจำนวนเซลล์โดยวิธีตามข้อ 3.1.1.1 และ 3.1.1.2 แล้วนำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้จำนวนเซลล์เป็น 4×10^4 cell/mL

3.2.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารตัวอย่าง (สารแต่ละกลุ่มทำการทดลอง 2 ครั้ง)

การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.4.1 สารละลาย Negative Control Day 0 (NC-0) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ในหลอด centrifuge นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เซลล์จะตกตะกอนอยู่ที่

กันหลอด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS นำไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม ดูดสารละลาย PBS ทิ้ง นำเซลล์ไปเก็บที่ 0 °C

3.2.4.2 สารละลาย Negative Control Day 4 (NC-4) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี solvent control 1 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5 % ความชื้น 50 % ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน

3.2.4.3 สารละลาย Positive Control Day 4 (PC-4) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี 5-FU (ความเข้มข้น 4 µg/mL) 1 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5 % ความชื้น 50 % ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน

3.2.4.4 สารละลาย Test Solution Day 4 (TS-4) ใส่ cell suspension จำนวน 3 mL ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีสารตัวอย่างและ solvent control ตามความเข้มข้นที่ต้องการ นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5 % ความชื้น 50 % ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน

ตาราง 2 แสดงปริมาณของสารและเซลล์ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Flask	5-FU (4 µg/mL) (mL)	ความเข้มข้น ของสาร ตัวอย่าง (µg/mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volumn (mL)
NC-0		-	-	-	3	4
NC-4		-	-	1	3	4
PC-4	1	-	-	-	3	4
TS-4		5 µg/mL	0.02	0.98	3	4
		10 µg/mL	0.04	0.96	3	4
		15 µg/mL	0.06	0.94	3	4
		20 µg/mL	0.08	0.92	3	4
		30 µg/mL	0.12	0.88	3	4

3.2.5 หลังจากครบ 4 วัน นำขวดเลี้ยงเซลล์ NC-4 PC-4 และ TS-4 ที่บ่มไว้มาเทอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง นำไปวัดอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ โอยามา และ อีเกิล (Oyama & Eagle. 1956 : 305-307) พร้อมกับ NC-0 ดังนี้ นำ NC-0 NC-4 PC-4 และ TS-4 มาเติม solution C ขวดละ 5 mL เพื่อละลายโปรตีนออกจากเซลล์ นำไปเขย่าด้วย vortex mixer ได้เป็น cell solution แล้วนำไปหาปริมาณโปรตีน ดังตาราง 3

h 265441 7.3

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

สารละลาย	ปริมาตร reagent (mL)				
	cell solution	BSA	solution C	น้ำกลั่น	solution F-C : น้ำ (5 : 7)
Blank	-	-	5	1	0.5
กลุ่มควบคุม	-	1	5	-	0.5
NC-0	1	-	4	1	0.5
NC-4	1	-	4	1	0.5
PC-4	1	-	4	1	0.5
TS-4	1	-	4	1	0.5

เมื่อผสมสารให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะมีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยวัดให้เสร็จภายใน 2 ชั่วโมง

3.2.6 การทดลองแต่ละครั้งจะมีการคำนวณค่า O.D.Day 4 (NC-4) /O.D.Day 0 (NC-0) เพื่อแสดงถึงอัตราส่วนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เนื่องจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้เซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่าเซลล์มะเร็งที่มีการเจริญเติบโตเป็นปกติจะมีอัตราส่วนการเจริญเติบโต (O.D.Day 4/O.D.Day 0) ประมาณ 4 เท่า ดังนั้นในการทดลองแต่ละครั้ง ค่า O.D.Day 4/O.D.Day 0 ที่ได้ควรมีค่าประมาณ 4 เท่า จึงจะถือว่าเซลล์ที่ใช้ในการทดลองมีการเจริญเติบโตเป็นปกติ

3.2.7 การหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมาหาปริมาณโปรตีนเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น นำมาคำนวณหาค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ ดังนี้

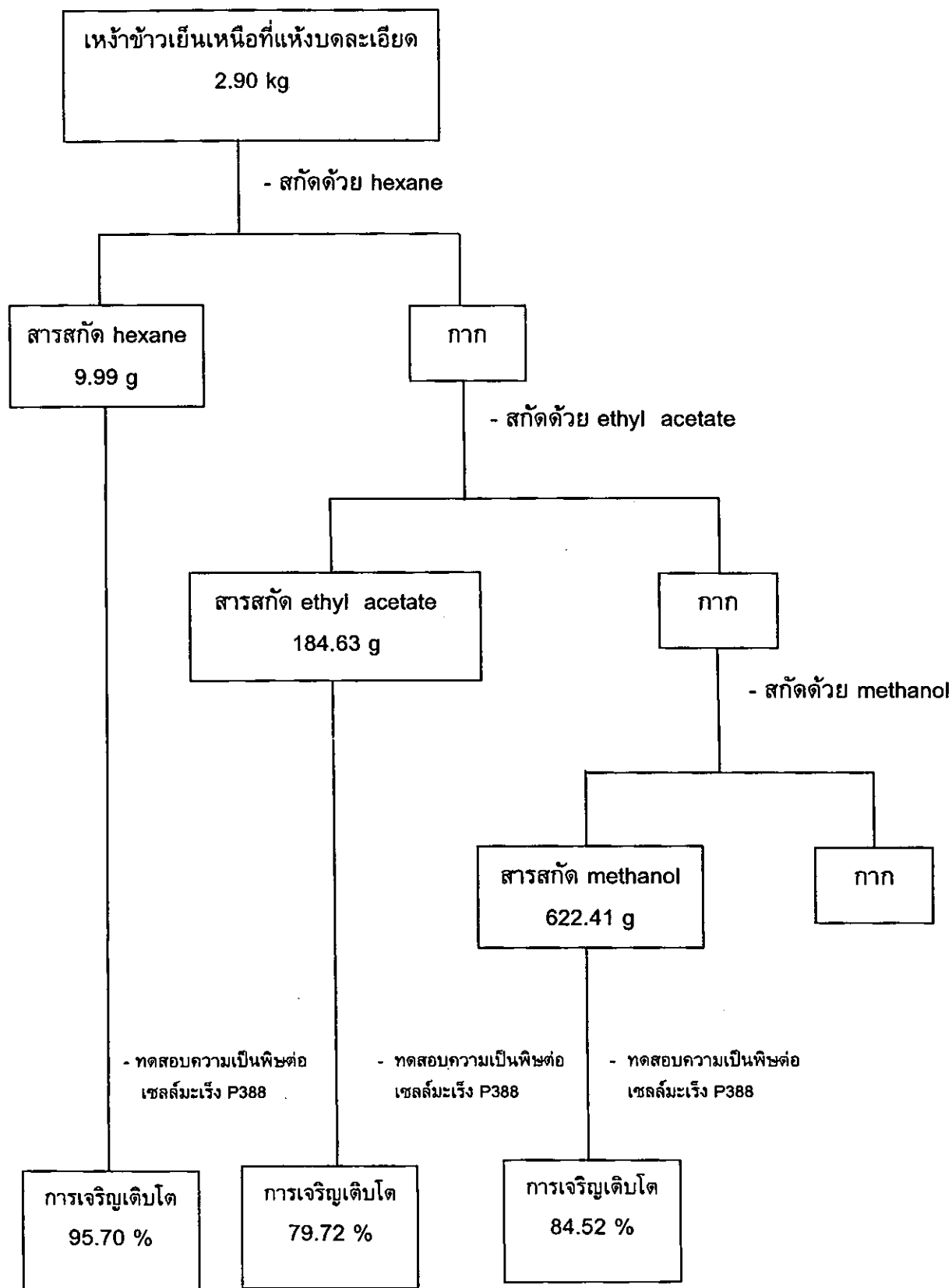
$$\text{ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลีนแสงของกลุ่มทดลอง (TS-4)}}{\text{ค่าการดูดกลืนคลีนแสงของกลุ่มควบคุม (NC-4)}} \times 100$$

3.2.8 การหาค่า ED₅₀

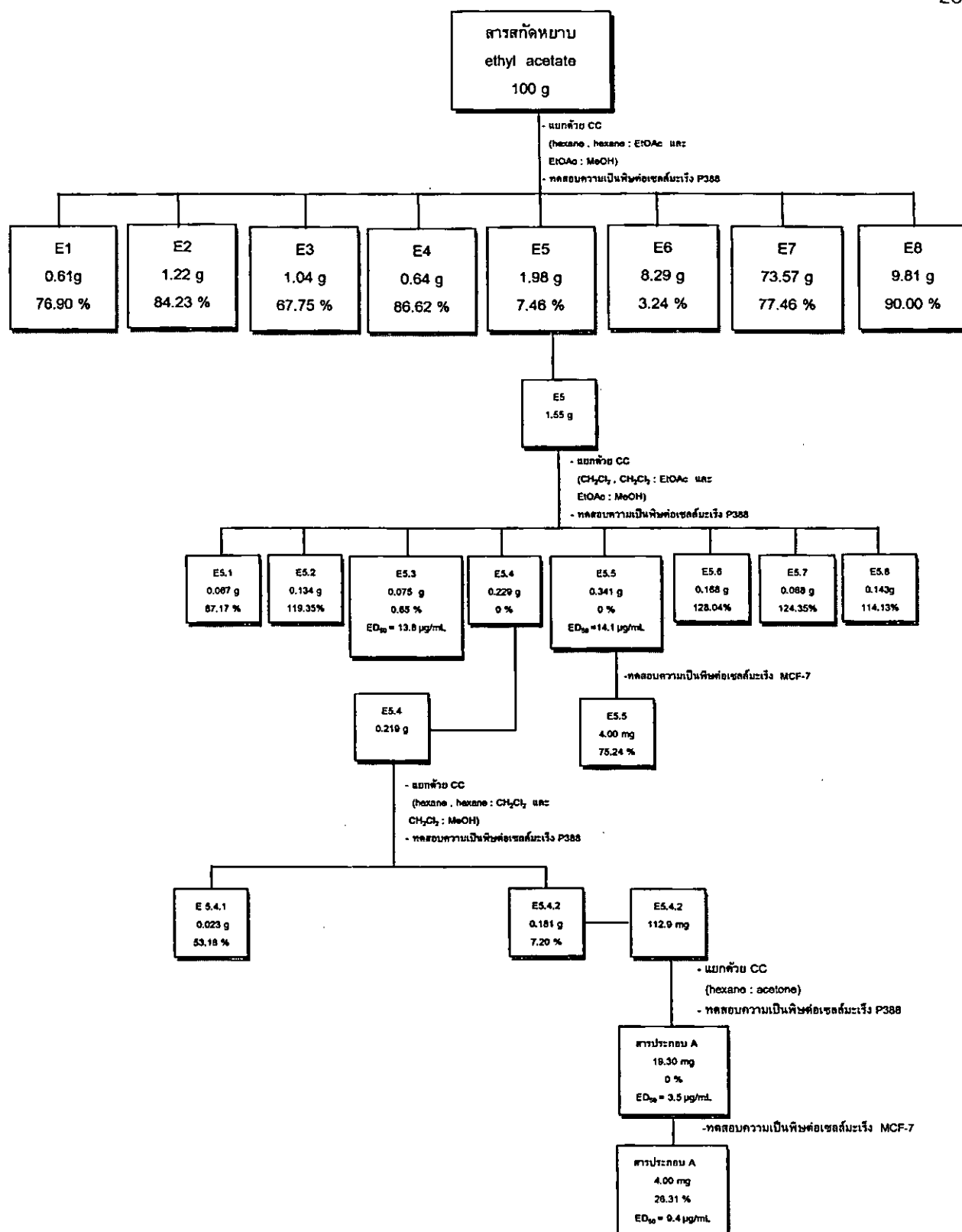
ค่า ED₅₀ หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างในหน่วย µg/mL (แกนนอน) กับร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ในวันที่ 4 (แกนตั้ง) จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์มะเร็ง MCF-7 ตายครึ่งหนึ่งเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นค่า ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/mL

4. การศึกษาสมบัติทางกายภาพ และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

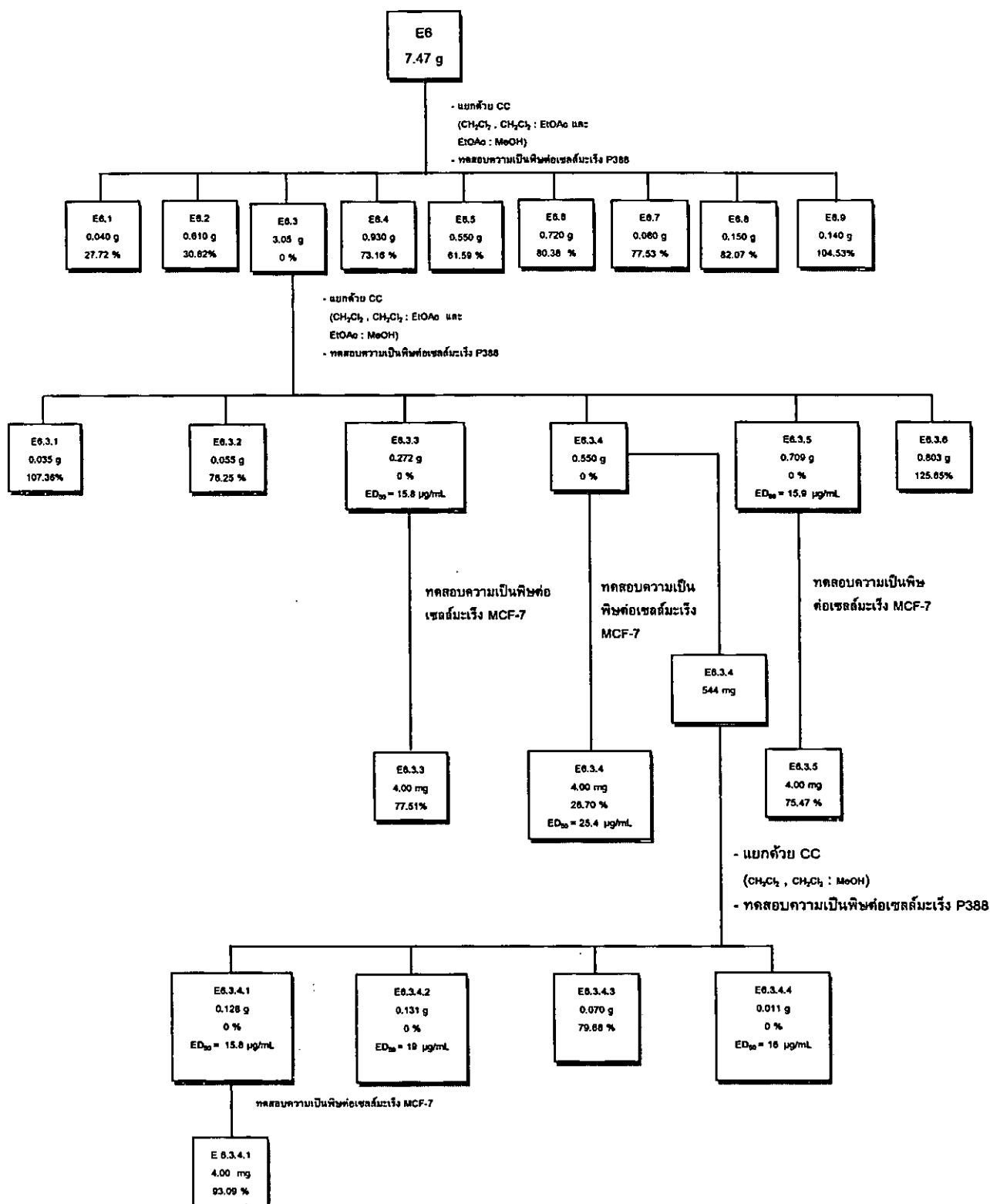
นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลว และวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีคือ IR ^1H NMR ^{13}C NMR และ MS



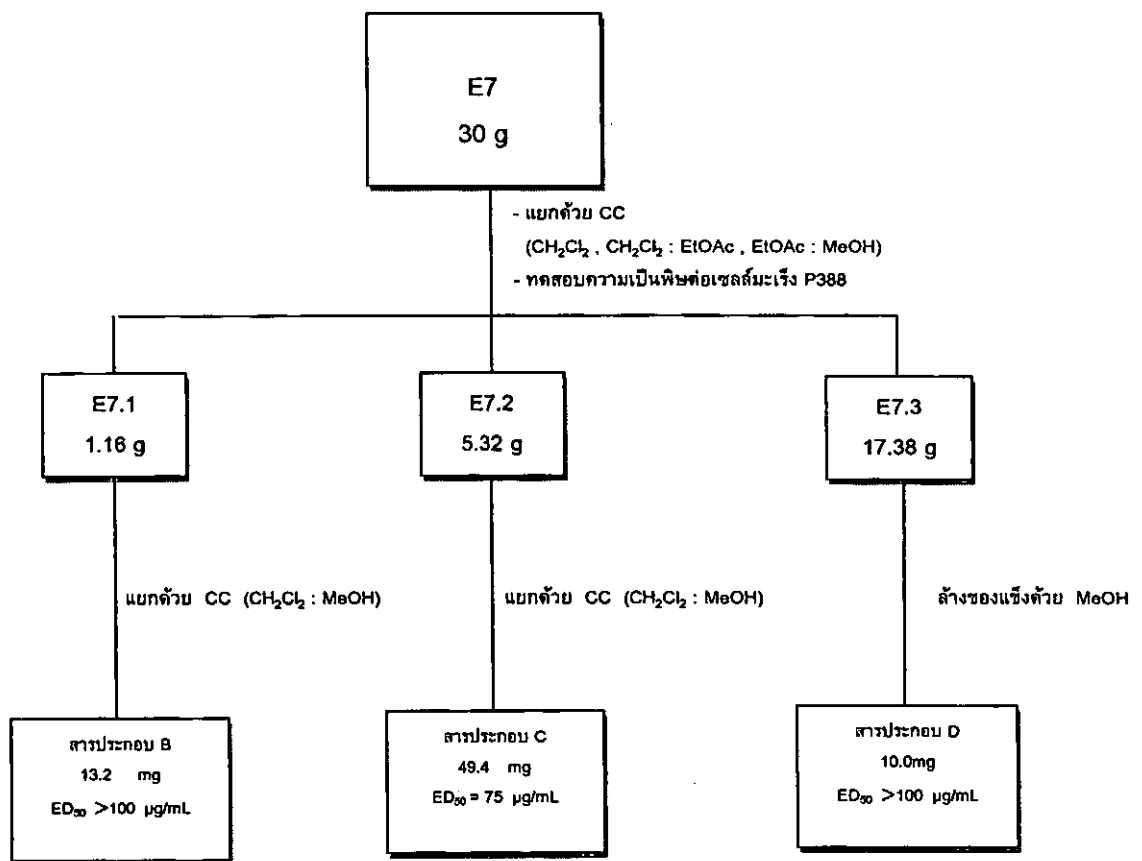
ภาพประกอบ 13 ขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเนื้อ และค่าร้อยละการเจริญเติบโตของ
เซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



ภาพประกอบ 14 ขั้นตอนการแยกสารสกัดหยาบ ethyl acetate สารกลุ่ม E5 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL และค่า ED₅₀ ของสารที่มีความเป็นพิษสูง



ภาพประกอบ 15 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E6 คำร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 μg/mL และค่า ED₅₀ ของสารที่มีความเป็นพิษสูง



ภาพประกอบ 16 ขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม E7 และค่า ED₅₀ ของสารประกอบที่ทดสอบกับเซลล์มะเร็ง P388

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากเหง้าข้าวเย็นเหนือ

ผลจากการสกัดเหง้าข้าวเย็นเหนือที่แห้งบดละเอียด 2.90 kg ด้วย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลือง หนัก 9.99 g สารสกัด ethyl acetate มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง หนัก 184.63 g และ สารสกัด methanol มีลักษณะเป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ หนัก 622.41 g

2. ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate และการทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 ผลจากการนำสารสกัด ethyl acetate หนัก 100 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm) ใช้ซิลิกาเจล 1.5 kg เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol โดยค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวชะ เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 mL นำแต่ละส่วนไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกันและมีลักษณะบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 8 กลุ่ม (E1-E8) (ตาราง 4) นำแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E5 และ E6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 13) จึงนำสารกลุ่ม E5 และ E6 มาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E7 มีลักษณะเป็นของแข็งจึงนำมาแยกและทำให้บริสุทธิ์

ตาราง 4 ผลการแยกสารสกัด ethyl acetate ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
hexane : EtOAc	(95 : 5)	E1	0.61	ของเหลวใส
	(70 : 30)	E2	1.22	น้ำมันสีน้ำตาล
	(60 : 40)	E3	1.04	สารคล้ายขี้ผึ้งสีเหลืองส้ม
	(50 : 50)	E4	0.64	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(30 : 70)	E5	1.98	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(10 : 90)	E6	8.29	ของแข็งสีน้ำตาล
EtOAc : MeOH	(90 : 10)	E7	73.57	ของแข็งสีน้ำตาลแดงอิฐ
	(50 : 50)	E8	9.81	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม

2.2 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E5หนัก 1.55 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm) ใช้ซิลิกาเจล 57 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane dichloromethane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 mL ได้สาร 8 กลุ่ม (E5.1-E5.8) (ตาราง 5) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E5.3 E5.4 และ E5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 14) เนื่องจากสารกลุ่ม E5.4 มีลักษณะเป็นของแข็งผสมอยู่จึงนำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E5.3 และ E5.5 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (dichloromethane : methanol = 98 : 2) พบว่ายังมีสารอยู่อย่างน้อย 7 ชนิด จึงไม่นำมาแยกต่อเพียงแต่นำไปหาค่า ED₅₀

ตาราง 5 ผลการแยกสารกลุ่ม E5 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc	(95 : 5)	E5.1	0.067	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(92 : 8)	E5.2	0.134	สารเหนียวสีน้ำตาลเหลือง
	(91 : 9)	E5.3	0.075	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
	(90 : 10)	E5.4	0.229	ของแข็งสีน้ำตาล
	(87 : 13)	E5.5	0.341	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
	(75 : 25)	E5.6	0.168	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ
	(60 : 40)	E5.7	0.068	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
EtOAc : MeOH	(70 : 30)	E5.8	0.143	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำ

2.3 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E5.4หนัก 219 mg ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 30 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane hexane : dichloromethane และ dichloromethane : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 20-50 mL ได้สาร 2 กลุ่ม (E5.4.1 และ E5.4.2) (ตาราง 6) นำสารทั้งสองกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E5.4.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่ม E5.4.1 (ตาราง 15) จึงนำสารกลุ่ม E5.4.2 มาแยกต่อ

ตาราง 6 ผลการแยกสารกลุ่ม E5.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย		สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
hexane : CH ₂ Cl ₂	(10 : 90)	E5.4.1	0.023	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	(99 : 1)	E5.4.2	0.181	ของแข็งสีน้ำตาล

2.4 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E5.4.2หนัก 112.9 mg ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm) ใช้ซิลิกาเจล 22 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย hexane : acetone (80 : 20) เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 10-50 mL ได้ผลึกของแข็งสีขาวหนัก 19.30 mg ให้ชื่อว่าสารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง และนำไปหาค่า ED₅₀ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตาราง 16)

2.5 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E6หนัก 7.47 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 180 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane dichloromethane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 mL ได้สาร 9 กลุ่ม (E6.1-E6.9) (ตาราง 7) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E6.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 19) จึงนำสารกลุ่ม E6.3 มาแยกต่อ

ตาราง 7 ผลการแยกสารกลุ่ม E6 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc	(80 : 20) E6.1	0.040	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(60 : 40) E6.2	0.610	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
	(40 : 60) E6.3	3.050	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
	(20 : 80) E6.4	0.930	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลเหลือง
	(10 : 90) E6.5	0.550	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
EtOAc : MeOH	(90 : 10) E6.6	0.720	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง
	(70 : 30) E6.7	0.060	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง
	(50 : 50) E6.8	0.150	ของแข็งสีน้ำตาลแดงส้ม
	(20 : 80) E6.9	0.140	ของแข็งสีน้ำตาลดำ

2.6 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E6.3หนัก 3.00 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 cm) ใช้ซิลิกาเจล 75 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane dichloromethane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 mL ได้สาร 6 กลุ่ม (E6.3.1-E6.3.6) (ตาราง 8) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E6.3.3 E6.3.4 และ E6.3.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 20) สารกลุ่ม E6.3.4 มีสารอยู่ปริมาณมากและมีผลึกของแข็งปนอยู่ จึงนำสารกลุ่ม E6.3.4 มาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E6.3.3 และ E6.3.5 เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (dichloromethane : ethyl acetate = 60 : 40) พบว่ายังมีสารอยู่อย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ นำไปหาค่า ED₅₀ (ตาราง 24 25 และ ภาพประกอบ 23 24 ตามลำดับ)

ตาราง 8 ผลการแยกสารกลุ่ม E6.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc	(96 : 4) E6.3.1	0.035	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(85 : 15) E6.3.2	0.055	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาล
	(80 : 20) E6.3.3	0.272	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลมีผลึกของแข็ง
	(76 : 24) E6.3.4	0.550	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลมีผลึกของแข็ง
	(50 : 50) E6.3.5	0.709	สารเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง
EtOAc : MeOH	(90 : 10) E6.3.6	0.803	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

2.7 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E6.3.4 น้หนัก 544 mg ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 30 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ dichloromethane : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (E6.3.4.1-E6.3.4.4) (ตาราง 9) นำสารแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบสารกลุ่ม E6.3.4.1 E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 21) เนื่องจากสารกลุ่ม E6.3.4.1 และ E6.3.4.2 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (dichloromethane : methanol = 98 : 2) พบว่ายังมีสารอยู่อย่างน้อย 4 ชนิดจึงไม่ได้นำมาแยกต่อ ส่วนสารกลุ่ม E6.3.4.4 มีสารอยู่ปริมาณน้อย จึงนำสารทั้ง 3 กลุ่มไปหาค่า ED₅₀ (ตาราง 22 23 และ ภาพประกอบ 21 22 ตามลำดับ)

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่ม E6.3.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : MeOH	(95 : 5) E6.3.4.1	0.128	สารเหนียวสีน้ำตาลเหลือง
	(94 : 6) E6.3.4.2	0.131	สารเหนียวสีน้ำตาลแดง
	(92 : 8) E6.3.4.3	0.070	สารเหนียวสีน้ำตาลแดง
	(90 : 10) E6.3.4.4	0.011	ของแข็งสีส้มแดง

2.8 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E7 น้หนัก 30 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm) ใช้ซิลิกาเจล 800 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane dichloromethane : ethyl acetate และ ethyl acetate : methanol เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 100 mL ได้สาร 3 กลุ่ม (E7.1-E7.3) (ตาราง 10) มีลักษณะเป็นของแข็ง จึงนำสารทั้ง 3 กลุ่มมาแยกต่อ

