

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้
จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

ปริญญานิพนธ์
ของ
วินัย สุขราช

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
มกราคม 2544
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้
จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

บทคัดย่อ
ของ
วินัย สุขราช

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
มกราคม 2544

วินัย สุขราช. (2544). การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากเหง้า
พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.). ปรินญาณินพนธ์ กศ.ม. (เคมี) กรุงเทพฯ :
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล, ดร. จินดา แต้มบรรจง,
ดร. พรทิพา พิชา.

เหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในตำหรับยารักษา
มะเร็งตำรับหนึ่งโดยใช้ประกอบกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ อีก 4 ชนิด สารสกัดหยาบจากเหง้า
พุทธรักษาใน hexane และใน ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 มีค่า ED₅₀
เท่ากับ 64.50 และ 133.50 µg/mL ตามลำดับ เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษา
องค์ประกอบที่มีความเป็นพิษมากต่อเซลล์มะเร็ง P388 จึงได้นำสารสกัดหยาบ hexane มา
แยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นสารดูดซับและใช้
สารละลาย hexane กับ ethyl acetate เป็นตัวชะโดยเพิ่มขั้วของตัวชะตามความมีขั้วของ
องค์ประกอบที่จะแยก พบว่าส่วนที่แยกได้ในช่วงที่ใช้ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน
7 : 3 เมื่อนำมาแยกต่อ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ stigmasterol ที่มีค่า ED₅₀ ต่อเซลล์มะเร็ง
P388 เท่ากับ 55.50 µg/mL และได้กลุ่มสารกึ่งบริสุทธิ์ 2 กลุ่มที่เป็นองค์ประกอบในปริมาณ
น้อยจนไม่สามารถแยกต่อให้บริสุทธิ์ได้ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ด้วยค่า ED₅₀
เท่ากับ 19.00 และ 21.50 µg/mL ตามลำดับ ส่วนที่แยกได้ในช่วง hexane : ethyl acetate
ในอัตราส่วน 6 : 4 เมื่อนำมาแยกต่อ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร คือ 6 β -hydroxystigmasta-
4,22-diene-3-one ที่มีค่า ED₅₀ ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 37.50 µg/mL โครงสร้างของ
สารบริสุทธิ์ทั้งสองสาร วิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนที่มี
พิษบางกลุ่มที่แยกได้จากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และเมื่อนำมาแยกต่อมีความเป็นพิษ
น้อยลงทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารที่เป็นองค์ประกอบในส่วนที่แยกจากกันอาจมีฤทธิ์เสริมกัน

STUDY ON CYTOTOXICITY OF SUBSTANCES ISOLATED
FROM THE RHIZOME OF *CANNA INDICA* LINN.
ON CANCER CELLS

AN ABSTRACT
BY
VINAY SOUKHARATH

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University
January 2001

Vinay Soukharath. (2001). *Study on Cytotoxicity of Substances Isolated from the Rhizome of Canna indica Linn. On Cancer Cells*. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University.
Advisor Committee: Asst. Dr. Sunan Chainakul, Dr. Chinda Tambunchong, Dr. Porntipa Picha.

The rhizome of *Canna indica* Linn. has been used in a Thai traditional medicine with other four herbs for anticancer. The crude extracts from hexane and ethanol were tested for cytotoxicity against P388 cancer cells with ED_{50} 64.50 and 133.50 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Since the study of the cytotoxic substances is the main objective of this research, the hexane crude extract was therefor further separated with gradient elution column chromatography using silica gel as an adsorbent and different ratios of hexane/ethyl acetate solutions as eluents. A pure compound was isolated from the fractions using hexane : ethyl acetate in the ratio of 7 : 3, the structure being identified as stigmasterol with ED_{50} 55.50 $\mu\text{g/mL}$ and also other two toxic minor components were isolated with ED_{50} 19.00 and 21.50 $\mu\text{g/mL}$ respectively. Another pure compound with the structure elucidated by spectroscopy techniques as 6 β -hydroxystigmasta-4,22-diene-3-one was isolated from further separations of the fraction which came out with hexane : ethyl acetate ratio at 6 : 4 with ED_{50} 37.50 $\mu\text{g/mL}$. There were some fractions with reduced toxicity after further separations. The combination of the separated compounds may enhance the toxicity.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้
จากเหง้าพุทธรักษา (*Canna indica* Linn.)

ของ

นายวินัย สุขราช

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คนบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. เสริมศักดิ์ วิชาลาภรณ์)

วันที่.....เดือนมกราคม พ.ศ. 2544

คณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ ชัยนะกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. จินดา แท้มบรรจง)

.....กรรมการ

(ดร. พรทิพา พินา)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรัชญาสิทธิกุล)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันท์ ชัยนะกุล ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ดร. จินดา แทมมบรรจง และ ดร. พรทิพา พิชชา กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่อง ต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุภาลักษณ์ ปรีชชญาสิทธิกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ที่ได้สละเวลาอันมีค่าในการร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ ที่ทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้นและขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้ความรู้ ความเมตตาแก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณกลุ่มงานวิจัยสารบาบัตมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยและถ่ายทอดเทคนิคการวิจัยด้านเซลล์มะเร็งขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือเพื่อใช้ในการวิจัยและขอขอบพระคุณ คุณณรงค์ นันทแสน นักวิชาการ กรมป่าไม้ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณกรมวิเทศสหการแห่งประเทศไทยและรัฐบาลสาธารณรัฐประชาธิปไตย ประชาชนลาว ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาในครั้งนี้ตั้งแต่ต้นจนถึงสิ้นสุดการศึกษา และขอขอบพระคุณ นายแพทย์ สมหมาย ทองประเสริฐ ที่กรุณาให้สมุนไพรรักษาการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถานเอกอัครราชทูต สปป ลาว ประจำราชอาณาจักรไทย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สถาบันเอเชียแปซิฟิกศึกษา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และ เพื่อน ๆ นิสิตปริญญาโททุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ เรื่อง อีกทั้งให้การสนับสนุนและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ประโยชน์และคุณความดีที่เกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแต่ บิดา มารดา ภรรยาและลูก ๆ ทุกคนที่เป็นแรงผลักดัน เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำปริญญานิพนธ์ด้วยดีเสมอมา

วินัย สุขวาท

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	10
ความสำคัญของการวิจัย	10
ขอบเขตของการวิจัย	11
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	11
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
3 วิธีดำเนินการทดลอง	18
พืชที่ใช้ในการวิจัย.....	18
เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย.....	18
สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา.....	18
สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็ง	19
การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์	19
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	20
4 ผลการวิจัย	30
ผลการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา	30
ผลการแยกสารสกัด hexane และทำสารให้บริสุทธิ์	30
ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	36
5 สรุปและอภิปรายผล	55
การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	55
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	60
ข้อเสนอแนะ.....	62

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	63
ภาคผนวก	67
อภิธานศัพท์	87
ประวัติย่อผู้วิจัย	89

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดของเซลล์มะเร็งที่พบมากในเพศชาย	3
2 ชนิดของเซลล์มะเร็งที่พบมากในเพศหญิง	4
3 ค่า ED ₅₀ ของ alkaloids จากใบและรากของ <i>Rhazya stricra</i> ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ P388	7
4 ค่า ED ₅₀ ของสาร clerodane diterpenes ที่ได้จากเปลือกของต้นอโศกพม่าที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A-549 MCF-7 และ HT-29	8
5 ค่า ED ₅₀ ของสารจากรากปลาไหลเผือกที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388	9
6 ค่า ED ₅₀ ของสารจากใบชาที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง	10
7 ตัวอย่างการเตรียมสารเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	22
8 ผลการแยกสารสกัด hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	30
9 ผลการแยกสารกลุ่ม H3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	31
10 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	32
11 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	32
12 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	33
13 ผลการแยกสารกลุ่ม H4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	33
14 ผลการแยกสารกลุ่ม HB-8 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	34
15 ผลการแยกสารกลุ่ม HB-10 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์	35
16 ผลการวัดค่าการเจริญเติบโตของเซลล์ P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์	36
17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	39
18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H1 ถึง H4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	41
19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H3.1 ถึง H3.6 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	42
20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H4.1 ถึง H4.5 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL	42

บัญชีตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกได้จาก H3.2 H3.3 และ H3.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$	43
22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกจาก H4.2 และ H4.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$	44
23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A และ สารประกอบ B ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	45
24 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	46
25 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED_{50} ของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษา ต่อเซลล์ มะเร็ง P388	48
26 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	57
27 ข้อมูล HMQC NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	58

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 สูตรโครงสร้างของ vinblastine และ vincristine	5
2 สูตรโครงสร้างของ bruceantin	5
3 สูตรโครงสร้างของ alkaloids ที่พบในใบและรากของ <i>Rhazya stricta</i>	6
4 สูตรโครงสร้างของ scopoletin และ 9- metoxycanthin-6-one	8
5 ต้นพุทธรักษาดอกสีแดง	13
6 เหง้าพุทธรักษาดอกสีแดง	13
7 สูตรโครงสร้างของ quinic acid และ shikimic acid	14
8 สูตรโครงสร้างของสารที่พบในใบของพุทธรักษา	14
9 สูตรโครงสร้างของสารประกอบบางชนิดที่พบในใบของ <i>Canna flaccida</i> Rosc.	15
10 สูตรโครงสร้างของ cannagenin	16
11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา	24
12 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane	25
13 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.2	26
14 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.3	26
15 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.4	27
16 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H4	28
17 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H4.4	29
18 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388	37
19 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารสกัด hexane และ ethanol ต่อเซลล์มะเร็ง P388	40
20 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารประกอบ A และ สารประกอบ B ต่อเซลล์มะเร็ง P388	47
21 กราฟแสดงค่า ED ₅₀ ของสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388	47
22 แผนภูมิแสดงร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จาก สารสกัด hexane	49
23 Negative Control ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ในวันที่ 4 (ขยาย 100 เท่า).....	50

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ

หน้า

24 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารประกอบ B ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ (ขยาย 100 เท่า).....	50
25 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารกลุ่ม H3.4.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ (ขยาย 100 เท่า).....	51
26 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารกลุ่ม H3.4.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ความ เข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ (ขยาย 100 เท่า)	51
27 การแตกพันธะของสารประกอบ B	59
28 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr)	68
29 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl_3 , 400 MHz)	69
30 ^1H NMR สเปกตรัมของ stigmasterol	70
31 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl_3 , 100 MHz)	71
32 DEPT 90 และ DEPT 135 องศาของสารประกอบ A	72
33 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr)	73
34 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (CDCl_3 , 400 MHz)	74
35 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	75
36 ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (CDCl_3 , 100 MHz)	76
37 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B	77
38 DEPT 90 และ DEPT 135 องศาของสารประกอบ B	78
39 COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B	79
40 HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ B	80
41 HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ B	81
42 Mass Spectrum ของสารประกอบ B	82
43 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H3.4.1 (CHCl_3)	83
44 FT IR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H3.4.5 (CHCl_3)	84

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขของทุกประเทศ พบว่าปัจจุบันประเทศไทยมีอัตราการตายเนื่องจากโรคมะเร็งเป็นอันดับสองรองจากโรคหัวใจ ในเพศหญิงมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านม เป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก ส่วนเพศชายมีอัตราการเกิดโรคมะเร็งหลอดคอ หลอดลมและปอดสูงกว่ามะเร็งชนิดอื่น ๆ ดังแสดงในตาราง 1 และ 2 (Ramathibodi Cancer Registry. 1999 : 8-12)

มะเร็งเป็นกลุ่มโรคที่มีการเจริญของเซลล์ หรือเนื้อเยื่ออย่างผิดปกติซึ่งอาจปรากฏเป็นตุ่ม โต ก้อนที่งอกออกมาเป็นเนื้องอก โดยทั่วไปเนื้องอกดังกล่าวนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ (เอมอร์ โสมนะพันธุ์. 2534 : 202)

1. เนื้องอกชนิดธรรมดา (benign tumour) เป็นเนื้องอกที่มีลักษณะเป็นก้อนชัดเจน สามารถผ่าตัดออกได้และไม่เกิดขึ้นอีก
2. เนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tumour) ซึ่งเรียกว่ามะเร็ง (cancer) เป็นเนื้องอกที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และสามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ เป็นอันตรายถึงชีวิต

โรคมะเร็งเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ สารก่อมะเร็ง (carcinogen) สารร่วมก่อมะเร็ง (cocarcinogen) สารส่งเสริมมะเร็ง (tumour promoter) การติดเชื้อไวรัส การได้รับรังสี การสูบบุหรี่ การดื่มเหล้าและพันธุกรรม เป็นต้น (ไมตรี สุทธิจิตต์. 2541 : 78)

โรคมะเร็งสามารถรักษาให้หายขาดได้ถ้าค้นพบในระยะเริ่มแรก ซึ่งการรักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันโดยทั่วไปใช้ 4 วิธีคือ

1. การผ่าตัด (surgery) เป็นวิธีหลักที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เพราะการผ่าตัดจะเข้ามาเกี่ยวข้องกับการรักษามะเร็งเกือบทุกชนิด ยกเว้นมะเร็งเม็ดเลือด การรักษาด้วยวิธีนี้จะมีผลในกรณีที่มะเร็งมีขอบเขตจำกัด ยังไม่แพร่กระจาย เป็นวิธีการรักษาโดยการผ่าตัดเอาส่วนของก้อนมะเร็งออกไป (Eilber. 1985 : 7-8)