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม E7 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลาย	สารกลุ่ม	น้ำหนัก (g)	ลักษณะสาร
CH ₂ Cl ₂ : EtOAc (30 : 70)	E7.1	1.16	ของแข็งสีน้ำตาล
(15 : 85)	E7.2	5.23	ของแข็งสีขาวปนสีน้ำตาลแดง
EtOAc : MeOH (80 : 20)	E7.3	17.38	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

2.9 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E7.1 น้ำหนัก 1.16 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 50 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane : methanol (96 : 4) เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 20 mL ได้ผลึกของแข็งสีขาวหนัก 13.20 mg ให้ชื่อว่า สารประกอบ B นำสารประกอบ B ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและหาค่า ED₅₀ (ตาราง 26)

2.10 ผลจากการแยกสารกลุ่ม E7.2 น้ำหนัก 500 g ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm) ใช้ซิลิกาเจล 15 g เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลาย dichloromethane และ dichloromethane : methanol (90 : 10) เก็บส่วนที่ชะได้ครั้งละ 50 mL ได้ผลึกของแข็งสีขาวหนัก 49.4 mg ให้ชื่อว่า สารประกอบ C นำสารประกอบ C ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและหาค่า ED₅₀ (ตาราง 26)

2.11 ผลจากการนำสารกลุ่ม E7.3 น้ำหนัก 17.38 g มาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 10 mg ให้ชื่อว่า สารประกอบ D นำสารประกอบ D ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างและหาค่า ED₅₀ (ตาราง 26)

3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

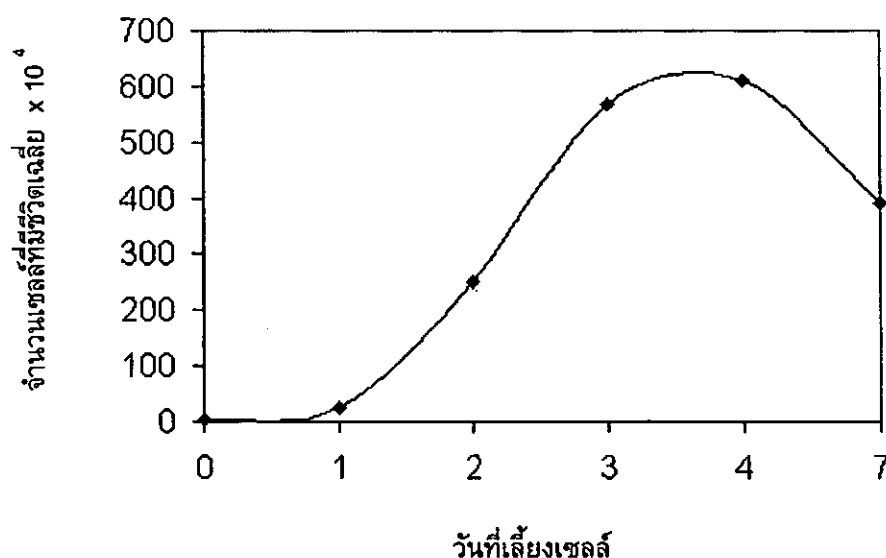
3.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.1.1 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

ผลจากการนับเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ นำข้อมูลที่ได้มาเขียน growth curve ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง จำนวนวันที่ทำการทดลอง (แกน X) จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกน Y) ผลที่ได้แสดงในตาราง 11 และภาพประกอบ 17

ตาราง 11 ผลการวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

เวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)
0	5.00×10^4
1	2.60×10^5
2	2.50×10^6
3	5.68×10^6
4	6.11×10^6
7	3.93×10^6



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P388 เจริญเติบโตได้ดีในขวดเลี้ยงเซลล์ในระยะ 4 วันแรกที่ทำการศึกษา โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตสูงสุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกากำหนดค่าเกณฑ์มาตรฐานความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็ง KB ดังนี้ สารสกัดหยาดควรมีค่า $ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ ถ้าเป็นสารบริสุทธิ์ควรมีค่า $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ (Geran, et al. 1972 : 7-17) ดังนั้นการทดสอบค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ในการวิจัยครั้งนี้จึงใช้เกณฑ์ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา

3.1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol

ผลจากการนำสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบว่าสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูงกว่าสารสกัด hexane และ methanol ดังตาราง 12

ตาราง 12 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารสกัด	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	6.46×10^6	100.00
Hexane	5.00×10^4	6.18×10^6	95.70
EtOAc	5.00×10^4	5.15×10^6	79.72
MeOH	5.00×10^4	5.46×10^6	84.52

3.1.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จากสารสกัด ethyl acetate

3.1.3.1 ผลจากการนำสารสกัด ethyl acetate มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 8 กลุ่ม (ตาราง 4) สารทั้ง 8 กลุ่ม (E1-E8) เมื่อไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบสารกลุ่ม E5 และ E6 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 13) จึงนำมาศึกษาต่อ

ตาราง 13 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E1 ถึง E8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	7.10×10^6	100.00
E1	5.00×10^4	5.46×10^6	76.90
E2	5.00×10^4	5.98×10^6	84.23
E3	5.00×10^4	4.81×10^6	67.75
E4	5.00×10^4	6.15×10^6	86.62
E5	5.00×10^4	5.30×10^5	7.46
E6	5.00×10^4	2.30×10^5	3.24
E7	5.00×10^4	5.50×10^6	77.46
E8	5.00×10^4	6.39×10^6	90.00

3.1.3.2 สารกลุ่ม E5 แยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 8 กลุ่ม (ตาราง 5) สารทั้ง 8 กลุ่ม (E5.1-E5.8) เมื่อไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบสารกลุ่ม E5.3 E5.4 และ E5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 14)

ตาราง 14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.1 ถึง E5.8 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.60×10^6	100.00
E5.1	5.00×10^4	4.01×10^6	87.17
E5.2	5.00×10^4	5.49×10^6	119.35
E5.3	5.00×10^4	3.00×10^4	0.65
E5.4	5.00×10^4	0	0
E5.5	5.00×10^4	0	0
E5.6	5.00×10^4	5.89×10^6	128.04
E5.7	5.00×10^4	5.72×10^6	124.35
E5.8	5.00×10^4	5.25×10^6	114.13

สารกลุ่ม E5.4 มีลักษณะเป็นของแข็งผสมอยู่ จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ แยกได้สาร 2 กลุ่ม (ตาราง 6) สารทั้ง 2 กลุ่ม (E5.4.1-E5.4.2) เมื่อไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL พบสารกลุ่ม E5.4.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่ม E5.4.1 (ตาราง 15)

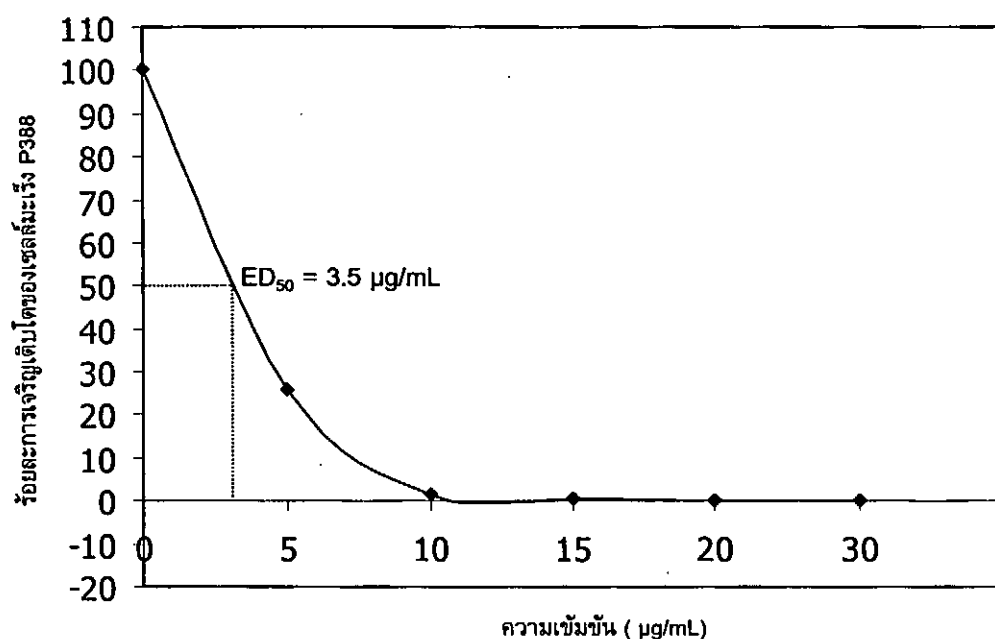
ตาราง 15 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.4.1 และ E5.4.2 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.72×10^6	100.00
E5.4.1	5.00×10^4	2.51×10^6	53.18
E5.4.2	5.00×10^4	3.40×10^5	7.20

สารกลุ่ม E5.4.2 แยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารประกอบ A ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} ของสารประกอบ A เท่ากับ $3.5 \mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตาราง 16 และภาพประกอบ 18

ตาราง 16 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.79×10^6	100.00
5	5.00×10^4	1.49×10^6	25.73
10	5.00×10^4	8.00×10^4	1.38
15	5.00×10^4	2.00×10^4	0.35
20	5.00×10^4	0	0
30	5.00×10^4	0	0

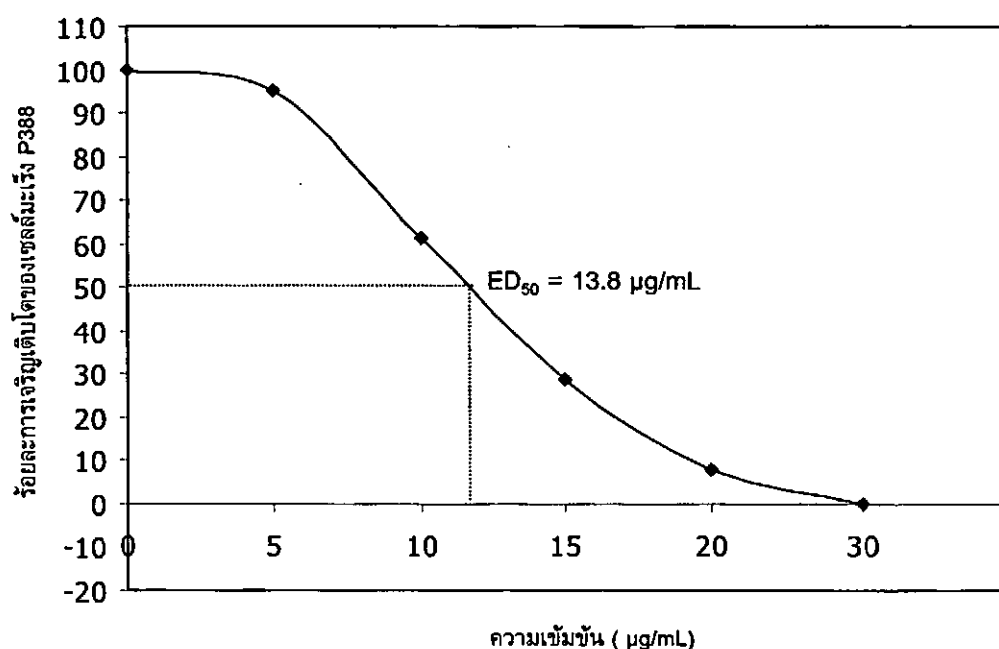


ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ A ต่อเซลล์มะเร็ง P388

สารกลุ่ม E5.3 และ E5.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง แต่มีสารอยู่ปริมาณน้อยและมีสารอยู่หลายชนิดจึงไม่นำมาศึกษาต่อ ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารกลุ่ม E5.3 และ E5.5 ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 13.8 และ 14.1 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 17 18 และ ภาพประกอบ 19 20

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

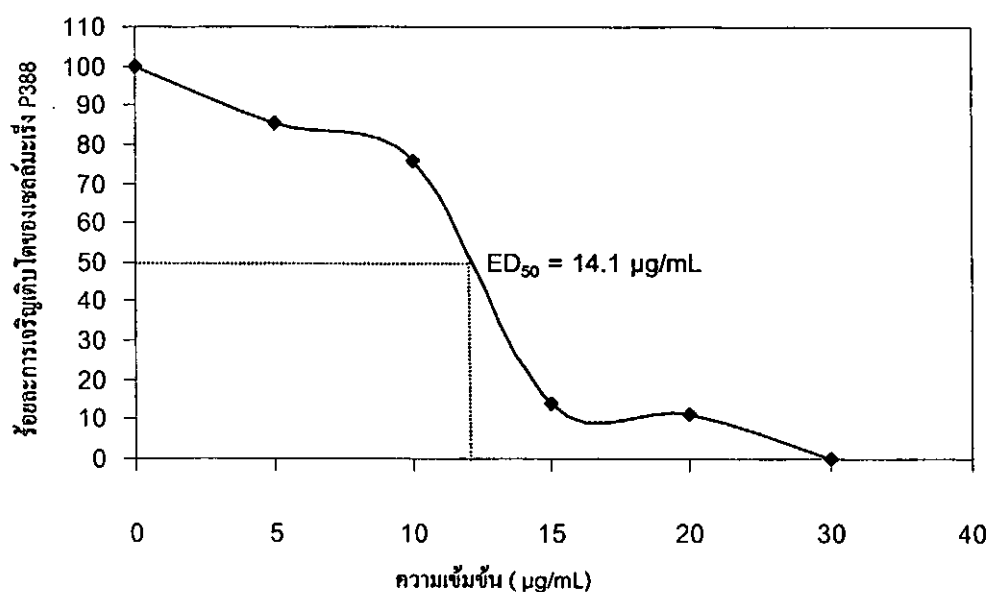
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.42×10^6	100.00
5	5.00×10^4	5.16×10^6	95.20
10	5.00×10^4	3.31×10^6	61.07
20	5.00×10^4	1.55×10^6	28.60
30	5.00×10^4	4.20×10^5	7.74
40	5.00×10^4	0	0



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E5.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E5.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.42×10^6	100.00
5	5.00×10^4	4.61×10^6	85.05
10	5.00×10^4	4.09×10^6	75.46
15	5.00×10^4	7.50×10^5	13.83
20	5.00×10^4	6.00×10^5	11.07
30	5.00×10^4	0	0



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E5.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.1.3.3 สารกลุ่ม E6 แยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สาร 9 กลุ่ม (E6.1-E6.9) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ของสารทั้ง 9 กลุ่ม พบสารกลุ่ม E 6.3 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 19) จึงนำมาศึกษาต่อ

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.1 ถึง E6.9 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.52×10^8	100.00
E6.1	5.00×10^4	1.53×10^8	27.72
E6.2	5.00×10^4	1.69×10^8	30.62
E6.3	5.00×10^4	0	0
E6.4	5.00×10^4	5.07×10^8	73.16
E6.5	5.00×10^4	3.40×10^8	61.59
E6.6	5.00×10^4	5.57×10^8	80.38
E6.7	5.00×10^4	4.28×10^8	77.53
E6.8	5.00×10^4	4.53×10^8	82.07
E6.9	5.00×10^4	5.77×10^8	104.53

สารกลุ่ม E6.3 แยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 6 กลุ่ม (E6.3.1-E6.3.6) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ของสารทั้ง 6 กลุ่ม พบสารกลุ่ม E6.3.3 E6.3.4 และ E6.3.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 20)

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.1 ถึง E6.3.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม (µg/mL)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.21×10^8	100.00
E6.3.1	5.00×10^4	4.52×10^8	107.36
E6.3.2	5.00×10^4	3.21×10^8	76.25
E6.3.3	5.00×10^4	0	0
E6.3.4	5.00×10^4	0	0
E6.3.5	5.00×10^4	0	0
E6.3.6	5.00×10^4	5.29×10^8	125.65

สารกลุ่ม E6.3.4 มีลักษณะเป็นของแข็งปนอยู่จึงนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ได้สาร 4 กลุ่ม (E6.3.4.1-E6.3.4.4) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ของสารทั้ง 4 กลุ่ม พบสารกลุ่ม E6.3.4.1 E6.3.4.2 E6.3.4.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 สูง (ตาราง 21)

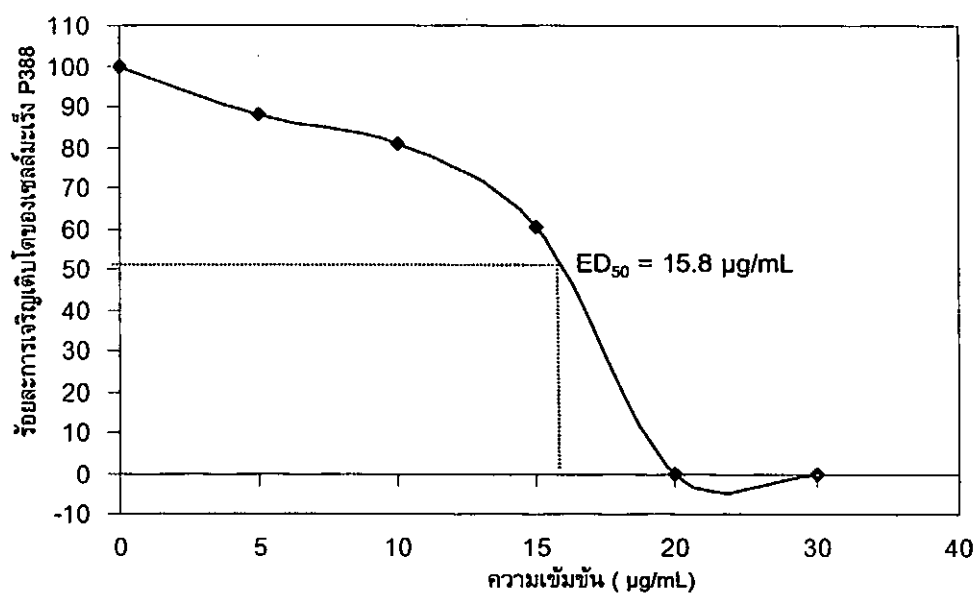
ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ถึง E6.3.4.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.72×10^6	100.00
E6.3.4.1	5.00×10^4	0	0
E6.3.4.2	5.00×10^4	0	0
E6.3.4.3	5.00×10^4	3.76×10^6	79.66
E6.3.4.4	5.00×10^4	0	0

สารกลุ่ม E6.3.4.1 และ E6.3.4.2 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (dichloromethane : methanol = 98 : 2) พบว่ายังมีสารอยู่อย่างน้อย 4 ชนิด ส่วนสารกลุ่ม E6.3.4.4 มีสารอยู่ปริมาณน้อย จึงไม่ได้นำสารทั้ง 3 กลุ่มไปศึกษาต่อเพียงแต่นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 15.8 19 และ 16 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 22 23 และภาพประกอบ 21 22 ตามลำดับ

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

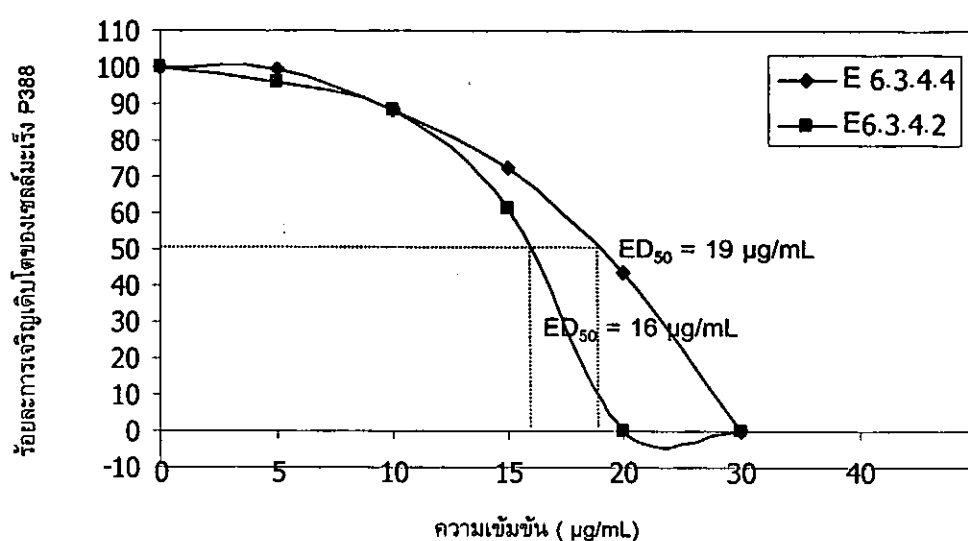
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.72×10^6	100.00
5	5.00×10^4	4.22×10^6	89.40
10	5.00×10^4	3.40×10^6	72.03
15	5.00×10^4	2.85×10^6	60.38
20	5.00×10^4	0	0
30	5.00×10^4	0	0



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

กลุ่มสาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	4.94×10^6	100.00
E6.3.4.2	5	5.00×10^4	4.73×10^6	95.75
	10	5.00×10^4	4.37×10^6	88.46
	15	5.00×10^4	3.02×10^6	61.13
	20	5.00×10^4	0	0
	30	5.00×10^4	0	0
E6.3.4.4	5	5.00×10^4	4.92×10^6	99.59
	10	5.00×10^4	4.36×10^6	88.26
	15	5.00×10^4	3.56×10^6	72.06
	20	5.00×10^4	2.14×10^6	43.31
	30	5.00×10^4	0	0

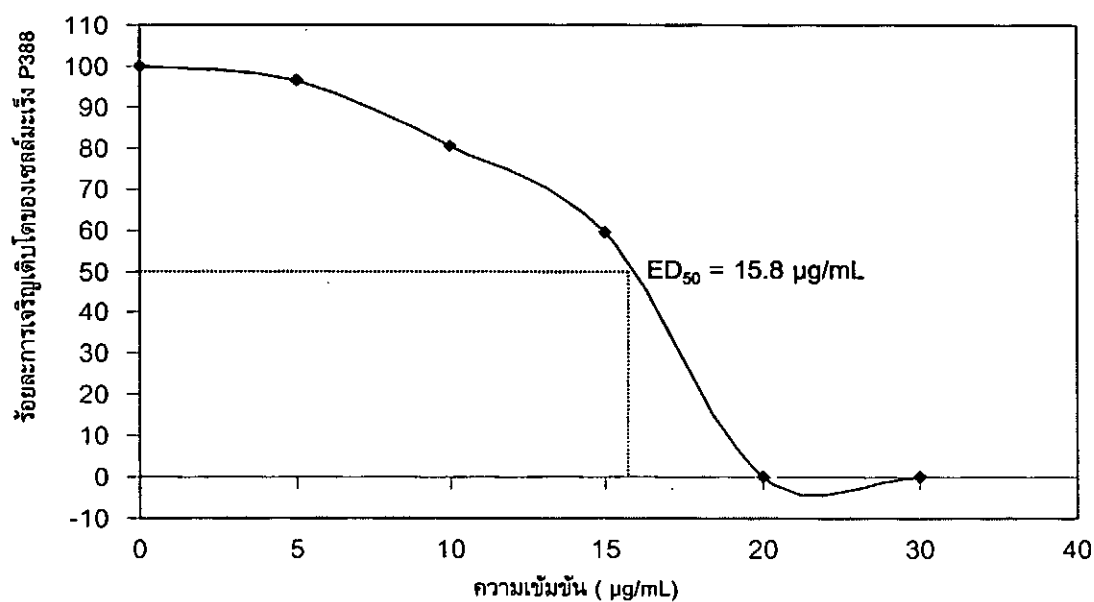


ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

สารกลุ่ม E6.3.3 และ E6.3.5 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (dichloromethane : ethyl acetate = 60 : 40) พบว่ายังมีสารอยู่อย่างน้อย 5 ชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 15.8 และ 15.9 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 24 25 และ ภาพประกอบ 23 24

ตาราง 24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.3 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

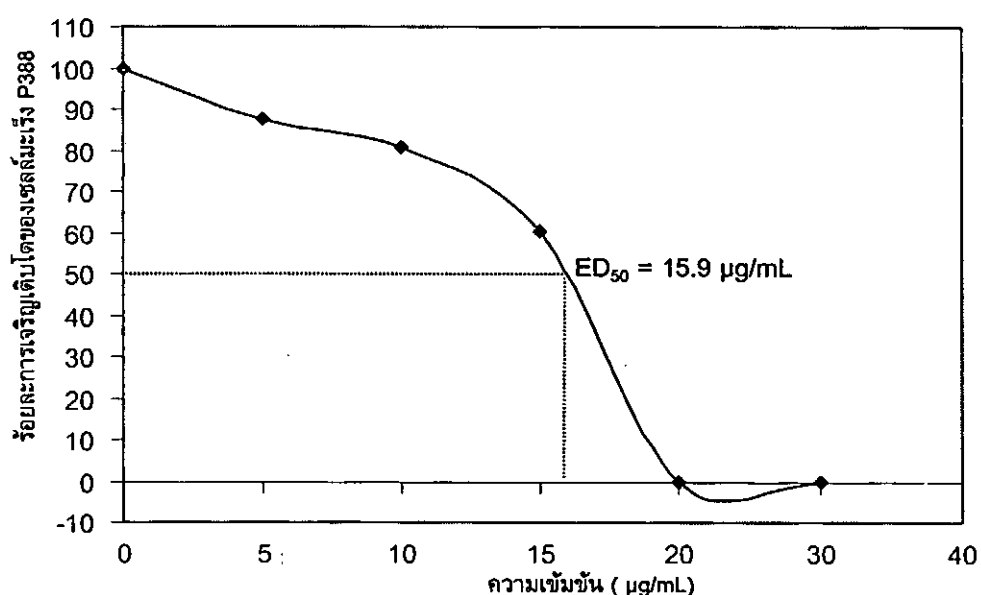
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	5.42×10^6	100.00
5	5.00×10^4	5.22×10^6	96.31
10	5.00×10^4	4.36×10^6	80.44
15	5.00×10^4	3.21×10^6	59.23
20	5.00×10^4	0	0
30	5.00×10^4	0	0



ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E6.3.3 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

ตาราง 25 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม E6.3.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวดเลี้ยงเซลล์ (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
	วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	5.00×10^4	4.72×10^6	100.00
5	5.00×10^4	4.14×10^6	87.71
10	5.00×10^4	3.81×10^6	80.72
15	5.00×10^4	2.85×10^6	60.38
20	5.00×10^4	0	0
30	5.00×10^4	0	0