2. การใช้รังสีรักษา (radiotherapy) เป็นการรักษาในกรณีที่มะเร็งอยู่เฉพาะที่โดยวิธีการฉายรังสีเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็ง พบว่าพยาธิวิทยาของเซลล์มะเร็งมีบทบาทต่อผลการรักษาด้วย มะเร็งบางชนิดจะตอบสนองดีต่อการรักษาในวิธีนี้เช่น มะเร็งหลังโพรงจมูก มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น ข้อควรระวังในการใช้รังสีรักษาคือจะมีผลต่ออวัยวะข้างเคียงเช่น ตับ ไต ประสาทไขสันหลัง เป็นต้น (Parker. 1985 : 14-20)

3. การใช้สารเคมีบำบัด (chemotherapy) เป็นการรักษาในกรณีที่มีมะเร็งอยู่ในระยะแพร่กระจาย เคมีบำบัดมีสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งได้มากกว่าเซลล์ปกติ โดยการเข้าไปขัดขวางหรือทำลายการทำงานของเอนไซม์หรือสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้าง DNA ของเซลล์ อย่างไรก็ตาม ยาแต่ละชนิดมีผลต่อเซลล์มะเร็งแตกต่างกันและมักเกิดผลข้างเคียงอีกด้วย ดังนั้นจึงมักใช้ร่วมกับการรักษาวิธีอื่นๆ เช่น ใช้เป็นการรักษาเสริมร่วมกับการผ่าตัด เป็นต้น ปัจจุบันการรักษาด้วยเคมีบำบัดนิยมใช้ยาหลายชนิดมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาและลดการดื้อยาของเซลล์มะเร็งอีกด้วย (เรวัต พันธุ์เขียวและวรชัย รัตนธรร. 2538 : 31-34)

4. การรักษาโดยใช้ระบบภูมิคุ้มกัน (immunotherapy) เป็นการนำสารชีวภาพมาใช้ในการรักษาเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันออกมาต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งส่วนมากมักจะใช้ร่วมกับการใช้เคมีบำบัดเพื่อลดผลข้างเคียงของเคมีบำบัดและเมื่อเพิ่มขนาดของยาจะสามารถรักษาโรคได้ดีขึ้น (Monton and Giuliano. 1985 : 113-114)

การรักษามะเร็งในแต่ละวิธีมีข้อจำกัด ดังนั้นจึงได้ใช้หลายวิธีผสมผสานกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้ดีขึ้นเรียกว่า multimodalities treatment เช่น การผ่าตัดร่วมกับการใช้รังสีรักษา การผ่าตัดร่วมกับการใช้เคมีบำบัด หรือใช้ทั้ง 4 วิธีดังกล่าวมาข้างต้นร่วมกัน เป็นต้น (สมิตรา ทองประเสริฐ. 2536 : 4) ปัจจุบันได้นำการรักษามะเร็งด้วยวิธี hyperthermia เป็นการรักษาโรคมะเร็งด้วยความร้อน โดยเพิ่มอุณหภูมิของเซลล์มะเร็งให้สูงถึง 41-45 °C ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ร่วมกับการผ่าตัด รังสีรักษาและเคมีบำบัด (Raaphorst. 1990 : 10-11)

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจในการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชนานาชนิด นับตั้งแต่พืชชั้นต่ำพวกไลเคน (lichens) จนถึงพืชชั้นสูง ในการศึกษาสารต้านมะเร็งจากธรรมชาตินั้น สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute : NCI) ได้ให้นิยามเพื่อแบ่งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ในระดับต่างๆดังนี้ (เอมอร์ โสมนะพันธ์. 2534 : 206)

1. สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic agents) หมายถึงสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (*in vitro*)
2. สารต้านเนื้องอก (antitumour หรือ antineoplastic agents) หมายถึงสารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกและมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
3. สารต้านมะเร็ง (anticancer agents) หมายถึงสารที่ให้ผลต้านมะเร็งในการทดลองขั้นคลินิกในคนเท่านั้น (human clinic trials)

ตาราง 1 ชนิดของมะเร็งที่พบบ่อยในเพศชาย

ชนิด	จำนวน (คน)	ร้อยละ
Trachea, Bronchus & Lung	145	13.45
Hematopoietic & R.E. System	134	12.43
Liver & Intrahepatic Bile Ducts	117	10.85
Colon	71	6.59
Unknown Primary Site	49	4.55
Nasopharynx	44	4.08
Brain	43	3.99
Urinary bladder	38	3.53
Prostate gland	38	3.53
Skin	38	3.53
Larynx	37	3.43
Esophagus	34	3.15

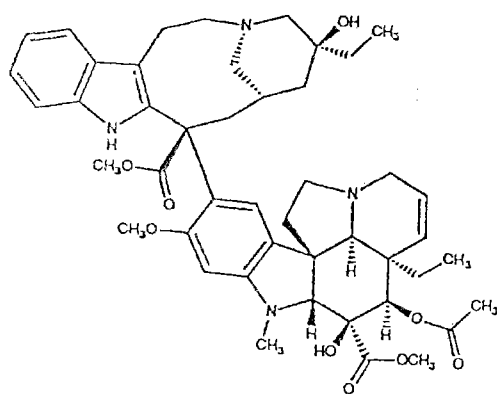
ที่มา : Ramathibodi Cancer Registry . 1999.

ตาราง 2 ชนิดของมะเร็งที่พบบ่อยในเพศหญิง

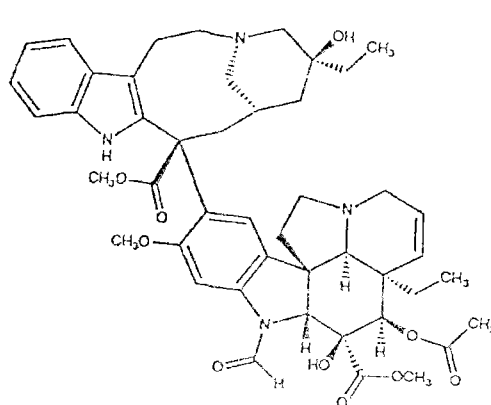
ชนิด	จำนวน (คน)	ร้อยละ
Female Breast	384	23.15
Cervix uteri	237	15.77
Hematopoietic & R.E. system	102	6.79
Ovary, Fallopian tube & Broad ligament	81	5.39
Trachea, Bronchus & Lung	74	4.92
Thyroid gland	70	4.66
Colon	56	3.72
Brain	55	3.66
Liver & Intrahepatic Bile Ducts	52	3.46
Unknown Primary Site	51	3.39

ที่มา : Ramathibodi Cancer Registry . 1999.

การนำเอาสมุนไพรมาใช้รักษาโรคมะเร็งมีมานานแล้ว พบว่ามีพืชที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งในยาพื้นบ้านมากกว่า 1,400 สกิลด้วยกัน (เอมอร์ โสมนะพันธ์. 2534 : 204) เช่น แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* G. Don) เมื่อนำมาสกัดจะได้ alkaloid 2 ชนิดคือ vinblastine และ vincristine ใช้ในการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 1 (Haskell. 1980 : 75-78)



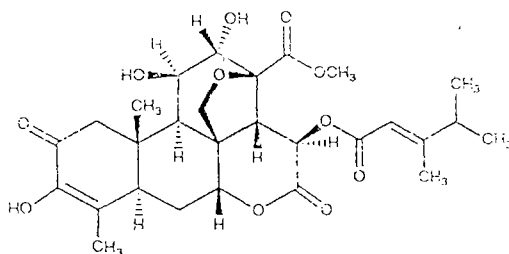
vinblastine



vincristine

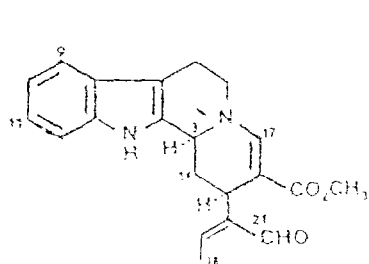
ภาพประกอบ 1 สูตรโครงสร้างของ vinblastine และ vincristine

นอกจากนี้ bruceantin เป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Brucea antidysenterica* อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเนื้องอกในกระต่ายได้ (Liao, et al. 1976 : 167-176) สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 2

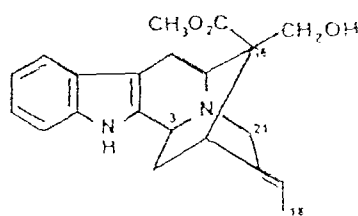


ภาพประกอบ 2 สูตรโครงสร้างของ bruceantin

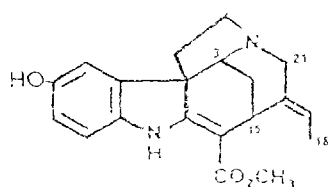
จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของ alkaloids จากใบและรากของ *Rhazya stricta* (Apocynaceae) โดยนำใบและรากแห้งของพืชดังกล่าวมาสกัดด้วย methanol หลังจากนั้นจึงนำสารที่สกัดได้มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ พบ indole alkaloids 4 ชนิดคือ vallesiachotamine polyneuridine sewarine และ tetrahydrosecamine เมื่อนำ tetrahydrosecamine ไปเตรียมอนุพันธ์ได้ alkaloid 3 ชนิดคือ tetrahydrosecaminediol tetrahydrosecaminediol diacetate และ didemethoxycarbonyl tetrahydrosecamine สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 3



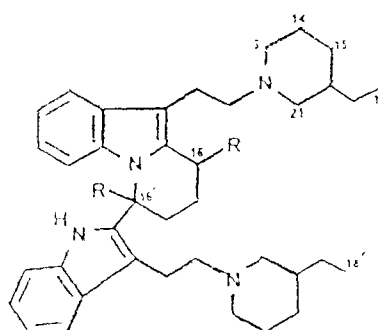
vallesiachotamine



polyneuridine



sewarine



tetrahydrosecamine R = CO_2CH_3

tetrahydrosecaminediol R = CH_2OH

tetrahydrosecaminediol diacetate R = CH_2OAc

didemethoxycarbonyl tetrahydrosecamine R = H

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของ alkaloids ที่พบในใบและรากของ *Rhazya stricta*

เมื่อนำ alkaloids ทั้ง 7 ชนิดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB (human epidermoid carcinoma of the floor of the mounth) และ P388 ในหลอดทดลองพบว่า สารดังกล่าวแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง ยกเว้น polyneuridine ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ค่า ED_{50} (effective dose) แสดงในตาราง 3 (Mukhopadhyay, et al. 1981 : 696-700)

ตาราง 3 ค่า ED₅₀ ของ alkaloids จากใบและรากของ *Rhazya stricta* ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ P388

Alkaloids	<i>In vitro</i>	
	KB results	P388 results
	ED ₅₀ (µg/mL)	ED ₅₀ (µg/mL)
Vallesiachotamine	3.56	1.1
Polyneuridine	>100	>100
Sewarine	-	2.7
Tetrahydrosecamine	0.69	0.40
Tetrahydrosecaminediol	0.0038	0.33
Tetrahydrosecaminediol diacetate	2.40	1.60
Didemethoxycarbonyl tetrahydrosecamine	0.50	0.29

การศึกษาฤทธิ์ของสารประกอบที่แยกได้จากต้นจำปีป่า (*Paramichelia baillonii*) พบว่า dihydroparthenoline และ (-)-parthenolide มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเนื้องอก ส่วนสาร (-)-bisparthenolidine มีฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง KB ซึ่งมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 0.73 µg/mL (อาทร รวีไพบูลย์. 2530 : บทคัดย่อ)

การศึกษาฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกของนมผึ้ง โดยการปลูกเซลล์มะเร็งปากมดลูกลงในหนูโกรน (nude mice) แล้วแบ่งหนูโกรนออกเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่น 10 mg / น้ำหนักตัว 1 kg / วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนนมผึ้ง 100 mg / น้ำหนักตัว 1 kg / วัน

กลุ่มที่ 3 ป้อนนมผึ้ง 1000 mg / น้ำหนักตัว 1 kg / วัน

หลังจากป้อนหนูทั้ง 3 กลุ่มวันละครั้งเป็นเวลา 60 วัน พบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งช้าลงกว่ากลุ่มควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับนมผึ้งแล้วพบว่า กลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับนมผึ้งมากกว่ามีฤทธิ์ด้านมะเร็งปากมดลูกสูงกว่ากลุ่มที่ 2 (เทอดชัย ดีสมเลิศ และ เทอดศักดิ์ ศรีสุระพัตร. 2533 : บทคัดย่อ)

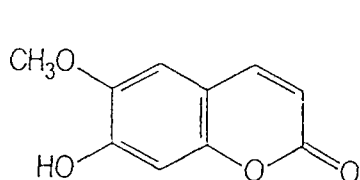
การสกัดและแยกสารจากเปลือกของต้นโศกพม่า (*Polyalthia longifolia* Thw.) พบสารประเภท clerodane diterpenes 3 ชนิดได้แก่ 16 α -cleroda-3,13(14) Z-dien-15,16-olide kolavenic acid และ polyalthial acid เมื่อนำสารประกอบทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด A-549 (human lung carcinoma) MCF-7 (human breast carcinoma)