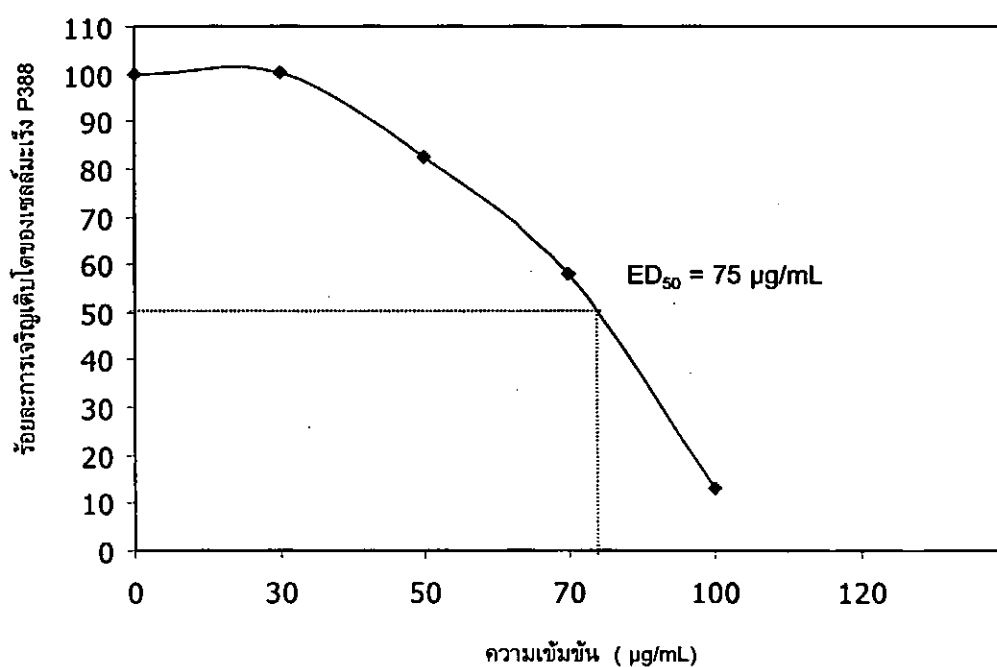


ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม E6.3.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.1.3.4 การแยกสารกลุ่ม E7.1 E7.2 และ E7.3 ได้สารประกอบ B C และ D ตามลำดับ ผลจากการนำสารประกอบดังกล่าวไปหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ค่า ED_{50} ของสารประกอบ B และ D มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนสารประกอบ C ได้ค่า ED_{50} เท่ากับ 75 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 26 และ ภาพประกอบ 25

ตาราง 26 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ B C และ D ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารประกอบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเฉลี่ยใน 1 ขวด (5 mL)		การเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง P388 (%)
		วันเริ่มต้น	วันที่ 4	
กลุ่มควบคุม	-	5.00×10^4	5.79×10^6	100.00
B	30	5.00×10^4	5.98×10^6	103.28
	50	5.00×10^4	5.59×10^6	96.54
	70	5.00×10^4	5.18×10^6	89.46
	100	5.00×10^4	4.35×10^6	75.12
C	30	5.00×10^4	5.81×10^6	100.34
	50	5.00×10^4	4.78×10^6	82.56
	70	5.00×10^4	3.35×10^6	57.85
	100	5.00×10^4	7.70×10^6	13.29
D	30	5.00×10^4	5.34×10^6	92.23
	50	5.00×10^4	5.20×10^6	89.81
	70	5.00×10^4	4.24×10^6	73.23
	100	5.00×10^4	3.55×10^6	61.31



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ C ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่มที่มีพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น

3.2.1 ผลจากการนำสารกลุ่ม E5.5 E6.3.3 E6.3.4 E6.3.5 E6.3.4.1 และ สารประกอบ A ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED_{50} 14.1 15.8 < 30 15.9 15.8 และ 3.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ดังแสดงในตาราง 27 และ 28

ตาราง 27 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E5.5 E6.3.3 E6.3.4 และ E6.3.5 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

ชนิดของสาร	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm(O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 (%)
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	0.076	0.076	0.0760	-
กลุ่มควบคุม NC-4	0.311	0.307	0.3090	100.00
E5.5	0.253	0.212	0.2325	75.24
E6.3.3	0.244	0.235	0.2395	77.51
E6.3.4	0.082	0.083	0.0825	26.70
E6.3.5	0.107	0.146	0.1265	40.94

$$\text{O.D.Day 4 / O.D.Day 0} = 0.390/0.076$$

$$= 4.07 \text{ เท่า}$$

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ตาราง 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E6.3.4.1 และ สารประกอบ A ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

ชนิดของสาร	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 (%)
	ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	0.095	0.130	0.1125	-
กลุ่มควบคุม NC-4	0.448	0.449	0.4485	100.00
E6.3.4.1	0.436	0.399	0.4175	93.09
สารประกอบ A	0.097	0.139	0.1280	26.31

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

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

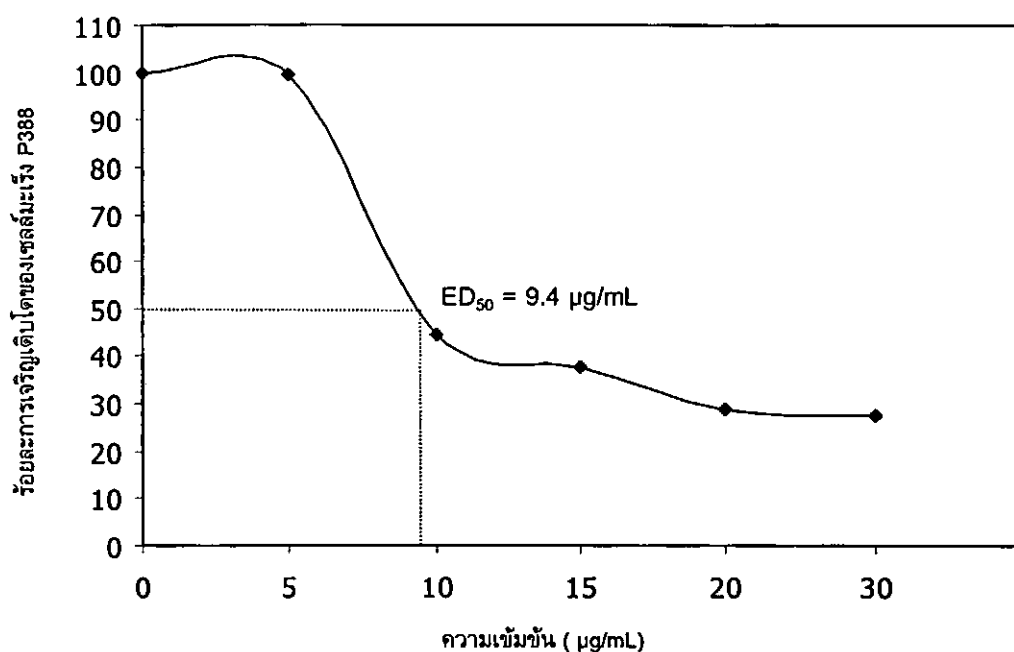
3.2.2 จากตาราง 27 และ 28 พบว่า สารประกอบ A และ E6.3.4 มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากกว่ากลุ่มอื่นโดยมีค่าร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 ที่ 30 µg/mL เท่ากับ 26.31 และ 26.70 ตามลำดับ ผลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ A และ สารกลุ่ม E6.3.4 ได้ค่า ED₅₀ เท่ากับ 9.4 และ 25.4 µg/mL ตามลำดับ ดังตาราง 29 30 และภาพประกอบ 26 27 ตามลำดับ

ตาราง 29 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารประกอบ A ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 (%)
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	-	0.051	0.065	0.0580	-
กลุ่มควบคุม NC-4	-	0.217	0.283	0.2500	100.00
PC-4	4	0.057	0.057	0.0570	22.80
สารประกอบ A	5	0.240	0.258	0.2490	99.60
	10	0.106	0.117	0.1115	44.60
	15	0.084	0.104	0.0940	37.60
	20	0.072	0.072	0.0720	28.80
	30	0.069	0.068	0.0685	27.40

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

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ



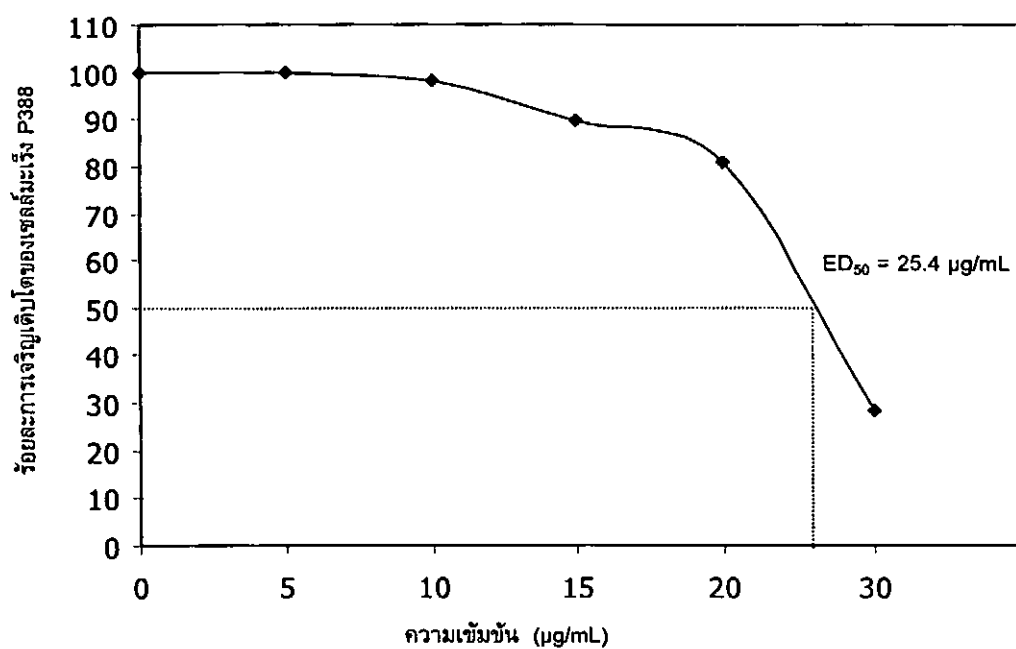
ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารประกอบ A ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

ตาราง 30 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารกลุ่ม E6.3.4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm (O.D.) วันที่ 4			ร้อยละการเจริญเติบโต ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 (%)
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	เฉลี่ย	
NC-0	-	0.084	0.084	0.0840	-
กลุ่มควบคุม NC-4	-	0.332	0.331	0.3315	100.00
PC-4	4	0.076	0.076	0.0760	22.93
E6.3.4	5	0.330	0.331	0.3305	99.69
	10	0.327	0.325	0.3260	98.34
	15	0.290	0.304	0.2970	89.59
	20	0.247	0.289	0.2680	80.84
	30	0.114	0.075	0.0945	28.50

$$\begin{aligned} \text{O.D. Day 4 / O.D. Day 0} &= 0.3315 / 0.084 \\ &= 3.95 \text{ เท่า} \end{aligned}$$

ดังนั้นถือว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 เป็นปกติตามเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม E6.3.4 ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7

3.3.3 จากการใช้สารต้านมะเร็งชนิด 5-fluorouracil เป็น positive control (PC-4) ตามสถาบันมะเร็งแห่งชาติ พบว่าเซลล์มะเร็ง MCF-7 มีค่าร้อยละการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 4 μg/mL เท่ากับ 22.80 และ 29.93 ตามลำดับ (ED₅₀ ≤ 4 μg/mL) แสดงว่าเซลล์มะเร็ง MCF-7 ตอบสนอง 5-fluorouracil เป็นอย่างดี

ตาราง 31 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED₅₀ ของสารที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือต่อ
เซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7

สารประกอบ/ กลุ่มสาร	ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL		ED ₅₀ (µg/mL)	
	P388	MCF-7	P388	MCF-7
Hexane	95.70	-	> 30	-
EtOAc	79.72	-	> 30	-
MeOH	84.52	-	> 30	-
E1	76.90	-	> 30	-
E2	84.23	-	> 30	-
E3	67.75	-	> 30	-
E4	86.62	-	> 30	-
E5	7.46	-	< 30	-
E6	3.24	-	< 30	-
E7	77.46	-	> 30	-
E8	90.00	-	> 30	-
E5.1	87.17	-	> 30	-
E5.2	119.35	-	> 30	-
E5.3	0.65	-	13.8	-
E5.4	0	-	< 30	-
E5.5	0	75.24	14.1	-
E5.6	128.04	-	> 30	-
E5.7	124.35	-	> 30	-
E5.8	114.13	-	> 30	-
E5.4.1	53.18	-	> 30	-
E5.4.2	7.20	-	< 30	-
E6.1	27.72	-	< 30	-
E6.2	30.62	-	> 30	-
E6.3	0	-	< 30	-
E6.4	73.16	-	> 30	-
E6.5	61.59	-	> 30	-
E6.6	80.38	-	> 30	-
E6.7	77.53	-	> 30	-
E6.8	82.07	-	> 30	-
E6.9	104.53	-	> 30	-
E6.3.1	107.36	-	> 30	-
E6.3.2	76.25	-	> 30	-
E6.3.3	0	77.51	15.8	-
E6.3.4	0	26.70	< 30	25.4
E6.3.5	0	40.94	15.9	-
E6.3.6	125.65	-	> 30	-
E6.3.4.1	0	93.09	15.8	-

ตาราง 31 (ต่อ) ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED₅₀ ของสารที่แยกได้จากข้าวเย็นเหนือต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7

สารประกอบ/ กลุ่มสาร	ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL		ED ₅₀ (µg/mL)	
	P388	MCF-7	P388	MCF-7
E6.3.4.2	0	-	19	-
E6.3.4.3	79.65	-	> 30	-
E6.3.4.4	0	-	16	-
สารประกอบ A	0	26.31	3.5	9.4
สารประกอบ B	103.28	-	>100	-
สารประกอบ C	100.34	-	75	-
สารประกอบ D	92.23	-	>100	-

4. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ผลการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สารประกอบ A เป็นผลึกของแข็งสีขาว น้ำหนัก 19.30 mg จุดหลอมเหลว 253-255 °C (จุดหลอมเหลวของ resveratrol เท่ากับ 257 °C, Sethi, et al. 1980 : 1831-1832) ให้สีม่วงน้ำเงินกับ anisaldehyde - sulfuric spray reagent ค่า R_f = 0.21 (hexane : acetone 60:40)

FT IR (cm⁻¹) (KBr) : 3300(O-H) 1634(C=C) 965(trans-CH=CH-) ภาพประกอบ 32

¹H NMR spectrum (acetone-d₆, 300MHz) δ (ppm) พบสัญญาณของหมู่ methine proton ทั้งหมด 6 สัญญาณที่ δ 7.42 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2' และ H-6') 7.02 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-β) 6.87 (1H, d, J = 16.3 Hz, H-α) 6.82 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3' และ H-5') 6.52 (2H, d, J 1.8 Hz, H-2 และ H-6) 6.26 (1H, brs, H-4) 8.3 (2H, s, 3-OH และ 5-OH) และ 8.6 (1H, s, 4'-OH) ดังแสดงในตาราง 32 และภาพประกอบ 33

COSY spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ methine proton H-2',6' กับ methine proton H-3',5'; H-α กับ H-β และ H-2,6 กับ H-4 ดังแสดงในตาราง 32 และภาพประกอบ 36

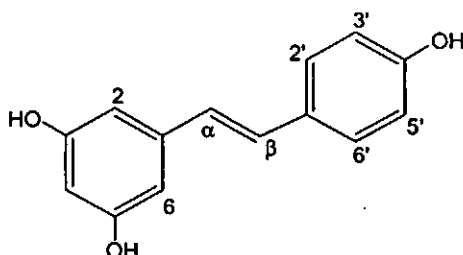
HMBC spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-2',6' กับ C-4' ; H-β กับ C-α, C-1, C-1' ; H-α กับ C-β, C-1, C-1' ; H-3',5' กับ C-2',6' C-4' ; H-2, 6 กับ C-α, C-4, C-3,5 ; H-4 กับ C-2,6 C-3,5 ; 3,5-OH กับ C-2,6 C-3,5 C-4 และ 4'-OH กับ C-3',5' และ C-4' ดังตาราง 33 และภาพประกอบ 38

¹³C NMR และ DEPT spectra (acetone-d₆, 75 MHz) δ (ppm) พบสัญญาณทั้งหมด 10 สัญญาณ เป็นของ 14 คาร์บอนในโมเลกุล โดยมี methine carbon 6 สัญญาณที่ δ(ppm) 102.63 (C-4) 105.59 (C-2,6) 116.36 (C-3',5') 126.78 (C-α) 128.66 (C-2',6') และ 129.02 (C-β) พบ

สัญญาณของ quaternary carbon 4 สัญญาณที่ δ 129.87 (C-1') 140.79 (C-1) 158.16 (C-4') และ 159.57 (C-3,5) ตาราง 34 และภาพประกอบ 34 35

EIMS spectrum ของสารประกอบ A ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity) : 228 (M^+ , 7) 161(80) 91(58) 77(16)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ A กับ resveratrol (Guiso, Marra & Farina. 2002 : 597-598) สรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ trans 3,4',5 trihydroxystilbene หรือ resveratrol



ภาพประกอบ 28 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A

ตาราง 32 ข้อมูล ^1H NMR ของ resveratrol และ สารประกอบ A

ตำแหน่ง	resveratrol ^a δ_H (ppm)	สารประกอบ A ^b δ_H (ppm)
2',6'	7.39 (2H, d, J 8.1 Hz)	7.42 (2H, d, J 8.4 Hz)
β	6.98 (1H, d, J _{trans} 16.2 Hz)	7.02 (1H, d, J 16.3 Hz)
α	6.87 (1H, d, J _{trans} 16.2 Hz)	6.87 (1H, d, J 16.3 Hz)
3',5'	6.82 (2H, d, J 8.1 Hz)	6.82 (2H, d, J 8.4 Hz)
2,6	6.52 (2H, s)	6.52 (2H, d, J 1.8 Hz)
4	6.24 (1H, t, J 2.1 Hz)	6.28 (1H, brs)
3,5-OH		8.3 (2H, s)
4'-OH		8.6 (1H, s)

^a บันทึกใน CD_3COCD_3 , 300 MHz (Guiso, Marra & Angela. 2002 : 597-598)

^b บันทึกใน acetone- d_6 , 300 MHz

ตาราง 33 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ A

ตำแหน่ง	สารประกอบ A			
	^1H NMR (δ , ppm)	COSY	HMQC	HMBC
2',6'	7.42 (2H, d, J 8.4 Hz)	H-3'5'	C-2',6'	C-3', C-4', C-5'
β	7.02 (1H, d, J 16.3 Hz)	H- α	C- β	C- α C-1 C-1'
α	6.87 (1H, d, J 16.3 Hz)		C- α	C- β C-1 C-1'
3',5'	6.82 (2H, d, J 8.4 Hz)		C-3'5'	C-2',6' C-4'
2,6	6.52 (2H, d, J 1.8 Hz)	H-4	C-2,6	C- α C-4 C-3,5
4	6.26 (1H, brs)		C-4	C-2,6 C3,5
3,5-OH	8.3 (2H, s)			C-4 C-2,6 C3,5
4'-OH	8.6 (1H, s)			C-4' C-3'5'

ตาราง 34 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ resveratrol และ สารประกอบ A

ตำแหน่ง	resveratrol ^a	สารประกอบ A ^b		
	δ_c (ppm)	δ_c (ppm)	DEPT-90 (ppm)	DEPT-135 (ppm)
1	140.6	140.79		
2,6	105.5	105.59	105.59	105.59
3,5	159.3	159.57		
4	102.5	102.63	102.63	102.63
1'	129.8	129.87		
2',6'	128.5	128.66	128.66	128.66
3',5'	116.2	116.36	116.36	116.36
4'	158.1	158.16		
C- α	126.6	126.78	126.78	126.78
C- β	128.9	129.02	129.02	129.02

^a บันทึกใน CD_3COCD_3 , 75 MHz (Guiso, Marra & Angela. 2002 : 597-598)

^b บันทึกใน acetone- d_6 , 75 MHz

สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 13.20 mg จุดหลอมเหลว 167-170 °C (จุดหลอมเหลวของ engeletin เท่ากับ 173-175 °C, Tschesche, et al. 1979 : 867-869) ให้สีส้มกับ anisaldehyde - sulfuric spray reagent ค่า R_f = 0.35 (CH_2Cl_2 : MeOH 90:10)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : 3356 (O-H) 1651 (C=O) ภาพประกอบ 39

^1H NMR spectrum (CDCl_3 - CD_3OD , 300MHz) พบสัญญาณของหมู่ methine proton ที่ δ 4.96 (1H, d, J= 11.21 Hz, H-2) 4.41 (1H, d, J= 11.21 Hz, H-3) 5.82 (1H, d, J= 1.69 Hz, H-6) 5.86 (1H, d, J= 1.96 Hz, H-8) 6.74 (2H, d, J= 8.42 Hz, H-3',5') 7.20 (2H, d, J= 8.42 Hz, H-2',6') 4.1(1H, m, H-5'') 3.74 (1H, s, H-1'') 3.56 (1H, dd, J= 9.5 , 3.15 Hz,

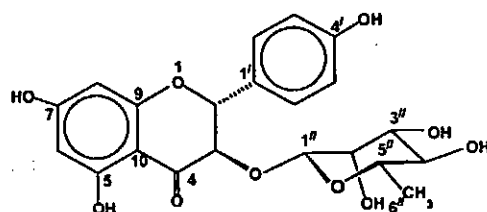
H-3'') 3.40 (1H, brs, H-2'') 3.15 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-4'') และพบสัญญาณ methyl proton 1 สัญญาณที่ δ 1.08 (3H, d, $J = 6.15$ Hz, H-6'') ดังตาราง 35 ภาพประกอบ 40

COSY spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-2 กับ H-3 ; H-3',5' กับ H-2', 6' ; H-3'' กับ H-2'' H-4'' ; H-4'' กับ H-5'' H-3'' ; H-5'' กับ H-4'' H-6'' และจาก HMBC spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-2 กับ C-1' C-2',6' C-3 C-4 ; H-3 กับ C-2 C-4 C-1' C-1'' ; H-6 กับ C-5 C-7 C-10 ; H-8 กับ C-7 C-9 C-10 ; H-3',5' กับ C-2',6' C-4' ; H-2',6' กับ C-2 C-3',5' C-4' ; H-1'' กับ C-3 C-2'' ; H-2'' กับ C-1'' C-3'' ; H-3'' กับ C-4'' ; H-4'' กับ C-3'' C-5'' C-6'' ; H-5'' กับ C-3 และ H-6'' กับ C-5'' ดังตาราง 36 และภาพประกอบ 43

^{13}C NMR และ DEPT Spectra ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 75 MHz) δ (ppm) พบสัญญาณทั้งหมด 21 สัญญาณ เป็นของ methyl carbon 1 สัญญาณที่ δ 16.98 (C-6'') methine carbon 13 สัญญาณที่ δ 82.24 (C-2) 76.90 (C-3) 96.55 (C-6) 95.49 (C-8) 128.48 (C-2',6') 115.42 (C-3',5') 100.22 (C-1'') 70.74 (C-2'') 69.83 (C-3'') 72.39 (C-4'') 68.84 (C-5'') และ quaternary carbons 7 สัญญาณที่ 194.25 (C-4) 163.64 (C-5) 166.81 (C-7) 162.38 (C-9) 101.25 (C-10) 126.87 (C-1') 157.66 (C-4') ดังตาราง 37 และภาพประกอบ 41 42

HRFAB⁻ แสดง $[\text{M-H}]^+$ ที่ m/z 433.10721 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ คำนวณสำหรับ $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}\text{-H}^+$ 433.10726

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ B กับ engeletin (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8, Trousdale & Singleton. 1983 : 619-620) สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ dihydrokaempferol 3- α -L-rhamnopyranoside หรือ engeletin



ภาพประกอบ 29 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ B

ตาราง 35 ข้อมูล ^1H NMR ของ engeletin และ สารประกอบ B

ตำแหน่ง	engeletin		สารประกอบ B ^c
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{H} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm)
2	5.28 (1H, d, J 10.3 Hz)	5.28 (1H, d, J 10.5 Hz)	4.96 (1H, d, J 11.21 Hz)
3	4.73 (1H, d, J 10.3 Hz)	4.76 (1H, d, J 10.6 Hz)	4.41 (1H, d, J 11.21 Hz)
6	5.87 (1H, d, J 1.9 Hz)	5.90 (1H, s)	5.82 (1H, d, J 1.69 Hz)
8	5.90 (1H, d, J 1.9 Hz)	5.91 (1H, s)	5.86 (1H, d, J 1.69 Hz)
3',5'	6.76 (2H, d, J 8.5 Hz)	6.78 (2H, d, J 8.4 Hz)	6.74 (2H, d, J 8.42 Hz)
2',6'	7.33 (2H, d, J 8.5 Hz)	7.33 (2H, d, J 8.5 Hz)	7.2 (2H, d, J 8.42 Hz)
1''	3.98 (1H, s)	3.95 (1H, s)	3.74 (1H, s)
2''			3.40 (1H, brs)
3''			3.56 (1H, dd, J 9.5, 3.15 z)
4''			3.15 (1H, t, J 9.58 Hz)
5''			4.1 (1H, m)
6''	1.05 (3H, d, J 6.2 Hz)	1.05 (3H, d, J 6.1 Hz)	1.08 (3H, d, J 6.15 Hz)

^a บันทึกใน DMSO- d_6 , 300 MHz (Lu & Yeap Foo, 1999 : 1-8)

^b บันทึกใน DMSO- d_6 , 300 MHz (Trousdale & Singleton, 1983 : 619-620)

^c บันทึกใน CDCl_3 - CD_3OD , 300 MHz

ตาราง 36 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	สารประกอบ B			
	^1H NMR (δ , ppm)	COSY	HMQC	HMBC
2	4.96 (1H, d, J 11.21 Hz)	H-3	C-2	C-1' C-2',6' C-3 C-4
3	4.41 (1H, d, J 11.21 Hz)		C-3	C-2 C-4 C-1' C-1''
6	5.82 (1H, d, J 1.69 Hz)		C-6	C-5 C-7 C-10
8	5.86 (1H, d, J 1.69 Hz)		C-8	C-7 C-9 C-10
3',5'	6.74 (2H, d, J 8.42 Hz)	H-2',6'	C-3',5'	C-2',6' C-4'
2',6'	7.2 (2H, d, J 8.42 Hz)		C-2',6'	C-2 C-3',5' C-4'
1''	3.74 (1H, s)		C-1''	C-3 C-2''
2''	3.40 (1H, brs)		C-2''	C-1'' C-3''
3''	3.56 (1H, dd, J 9.5, 3.15 Hz)	H-2'' H-4''	C-3''	C-4''
4''	3.15 (1H, t, J 9.5)	H-5'' H-3''	C-4''	C-3'' C-5'' C-6''
5''	4.1 (1H, m)	H-4'' H-6''	C-5''	C-1''
6''	1.08 (1H, d, J 6.15 Hz)		C-6''	C-4''

ตาราง 37 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ engeletin และสารประกอบ B

ตำแหน่ง	engeletin		สารประกอบ B ^c		
	δ_c (ppm) ^a	δ_c (ppm) ^b	δ_c (ppm)	DEPT-90	DEPT-135
2	81.28	83.10	82.24	82.24	82.24
3	75.75	77.6	76.90	76.90	76.90
4	194.32	195.8	194.25		
5	163.21	165.1	163.64		
6	95.97	97.3	96.55	96.55	96.55
7	167.28	167.9	166.81		
8	94.97	96.1	95.49	95.49	95.49
9	161.99	163.6	162.38		
10	100.61	101.4	101.25		
1'	126.32	128.2	126.87		
2'	128.82	129.8	128.48	128.48	128.48
3'	114.96	116.3	115.42	115.42	115.42
4'	157.63	158.9	157.56		
5'	114.96	116.3	115.42	115.42	115.42
6'	128.82	129.8	128.48	128.48	128.48
1''	100.10	102.3	100.22	100.22	100.22
2''	70.20	71.3	70.74	70.74	70.74
3''	69.95	73.4	69.83	69.83	69.83
4''	71.42	69.9	72.39	72.39	72.39
5''	68.77	72.1	68.84	68.84	68.84
6''	17.52	-	16.98		16.98

^a บันทึกใน DMSO- d_6 , 75 MHz (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8)^b บันทึกใน acetone- d_6 , 75 MHz (Monache & Suarez. 1992 : 2481-2482)^c บันทึกใน CDCl_3 - CD_3OD , 75 MHz

สารประกอบ C เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 49.4 mg จุดหลอมเหลว 180-185 °C (จุดหลอมเหลวของ astilbin เท่ากับ 181-183 °C, Tschesche, et al. 1979 : 867-869) ให้สีส้มกับ anisaldehyde-sulfuric spray reagent ค่า $R_f = 0.25$ (CH_2Cl_2 : MeOH 90:10)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : 3404(O-H) 1652(C=O) ภาพประกอบ 45

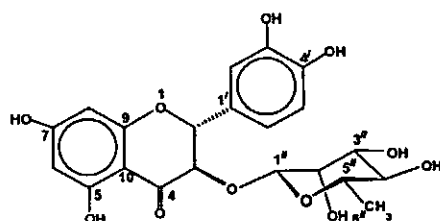
^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 300MHz) พบสัญญาณของหมู่ methine proton ที่ δ 5.20 (1H, d, $J = 9.72$ Hz, H-2) 4.61 (1H, d, $J = 9.72$ Hz, H-3) 5.85 (1H, brs, H-6) 5.87 (1H, brs, H-8) 6.86 (1H, s, H-2') 6.72 (2H, s, H-5',6') 4.01 (1H, s, H-1'') สัญญาณ methyl proton ที่ δ 1.00 (3H, d, $J = 6.05$ Hz, H-6'') สัญญาณที่ δ 11.8 (1H, s) เป็นของ 5-OH ซึ่งเป็นหมู่ chelated hydroxyl และสัญญาณที่ δ 3.10-4.00 (m) เป็น proton ของวงน้ำตาล ดังตาราง 38 และภาพประกอบ 46

COSY spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่างหมู่ methine proton H-2 กับหมู่ methine proton H-3 และจากความสัมพันธ์ HMBC spectrum พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-2 กับ C-3 C-4 C-9 C-1' C-2' C-6' ; H-3 กับ C-2 C-4 C-1' C-1'' ; H-6 กับ C-5 C-7 C-8 C-10 ; H-8 กับ C-6 C-7 C-9 ; H-2' กับ C-2 C-1' C-3' C-6' ; H-5',6' กับ C-2 C-1' C-2' C-4' ; H-1'' กับ C-3 C-2'' ; H-6'' กับ C-4'' C-5'' และ 5-OH กับ C-5, C-6, C-10 ดังตาราง 39 และภาพประกอบ 49

^{13}C NMR และ DEPT spectra (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm) พบสัญญาณทั้งหมด 21 สัญญาณ เป็นของ methyl carbon 1 สัญญาณที่ δ 18.10 (C-6'') methine carbon 12 สัญญาณ ที่ δ 81.90 (C-2) 76.09 (C-3) 96.57 (C-6) 95.59 (C-8) 115.05 (C-2') 115.76 (C-5') 119.37 (C-6') 100.42 (C-1'') 70.79 (C-2'') 70.50 (C-3'') 72.05 (C-4'') 69.43 (C-5'') และ quaternary carbons 8 สัญญาณที่ 194.7 (C-4) 163.82 (C-5) 167.72 (C-7) 162.54 (C-9) 101.31 (C-10) 127.34 (C-1') 145.55 (C-3') 146.28 (C-4') ดังตาราง 40 และ ภาพประกอบ 47 และ 48

HRFAB⁺ แสดง $[\text{M}-\text{H}]^+$ ที่ m/z 449.10786 ซึ่งตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ คำนวณ สำหรับ $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}-\text{H}^+$ 449.10840

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ C กับ astilbin (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8, Trousdale & Singleton. 1983 : 619-620) สรุปได้ว่าสารประกอบ C คือ dihydroquercetin 3- α -L-rhamnopyranoside หรือ astilbin



ภาพประกอบ 30 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ C

ตาราง 38 ข้อมูล ^1H NMR ของ astilbin และ สารประกอบ C

ตำแหน่ง	astilbin		สารประกอบ C ^c
	δ_{H} (ppm) ^a	δ_{H} (ppm) ^b	δ_{H} (ppm)
2	5.23 (1H, d, J 9.8 Hz)	5.23 (1 H, d, J 9.9 Hz)	5.20 (1H, d, J 9.81 Hz)
3	4.63 (1H, d, J 9.8 Hz)	4.65 (1H, d, J 9.9 Hz)	4.61 (1H, d, J 9.62 Hz)
6	5.87 (1H, d, J 2.0 Hz)	5.88 (1H, s)	5.85 (1H, brs)
8	5.89 (1H, d, J 2.0 Hz)	5.90 (1H, s)	5.87 (1H, brs)
2'	6.88 (1H, s)	6.88 (1H, s)	6.86 (1H, s)
5',6'	6.74 (2H, s)	6.73 (2H, s)	6.72 (2H, s)
1''	4.04 (1H, s)	4.02 (1H, s)	4.01 (1H, s)
2''-5''	3.09-3.91(4H, m)		3.10-4.00 (4H, m)
6''	1.04 (3H, d, J 5.9 Hz)	1.05 (3H, d, J 6.2 Hz)	1.00 (3H, d, J 6.05 Hz)
5-OH	11.8 (1H, s)	11.81 (1H, s)	11.81 (1H, s)

^a บันทึกใน DMSO-d₆ , 300 MHz (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8)^b บันทึกใน DMSO-d₆ , 300 MHz (Trousdale & Singleton. 1983 : 619-620)^c บันทึกใน DMSO-d₆ , 300 MHzตาราง 39 ข้อมูล ^1H NMR COSY HMQC HMBC ของสารประกอบ C

ตำแหน่ง	สารประกอบ C			
	^1H NMR (δ , ppm)	COSY	HMQC	HMBC
2	5.20 (1H, d, J 9.81 Hz)	H-3	C-2	C-3 C-4 C-9 C-1' C-2' C-6'
3	4.61 (1H, d, J 9.62 Hz)	H-2	C-3	C-2 C-4 C-1' C-1''
6	5.85 (1H, brs)		C-6	C-5 C-7 C-8 C-10
8	5.87 (1H, brs)		C-8	C-6 C-7 C-9
2'	6.86 (1H, s)		C-2'	C-2 C-1' C-3' C-6'
5',6'	6.72 (2H, s)		C-5'6'	C-2 C-1' C-2' C-4'
1''	4.01 (1H, s)		C-1''	C-3 C-2''
C-2'' C-3'' C-4'' C-5''	3.10-4.00 (4H, m)		C-2'' C-3'' C-4'' C-5''	
6''	1.00 (3H, d, J 6.05 Hz)		C-6''	C-4'' C-5''
5-OH	11.81 (1H, s)			C-5 C-6 C-10

ตาราง 40 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ astilbin และสารประกอบ C

ตำแหน่ง	astilbin		สารประกอบ C		
	δ_{C} (ppm) ^a	δ_{C} (ppm) ^b	δ_{C} (ppm)	DEPT-90	DEPT-135
2	81.84	82.8	81.90	81.90	81.90
3	75.62	77.6	76.09	76.09	76.09
4	194.3	195.2	194.7		
5	163.41	164.3	163.82		
6	96.06	97.2	96.57	96.57	96.57
7	167.23	167.8	167.72		
8	95.11	96.1	95.59	95.59	95.59
9	162.14	163.2	162.54		
10	100.68	101.9	101.31		
1'	126.97	128.4	127.34		
2'	114.72	116.4	115.05	115.05	115.05
3'	145.10	145.6	145.55		
4'	145.90	146.4	146.28		
5'	115.31	115.4	115.76	115.76	115.76
6'	118.88	120.2	119.37	119.37	119.37
1''	100.02	101.2	100.42	100.42	100.42
2''	70.39	70.8	70.79	70.79	70.79
3''	70.10	71.4	70.50	70.50	70.50
4''	71.62	72.8	72.05	72.05	72.05
5''	68.95	70.0	69.43	69.43	69.43
6''	17.73	17.7	18.10		18.10

^a บันทึกใน DMSO- d_6 , 75 MHz (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8)

^b บันทึกใน acetone- d_6 , 75 MHz (Kasal, et al. 1988 : 4167-4170)

^c บันทึกใน DMSO- d_6 , 75 MHz

สารประกอบ D เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 10 mg จุดหลอมเหลว 298-300 °C ให้สีม่วง กับ anisaldehyde – sulfuric spray reagent ค่า Rf = 0.35 (CH₂Cl₂ : MeOH 90:10)

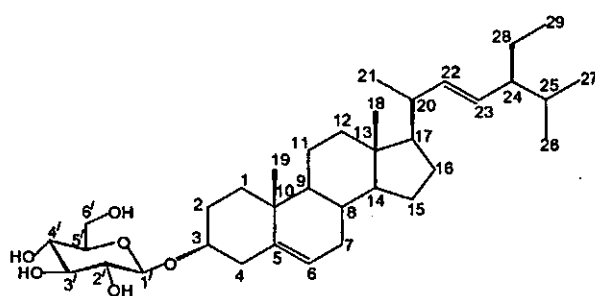
FT IR (cm⁻¹) (KBr) : 3422 (O-H) 2933 (CH) 1367 (CH₃) 1022 (C-O)

ภาพประกอบ 52

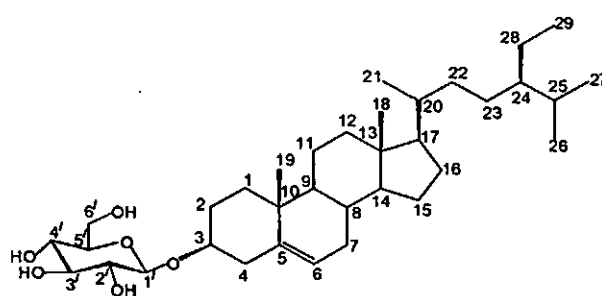
¹H NMR spectrum (pyridine-d₅, 300MHz) พบสัญญาณของหมู่ CH₃ ที่ δ 0.43 สัญญาณของหมู่ CH CH₂ CH₃ ของ steroid ปรากฏที่ δ 0.60-2.60 สัญญาณของ glucocidic protons ที่ δ 3.08-4.43 ภาพประกอบ 53

¹³C NMR และ DEPT Spectra (pyridine-d₅, 75 MHz) δ (ppm) พบสัญญาณทั้งหมด 37 สัญญาณ เป็นของ methyl carbon 6 สัญญาณ methylene carbon 12 สัญญาณ methine carbon 16 สัญญาณ และ quaternary carbon 3 สัญญาณ ดังตาราง 40 และภาพประกอบ 54 55

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ D กับ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1994 : 31-39) และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside (Jarikasem. 2000) สรุปได้ว่าสารประกอบ D คือ สารผสมของ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside



stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside



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

ภาพประกอบ 31 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ D

ตาราง 41 ข้อมูล ^{13}C NMR ของ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside
และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside กับ สารประกอบ D

ตำแหน่ง	β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside	stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside	สารประกอบ D ^c		
	δ_c (ppm) ^a	δ_c (ppm) ^b	δ_c (ppm)	DEPT-90	DEPT-135
1'	102.59	102.60	102.43	102.43	102.43
2'	75.27	75.33	75.21	75.21	75.21
3'	78.55	78.60	78.47	78.47	78.47
4'	71.76	71.76	71.56	71.56	71.56
5'	78.34	78.40	78.35	78.35	78.35
6'	62.88	62.89	62.69		62.69
1	37.49	37.53	37.35		37.35
2	30.24	30.29	30.12		30.12
3	78.17	78.60	78.00	78.00	78.00
4	39.34	39.40	39.20		39.20
5	140.95	140.96	140.79		
6	121.84	121.92	121.80	121.80	121.80
7	32.16	32.20	32.04		32.04
8	32.07	32.11	31.92	31.92	31.92
9	50.38	50.42	50.21	50.21	50.21
10	36.92	36.97	36.79		
11	21.28	21.30	21.15		21.15
12	28.49	40.01	28.41		21.15
13	42.49	42.53	42.35		
14	56.85	56.89	56.70	56.70	56.70
15	24.48	24.55	24.38		24.38
16	39.97	29.33	39.82		39.82
17	56.29	56.13	56.11	56.11	56.11
18	11.95	12.19	12.40		12.40
19	18.99	19.21	18.88		18.88
20	36.36	40.78	36.26	36.26	36.26
21	19.92	21.50	19.85		19.85
22*	23.43		23.26		23.26
22**		138.83	138.70	138.70	138.70
23*	34.24		34.07		34.07
23**		129.52	129.33	129.33	129.33
24	46.09	51.46	45.90	45.90	45.90
25	29.54	32.11	29.33	29.33	29.33

ตาราง 41 (ต่อ)

ตำแหน่ง	β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside	stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside	สารประกอบ D		
	δ_c (ppm) ^a	δ_c (ppm) ^b	δ_c (ppm)	DEPT-90	DEPT-135
26	19.22	21.50	19.08		19.08
27	19.38	20.00	19.29		19.29
28	26.50	25.71	26.24		26.24
29	12.14	12.53	12.39		12.39

^a บันทึกใน pyridine-d₅, 100 MHz (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1994 : 31-39)

^b บันทึกใน pyridine-d₅, 100 MHz (Jarikasem. 2000)

^c บันทึกใน pyridine-d₅, 75 MHz

* กรณีที่พันธะระหว่าง C กับ C ที่ตำแหน่งที่ 22 และ 23 เป็น -CH₂-CH₂-

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

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 ของสารสกัดที่แยกได้จากเหง้าข้าวเย็นเหนือ โดยนำมาสกัดด้วย hexane ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 พบว่าสารสกัด ethyl acetate มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่าสารสกัด hexane และ methanol จึงนำสารสกัด ethyl acetate มาแยก และทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับชะด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม แยกได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ resveratrol engletin และ estilbin และสารผสม 1 ชนิดที่ประกอบด้วย สารบริสุทธิ์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน คือ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 อีก 7 กลุ่มได้แก่ E5.3 E5.5 E6.3.3 E6.3.5 E6.3.4.1 E6.3.4.2 และ E6.3.4.4 เมื่อนำมาหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีค่า ED₅₀ เท่ากับ 13.8 14.1 15.8 15.9 15.8 19 และ 16 μ g/mL ตามลำดับ เมื่อนำกลุ่มสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่ากลุ่มอื่น มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 มากกว่ากลุ่มอื่น คือ resveratrol และกลุ่มสาร E6.3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 9.4 กับ 25.4 μ g/mL ตามลำดับ

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่า สารประกอบ A คือ resveratrol แยกได้จากสารกลุ่ม E5.4.2 หนัก 19.30 mg มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 3.5 และ 9.4 μ g/mL ตามลำดับ เป็นสารประกอบ polyphenol เคยพบในพืชสกุลอื่นหลายชนิด เช่น จากฝักร่อนถั่วลิสง *Arachis hypogaea* L. (phytochemical unit, et al. 1976 : 1791-1793) รากของ *Scirpus fluviatilis* (Torr.) (Nakajima, Taguchi & Endo. 1978 : 3050-3057) ใบของ *Juniperus macropoda* (Sethi, et al. 1980 : 1831-1832) ลำต้นของ *Phoenix dactylifera* (Fernández, Pedro & Seoane. 1983 : 2819-2821) และพบว่า resveratrol มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ยับยั้งการจำลองแบบของ DNA ที่ทำให้เกิดเซลล์ที่ใหญ่ขึ้น (Evers, et al. 2004 : 85-95) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ B16 melanoma cell. (Asensi, et al. 2002 : 387-398) เป็นสาร antioxidant สามารถป้องกันมะเร็งระยะเริ่มต้น ต่อด้านการเปลี่ยนแปลงลักษณะของยีน ยับยั้งการพัฒนาของเนื้อเยื่อในต่อมเต้านมให้กลายเป็นเนื้องอก (Pezzuto, et al. 1997 : 218-221)

สารประกอบ B คือ engeletin แยกได้จากสารกลุ่ม E7.1 หนัก 13.2 mg มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ มีค่า $ED_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ เป็นสารประกอบ flavanone ซึ่งเคยพบในพืชสกุลอื่นหลายชนิดเช่น ใบของ *Eucalyptus sideroxylon*. (Hillis & Isoi. 1965 : 541-550) ยางของ *Eucalyptus astringens*, *Eucalyptus lehmannii* และ *Eucalyptus platypus*. (Hillis & Yazaki. 1974 : 495-498) ใบเปลือกของ *Eucryphia cordifolia* (Tschesche, et al. 1979 : 867-869) ผลและเมล็ดขององุ่น (Trousdale & Singleton. 1983 : 619 - 620) เปลือกลำต้นของ *Flindersia Australis*. (Reisch, Hussain & Master. 1984 : 2114-2115) ใบของ *Petiveria alliacea*. (Monache & Suarez. 1992 : 2481-2482) กากองุ่นที่คั้นน้ำแล้ว (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8) จากเหง้าของ *Smilax glabra* Roxb. และพบว่า engeletin เป็นสารป้องกันภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ถูกทำลาย (Chen, et al. 1999 : 56-59)

สารประกอบ C คือ astilbin แยกได้จากสารกลุ่ม E7.2 หนัก 49.4 mg มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ มีค่า ED_{50} เท่ากับ $75 \mu\text{g/mL}$ เป็นสารประกอบ flavanone ซึ่งเคยพบในพืชสกุลอื่นหลายชนิดเช่น ใบเปลือกของ *Eucryphia cordifolia* (Tschesche, et al. 1979 : 867-869) ผลและเมล็ดขององุ่น (Trousdale & Singleton. 1983 : 619 - 620) ใบของ *Engelhardtia chrysolepis* (Kasai, et al. 1988 : 4167-4170) ใบของ *Petiveria alliacea*. (Monache & Suarez. 1992 : 2481-2482) ลำต้นของ *Sphaerostephanos arbuscula* (Britto, et al. 1995 : 338-339) ใบเปลือกของ *Drimys winteri* (Filho, et al. 1998 : 223-227) กากองุ่นที่คั้นน้ำแล้ว (Lu & Yeap Foo. 1999 : 1-8) และพบว่า astilbin เป็นสาร antioxidant (Ohmori, Ohruai & Suzuki. 2000 : 5537-5541) ลดการอักเสบของบาดแผลที่ตัวอย่างมีนัยสำคัญ (Xu, et al. 1999 : 93-100) เป็นสารป้องกันภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ถูกทำลาย (Chen, et al. 1999 : 56-59) และ astilbin ยังสามารถฆ่าแมลงและยับยั้งการเจริญเติบโตในระยะตัวอ่อนและดักแด้ของ *Anticarsia gemmatilis*. และ *Spodoptera frugiperda*. (Pereira, et al. 2002 : 503-507) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัด EtOAc ซึ่งมี astilbin เป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Nia, et al. 1999 : 58-60)

สารประกอบ D คือ สารผสมที่ประกอบด้วย stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside แยกได้จากสารกลุ่ม E7.3 หนัก 10 mg มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ต่ำ มีค่า $ED_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งเคยพบในพืชสกุลอื่น เช่น หน้าลิ้นงู *Hedyotis corymbosa* Lamk. (จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. 2544.) เหง้าพุทธรักษา *Canna indica* Linn. (กัญญาณัฐ กนกแก้ว. 2547.) *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy (Jiratchariyakul, Okabe & Frahm. 1994 : 31-39) *Bridelia tomentosa* BL. (Boonyaratavej & Petsom. 1991 : 61-69) จากรากของ *Cryptolepis obtuse* (Paulo, et al. 2000 : 417-422) เปลือกลำต้นของ *Allanblackia floribunda* (Nkengfack, et al. 2002 : 381-384)

จากผลการศึกษาวิจัยข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยารักษาโรคมะเร็งของแพทย์แผนโบราณที่นำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเป็นเวลานานและเป็นที่ยอมรับของผู้ป่วยโรคมะเร็งจำนวนมาก พบสารประกอบที่น่าสนใจ คือ resveratrol และ astilbin มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเกิดมะเร็ง และยังต้านการอักเสบ ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 พบว่า resveratrol มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งค่อนข้างสูง และจากการศึกษาฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาของสารประกอบ resveratrol จากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายด้าน โดยเฉพาะในด้านการต้านมะเร็งและเนื้องอก จากผลการทดลองและข้อมูลของงานวิจัยต่าง ๆ นี้ จึงอาจเป็นข้อมูลที่ใช้อธิบายได้ว่า resveratrol น่าจะเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในตำรับยาแผนโบราณนอกเหนือจากสารชนิดอื่น ๆ ในตำรับที่มีผู้วิจัยเคยศึกษามาแล้ว

ข้อเสนอแนะ

1. resveratrol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 และ MCF-7 สูง จึงควรนำไปศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเพิ่มเติม เช่น ทดสอบกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น และ/หรือทดสอบคุณสมบัติต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง
2. สารบริสุทธิ์และ/หรือกลุ่มสารที่แยกได้ ควรนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่น เช่น การต้านไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา
3. กลุ่มสารที่มีความเป็นพิษสูงแต่มีปริมาณน้อยมากควรนำมาศึกษาและแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค HPLC

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กมลวรรณ อนันต์. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ สารสกัดเอทิลเอซิเตตและเมทานอลจากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis corymb Lamk.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- กัญญาณัฐ กกแก้ว. (2547). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ สารสกัด chloroform และ methanol จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica Linn.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- จันทร์ทิพย์ แซ่ตัน. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ จากหญ้าลิ้นงู (*Hedyotis Corymbosa Lamk.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- เต็ม สมิตินันท์. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ประชาชน.
- ทวัฒน์ ชูชนะกิจ. (2547).การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้น หลอดเถียน (*Mallotus oblongifolius Muell. Arg.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- นันทรัตน์ รุ่งสกุล. (2547). การศึกษาความเป็นพิษของสารที่แยกได้จากหญ้าสามกา (*Hygrophila incana Nees.*). ต่อเซลล์มะเร็งลิ่วเคีเมีย (P388) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- นันทวัน บุณยะประภัศร, และ อรุณ โชคชัยเจริญพร. (2539). สมุนไพรไม้พื้นบ้าน(1). กรุงเทพฯ: ประชาชน.
- วนิดา จันทรเทพเทวัญ. (2533). การตรวจพิสูจน์และการทำข้อกำหนดของข้าวเย็นเหนือ ข้าวเย็นใต้. วิทยานิพนธ์ (เภสัชพฤกษศาสตร์). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- วินัย สุรราช. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากเหง้า พุทธรักษา (*Canna indica Linn.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.
- อนันต์ คงชุม. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารประกอบที่แยกได้จากลำต้น หลอดเถียน (*Mallotus oblongifolius Muell. Arg.*). วิทยานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

- Asensi, M., et al. (2002). "Inhibition of Cancer Growth by Resveratrol is Related to its Low Bioavailability," *Free Radical Biology and Medicine*. 33 : 387-389.
- Babu, B.H., Shylesh, B.S. & Padikkala, J. (2002). "Tumour Reducing and Anticarcinogenic Activity of *Acanthus ilicifolius* in Mice," *J. of Ethnopharm.* 79 : 27-33.
- Bernardo, R.R., Pinto, A.V. & Parente, J.P. (1996). "Steroidal Saponins from *Smilax Officinalis*," *Phytochemistry*. 43: 465-469.
- Britto, J.D., et al. (1995). "Determination of Aglycone Chirality in Dihydroflavonol 3-O- α -L-Rhamnosides by ^1H NMR Spectroscopy," *Chem.Pharm.Bull.* 43(2) : 338-339.
- Chen, T., et al. (1999). "A New Flavanone Isolated from *Rhizoma Smilacis Glabrae* and the Structural Requirements of Its Derivatives for Preventing Immunological Hepatocyte Damage," *Planta Med.* 65 : 56-59.
- Chen, T., Li, J-X & Xu, Q. (2000). "Phenylpropanoid Glycosides from *Smilax glabra*," *Phytochemistry*. 53 : 1051-1055.
- Daulatabad, C.D., Bhat, G.G. & Jamkhandi, A.M. (1996). "A Keto Fatty Acid from *Smilax macrophylla* Seed Oil," *Phytochemistry*. 42 : 889-890.
- Dongsheng, C., Yongning, L. & Jie, W. (2000). "Study on Anti-Inflammatory Effect of *Smilax china* L," (microfilm). *Zhongguo Yiyuan Yaouxue Zazhi*. 20 : 544-545.
- Evers, A., et al. (2004). "3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication and Virus-induced Cellular Signaling," *Antiviral Research*. 63 : 85-95.
- Fernández, M.I., Pedro, J.R. & Seoane, E. (1983). "Two Polyhydroxystilbenes from Stems of *Phoenix dactylifera*," *Phytochemistry*. 22 : 2819 – 2821.
- Filho, V.C., et al. (1998). "Isolation and Identification of Active Compounds from *Drimys winteri* Barks," *J. Ethnopharm.* 62 : 223-227.
- Fukunaga, T., et al. (1997). "Hypoglycemic Effect of the Rhizomes of *Smilax glabra* in Normal and Diabetic Mice," *Biol. Pharm. Bull.* 20 : 44-46.
- Geran, R.I., et al. (1972). *Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems*. Maryland : National Cancer Institute National Institutes of Health.
- Guiso, M., Marra, C. & Farina, A. (2002). "A New Efficient Resveratrol Synthesis," *Tetrahedron Letters*. 43: 597-598.
- Hillis, W.E. & Isoi, K. (1965). "Variation in the Chemical Composition of *Eucalyptus sideroxylon*," *Phytochemistry*. 4 : 541-550.