HT-29 (human colon adenocarcinoma) พบว่าสาร clerodane diterpenes เหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งดังกล่าว ค่า ED_{50} แสดงในตาราง 4 (Zhao, et al. 1991 : 380-383)

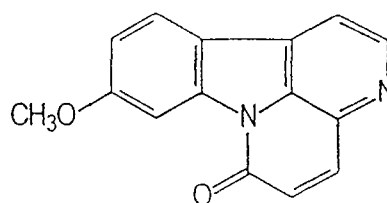
ตาราง 4 ค่า ED_{50} ของสาร clerodane diterpenes ที่ได้จากเปลือกต้นนอโตกพม่าที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง A-549 MCF-7 และ HT-29

Compounds	Cell lines ED_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	A-549	MCF-7	HT-29
16 α -cleroda-3,13(14) Z -dien-15,16-olide	2.97	2.15	1.91
kolavenic acid	3.34	1.81	1.39
polyalthial acid	0.68	0.55	0.75

นอกจากนี้ polysaccharide ที่สกัดได้จากเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกเซลล์มะเร็งในหนูโกรน (ปริญญญา รัตนพิมาน. 2534 : บทคัดย่อ) สาร lentinan ที่สกัดได้จากเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งชนิด sarcoma และกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง (Chihara, et al. 1969 : 689) จากการศึกษาสารสกัดจากรากของต้นปลาไหลเผือก (*Eurycoma longifolia* Jack) พบสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด P388 สูตรโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 4 และค่า ED_{50} แสดงในตาราง 5 (Kanchanapoom. 1996 : 96)



scopoletin



9-methoxycanthin-6-one

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของ scopoletin และ 9-methoxycanthin-6-one

ตาราง 5 ค่า ED₅₀ ของสารสกัดจากรากของต้นปลาไหลเผือกที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388

Compounds	ED ₅₀ (µg/mL)
Hexane extract	15.50
Chloroform extract	19.16
Methanol extract	19.58
Scopoletin	4.94
9-Methoxycanthin-6-one	2.21

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิด P388 KB MCF-7 และ HeLa ของน้ำสกัดจากใบชาสำเร็จรูป 4 ตัวอย่างคือ Superior Three Horse Ra-ming Nok Nang-nual และ Suang Sea และใบชาสด 2 ตัวอย่างคือ ใบชาสดเก็บจากจังหวัดตากและใบชาสดเก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเหล่านี้ต่อเซลล์มะเร็งดังกล่าวในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดจากใบชาสำเร็จรูปทุกตัวอย่างและใบชาสดเก็บจากจังหวัดตากมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งชนิด P388 ค่า ED₅₀ แสดงใน ตาราง 6 (Wattanasillapapreecha. 1998 : 48-52)

ตาราง 6 ค่า ED₅₀ ของสารสกัดจากใบชาชนิดต่าง ๆ ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

ชนิดของชา	Cell line ED ₅₀ (µg/mL)			
	P388	KB	MCF-7	HeLa
Superior Three Horse	3.4	27.9	29.2	34.0
Ra-ming	4.4	28.3	32.3	37.7
Nok Nang-nual	4.7	29.2	43.3	41.3
Suang Sea	6.5	27.9	28.8	40.0
ใบชาสดเก็บจากจังหวัดตาก	5.6	27.1	29.1	29.6
ใบชาสดเก็บจากจังหวัดเชียงใหม่	41.6	20.8	27.1	29.1

เหง้าพุทธรักษาเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตำรับยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งของแพทย์แผนโบราณตำรับหนึ่งซึ่งมีปริมาณมากกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ถึง 10 เท่าโดยน้ำหนัก มีผู้นำพืชสมุนไพรตำรับนี้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB พบว่าสมุนไพรตำรับนี้มีค่า ED₅₀ สูงกว่า 30 µg/mL และเมื่อนำสมุนไพรตำรับนี้มาทดลองกับหนูพบว่าสามารถยืดอายุของหนูกลุ่มที่เป็นมะเร็งได้ (Pornsiriprasert. 1986 : abstract) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำเหง้าพุทธรักษามาศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่การศึกษาในคนต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดต่าง ๆ ที่ได้จากเหง้าพุทธรักษา
2. เพื่อศึกษาวิธีการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลักและการทำสารให้บริสุทธิ์
3. เพื่อวิเคราะห์หาสูตร โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการแยกสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและ/หรือสารที่เป็นองค์ประกอบหลักที่สกัดจากเหง้าพุทธรักษา

2. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดต่าง ๆ ต่อเซลล์มะเร็งและอาจเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ในอนาคต
3. ได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์มากขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

1. สกัดสารจากเหง้าแห้งของพุทธรักษาดอกสีแดง
2. ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารคือ hexane และ ethanol ตามลำดับ
3. การแยกและทำให้สารบริสุทธิ์ใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography techniques) และการตกผลึก
4. ศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy techniques)
5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ใช้เซลล์มะเร็ง P388 ที่เลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง

นิยามศัพท์เฉพาะ

P388 หมายถึงเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (mouse lymphocytic leukemia) เป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่ติดแก้ว (cell suspension)

ED₅₀ หมายถึงค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง ที่ทำให้เซลล์มะเร็งที่เลี้ยงไว้ในกลุ่มทดลองตายเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/mL)

บทที่ 2

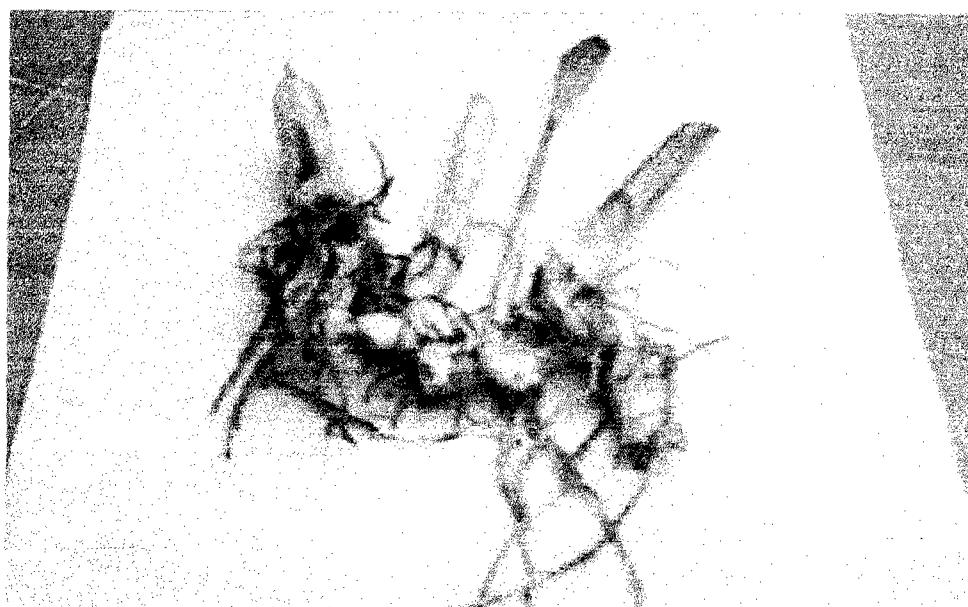
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พุทธรักษามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Canna indica* Linn. อยู่ในวงศ์ Cannaceae สกุล *Canna* มีชื่ออื่นที่เรียกกันตามความแตกต่างของท้องถิ่นคือ มุยหยิ่งเจีย กวางอิมเกีย เขียวปาเจีย (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธและคณะ. 2522 : 121) Butsarana Indian Shot (วิทย์ เทียงบุรณธรรม. 2542 : 567) พุทธรศ บัวหลวง (วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540 : 324) พุทธรักษาเป็นไม้ล้มลุก เนื้ออ่อน มีลำต้นใต้ดิน (เหง้า) สูงประมาณ 1 m ใบใหญ่รูปรียาว 10-30 cm ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ดอกออกเป็นช่ออาจเป็นดอกเดี่ยวหรือดอกคู่มีกลีบก่อนกลีบเลี้ยง 1 ใบ ยาวประมาณ 1-2 cm กลีบเลี้ยงมี 3 กลีบยาวประมาณ 1 cm มีสีเขียวอ่อนปลายแหลมมีสีแดง กลีบดอกเล็กเรียวยาวมีสีแดง ส่วนโคนติดกันเป็นหลอดยาวประมาณ 1 cm ส่วนปลายแยกเป็น 3 กลีบ ปลายแหลมยาวประมาณ 3 cm ผลมีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 cm มีหนามไม้แข็งอยู่ภายนอก ดังแสดงในภาพประกอบ 5 และ 6 (Bailey, et al. 1969 : 290-292) พุทธรักษาเป็นพรรณไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย แอฟริกาและอเมริกา ต่อมาจึงขยายพันธุ์ไปยังประเทศเอเชียเขตร้อนโดยนำไปปลูกเป็นไม้ประดับ (วิทย์ เทียงบุรณธรรม. 2542 : 568)

พุทธรักษาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น เหง้าพุทธรักษาใช้รักษาโรคตับอักเสบอย่างเฉียบพลันโดยใช้เหง้าสด 60-120 g ต้มดื่มวันละสองเวลาคือเช้าและเย็นติดต่อกัน 20 วัน ซึ่งมีคนไข้เข้าทำการรักษา 63 ราย พบว่ารักษาหาย 58 ราย มีอาการดีขึ้น 3 รายและไม่เห็นผล 2 ราย (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. 2529 : 57) นอกนั้นยังนำมาผสมกับข้าวเย็นจีน สมอไทย หนุ่ยางวงช้าง ไพร ขิง กะทือ ชิงช้าชาลี ต้มดื่มบรรเทาอาการโรคเบาหวาน (นักรบ ปิณشري. 2529 : 107) ดอกพุทธรักษานำมาบดและพอกบนบาดแผลเพื่อห้ามเลือด รักษาแผลมีหนอง ส่วนเหง้ายังใช้เป็นยาบำรุงปอด แก้วโรค แก้อาเจียนเป็นเลือดและแก้บิดเรื้อรัง (วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2542 : 561-562) ในอินเดียเมื่อสัตว์เลี้ยงที่กินหญ้าพิษเข้าไป จะเอาน้ำต้มจากก้านใบพุทธรักษาผสมกับข้าวและพริกไทยให้สัตว์เลี้ยงกินแก้พิษ นอกจากนั้นยังใช้เหง้าพุทธรักษาเพื่อขับเหงื่อ ปัสสาวะและในคนป่วยที่มีอาการไข้และอาการบวมหน้า ส่วนในชาวใช้น้ำคั้นจากเหง้าพุทธรักษาแก้อาการท้องร่วง (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธและคณะ. 2522 : 124)

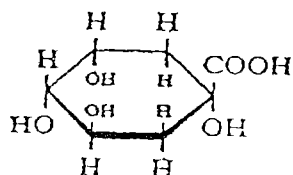


ภาพประกอบ 5 ต้นพุทธรักษาดอกสีแดง

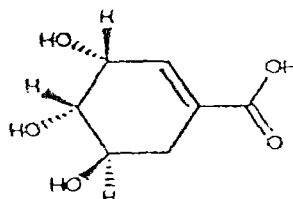


ภาพประกอบ 6 เหง้าพุทธรักษาดอกสีแดง

โยชิตะ ทาซากิและมินามิกาวา (Yoshida, Tazaki & Minamikawa. 1975 : 195-197) ได้สำรวจพืชดอก (angiosperms) 83 ชนิด ซึ่งมี *Canna generalis* Bailey อยู่ในวงศ์ Cannaceae เป็นพืช 1 ใน 83 ชนิดที่สำรวจ เมื่อนำใบสดมาสกัดด้วย 80% aq. EtOH และแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบว่ามี quinic acid 0.11 mg / น้ำหนักใบสด 1 g และ shikimic acid 0.04 mg / น้ำหนักใบสด 1 g สูตรโครงสร้างของสารทั้ง 2 แสดงในภาพประกอบ 7



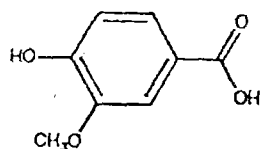
quinic acid



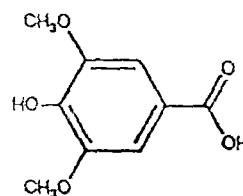
shikimic acid

ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของ quinic acid และ shikimic acid

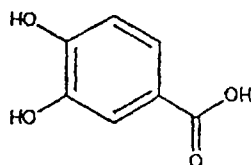
เมอร์ ดาเนียนและสับนิส (Merh, Daniel & Sabnis. 1986 : 835-839) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืช 39 ชนิด จัดอยู่ใน 7 วงศ์ ซึ่งมีพืชในวงศ์ Cannaceae 2 ชนิดรวมอยู่ด้วยคือ *Canna indica* Linn. และ *Canna flaccida* Rosc. การสกัดสารจากใบของ *Canna indica* Linn. พบสาร phenolic acids 4 ชนิดคือ vanillic acid syringic acid protocatechuic acid และ p-hydroxybenzoic acid มีโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 8 และการสกัดสารจากใบของ *Canna flaccida* Rosc. พบสาร phenolic acids 7 ชนิดคือ vanillic acid p-hydroxybenzoic acid gentisic acid melilotic acid p-coumaric acid ferulic acid และ chlorogenic acid มีโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 9