- Hillis, W.E. & Yazaki, Y-I. (1974). "Kinos of *Eucalyptus* Species and Their Acid Degradation Products," *Phytochemistry*. 13 : 495-498.
- Ho, C-K, Huang, Y-L & Chen, C.-C. (2002). "Garcinone E, a Xanthone Derivative, has Potent Cytotoxic Effect Against Hepatocellular Carcinoma Cell Lines," *Planta Med.* 68 : 975-979.
- Ito, H., et al. (2000). "Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and Their Cytotoxicity Against Human Oral Tumor Cell Lines," *Chem. Pharm. Bull.* 48 : 687-693.
- Jarikasem, S. (2000). *A Phytochemical Study of Anti-Herpes Simplex Components from Gynura Procumbens Merr.* Dissertation, Ph.D. (Pharmaceutical Chemistry and Phytochemistry). Bangkok : Graduate school Mahidol University. Photocopied.
- Jiratchariyakul, W., Okabe, H. & Frahm, AW. (1996). "A Steroidal Glucoside from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy," *Thai J. Phytopharm.* 3(1) : 31-39.
- Jong-Ho, S., et al. (1998). "Antimicrobial Activity and Composition of Extract from *Smilax china* Root," (microfilm). *Han'guk Sikip'um Yongyang kwahak Hoechi.* 27 : 574-584.
- Ju, Y. & Jia, Z-J (1992). "Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Smilax Menispermioidea*," *Phytochemistry*. 31 : 1349-1351.
- .(1993). "Minor Steroidal Glycosides from the Roots of *Smilax lebrunii*," *Phytochemistry*. 33 : 1193-1195.
- Kasai, R., et al. (1988). " Sweet Dihydroflavonol Rhamnoside from Leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese Folk Medicine, Hung-qi," *Chem. Pharm. Bull.* 36(10) : 4167-4170.
- Kim, J.Y., et al. (2002). "Inhibitory Effect of Tumor Cell Proliferation and Induction of G₂/M Cell Cycle Arrest by Panaxytriol," *Planta Med.* 68 : 119-122.
- Kubo, S., et al. (1992). "Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Smilax sieboldii*," *Phytochemistry*. 31 : 2445-2450.
- Lee, K.H., et al. (2000). "Anti-leukaemic and Anti-mutagenic Effects of Di(2-ethylhexyl)phthalate Isolated from *Aloe vera* Linne," *J. Pharm. Pharmacol.* 52 : 593-598.
- Li, S.Y., et al. (2002). "New Phenolic Constituents from *Smilax bracteata*," *J. Nat. Prod.* 65 : 262-266.
- Lu, Y. & Yeap Foo L. (1999). "The Polyphenol Constituents of Grape Pomace," *Food Chemistry*. 65 : 1-8.

- Monache, F.D. & Suarez, L.E.C. (1992) " 6-C-Formyl And 6-C-hydroxymethyl Flavanones from *Petiveria alliancea*," *Phytochemistry* 31(7) : 2481-2482.
- Nakajima, K., Taguchi, H. & Endo, T. (1978) "The Constituents of *Scirpus fluviatilis* (Torr.) A.Gray.I. The Structures of Two New Hydroxystilbene Dimers, Scirpusin A and B," *Chem. Pharm. Bull.* 26(10) : 3050-3057.
- Nia, R., et al. (1999). "Antibacterial Constituents of *Calliandra haematocephala*," *Nig. J. Nat prod. And Med.* 3 : 58-60.
- Nkengfack, A.E., et al. (2002). "A Prenylated Xanthone from *Allanblackia Floribunda*," *Phytochemistry*. 60 : 381-384.
- Ohmori, K., ohroi, H. & Suzuki K. (2000). "First Synthesis of Astilbin Biologically Active Glycosyl Flavonoid isolated from Chinese Folk Medicine," *Tetrahedron Letters*. 41 : 5537-5541.
- Oyama, V.I. & Eagle, H. (1956). "Measure of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin-Ciocalteu)," *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 91 : 305-307.
- Paulo, A., et al. (2000) " Steroidal Alkaloids from *Cryptolepis obtusa*," *Phytochemistry*. 53 : 417-422.
- Pavia, D.L., et al. (1995). *Organic Laboratory Techniques*. 2nd ed Philadelphia : Saunder College Publishing. 732.
- Pereira, L.G.b., (2002)" Biological Activity of Astilbin form *Dimorphandra mollis*. Against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera Frugiper*a," *Pest Manage Science*.58 : 503-507.
- Pezzuto, J.M., et al. (1997). "Resveratrol in Grapes Fights Cancer," *Science*. 10 : 218-221.
- Phytochemical Unit., et al. (1976). "3,5,4'-trihydroxystilbene as a Phytoalexin from Groundnuts (*Arachis hypogaea*)," *Phytochemistry*. 15 : 1791-1793.
- Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of A well-known Thai remedy*. Thesis. M.Sc. (pharmacology). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.
- Rajeshkumar, N.V., et al. (2002). "Antitumour and Anticarcinogenic Activity of *Phyllanthus amarus* Extract," *J. Ethnopharm.* 80 : 17-22.
- Reisch, J., Hussain, R.A., Mester, I.(1984). "Flavonoids from *Flindersia australis*," *Phytochemistry*. 23 : 2114 – 2115.
- Saleem, A., et al. (2002). "Inhibition of Cancer Cell Growth by Crude Extract and the Phenolics of *Terminalia chebula* retz. Fruit," *J. Ethnopharm.* 81 : 327-336.

- Sashida, Y., et al. (1992). "Steroidal Saponins from *Smilax riparia* and *Smilax china*," *Phytochemistry*. 31 : 2439-2443.
- Sethi, M.L., et al. (1980). "Isoflavones and Stilbenes from *Juniperus macropoda*," *Phytochemistry*. 19 : 1831-1832.
- Trousdale, E.K. & Singleton, V.L. (1983). "Astilbin and Engeletin in Grapes and Wine," *Phytochemistry*. 22 : 619 – 620.
- Tschesche, R., et al. (1979). "Eucryphin, A New Chromone Rhamnoside from the Bark of *Eucryphia cordifolia*," *Phytochemistry*. 18 : 867-869.
- Yijun, Y., et al. (1998). "Studies on Chemical Constituents of *Smilax glabra* Roxb.," (microfilm). *Yaoxue Xuebao*. 33 : 873-875.
- Xu, Q., et al. (1999). "Astilbin Selectively Induces Dysfunction of Liver-infiltrating Cells-novel Protection from Liver Damage," *European Journal of Pharmacology*. 377 : 93-100.

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับเซลล์มะเร็ง P388

1. RPMI 1640 medium

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

ละลาย RPMI medium 1640 power ในน้ำกลั่น โดยคนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม Sodium bicarbonate และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.20-7.40 ด้วยสารละลาย 1M NaOH หรือ 1M HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น เติม Sodium penicillin G และ Streptomycin เพื่อให้ปราศจากเชื้อ นำไปกรองด้วย Millipore filter นำไปทดสอบ sterility เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น และก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้เสร็จแล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น

2. Trypan blue dye

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

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

การเตรียมสารเคมีสำหรับเซลล์มะเร็ง MCF-7

1. Eagle ' s Minimum Essential Medium (EMEM)

EMEM Biowhittaker (power)	19.02 g
Sterile water for injection	2.00 L
HEPES	3.00 g
NaHCO ₃	2.00 g

ปรับ pH ด้วย 7.5 % NaHCO₃ ให้ได้ pH 7.0-7.2

เติม Sodium penicillin G	0.40 g
เติม Streptomycin	4.00 mL

ละลาย EMEM ในน้ำกลั่น โดยคนตลอดเวลาจนสารละลายใส เติม NaHCO_3 และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 7.20-7.40 ด้วยสารละลาย 1M NaOH หรือ 1M HCl ปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Sodium penicillin G และ Streptomycin เพื่อให้ปราศจากเชื้อ นำไปกรองด้วย Millipore filter นำไปทดสอบ sterility เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เก็บสารละลายที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น และก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้เสร็จแล้วนำมาเก็บไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ

1.1 การเตรียม Sodium penicillin G โดยใช้ Sodium penicillin G 5,000,000 units เติมน้ำกลั่น 10 mL จะได้ stock มีความเข้มข้น 500,000 units/mL ซึ่งปริมาตรของ Sodium penicillin G ที่ต้องใช้คือ 100,000 units/media 1 L

1.2 การเตรียม Streptomycin โดยใช้ Streptomycin base 1 g เติมน้ำกลั่น 5 mL จะได้ stock มีความเข้มข้น 0.2 g/mL ซึ่งปริมาณที่ต้องการคือ Streptomycin 0.1 g/media 1 L

2. Hank 's Balanced Salt Solution (HBSS)

	Per liter of 10X solution
Solution 1	
NaCl	80.00 g
KCl	4.00 g
CaCl_2	1.40 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.00 g
Solution 2	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.7557 g
KH_2PO_4	0.60 g
Glucose	10.00 g
Phenol red 1%	16.00 mL

ค่อย ๆ เทสารละลาย 2 ลงในสารละลาย 1 ให้มีปริมาตรรวมไม่เกิน 500 mL คนสารละลายด้วยแท่งคนแม่เหล็ก ปรับปริมาตรเป็น 1,000 mL ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วย Millipore filter จะได้สารละลาย HBSS ที่มีความเข้มข้นเป็น 10X ซึ่งตอนนำมาใช้ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1X ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปฟุ้งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ปรับ pH ให้ได้ 7.0-7.2 ด้วย 2.8 % NaHCO_3

3. Phosphate Buffer Saline Solution (PBS)

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

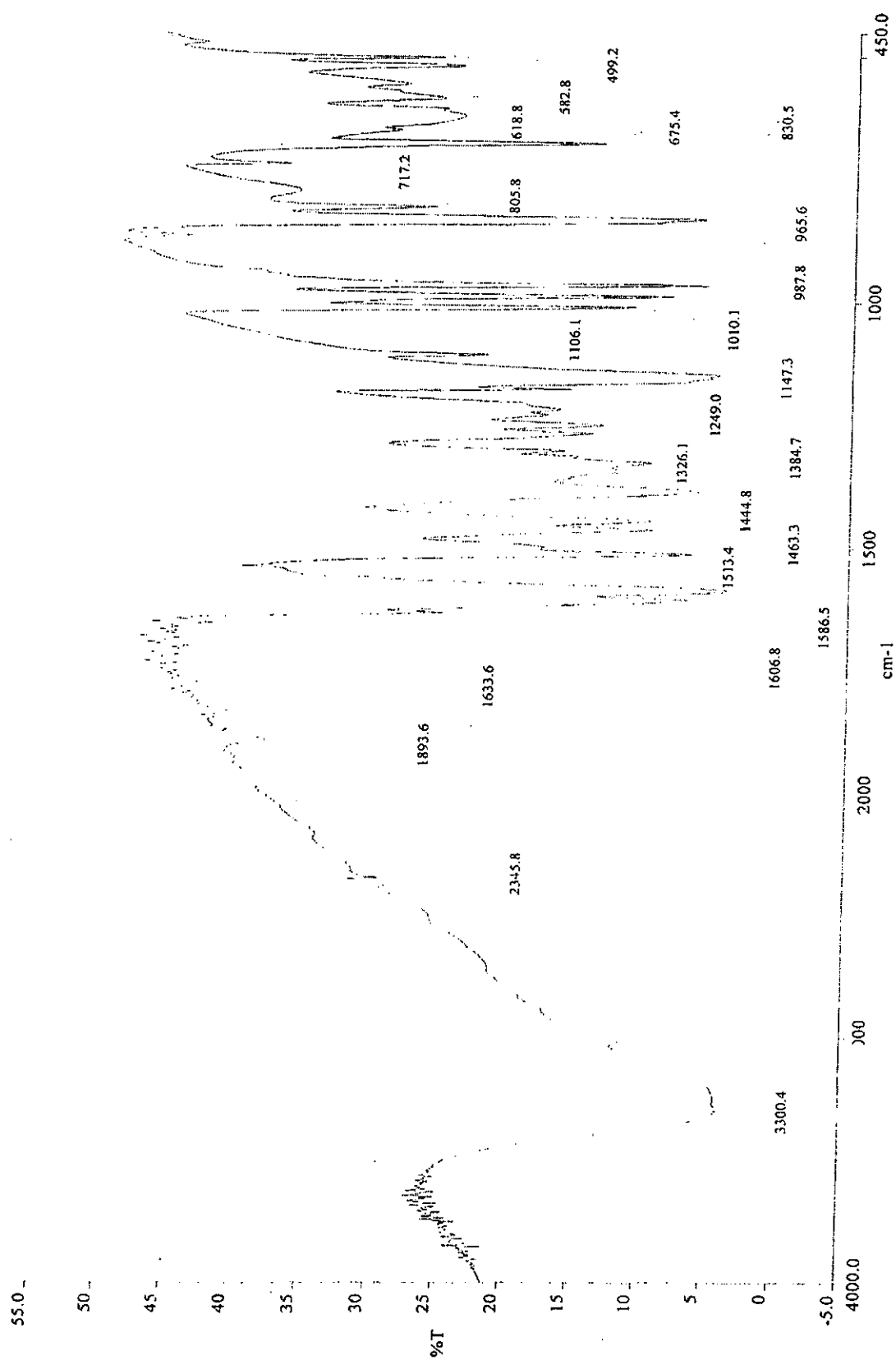
ละลายส่วนประกอบข้างบนในน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. 0.25 % Trypsin solution ใน HEPES buffer solution

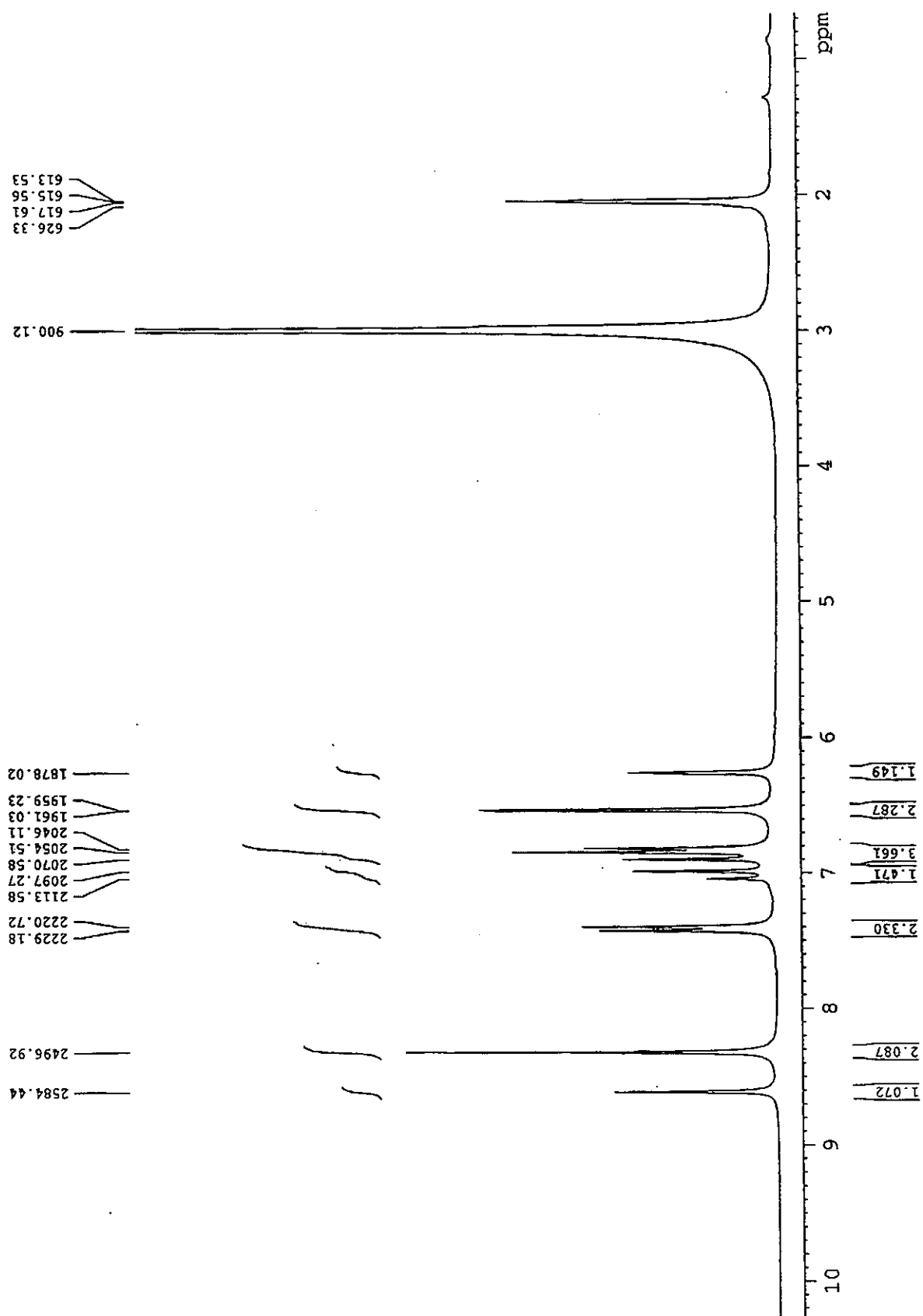
HEPES buffer solution ประกอบด้วย

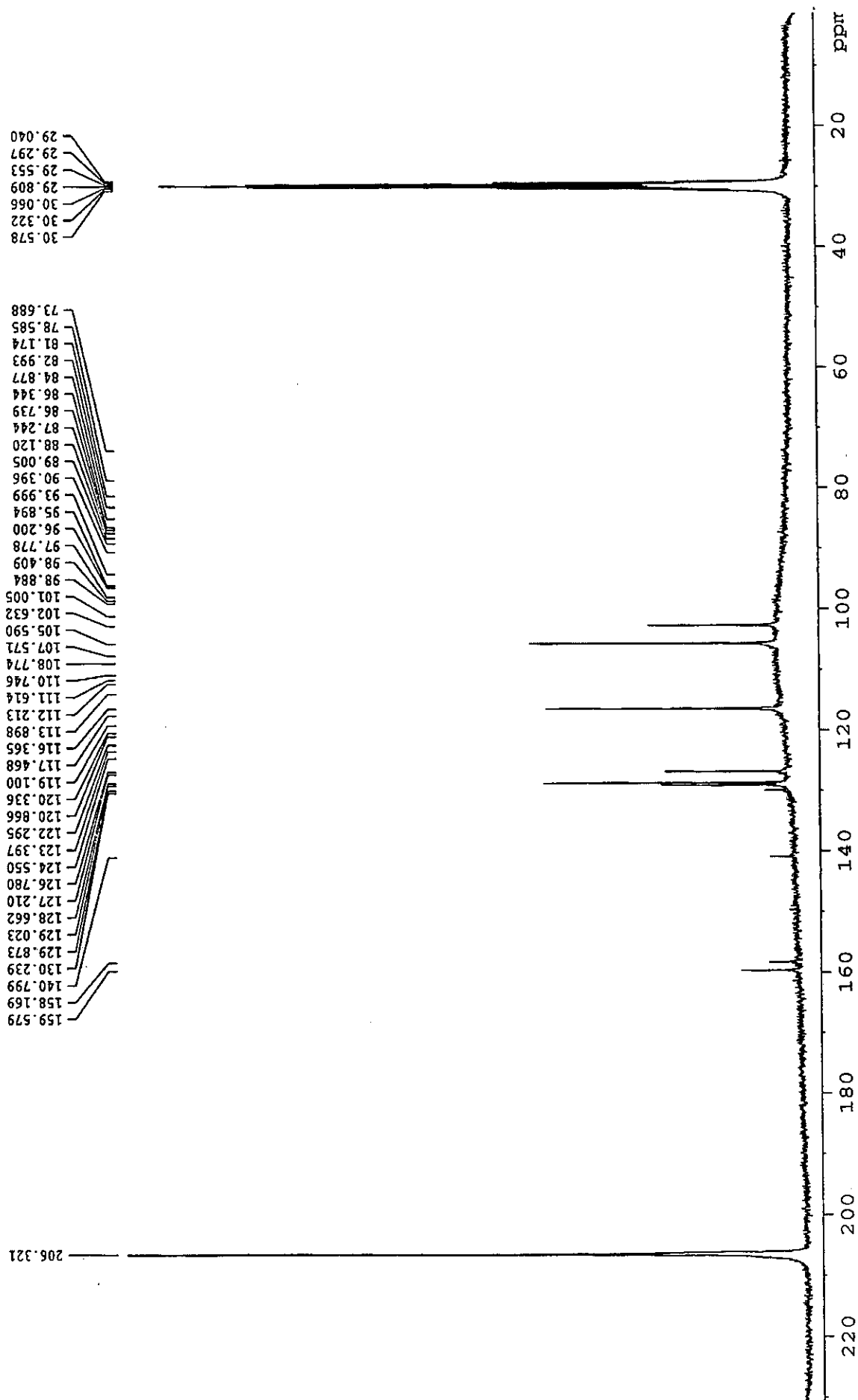
NaCl	8.00	g
KCl	0.40	g
Na ₂ PO ₄	0.10	g
Dextrose	1.00	g
HEPES	2.38	g
น้ำกลั่น	1,000	mL

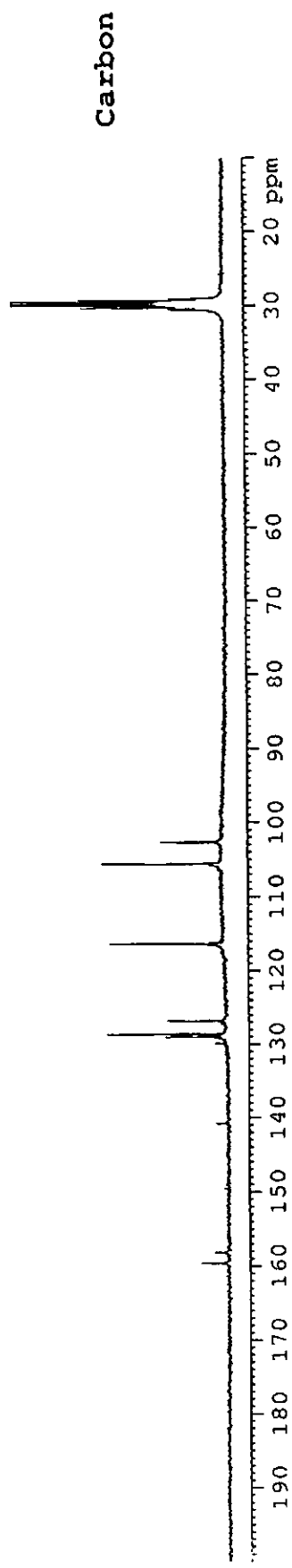
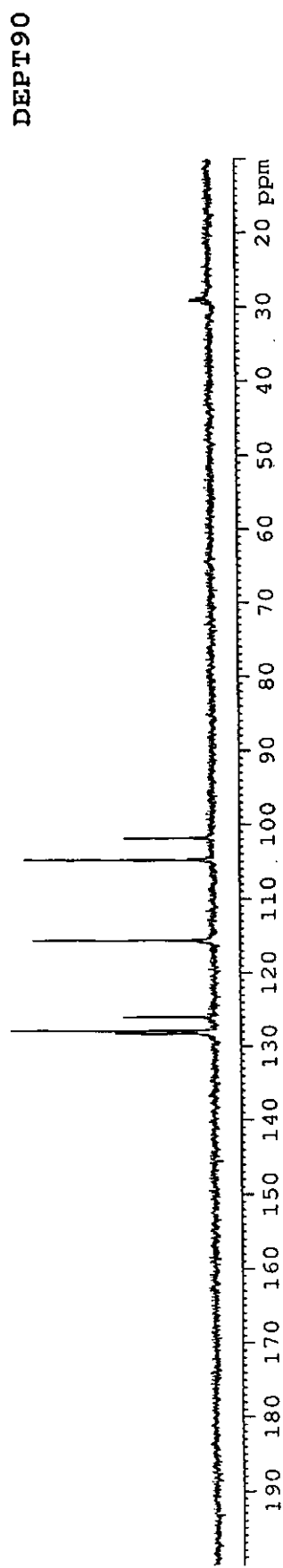
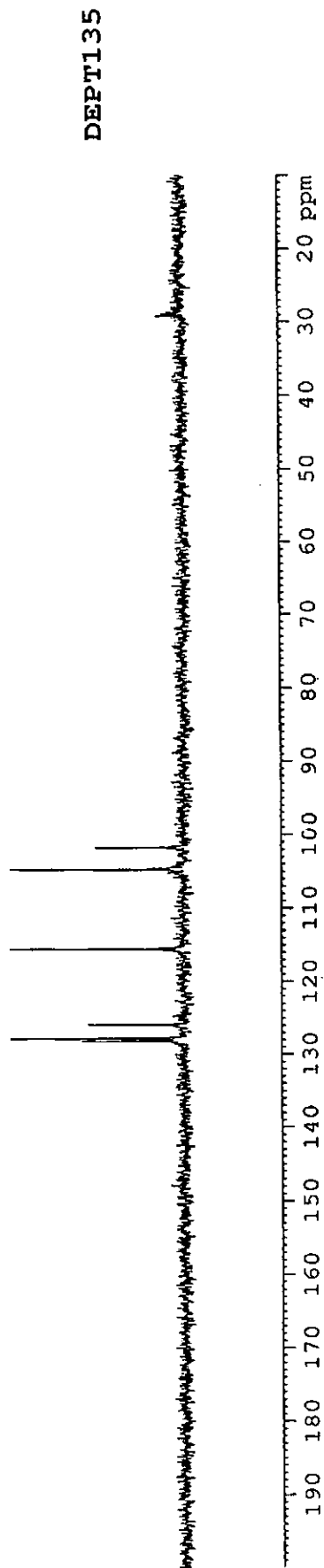
ละลาย Trypsin 2.5 g ใน HEPES buffer solution 1,000 mL คนด้วยแท่งคนแม่เหล็ก เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 7.4 กรองด้วย Millipore filter