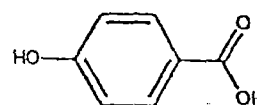
vanillic acid



syringic acid

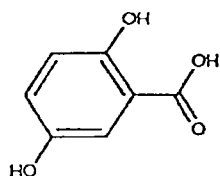


protocatechuic acid

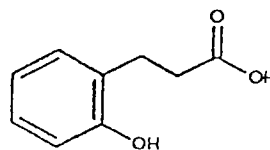


p-hydroxybenzoic acid

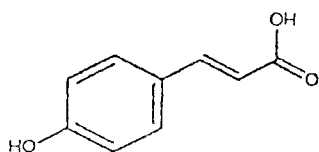
ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่พบในใบของพุทธรักษา



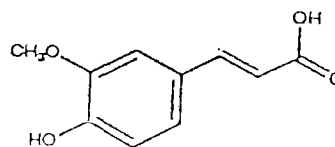
gentisic acid



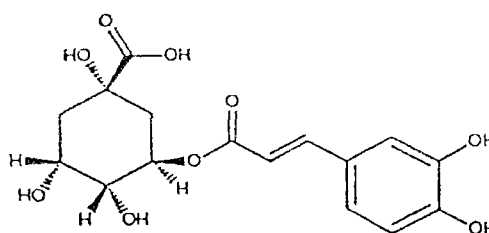
melilotic acid



p-coumaric acid



ferulic acid

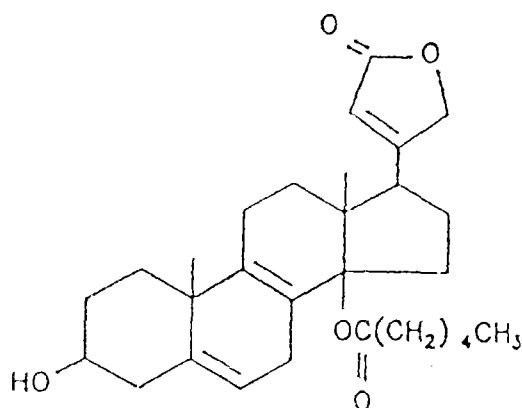


chlorogenic acid

ภาพประกอบ 9 สูตรโครงสร้างของสารประกอบบางชนิดที่พบในใบของ
Canna flaccida Rosc.

โฮลด์วอร์ท (Holdsworth. 1990 : 209-218) ได้ศึกษาพืชสมุนไพรพื้นเมืองที่อยู่ในหมู่
เกาะคุก มีการใช้ส่วนรากของพุทธรักษา รากของ *Phymatosorus scolopendria* รากของ
Phymatosorus nigrescens ยอดของ *Cordylin terminalis* ปล้องของอ้อยและเนื้อมะพร้าวห้าวมา
ผสมเข้าด้วยกันใช้เป็นยาระบาย ส่วนใบของพุทธรักษาใช้เป็นยาบรรเทาอาการปวดหลัง

โมตาเว (Motawe. 1994 : 3 –10) ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพุทธรักษาที่แสดงฤทธิ์ในการทำลายหอยทากชนิด *Biomphalaria alexandrina* พบว่าสารสกัดจากส่วนรากของพุทธรักษา มีฤทธิ์ในการทำลายหอยทากมากกว่าสารสกัดส่วนอื่น ๆ ของพุทธรักษา ค่า LD_{50} ของสารสกัด ether และสารสกัด chloroform เท่ากับ 110 ppm และ 160 ppm ตามลำดับ ส่วนสารสกัด ether จากพืชทั้งต้น เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้ chlorophyll และ cannagenin ซึ่งเป็นสารประกอบชนิดใหม่ที่ประกอบด้วย β -unsaturated และ 5-member lactone ring มีโครงสร้างแสดงในภาพประกอบ 10 เมื่อนำ cannagenin และ chlorophyll ไปทดสอบฤทธิ์ในการทำลายหอยทากพบว่าสารทั้งสองนี้มีค่า LD_{50} สูงกว่า 1,000 ppm แต่เมื่อนำ cannagenin และ chlorophyll มาผสมกันจะมีฤทธิ์ในการทำลายหอยทากสูงกว่าเดิมโดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 1.1 ppm และ 11 ppm ตามลำดับ



ภาพประกอบ 10 สูตรโครงสร้างของ cannagenin

ดลัด พรศิริประเสริฐ (Pornsiriprasert. 1986 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของพืชสมุนไพรตำรับหนึ่งซึ่งประกอบด้วยพืช 5 ชนิดได้แก่ ไฟเดื่อนห้า (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell) หญ้าปักไก่ดำ (*Polygala chinensis* Linn.) พุทธรักษา (*Canna indica* Linn.) ข้าวเย็นเหนือ (*Similax corburia* Kunth) และต้นลิ้นงูเห่า (*Climacanthus siamensis* Brem) โดยนำสารสกัดด้วยน้ำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งในหลอดทดลองและหนูขาว ผลการทดสอบพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรกับเซลล์มะเร็ง KB มีค่า ED_{50} สูงกว่า 30 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนในหนูขาวที่เป็นมะเร็งเต้านม โดยให้สารก่อมะเร็งชนิด 7,12 – Dimethylbenzanthracene (7,12-DMBA) จำนวน 130 mg/kg ครั้งเดียว ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดและยืดอายุของหนูได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพร

เกศรา ณ บางช้าง (Na Bangchang. 1987 : abstract) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชสมุนไพรตำรับหนึ่งที่ประกอบด้วยพืช 5 ชนิดได้แก่ เหง้าพุทธรักษา ต้นไฟเดือนห้า หญ้าปึกไก่ดำ ต้นลิ้นงูเห่า ข้าวเย็นเหนือ และประกอบด้วยสัตว์อีก 5 ชนิด ได้แก่ เกล็ดนึ่งม (*Manis javanica* Desmarest) ขนเม่น (*Hystrix blachyura* Linn.) กระดองเต่า (*Damonia subtrijuka* Boulenger) เจริญปลากกระเบน (*Dasyatis* ssp) และอกตะพานน้ำ (*Trionix cartilagineus* Boulenger) และยังมีครูดักน้ำประกอบอยู่ด้วย จากการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองและหนูทดลองพบว่าน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ KB ในหลอดทดลอง ค่า ED_{50} สูงกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนการทดลองกับหนูที่เป็นมะเร็งเต้านมโดยให้สารก่อมะเร็ง 7,12-DMBA พบว่าเมื่อหนูทดลองได้รับน้ำสกัดยาสมุนไพรทุกวันๆ ละ 1,500 mg/kg ของน้ำหนักตัว สามารถยับยั้งการเจริญของก้อนมะเร็งได้ในช่วง 4 สัปดาห์แรก มีผลช่วยยืดอายุ และเพิ่มอัตราการอยู่รอดของหนูทดลองนี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับน้ำยาสมุนไพร

สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่ประกอบด้วยพืช 5 ชนิดและสัตว์ 5 ชนิดตามที่ เกศรา ณ บางช้างนำมาศึกษา (Na Bangchang. 1987 : abstract) พบว่า สมุนไพรตำรับนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ปลูกถ่ายในหนูโกรน และจากผลการศึกษาทางระบบภูมิคุ้มกันพบว่าการเพิ่มความสามารถในการทำงานของ Natural Killer cells (NK cells) ต่อการทำลาย Yac-Cell (Lymphoma Cells) ในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งการเติบโตของสารสกัดนี้อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ NK cell

เพียงเพ็ญ ธิโสดา (Thisoda. 1995 : abstract) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรตำรับที่สุจิตรา วิวัฒน์วิทยา นำมาศึกษา (Wiwatwithaya. 1992 : abstract) โดยนำสมุนไพรตำรับนี้มาศึกษาฤทธิ์ต่อการทำงานของ NK cells ในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเต้านม โดยให้ผู้ป่วยรับประทานน้ำสกัดจากสมุนไพรตำรับนี้นาน 2 สัปดาห์ พบว่าความสามารถของ NK cells ในการทำลายเซลล์มะเร็งเป้าหมายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

พืชที่ใช้ในการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือส่วนเหง้าของต้นพุทธรักษาดอกแดงที่ได้จากคลินิก นายแพทย์ สมหมาย ทองประเสริฐ อำเภอเมือง จังหวัดสิงห์บุรี ได้ผ่านการตรวจสอบเอกลักษณ์ โดย คุณณรงค์ นันทแสน นักวิชาการ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ถนนพหลโยธิน กรุงเทพมหานคร

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการวิจัย

ใช้เซลล์มะเร็ง P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด ได้จากห้องปฏิบัติการงานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา

สารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ acetone chloroform ethanol ethyl acetate hexane และ methanol ตัวทำละลายเหล่านี้ผ่านการกลั่นก่อนนำมาใช้
2. anisaldehyde (E.Merck, AR grade)
3. conc. sulfuric acid (E.Merck, AR grade)
4. glacial acetic acid (E.Merck, AR grade)
5. silica gel สำหรับโครมาโทกราฟี
 - silica gel 60 (0.063-0.200 mm, E.Merck, AR grade)
 - silica gel 60 (< 0.063 mm, E.Merck, AR grade)
6. silica gel GF₂₅₄ สำหรับโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (E.Merck, AR grade)

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Precisa 240 A)
2. เครื่องบดสมุนไพร
3. คอลัมน์ขนาด 1.5 2 3.5 และ 10 cm
4. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)

5. Rotary evaporator (Buchi, R-114)
6. Freeze-Dryer (FTS Systems, FD-3-550-MP)
7. หลอดอัลตราไวโอเลต (Spectroline)
8. Infrared Spectrophotometer (Perkin Elmer FT-IR spectrum DX)
9. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker AM 400, 400MHz)
10. Mass Spectrometer (Finnigan MAT INCOS 50)

สารเคมีและอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารเคมี

1. Roswell Park Memorial Institute medium number 1640 (RPMI 1640 medium) (Bio-Whittaker)
2. Newborn Calf Serum (NCS) (E.Merck, AR grade)
3. 0.4% Trypan blue dye
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (E.Merck, AR grade)

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. ขวดเลี้ยงเซลล์ (aseptic flask) ขนาด 40 mL x 25 cm² (Corning)
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler, AE 240)
3. ตู้บ่ม (Shel-Lab. TC 2323)
4. กล้องจุลทรรศน์ Inverted Microscope (Olympus)
5. Hemacytometer (Boeco)

การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์

1. การสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา

1.1 นำเหง้าพุทธรักษาที่แห้งและบดละเอียด 10.80 kg มาแช่ใน hexane 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำไปแช่ใน hexane อีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมดแล้วระเหย hexane ออกโดยใช้ rotary evaporator ได้สารสกัด hexane (crude hexane) 29 g นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 11)

1.2 กากที่เหลือจากการสกัดด้วย hexane นำไปผึ่งให้แห้งแล้วนำไปแช่ใน ethanol 20 L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำสารละลายที่ได้มากรอง กากที่เหลือนำไปแช่ใน ethanol อีก 2 ครั้ง รวมสารสกัดทั้งหมดแล้วระเหย ethanol ออกโดยใช้ rotary evaporator ได้สารสกัด ethanol (crude ethanol) 55 g นำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ภาพประกอบ 11)

2. การแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์

เมื่อนำสารสกัด hexane และ ethanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แล้วพบว่า สารสกัดหยาบ hexane มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 มากกว่า สารสกัด ethanol ดังนั้นจึงนำสารสกัด hexane มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบ คอลัมน์ (column chromatography) โดยใช้อัตราส่วนสาร : ซิลิกาเจลประมาณ 1 : 25 ส่วนโดย น้ำหนัก (Pavia, et al. 1995 : 732) สะดวกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บสารละลายที่ผ่าน คอลัมน์ออกมาเป็นส่วน ๆ นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วย เทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน จะได้สารแต่ละกลุ่มที่มีขั้วใกล้เคียงกัน นำสารแต่ละกลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำส่วนที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมาแยกด้วย โครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ จากนั้นจึงนำสารที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทำ เช่นนี้ต่อไปจนได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและสารบริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 12-17)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์มะเร็ง P388 เป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงใน ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 40 mL มีพื้นที่ผิว 25 cm² โดยใช้ RPMI 1640 ผสมกับ 10% ของ NCS เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ ปรับค่า pH =7.0-7.2 เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้ป่นที่มี CO₂ 5% การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม stock cell suspension

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้อายุประมาณ 3-4 วันมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) โดยวิธีการย้อมสี (dye exclusion) ดังนี้

1.1 การย้อมสีเซลล์

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบา ๆ เพื่อให้เซลล์กระจายไปทั่วขวด ใช้ปิเปตต์ดูดเซลล์ จากขวดเลี้ยงมา 0.20 mL ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เติม 0.40 % trypan blue ลงไป 0.20 mL ผสมให้เข้ากันโดยใช้ pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบา ๆ ปล่อยให้ทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

1.2 การนับเซลล์

นำเซลล์ที่ย้อมสีแล้วไปหยดลงบน haemocytometer ซึ่งมี cover slide ปิดอยู่ แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงินของ trypan blue) คำนวณจำนวนเซลล์ที่นับได้

ตัวอย่างการคำนวณเซลล์ที่นับได้

$$\begin{aligned}
 &\text{ถ้าจำนวนเซลล์ที่นับได้ 1 chamber} &&= 200 \text{ เซลล์} \\
 &(\text{chamber} = 5 \text{ ช่องเล็ก}) \\
 &\text{ปริมาตร 1 ช่องเล็ก} &&= \text{ความยาว} \times \text{ความกว้าง} \times \text{ความลึก} \\
 & &&= 0.10 \text{ cm} \times 0.10 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm} \\
 & &&= 0.0001 \text{ mL} \\
 & &&= 1 \times 10^{-4} \text{ mL}
 \end{aligned}$$

แต่เซลล์ที่นับได้ถูกเจือจางด้วย trypan blue เป็น 2 เท่า

$$\begin{aligned}
 &\text{ดังนั้นจำนวนเซลล์ใน 1 chamber} &&= 200 \times 2 \text{ เซลล์} \\
 &\text{จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก (1 x 10}^{-4} \text{ mL)} &&= 200 \times 2/5 \text{ เซลล์} \\
 & &&= 80 \text{ เซลล์} \\
 &\text{ปริมาตร 1 mL มีเซลล์} &&= 80 \times 10^4 \text{ เซลล์} \\
 &\text{Dilution Number (D.N)} &&= 80 \times 10^4 / 5 \times 10^4 \\
 & &&= 16
 \end{aligned}$$

นั่นคือจะต้องเจือจาง cell suspension ที่เตรียมไว้ 16 เท่า ดังนั้นถ้าต้องการใช้เซลล์ปริมาณ 5×10^4 เซลล์ จะต้องใช้ cell suspension 1 mL ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 15 mL จะได้ stock cell suspension ที่มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. เตรียมสารตัวอย่าง

ซึ่งสารตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบกับเซลล์ 4 mg ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติม DMSO 0.1 mL ละลายสารตัวอย่างให้หมดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.90 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL}$ ในปริมาตร 4 mL

3. การเตรียมสารละลาย negative control

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

4. การเตรียมสารละลาย positive control

ใช้ micropipette ดูดสารละลาย 5-FU 5 μL ซึ่งมีเนื้อสารเท่ากับ 250 μg ใส่หลอดทดลอง เติม 2.50 % DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จำนวน 5 mL ได้สารที่มีความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ เจือจางต่อไปจนได้ความเข้มข้น 4 $\mu\text{g/mL}$ นำสารละลายนี้มา 1 mL ใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มี cell suspension 4×10^4 เซลล์/mL จำนวน 3 mL นำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO_2 5% ที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 4 วัน

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมสารตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2 ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยง negative control (เป็น solvent control) stock cell suspension ให้ได้ความเข้มข้นของสารที่จะทดสอบตามความต้องการ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 4 วัน แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 2 ครั้ง

ตาราง 7 ตัวอย่างการเตรียมสารเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

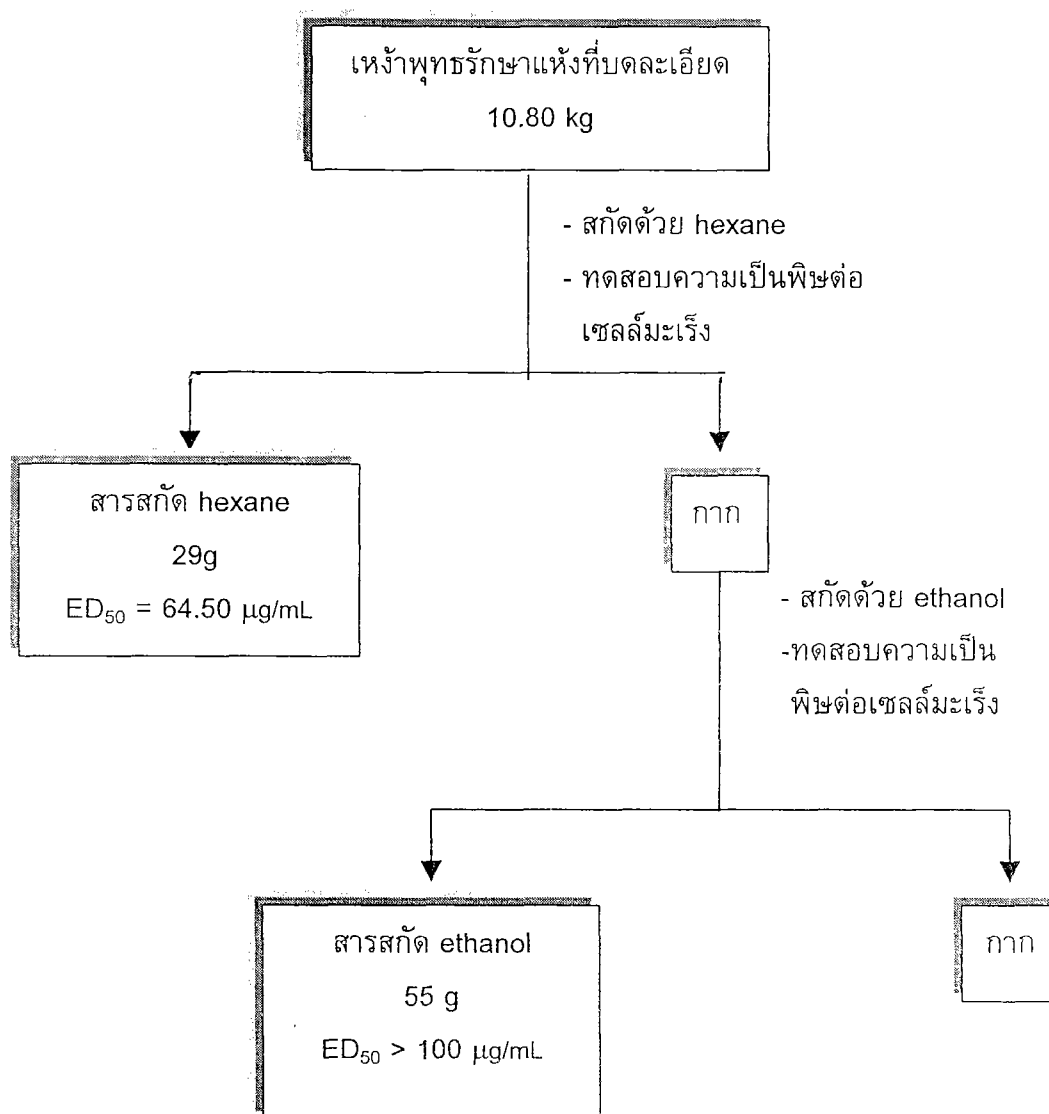
ความเข้มข้นของ สารตัวอย่าง ($\mu\text{g/mL}$)	อาหาร เลี้ยงเซลล์ (mL)	สารตัวอย่าง (mL)	solvent control (mL)	cell suspension (mL)	final volume (mL)	DMSO %
0	3	0.00	1.00	1	5	0.50
10	3	0.05	0.95	1	5	0.50
30	3	0.15	0.85	1	5	0.50
50	3	0.25	0.75	1	5	0.50
100	3	0.50	0.50	1	5	0.50

6. การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสาร

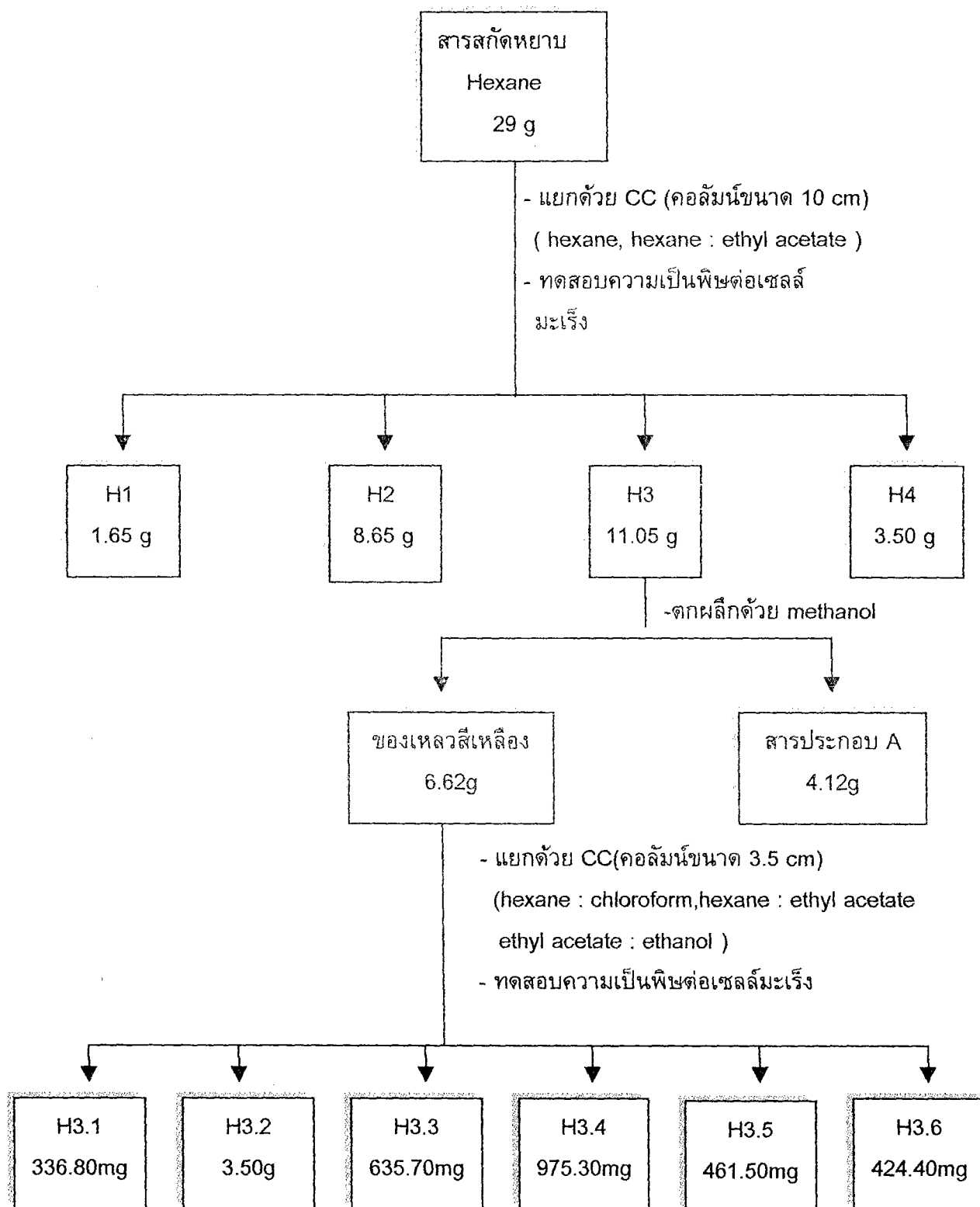
นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 และ 4 วัน ภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากผลที่นับได้นำมาหาความเป็นพิษของสารตัวอย่างต่อเซลล์มะเร็ง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งคำนวณได้จากสมการ (1) ดังนี้

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

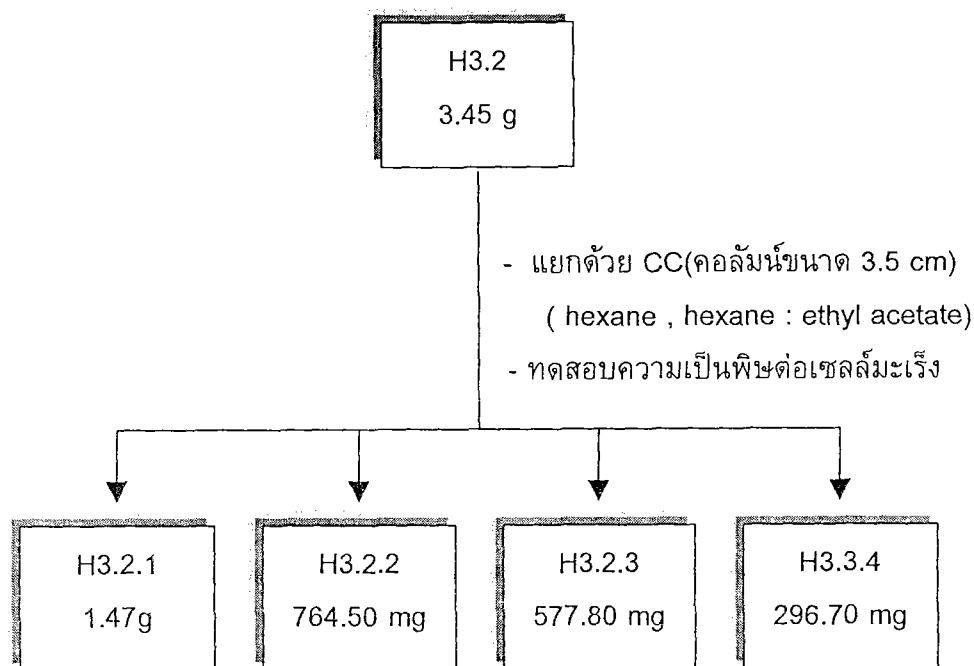
7. ค่า ED_{50} หาได้จากการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 ซึ่งคำนวณจากสมการ 1 (แกนตั้ง) กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารตัวอย่าง (แกนนอน) บนกระดาษกราฟปกติ จากกราฟอ่านค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่ง