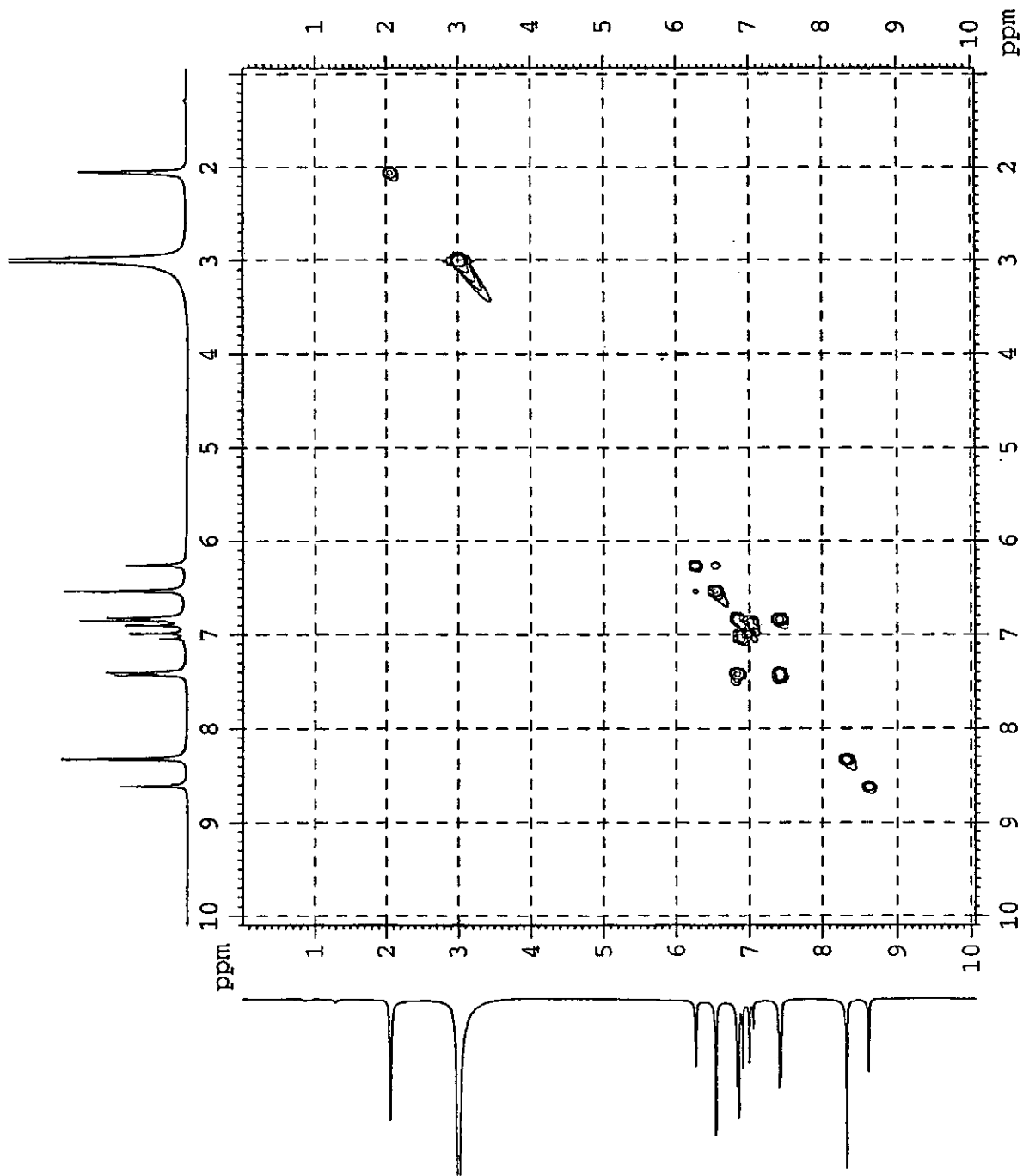
ภาพประกอบ 32 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ A

ภาพประกอบ 33 ^1H NMR spectrum (acetone- d_6 , 300 MHz) ของสารประกอบ A

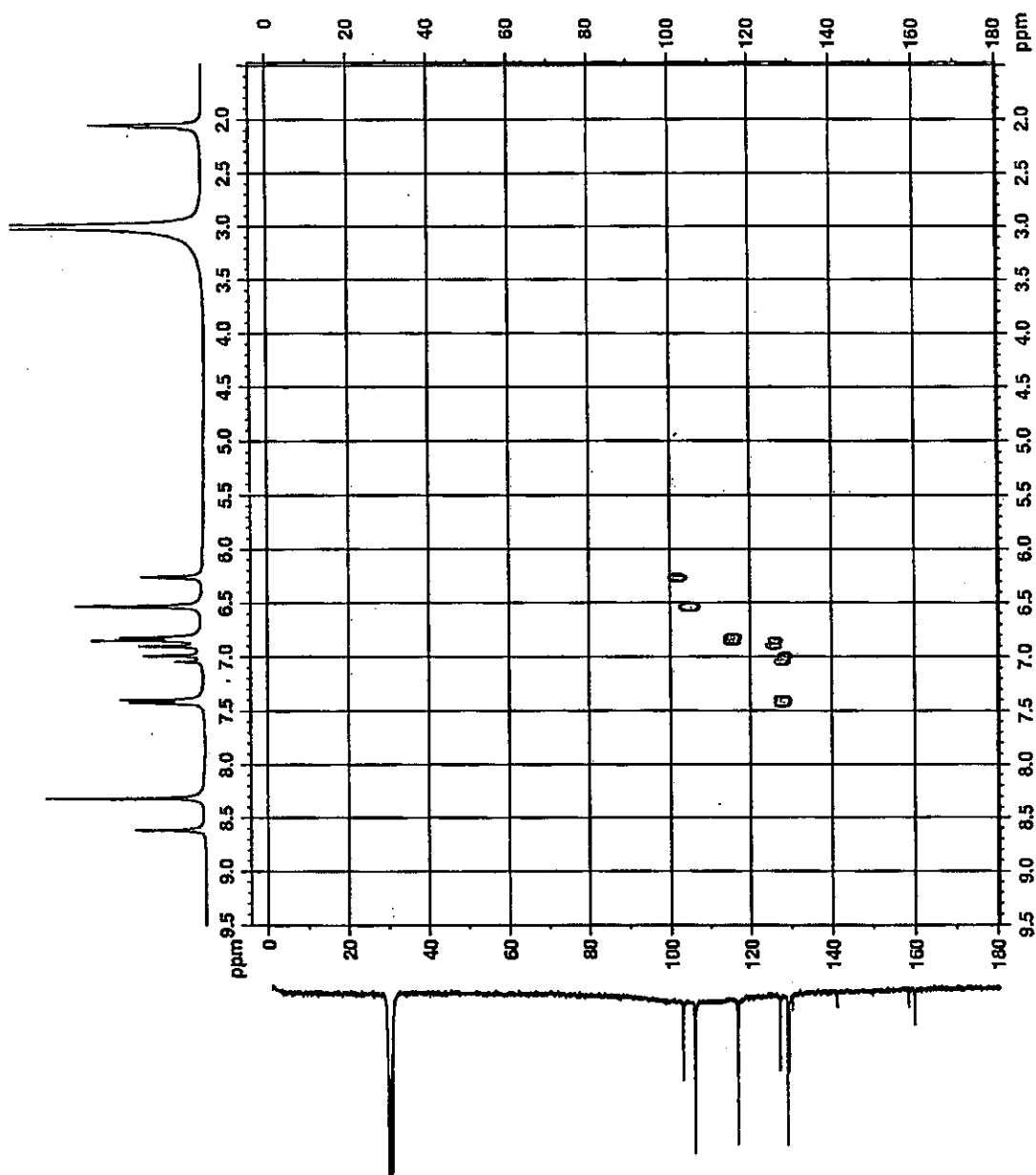
ภาพประกอบ 34 ^{13}C NMR spectrum (acetone- d_6 , 75 MHz) ของสารประกอบ A



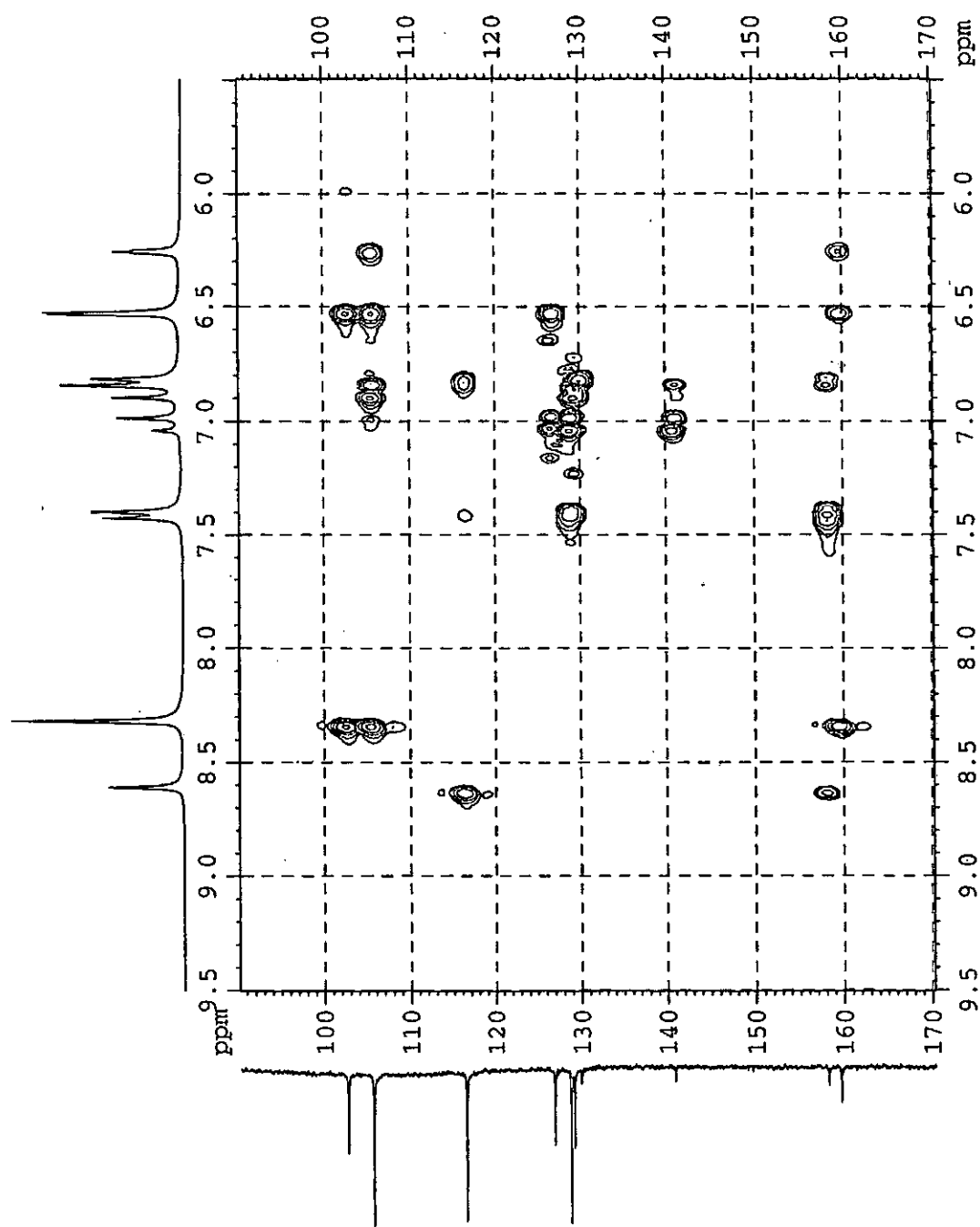
ภาพประกอบ 35 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ A



ภาพประกอบ 36 COSY spectrum ของสารประกอบ A



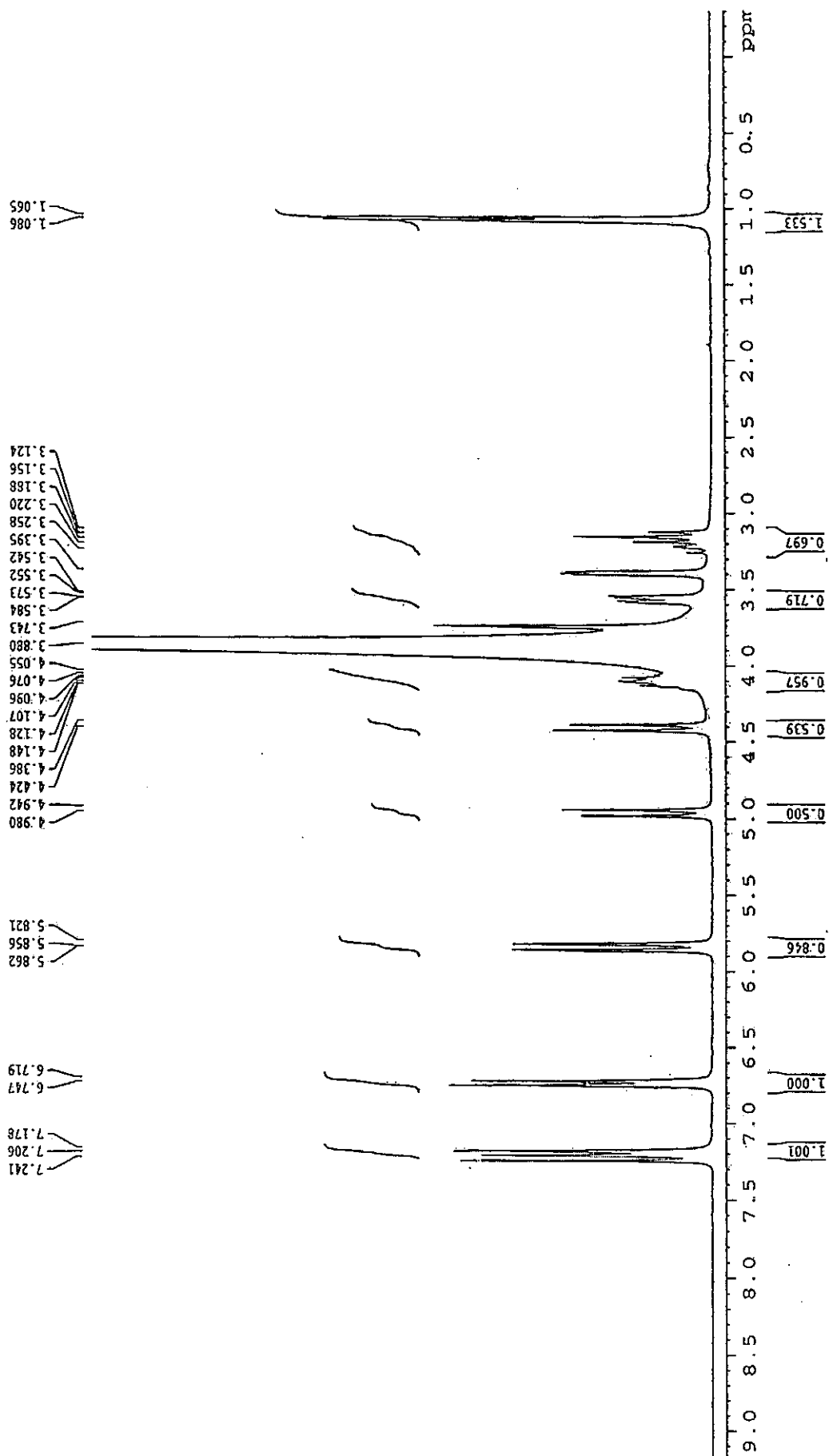
ภาพประกอบ 37 HMQC spectrum ของสารประกอบ A



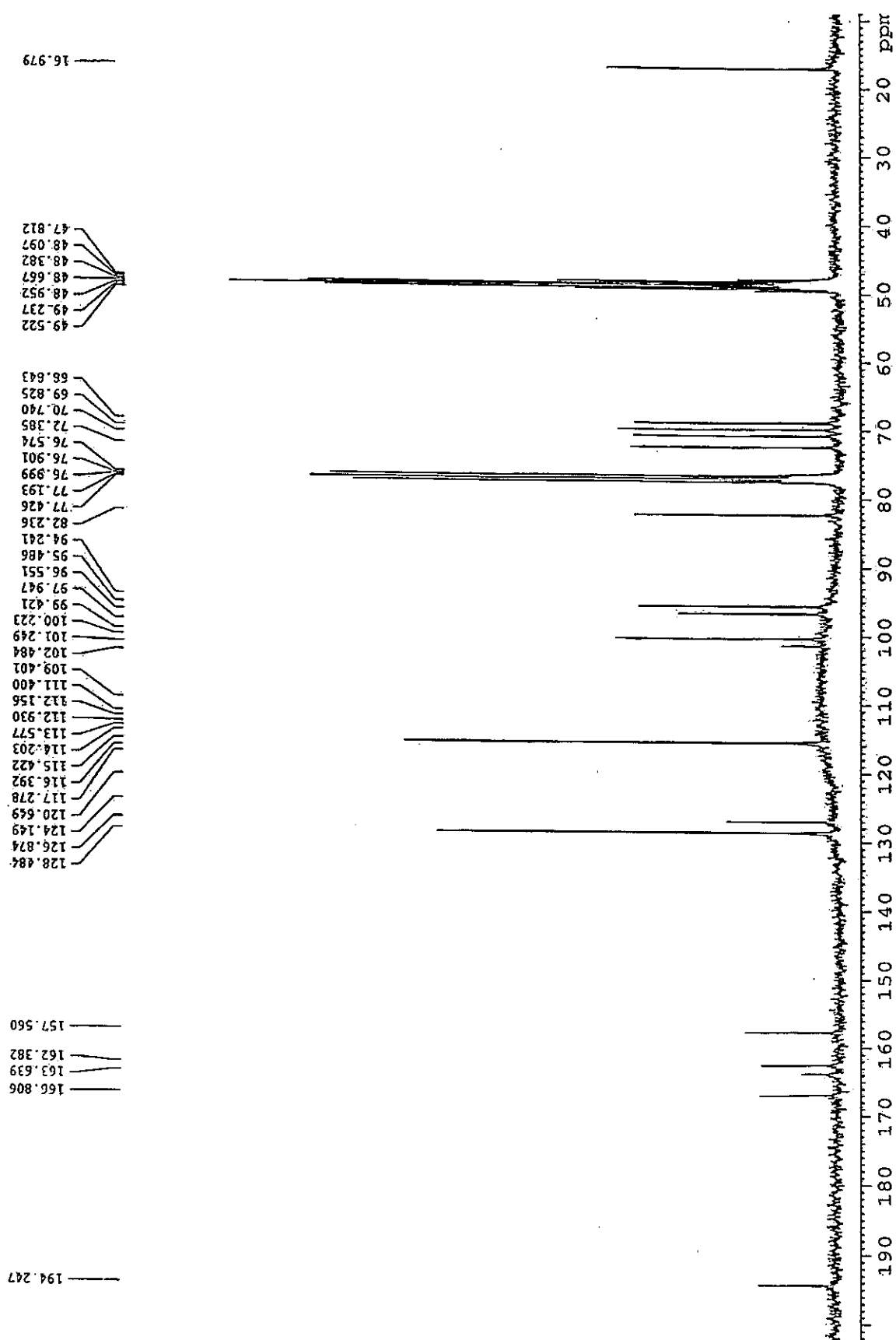
ภาพประกอบ 38 HMBC spectrum ของสารประกอบ A

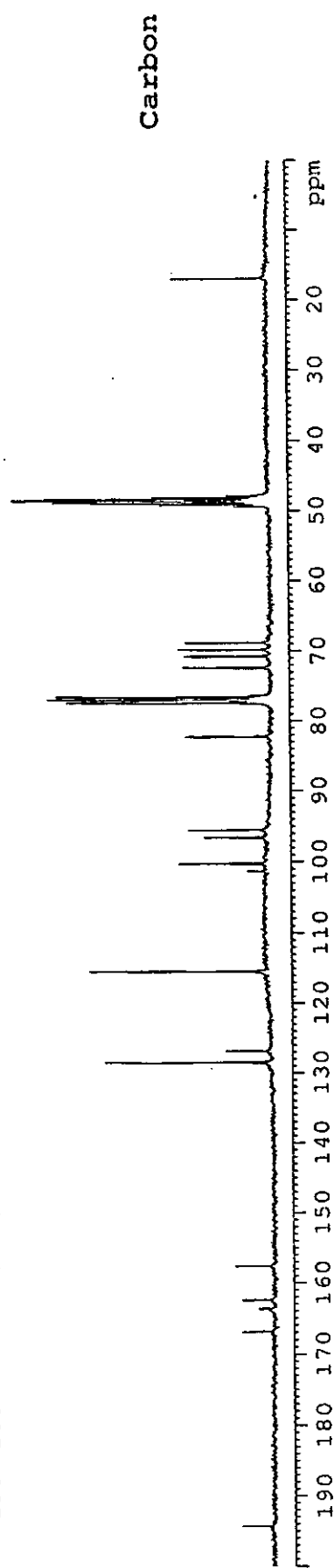
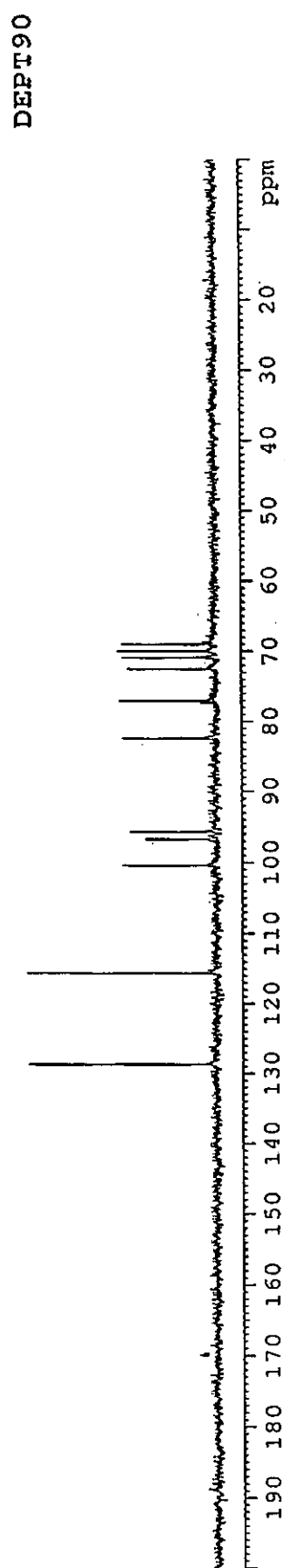
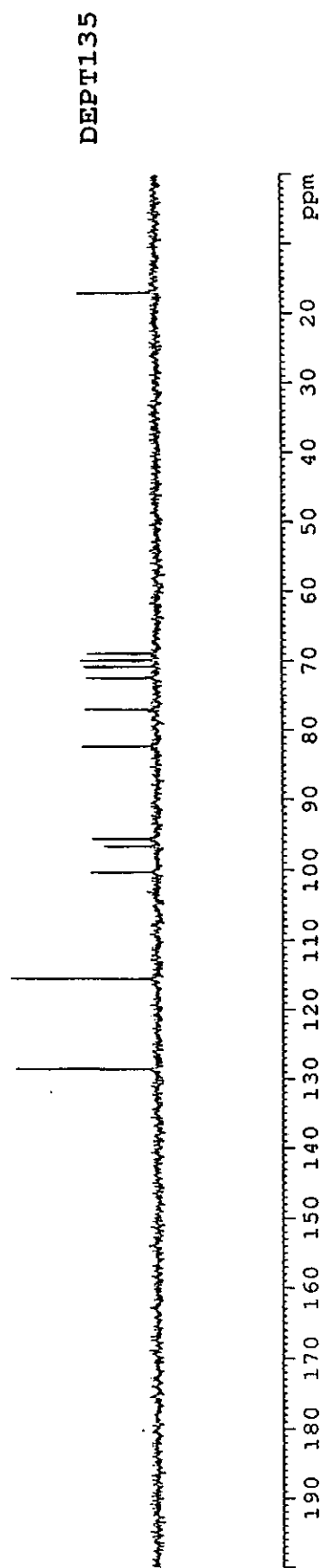


ภาพประกอบ 39 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ B

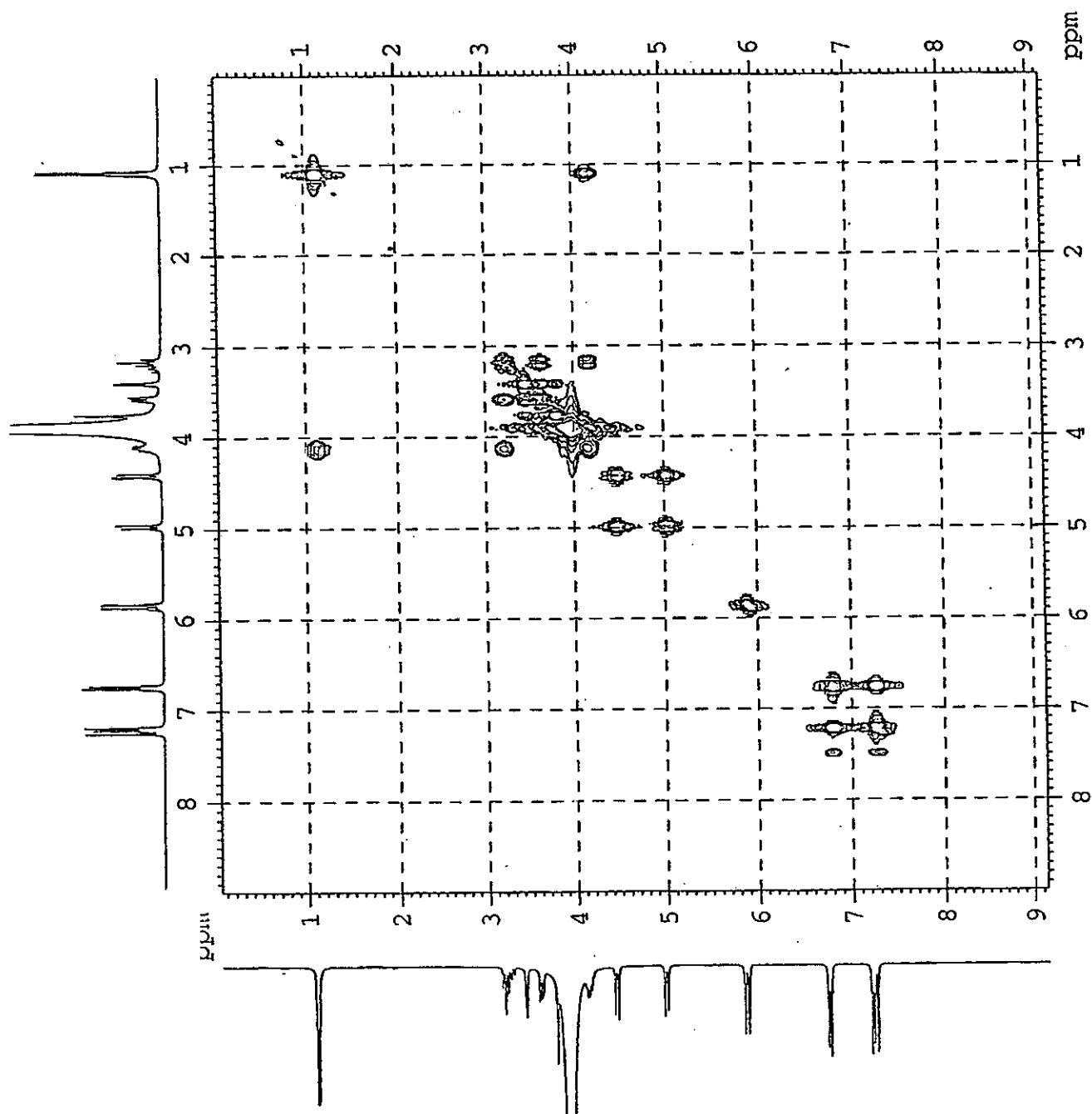
ภาพประกอบ 40 ^1H NMR spectrum ($\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 300 MHz) ของสารประกอบ B