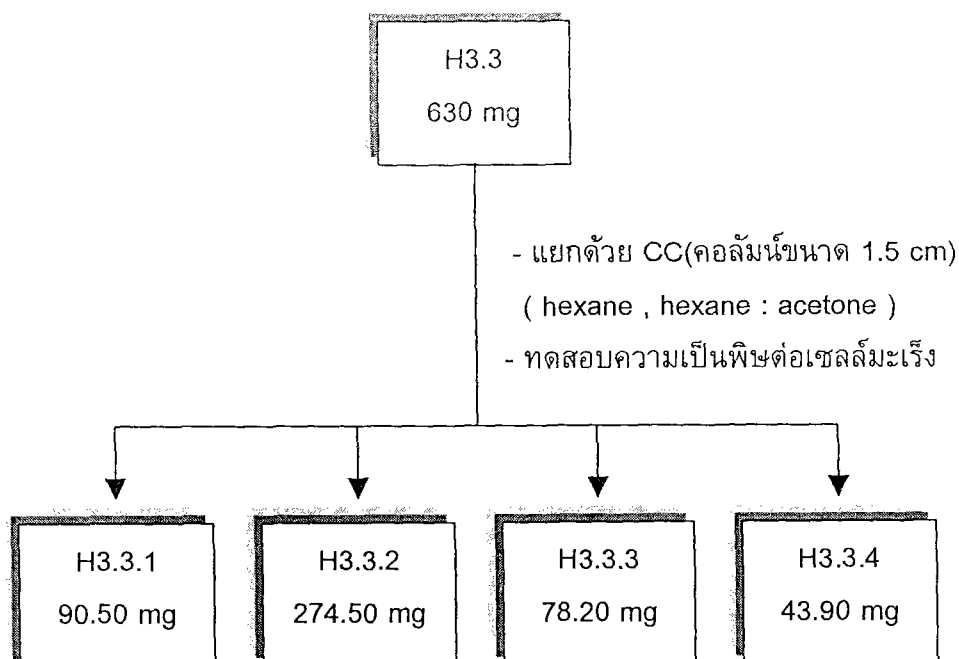
ภาพประกอบ 11 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา



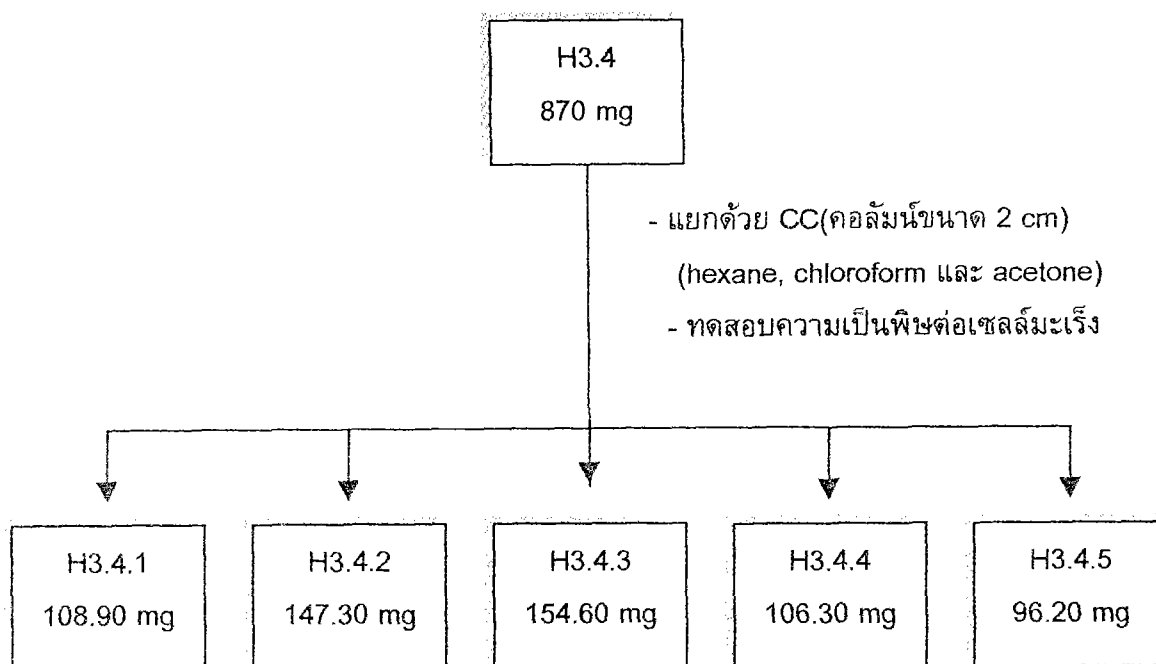
ภาพประกอบ 12 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารสกัด hexane



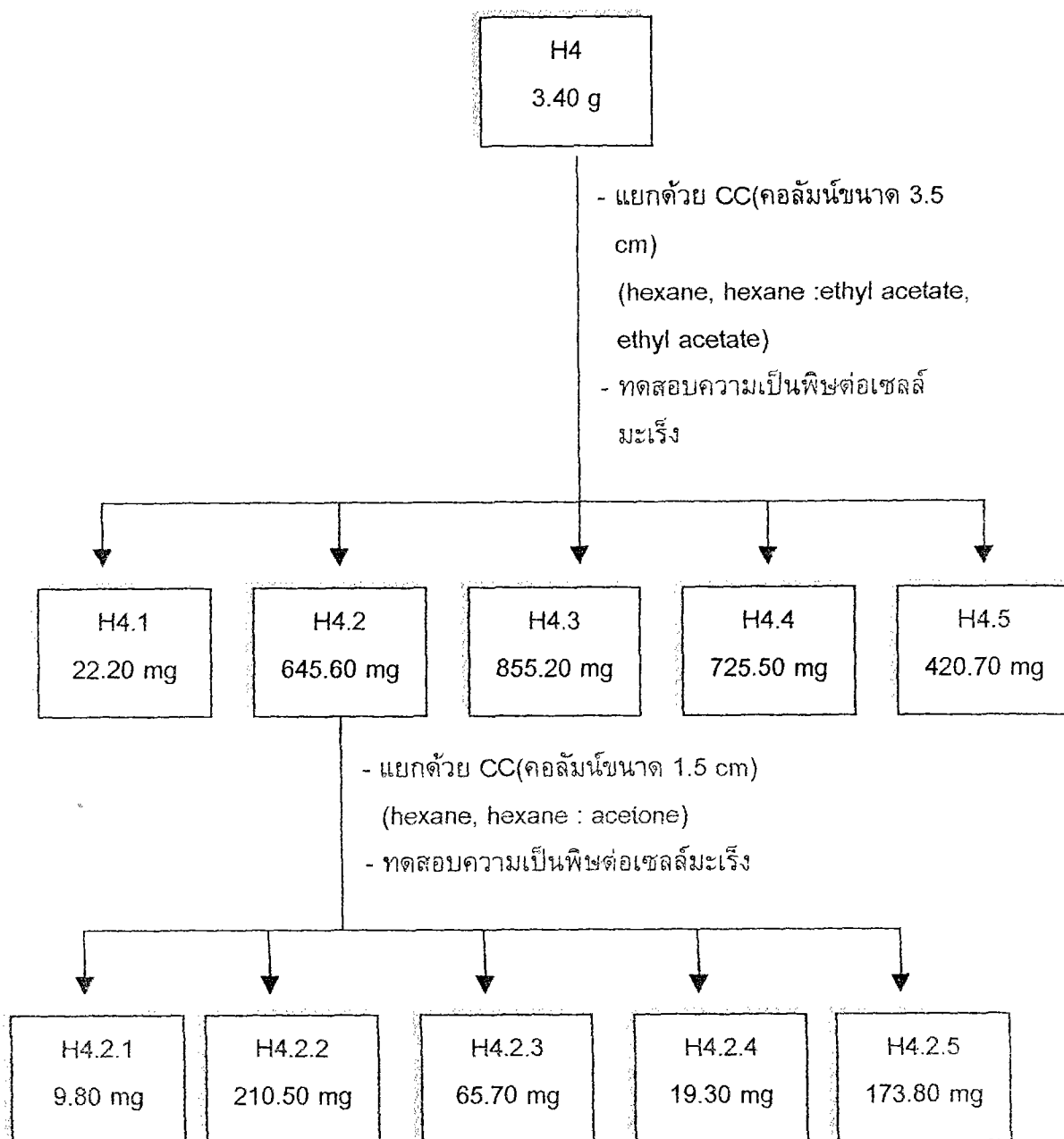
ภาพประกอบ 13 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.2



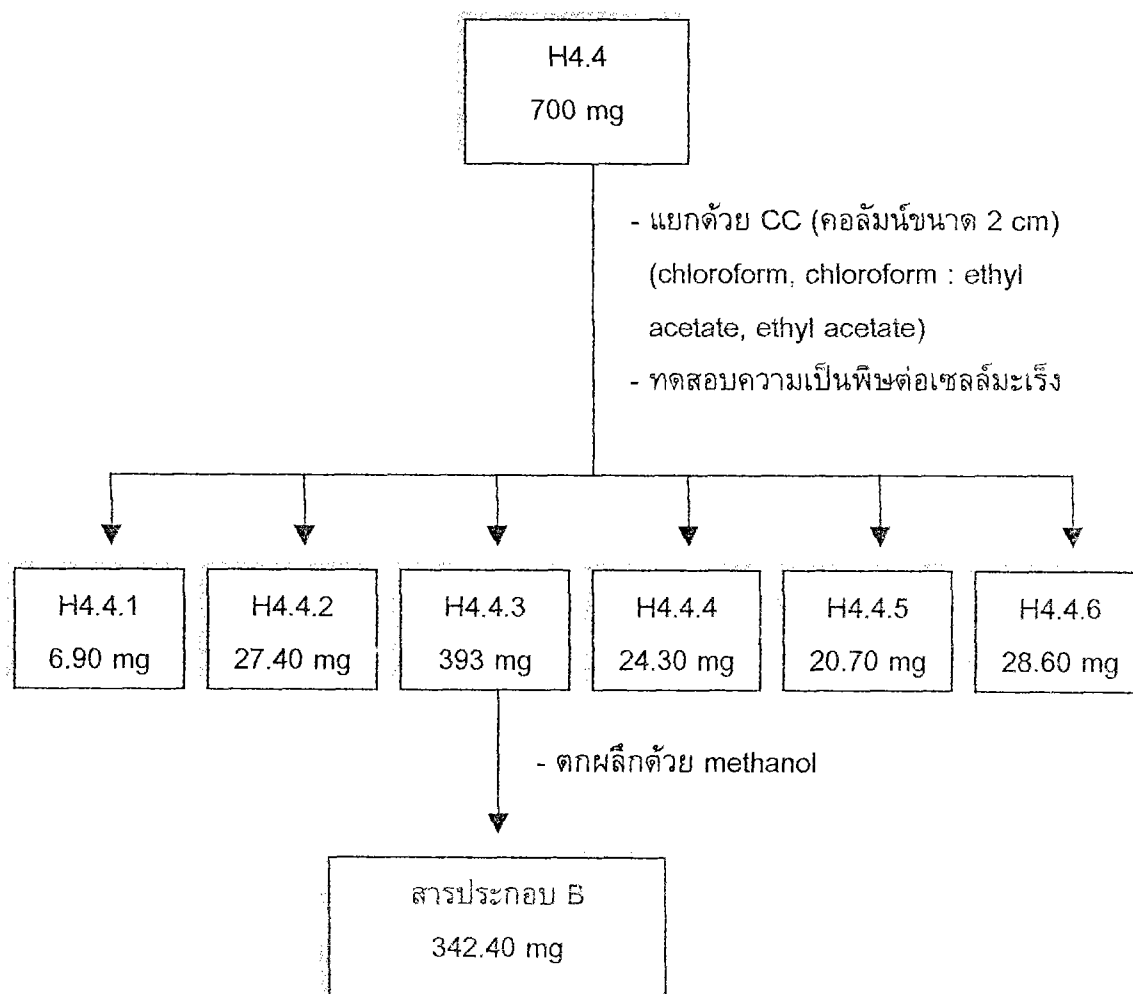
ภาพประกอบ 14 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.3



ภาพประกอบ 15 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H3.4



ภาพประกอบ 16 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H4



ภาพประกอบ 17 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการแยกสารกลุ่ม H4.4

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากเหง้าพุทธรักษา

นำเหง้าพุทธรักษา 10.80 kg มาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane เป็นของเหลวสีเหลืองหนัก 29 g และสารสกัด ethanol เป็นสารเหนียวหนืดสีน้ำตาลดำน้ำหนัก 55 g

2. ผลการแยกสารสกัด hexane และทำสารให้บริสุทธิ์

2.1 นำสารสกัด hexaneหนัก 29 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane และ hexane : ethyl acetate โดยค่อยๆเพิ่มขั้วของตัวชะ เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 100 mL นำแต่ละส่วนมาระเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบส่วนที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 8) นำแต่ละกลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H3 และ H4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 18) จึงนำสาร H3 และ H4 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์

ตาราง 8 ผลการแยกสารสกัด hexane ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : EtOAc (90 : 10)	H1	1.66g	เป็นของเหลวสีเหลือง
(80 : 20)	H2	8.65g	เป็นของเหลวสีส้ม
(70 : 30)	H3	11.05g	ผลึกสีขาวรูปเข็มปนกับของเหลวสีเหลือง
(60 : 30)	H4	3.50g	เป็นของเหลวเหนียวหนืดสีน้ำตาล

2.2 สารกลุ่ม H3 มีผลึกสีขาวรูปเข็มปนกับส่วนที่เป็นของเหลวสีเหลือง จึงนำมาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 4.12 g ให้ชื่อว่าสารประกอบ A นำสารประกอบ A ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED₅₀

2.3 เมื่อแยกสารประกอบ A ออกแล้วเหลือของเหลวสีเหลืองหนัก 6.62 g นำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ะด้วยตัวทำละลายเรียงลำดับดังนี้ hexane chloroform ethyl acetate และ ethanol โดยค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 20 mL ได้สาร 6 กลุ่ม (ตาราง 9) นำสารทั้ง 6 กลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H3.2 H3.3 และ H3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น (ตาราง 19) จึงนำสารกลุ่ม H3.2 H3.3 และ H3.4 ไปแยกต่อ

ตาราง 9 ผลการแยกสารกลุ่ม H3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : CHCl_3 (70 : 30)	H3.1	336.80 mg	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
Hexane : CHCl_3 (50 : 50)	H3.2	3.50 g	ของเหลวสีเหลือง
Hexane : EtOAc (60 : 40)	H3.3	635.70 mg	ของเหลวสีน้ำตาลอ่อน
CHCl_3 : EtOAc (30 : 70)	H3.4	975.30 mg	ของเหลวสีน้ำตาล
EtOAc : EtOH (98 : 2)	H3.5	461.50 mg	ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม
EtOAc : EtOH (90 : 10)	H3.6	424.40 mg	ของเหลวสีน้ำตาลดำ

2.4 นำสารกลุ่ม H3.2หนัก 3.45 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane : ethyl acetate เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 10) นำสารทั้ง 4 กลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารแต่ละกลุ่มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 21) จึงไม่ได้นำมาแยกต่อ

ตาราง 10 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : EtOAc (98 : 2)	H3.2.1	1.47 g	เป็นสารเหนียวสีเหลืองอ่อน
(95 : 5)	H3.2.2	764.50 mg	ของเหลวสีเหลืองอ่อน
(80 : 20)	H3.2.3	577.80 mg	ของเหลวเหนียวสีเหลือง
(70 : 30)	H3.2.4	296.70 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน

2.5 นำสารกลุ่ม H3.3 น้ำหนัก 630 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้น้ำยาตัวทำละลายดังนี้ hexane : acetone เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 mL ได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 11) นำสารทั้ง 4 กลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารแต่ละกลุ่มมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 21) จึงไม่นำมาแยกต่อ

ตาราง 11 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.3 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : Acetone (95 : 5)	H3.3.1	90.50 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
(90 : 10)	H3.3.2	274.50 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล
(80 : 20)	H3.3.3	78.50 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
(70 : 30)	H3.3.4	43.90 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล

2.6 นำสารกลุ่ม H3.4 น้ำหนัก 870 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ใช้น้ำยาตัวทำละลายดังนี้ hexane : chloroform และ acetone โดยค่อยๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลาย เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 10) นำสารทั้ง 5 กลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 21) เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณน้อยและเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC

พบว่ายังมีสารอยู่อีกหลายชนิด จึงไม่นำมาแยกให้บริสุทธิ์ แต่นำมาตรวจสอบเพื่อหาประเภทของสารเท่านั้น

ตาราง 12 ผลการแยกสารกลุ่ม H3.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : CHCl ₃ : Acetone			
(60 : 30 : 10)	H3.4.1	108.90 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
(50 : 30 : 20)	H3.4.2	147.30 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน
(40 : 30 : 30)	H3.4.3	154.60 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล
(30 : 30 : 40)	H3.4.4	106.30 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล
(10 : 30 : 60)	H3.4.5	96.20 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล

2.7 นำสารกลุ่ม H4 น้ำหนัก 3.40 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ะด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane : ethyl acetate และ ethyl acetate ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 30 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 13) นำสารทั้ง 5 กลุ่มที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารกลุ่ม H4.2 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (ตาราง 20) จึงนำสารกลุ่ม H4.2 มาแยกต่อ

ตาราง 13 ผลการแยกสารกลุ่ม H4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : EtOAc			
(90 : 10)	H4.1	22.20 mg	ของเหลวเหนียวสีเหลืองอ่อน
(90 : 10)	H4.2	645.60 mg	ของเหลวสีชมพู
(80 : 20)	H4.3	855.20 mg	ของเหลวสีเหลือง
(70 : 30)	H4.4	725.50 mg	ของแข็งปนของเหลวสีเหลือง
(60 : 40)	H4.5	420.70 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล

2.8 นำสารกลุ่ม H4.2 หน้า 640 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ๒ ด้วยตัวทำละลายดังนี้ hexane hexane : acetone ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 mL ได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 14) นำสารกลุ่ม H4.2.2 H4.2.3 และ H4.2.5 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 22) ส่วนสารกลุ่ม H4.2.1 และ H4.2.4 มีปริมาณน้อยจึงไม่ได้นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

ตาราง 14 ผลการแยกสารกลุ่ม H4.2 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
Hexane : Acetone (95 : 5)	H4.2.1	9.80 mg	ของเหลวสีชมพู
(95 : 5)	H4.2.2	210.50 mg	ของแข็งสีขาวปนของเหลวสีเหลือง
(90 : 10)	H4.2.3	65.70 mg	ของเหลวสีเหลือง
(80 : 20)	H4.2.4	19.30 mg	ของเหลวสีน้ำตาล
(70 : 30)	H4.2.5	173.80 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม

2.9 สารกลุ่ม H4.4 มีของแข็งสีขาวปนกับของเหลวสีเขียวย จึงนำสารกลุ่ม H4.4 หน้า 700 mg มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ๒ ด้วยตัวทำละลายดังนี้ chloroform chloroform : ethyl acetate และ ethyl acetate ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ได้ครั้งละ 10 mL ได้สาร 6 กลุ่ม (ดังตาราง 15) สารกลุ่ม H4.4.3 มีของแข็งสีขาวปนของเหลวสีเหลืองจึงนำสารกลุ่ม H4.4.3 มาตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกสีขาวหนัก 342.40 mg ให้ชื่อว่าสารประกอบ B นำสารประกอบ B ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อหาค่า ED₅₀ และนำสารกลุ่ม H4.4.2 และ H4.4.6 ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ (ตาราง 20) ส่วนสารกลุ่ม H4.4.1 H4.4.4 และ H4.4.5 มีปริมาณน้อยจึงไม่ได้นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง

ตาราง 15 ผลการแยกสารกลุ่ม H4.4 ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์

ตัวทำละลายที่ใช้	สารกลุ่ม	น้ำหนัก	ลักษณะของสาร
CHCl ₃ : Acetone (100 : 00)	H4.4.1	6.90 mg	ของเหลวสีเหลือง
(90 : 10)	H4.4.2	27.40 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาล
(80 : 20)	H4.4.3	393.00 mg	ของแข็งสีขาวปนของเหลวสีเหลือง
(70 : 30)	H4.4.4	24.30 mg	ของเหลวสีน้ำตาล
(60 : 40)	H4.4.5	20.70 mg	ของเหลวสีน้ำตาลอ่อน
(50 : 50)	H4.4.6	28.6 mg	ของเหลวเหนียวสีน้ำตาลเข้ม

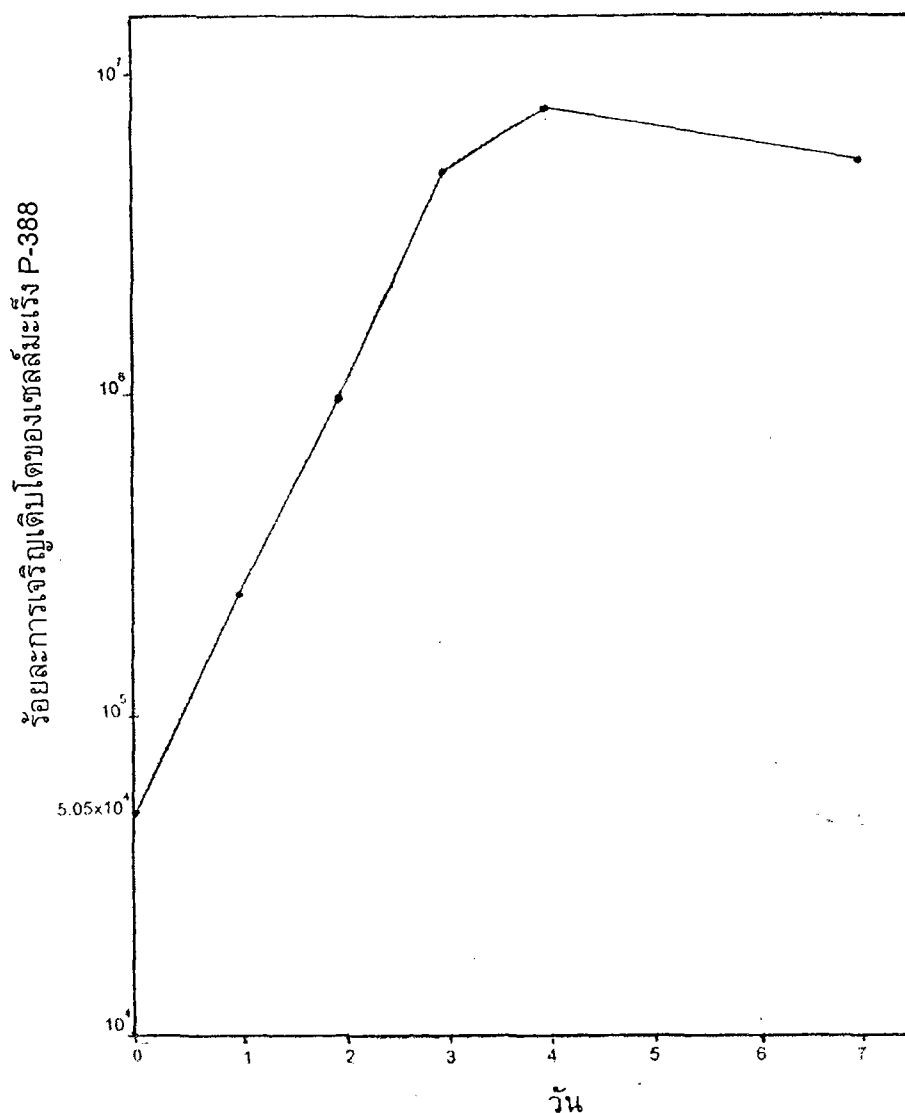
3. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3.1 การวัดการเจริญเติบโตของเซลล์ P388

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ออกมานับเมื่อเวลาผ่านไป 1 2 3 4 และ 7 วัน ผลที่นับได้แสดงในตาราง 16 นำข้อมูลมา plot growth curve บนกระดาษกราฟแบบ semi-logarithm ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (แกนตั้ง) กับจำนวนวันที่ทำการทดลอง (แกนนอน) แสดงในตาราง 16 และภาพประกอบ 18

ตาราง 16 ผลการวัดค่าการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ในอาหารเลี้ยงเซลล์

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



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388

จากกราฟพบว่าเซลล์มะเร็ง P388 เจริญเติบโตในขวดเลี้ยงเซลล์ได้ดีในระยะ 4 วันแรกที่ทำการศึกษาทดลอง โดยเฉพาะในวันที่ 4 เป็นช่วงที่เซลล์เจริญเติบโตสูงสุด จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด P388

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งนี้ใช้ DMSO เป็น negative control 0.5% ซึ่งไม่มีผลต่อเซลล์มะเร็ง และใช้ 5-FU เป็น positive control เพื่อยืนยันว่าเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบนี้ สามารถตอบสนองต่อสารต้านมะเร็งได้ เนื่องจากปัจจุบันสถาบันมะเร็งแห่งชาติได้ใช้ 5-FU ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งเป็นจำนวนมาก และจากการทดลองเกี่ยวกับสารต้านมะเร็งของสถาบันมะเร็งแห่งชาติโดยใช้ 5-FU เป็น positive control ก็ได้ผลดีมาตลอด

ตามเกณฑ์มาตรฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกากำหนดค่าความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งดังนี้

	First test	Average (first and second test)
Sequential : Synthetics	$ED_{50} \leq 6 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$
Plant extracts	$ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$	$ED_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$
Fermentation products	$ED_{50} > 1 : 100 \text{ dilution}$	$ED_{50} > 1 : 100 \text{ dilution}$
Confirmation : Synthetics	$ED_{50} \leq 6 \mu\text{g/mL}$	
Plant and animal extracts	$ED_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$	
Fermentation products	$ED_{50} > 1 : 100$ it known classes of cytotoxic agents are excluded	

(Geran, et al. 1972 : 7-17)