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

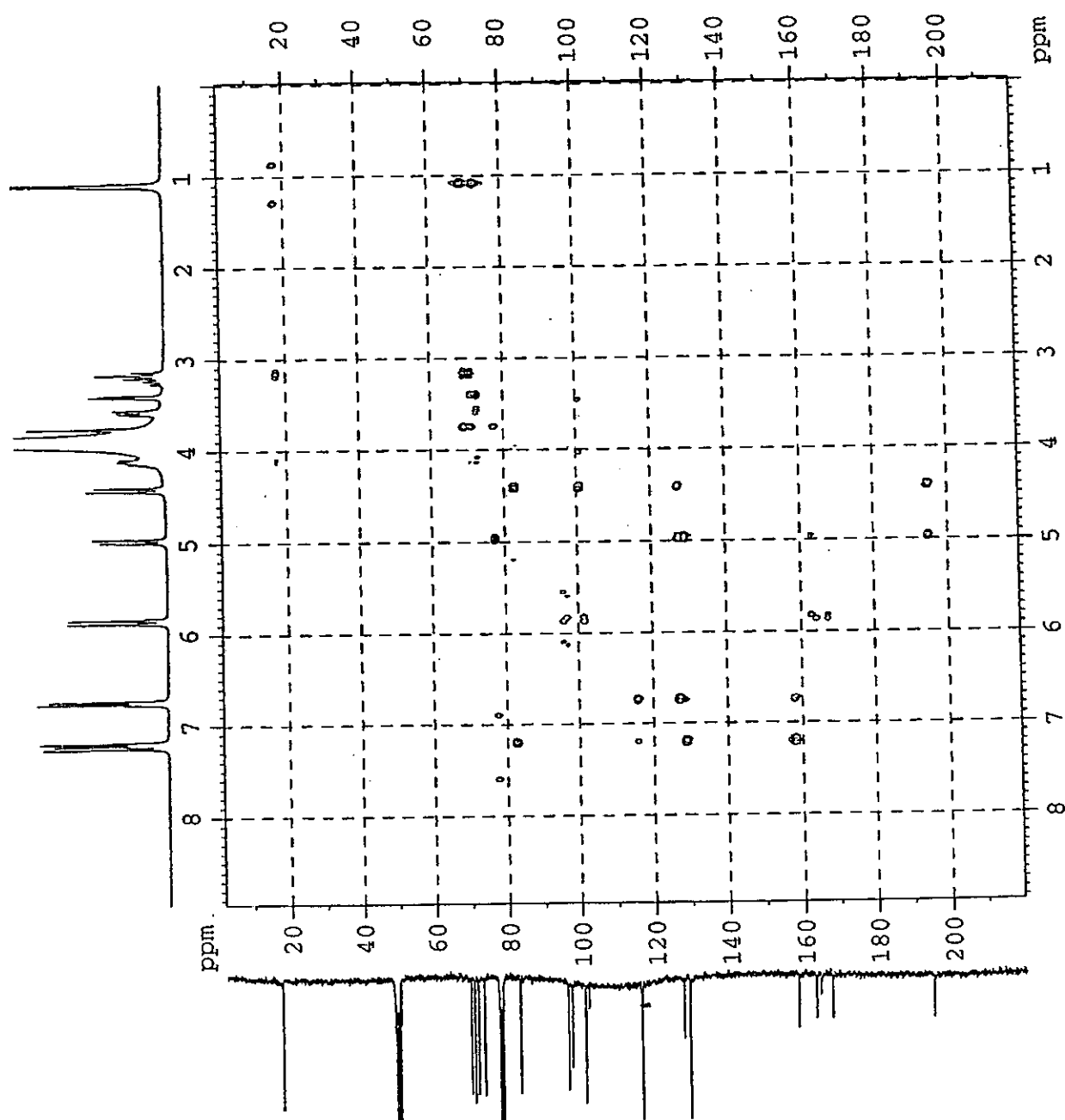




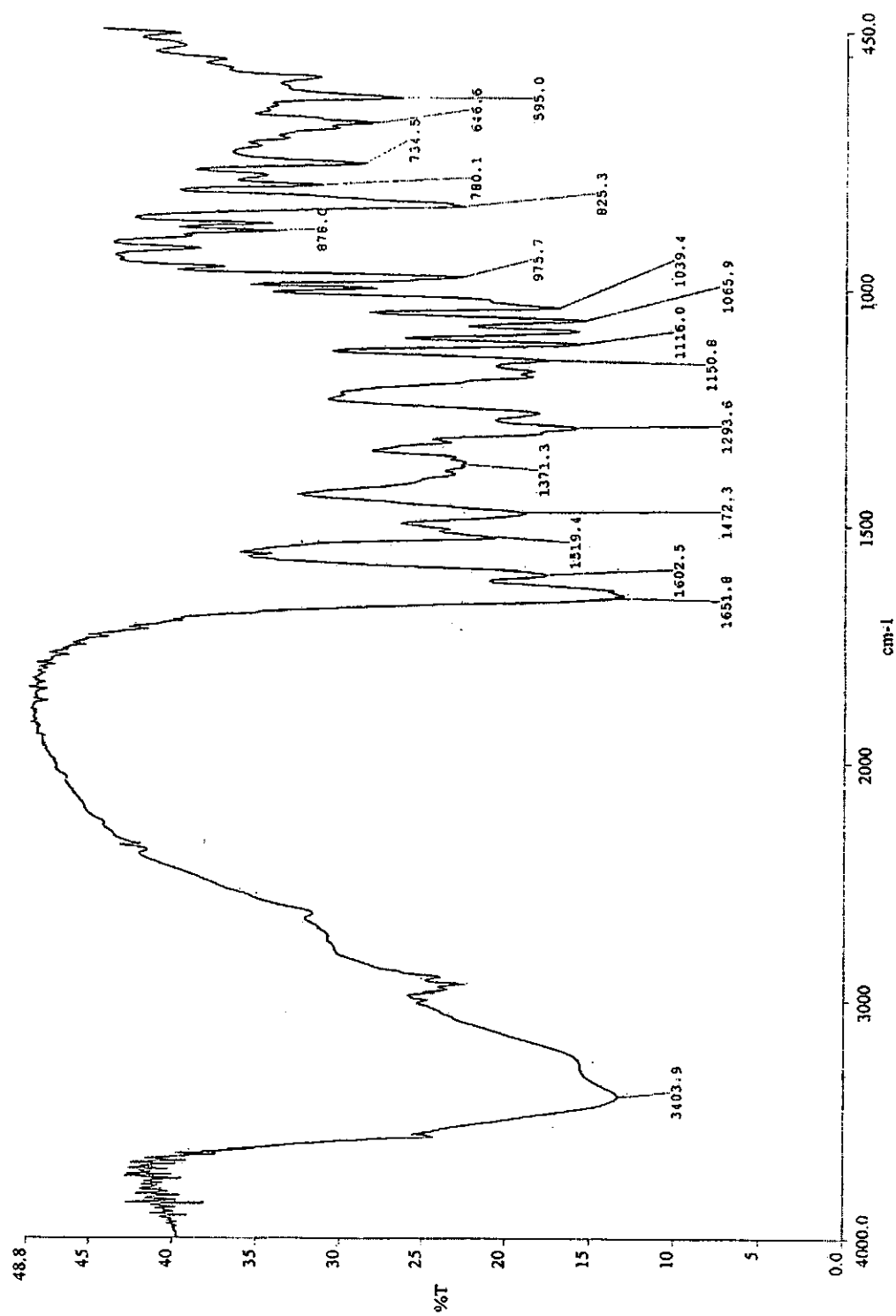
ภาพประกอบ 42 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ B



ภาพประกอบ 43 COSY spectrum ของสารประกอบ B

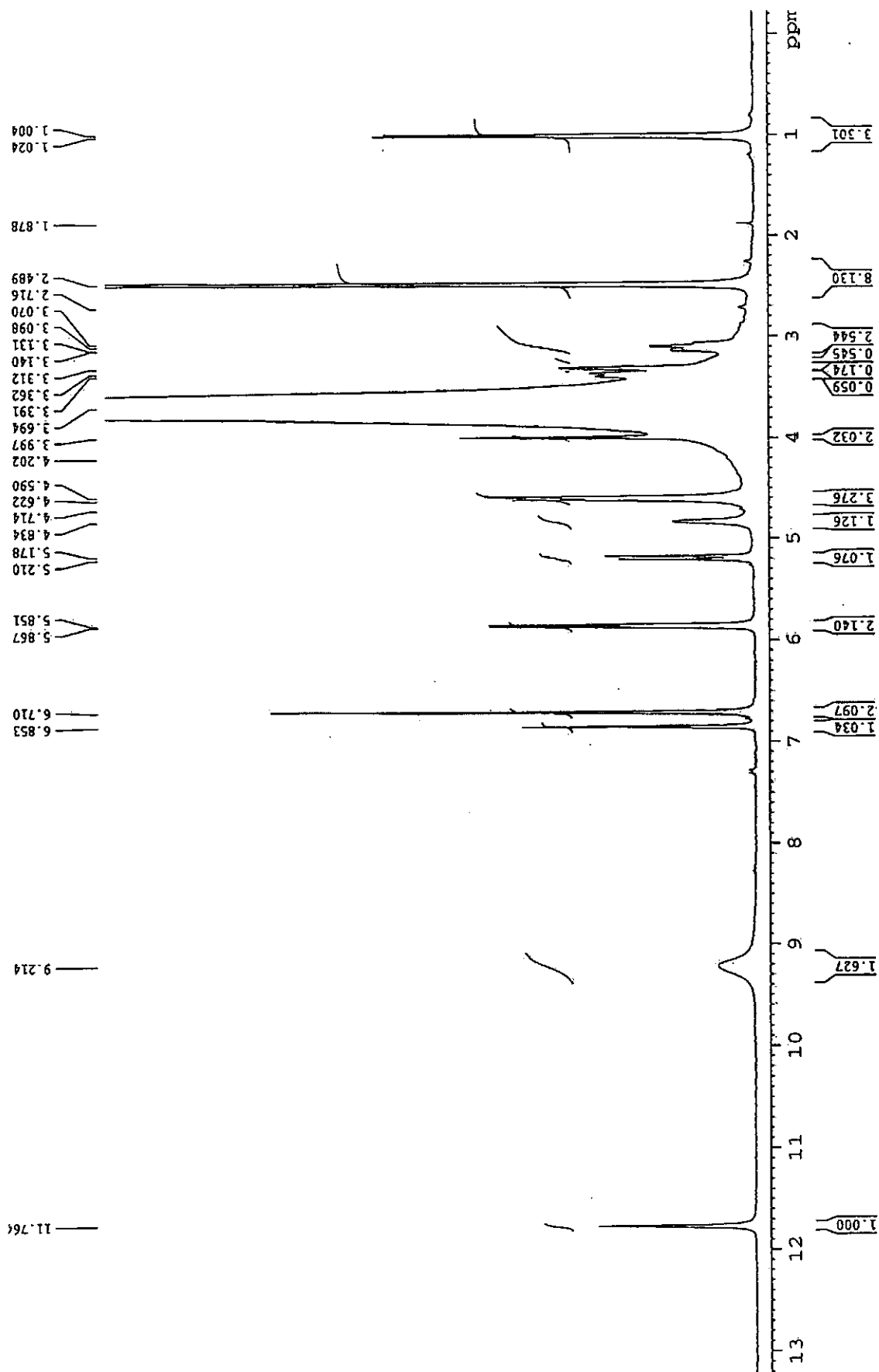


ภาพประกอบ 44 HMBC spectrum ของสารประกอบ B

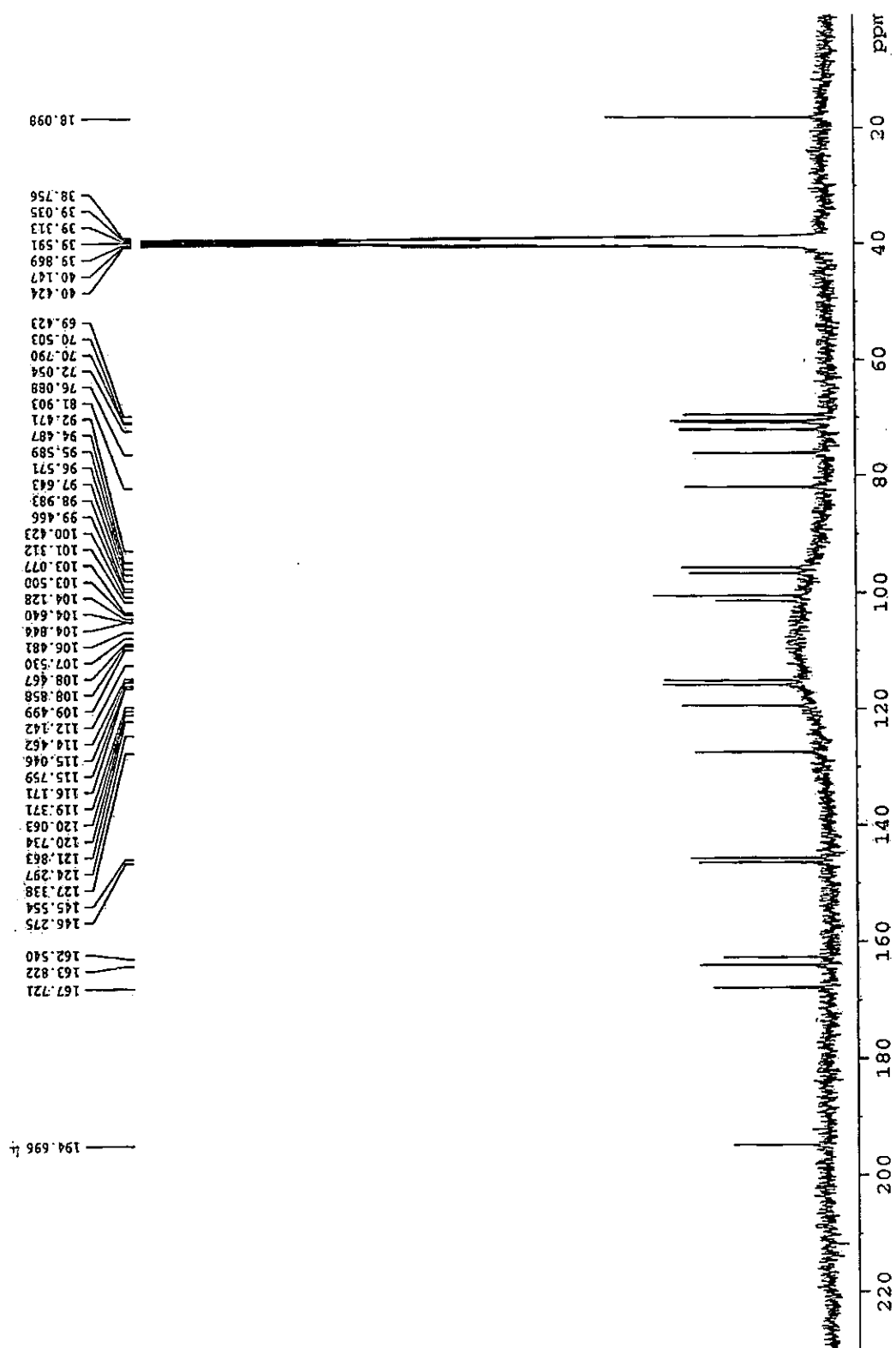


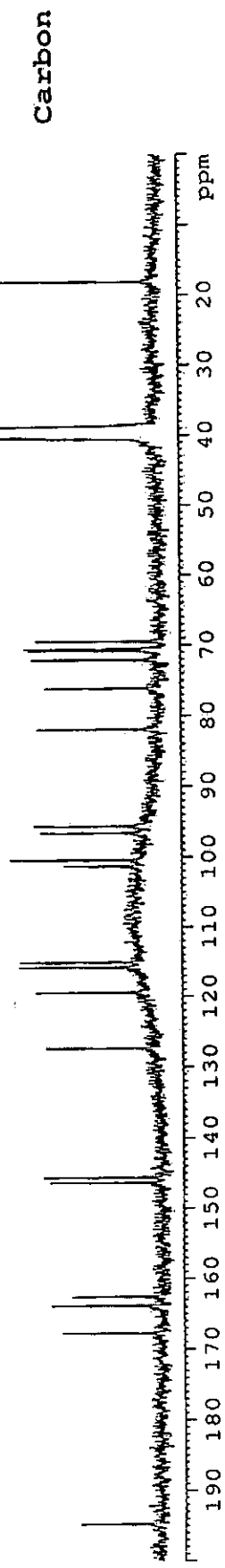
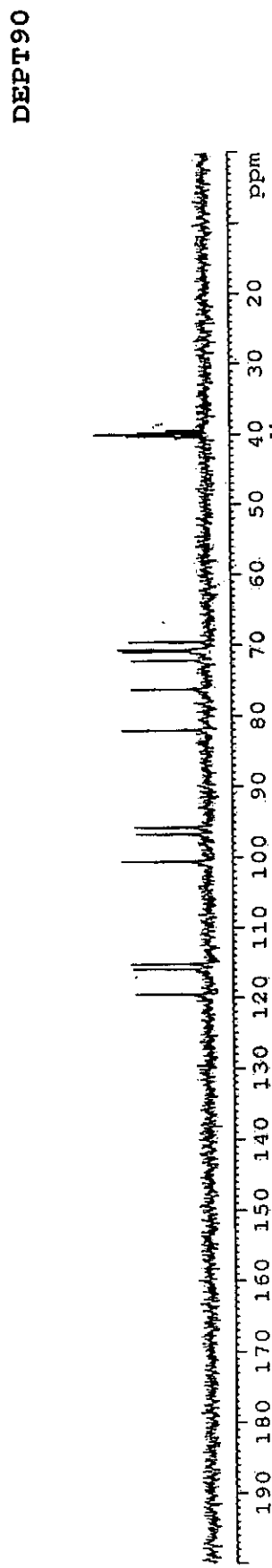
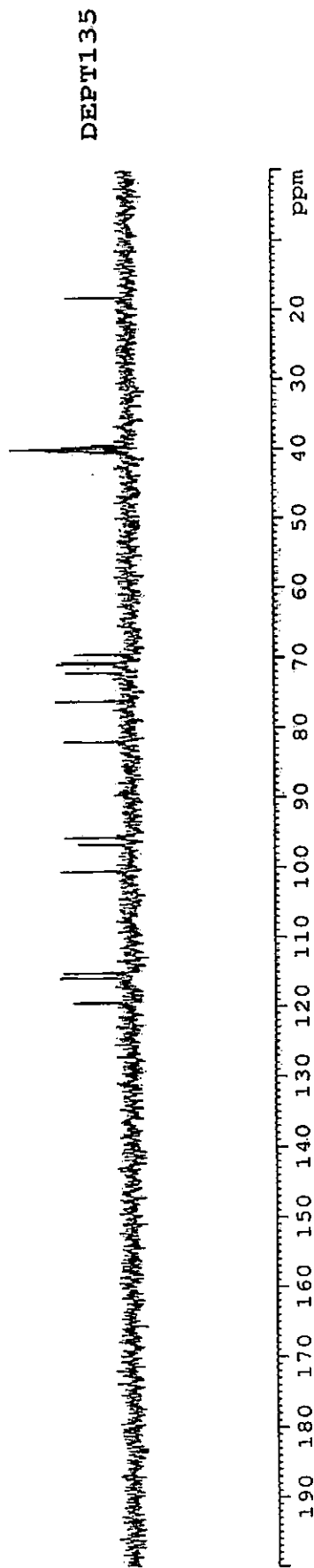
ภาพประกอบ 45 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ C

ภาพประกอบ 46 ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 300 MHz) ของสารประกอบ C

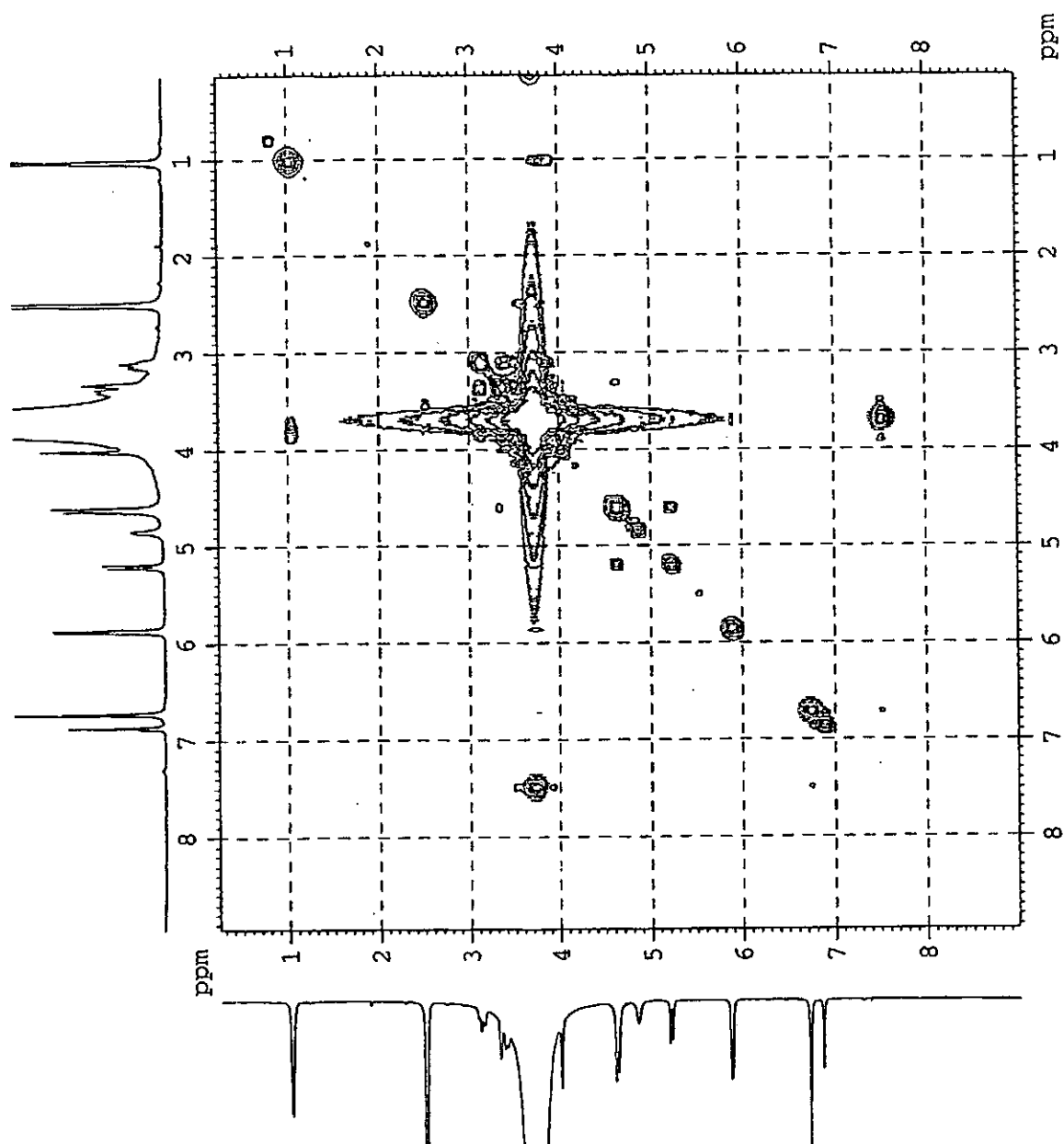


ภาพประกอบ 47 ^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 75 MHz) ของสารประกอบ C

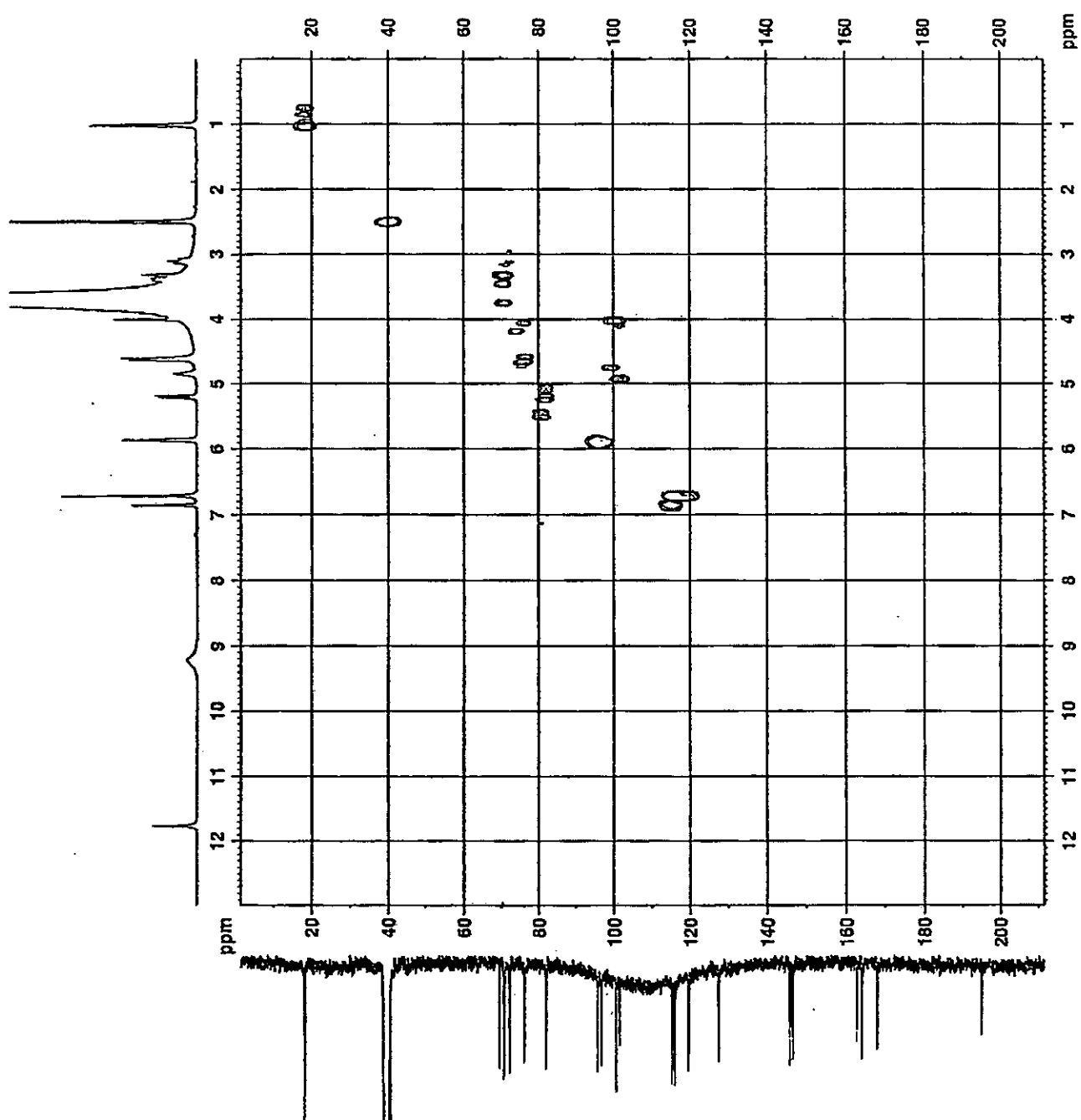




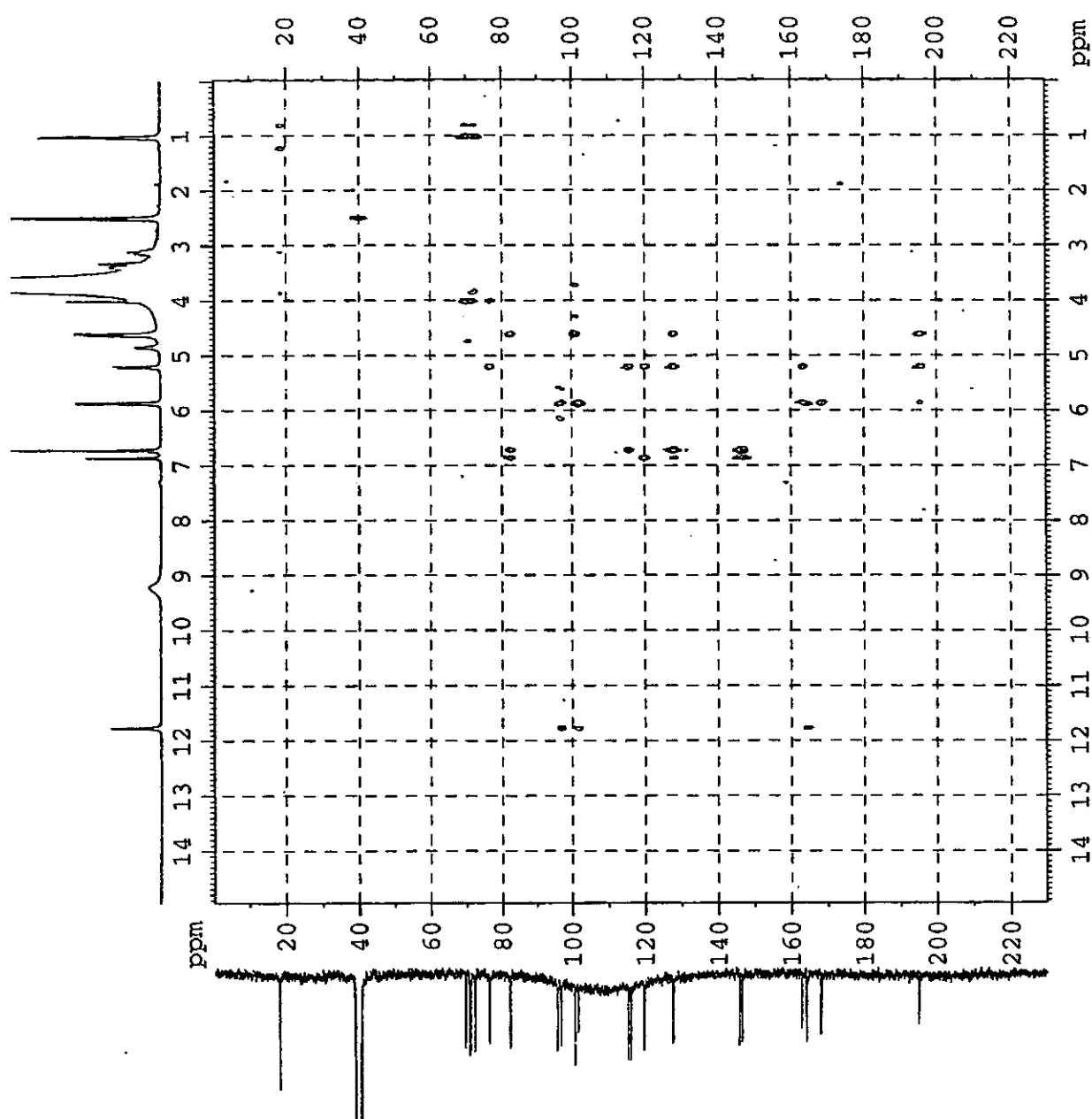
ภาพประกอบ 48 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ C



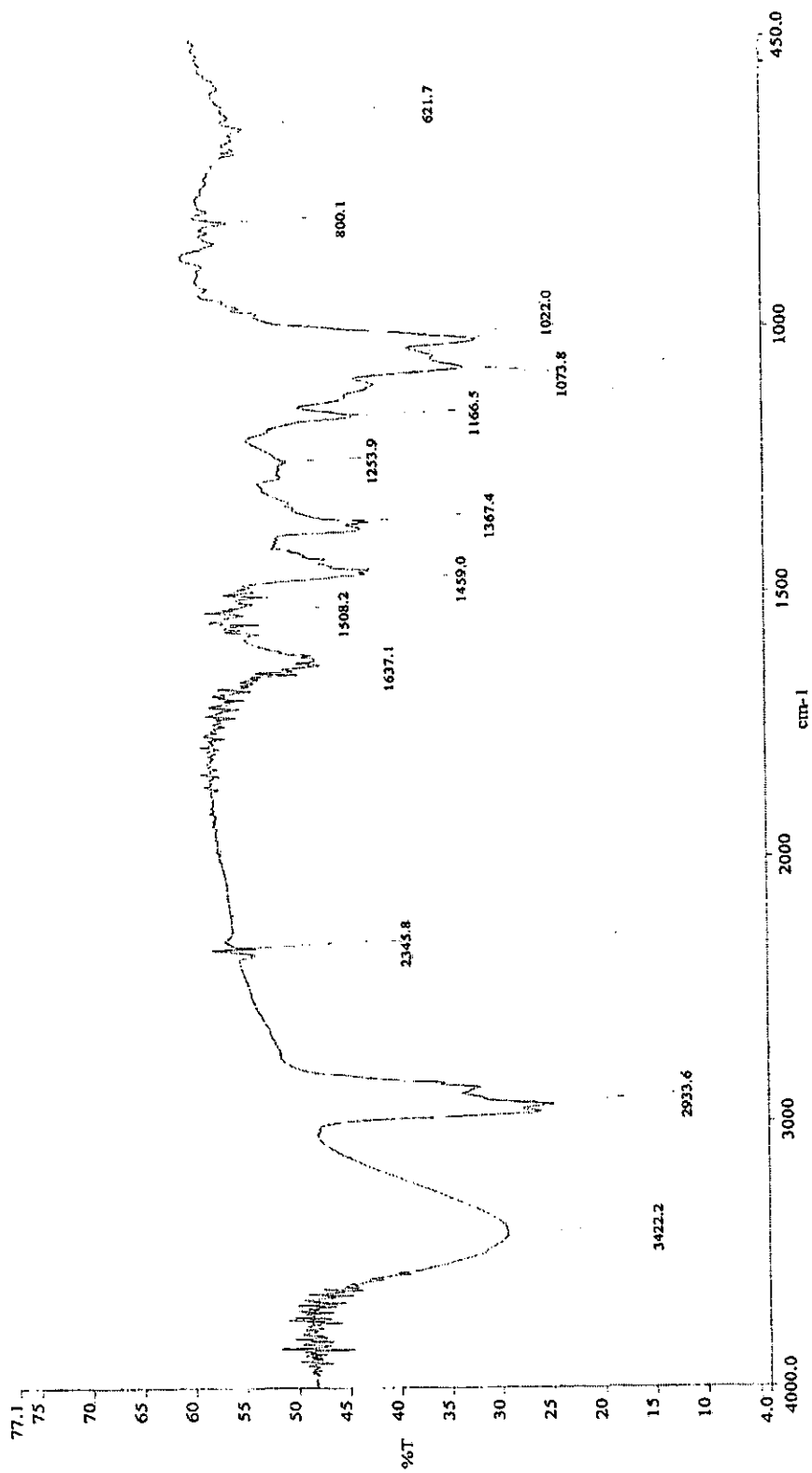
ภาพประกอบ 49 COSY spectrum ของสารประกอบ C



ภาพประกอบ 50 HMQC spectrum ของสารประกอบ C

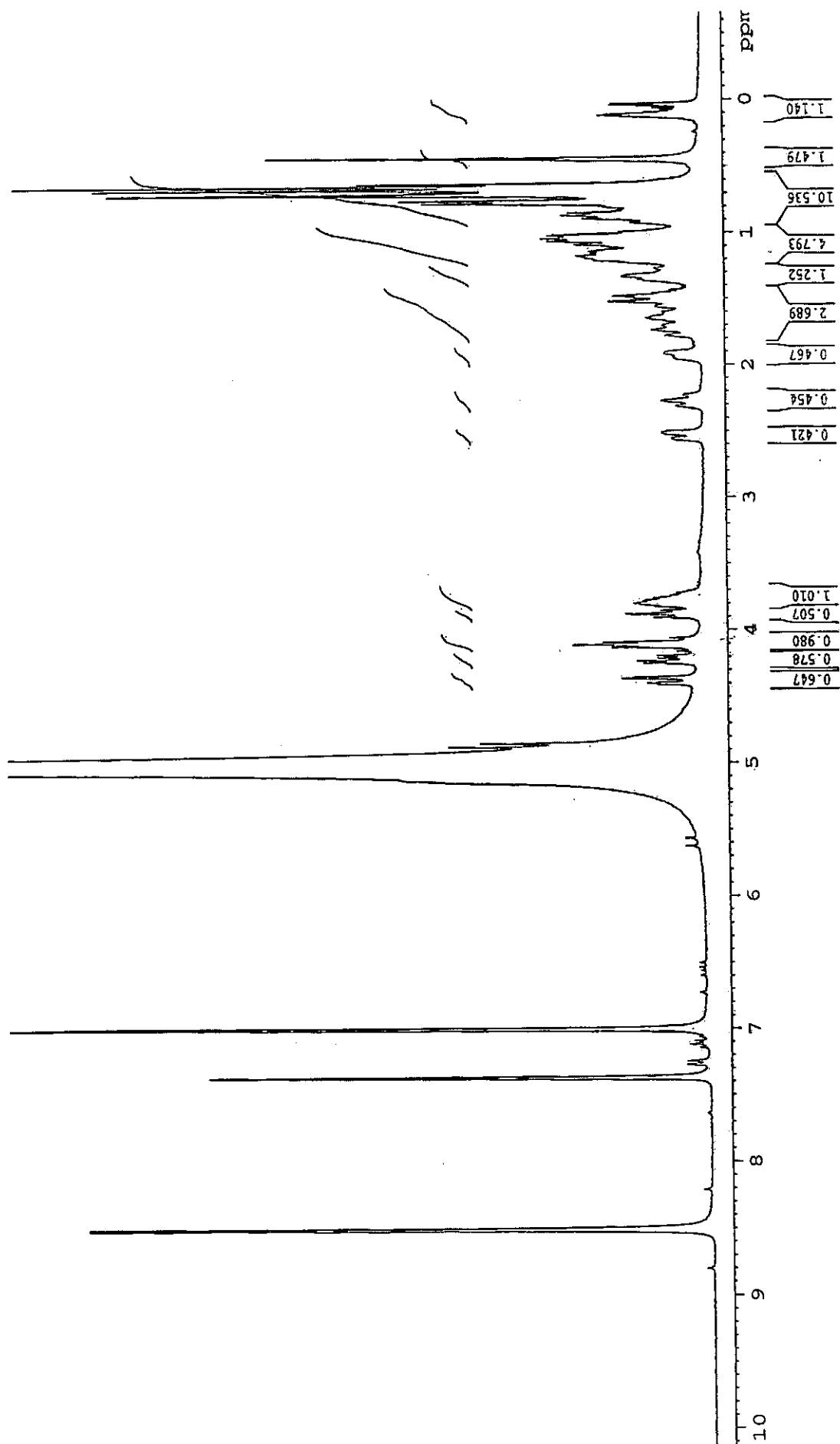


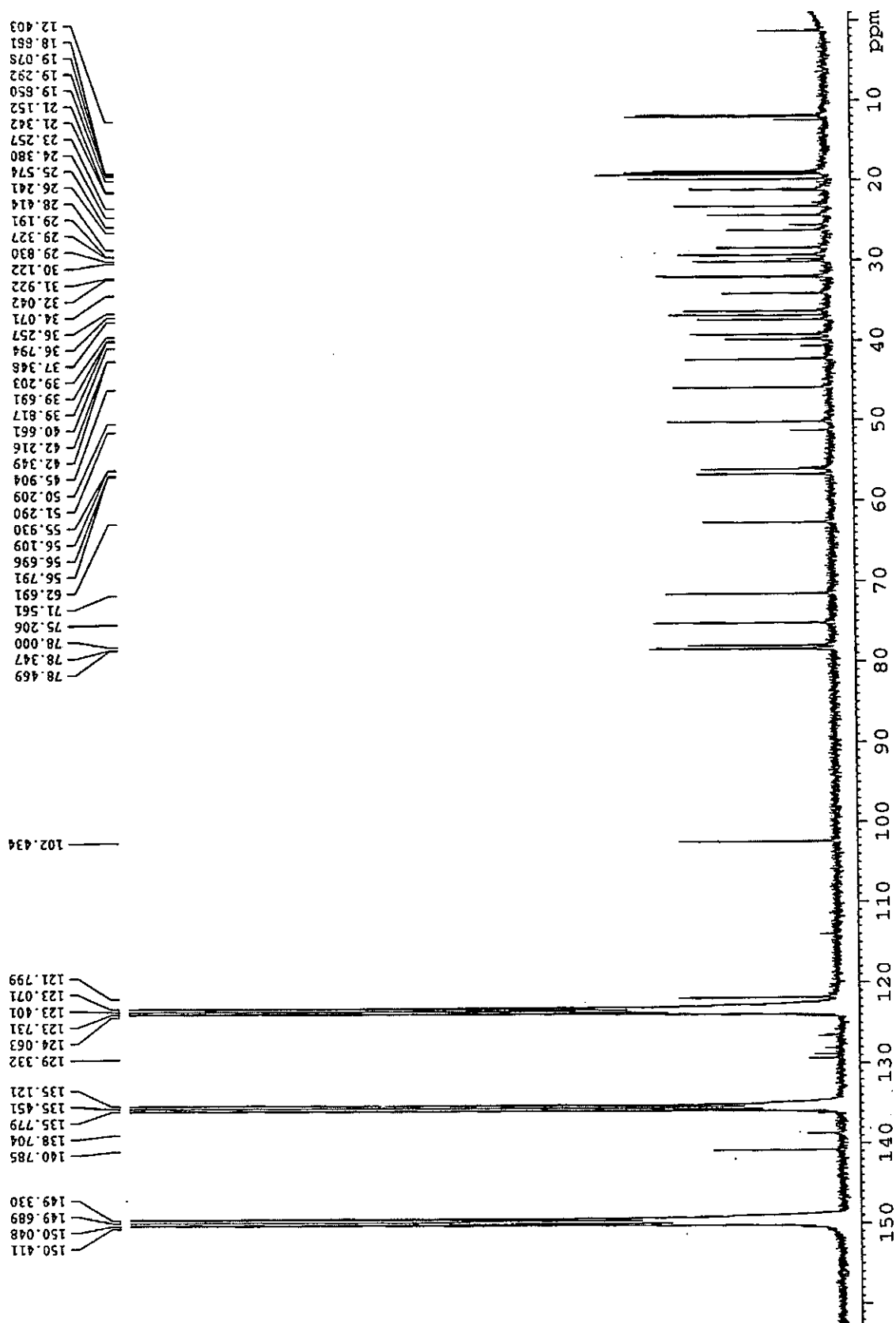
ภาพประกอบ 51 HMBC spectrum ของสารประกอบ C

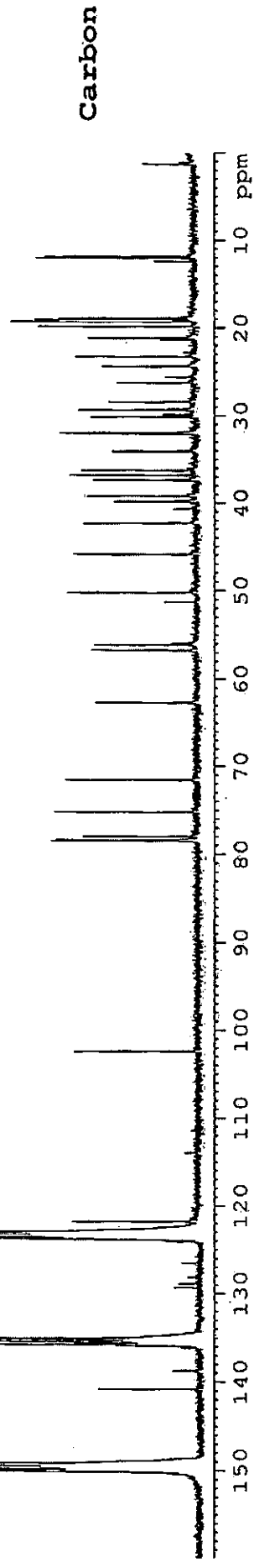
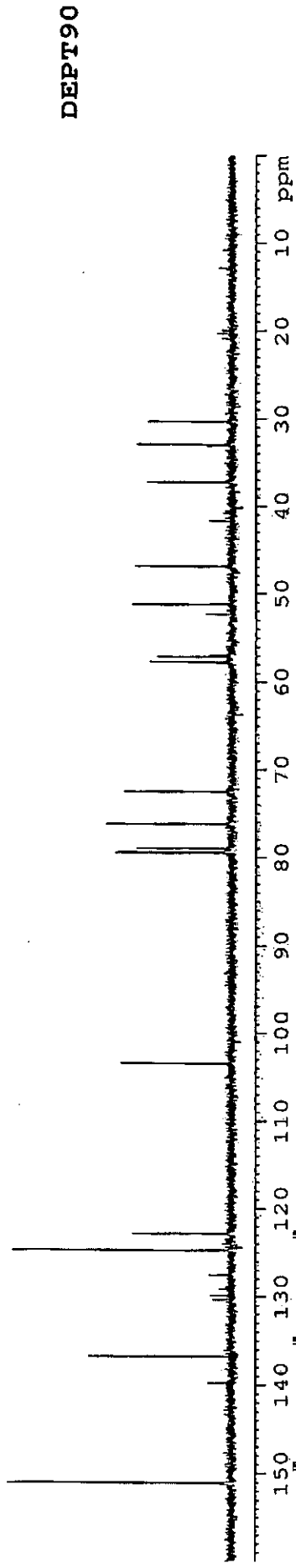
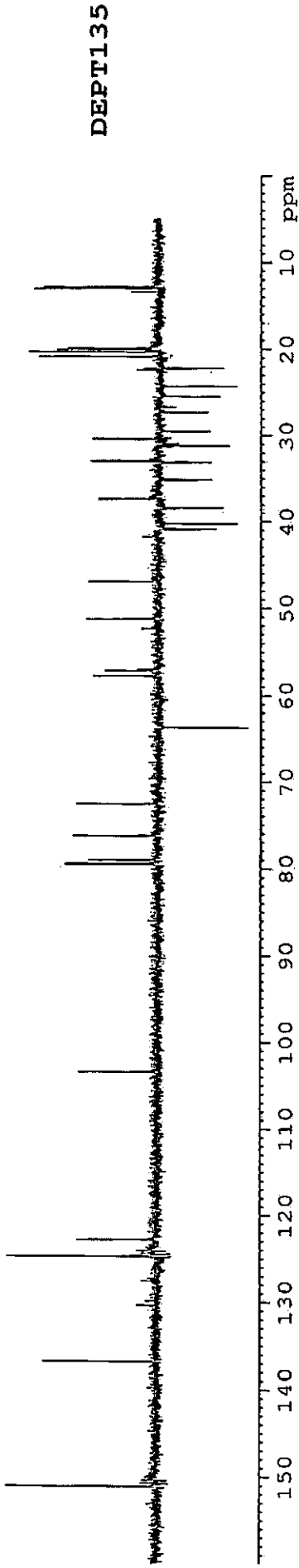


ภาพประกอบ 52 FT-IR spectrum (KBr) ของสารประกอบ D

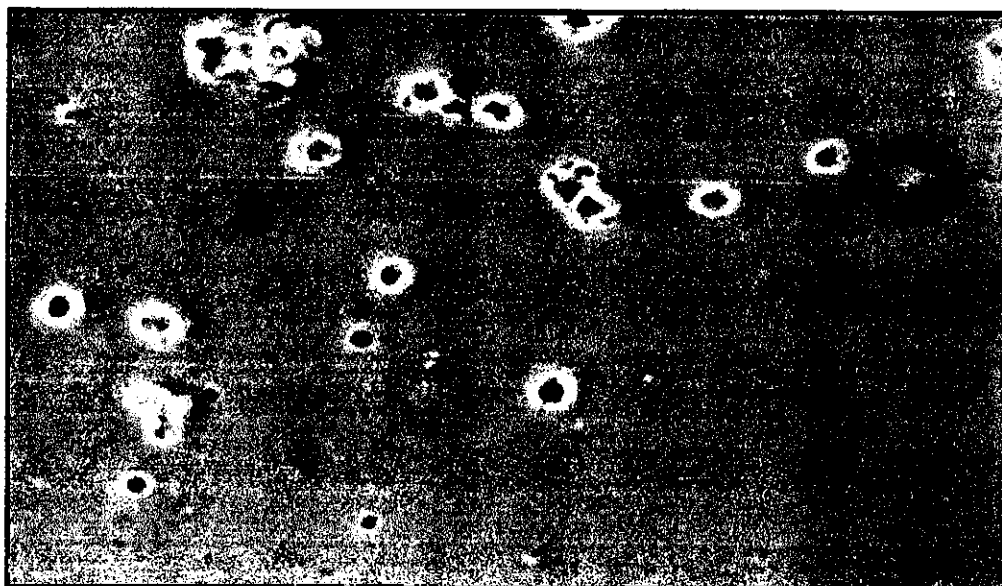
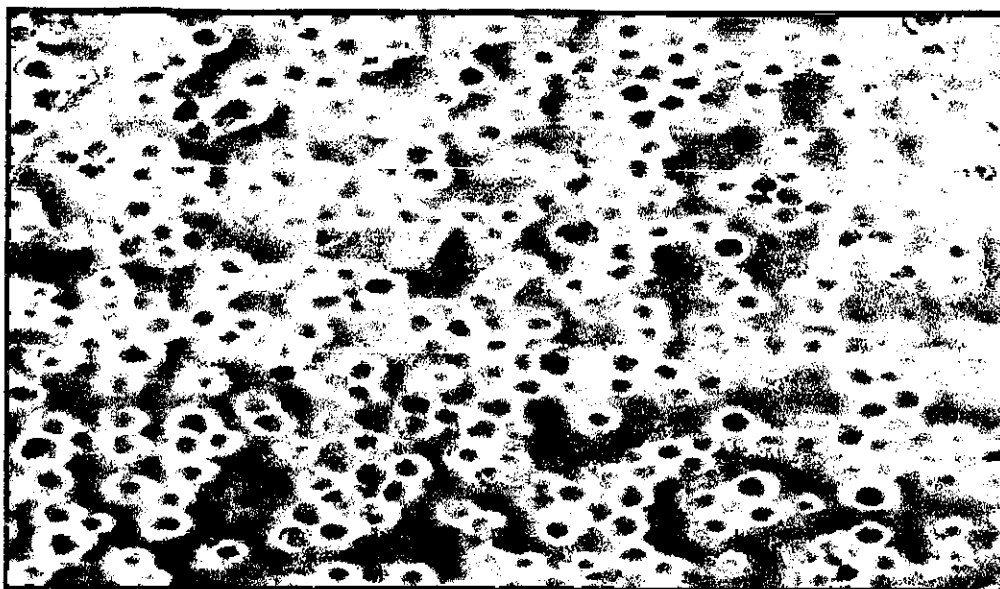
ภาพประกอบ 53 ^1H NMR spectrum (Pyridine- d_5 , 300 MHz) ของสารประกอบ D



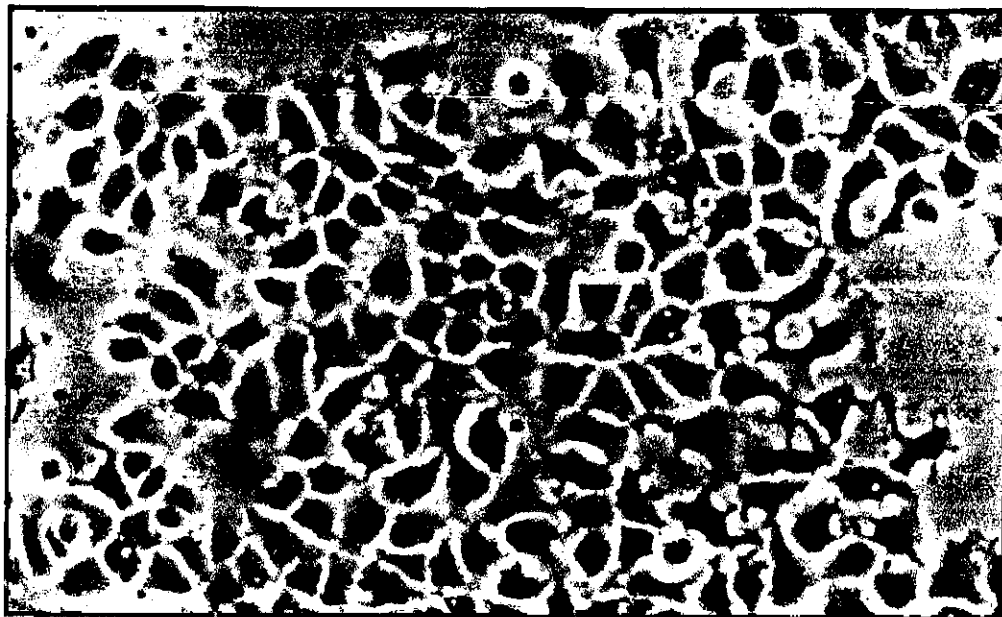
ภาพประกอบ 54 ^{13}C NMR spectrum (Pyridine- d_5 , 75 MHz) ของสารประกอบ D



ภาพประกอบ 55 ^{13}C DEPT-90 และ DEPT-135 spectrum ของสารประกอบ D



ภาพประกอบ 56 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง P388 กลุ่มควบคุม (บน) และกลุ่มทดลอง (ล่าง)



ภาพประกอบ 57 ลักษณะของเซลล์มะเร็ง MCF-7 กลุ่มควบคุม (บน) และกลุ่มทดลอง (ล่าง)

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

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

mp	melting point
MHz	Mega Hertz
δ	Chemical shift
J	coupling constant
Hz	Hertz
m	multiplet
d	doublet
s	singlet
br s	broad singlet
nm	nanometer

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวเจลิยว สุภาพ
วันเดือนปีเกิด	4 พฤศจิกายน 2515
สถานที่เกิด	อำเภอลาดบัวหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	37 หมู่ 4 ตำบลบึงคอไห อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	อาจารย์ 1 ระดับ 4
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนเทพศิรินทร์คลองสิบสาม ปทุมธานี อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2548	กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
พ.ศ. 2538	กศ.บ. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางเขน
พ.ศ. 2534	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนลาดบัวหลวงไพโรจน์วิทยา
พ.ศ. 2531	มัธยมศึกษาปีที่ 3 จากโรงเรียนลาดบัวหลวงไพโรจน์วิทยา