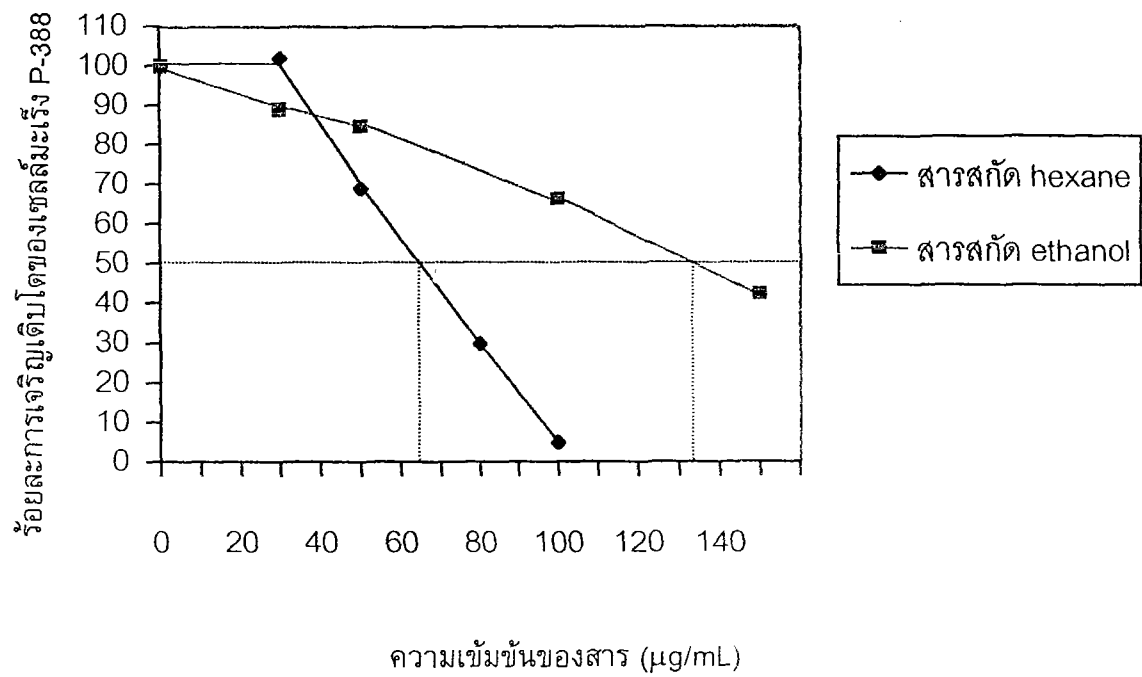
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาใช้ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/mL}$ ตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCI ของสหรัฐอเมริกา

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และ ethanol

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 โดยวัดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 ของการทดลอง ด้วยการนำสารสกัด hexane และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และได้ค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane และ ethanol เท่ากับ 64.50 และ $133.50 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แสดงในตาราง 17 และภาพประกอบ 19

ตาราง 17 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารสกัด hexane และ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น ของสาร ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		ร้อยละการ เจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388	
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	5.82×10^6	5.90×10^6	5.86×10^6	100.00
สารสกัด hexane	30	5.76×10^6	6.18×10^6	5.97×10^6	101.88
	50	4.30×10^6	3.80×10^6	4.05×10^6	69.11
	80	1.82×10^6	1.70×10^6	1.76×10^6	30.03
	100	2.60×10^5	3.20×10^5	2.90×10^5	4.99
สารสกัด ethanol	30	5.14×10^6	5.30×10^6	5.22×10^6	89.08
	50	5.10×10^6	4.82×10^6	4.96×10^6	84.64
	100	3.80×10^6	3.96×10^6	3.88×10^6	66.21
	150	2.54×10^6	2.40×10^6	2.47×10^6	42.45



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงค่า ED_{50} ของสารสกัด hexane และ ethanol ต่อเซลล์มะเร็ง P388

3.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จากสารสกัด hexane

3.3.1 นำสารสกัด hexane ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารสกัด ethanol มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สาร 4 กลุ่ม นำสารทั้ง 4 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดสอบแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H1 ถึง H4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งP388
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5×10^4	5×10^4	5×10^4	6.46×10^6	6.06×10^6	6.26×10^6	100.00
H1	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.74×10^6	6.20×10^6	5.97×10^6	95.37
H2	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.92×10^6	5.78×10^6	5.85×10^6	93.45
H3	5×10^4	5×10^4	5×10^4	4.10×10^6	4.26×10^6	4.18×10^6	66.77
H4	5×10^4	5×10^4	5×10^4	3.16×10^6	2.90×10^6	3.03×10^6	48.40

3.3.2 จากตาราง 18 สารกลุ่ม H3 และ H4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารดังกล่าวมาแยกซ้ำด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H3 แยกได้สาร 6 กลุ่ม (ตาราง 9) และสารกลุ่ม H4 แยกได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 13) นำสารทั้ง 11 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดสอบแสดงในตาราง 19 และ 20

ตาราง 19 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H3.1 ถึง H3.6 ที่
ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						ร้อยละการ เจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็งP388
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.68×10^6	5.012×10^6	5.40×10^6	100.00
H3.1	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.10×10^6	5.30×10^6	5.20×10^6	96.30
H3.2	5×10^4	5×10^4	5×10^4	8.00×10^5	9.60×10^5	8.08×10^5	16.30
H3.3	5×10^4	5×10^4	5×10^4	2.40×10^5	2.80×10^5	2.60×10^5	4.81
H3.4	5×10^4	5×10^4	5×10^4	2.20×10^5	2.00×10^5	2.10×10^5	3.89
H3.5	5×10^4	5×10^4	5×10^4	2.64×10^6	2.78×10^6	2.71×10^6	50.19
H3.6	5×10^4	5×10^4	5×10^4	3.44×10^6	3.98×10^6	3.71×10^6	68.87

ตาราง 20 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่ม H4.1 ถึง H4.5 ที่
ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งP388
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5×10^4	5×10^4	5×10^4	6.22×10^6	6.74×10^6	6.48×10^6	100.00
H4.1	5×10^4	5×10^4	5×10^4	6.18×10^6	5.72×10^6	5.95×10^6	91.82
H4.2	5×10^4	5×10^4	5×10^4	1.04×10^5	2.00×10^5	1.70×10^5	2.62
H4.3	5×10^4	5×10^4	5×10^4	4.66×10^6	5.08×10^6	4.87×10^6	75.15
H4.4	5×10^4	5×10^4	5×10^4	4.20×10^6	4.52×10^6	4.36×10^6	67.28
H4.5	5×10^4	5×10^4	5×10^4	4.36×10^6	4.54×10^6	4.45×10^6	68.67

3.3.3 จากตาราง 19 สารกลุ่ม H3.2 H3.3 และ H3.4 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จึงนำสารทั้ง 3 กลุ่มมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ สารกลุ่ม H3.2 แยกได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 10) สารกลุ่ม H3.3 แยกได้สาร 4 กลุ่ม (ตาราง 11) และสารกลุ่ม H3.4 แยกได้สาร 5 กลุ่ม (ตาราง 12) นำสารทั้ง 13 กลุ่มไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 µg/mL ผลการทดสอบดังแสดงในตาราง 21

ตาราง 21 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกได้จาก H3.2 H3.3 และ H3.4 ที่ความเข้มข้น 30 µg/mL

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งP388
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5.88x10 ⁶	5.24x10 ⁶	5.56x10 ⁶	100.00
H3.2.1	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.78x10 ⁶	3.78x10 ⁶	3.78x10 ⁶	67.98
H3.2.2	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5.46x10 ⁶	5.54x10 ⁶	5.50x10 ⁶	98.92
H3.2.3	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5.08x10 ⁶	5.42x10 ⁶	5.25x10 ⁶	94.42
H3.2.4	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	4.26x10 ⁶	4.74x10 ⁶	4.50x10 ⁶	80.93
H3.3.1	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.29x10 ⁶	3.64x10 ⁶	3.78x10 ⁶	67.99
H3.3.2	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.28x10 ⁶	3.52x10 ⁶	3.40x10 ⁶	61.15
H3.3.3	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.62x10 ⁶	3.10x10 ⁶	3.18x10 ⁶	57.19
H3.3.4	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.48x10 ⁶	3.76x10 ⁶	3.62x10 ⁶	65.11
H3.4.1	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	1.10x10 ⁶	1.16x10 ⁶	1.13x10 ⁶	20.32
H3.4.2	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	3.10x10 ⁶	3.00x10 ⁶	3.05x10 ⁶	54.86
H3.4.3	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	2.98x10 ⁶	3.20x10 ⁶	3.09x10 ⁶	55.58
H3.4.4	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	2.46x10 ⁶	2.88x10 ⁶	2.67x10 ⁶	48.02
H3.4.5	5x10 ⁴	5x10 ⁴	5x10 ⁴	1.20x10 ⁶	1.24x10 ⁶	1.22x10 ⁶	21.94

3.3.4 นำสารกลุ่ม H4.2.2 H4.2.3 H4.2.5 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม H4.2 (ตาราง 14) และสารกลุ่ม H4.4.2 H4.4.6 ที่แยกได้จากสารกลุ่ม H4.4 (ตาราง 15) ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ ผลการทดสอบ แสดงในตาราง 22

ตาราง 22 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารกลุ่มที่แยกได้จาก H4.2 และ H4.4 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$

สารกลุ่ม	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด						ร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งP388
	วันเริ่มต้น			วันที่ 4			
	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	ขวด 1	ขวด 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.46×10^6	6.34×10^6	5.90×10^6	100.00
H4.2.2	5×10^4	5×10^4	5×10^4	3.92×10^6	3.72×10^6	3.82×10^6	67.98
H4.2.3	5×10^4	5×10^4	5×10^4	4.96×10^6	5.16×10^6	5.06×10^6	98.92
H4.2.4	5×10^4	5×10^4	5×10^4	5.46×10^6	5.70×10^6	5.58×10^6	94.42
H4.4.2	5×10^4	5×10^4	5×10^4	3.22×10^6	3.30×10^6	3.26×10^6	80.93
H4.4.6	5×10^4	5×10^4	5×10^4	3.92×10^6	3.84×10^6	3.88×10^6	61.15

3.3.5 นำสารประกอบ A และสารประกอบ B ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารประกอบ A และ B เท่ากับ 55.50 และ 37.50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 23 และภาพประกอบ 20

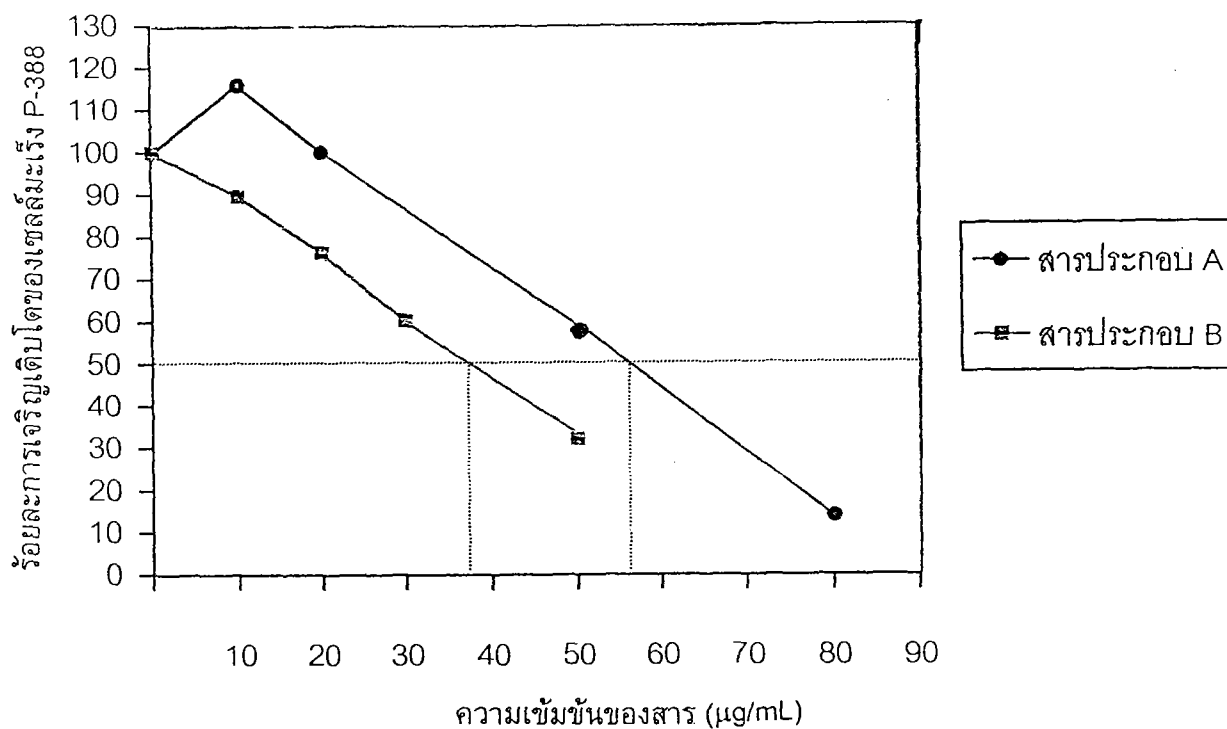
ตาราง 23 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารประกอบ A และสารประกอบ B ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารสกัด	ความเข้มข้น ของสาร ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด		ร้อยละการ เจริญเติบโตของ เซลล์มะเร็ง P388	
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	6.44×10^6	6.36×10^6	6.40×10^6	100.00
สารประกอบ A	10	7.38×10^6	7.48×10^6	7.43×10^6	116.09
	20	6.46×10^6	6.38×10^6	6.42×10^6	100.31
	50	3.76×10^6	3.66×10^6	3.71×10^6	57.97
	80	6.28×10^5	6.52×10^5	6.40×10^5	14.06
สารประกอบ B	10	5.74×10^6	5.76×10^6	5.75×10^6	89.84
	20	4.96×10^6	4.82×10^6	4.89×10^6	76.41
	30	3.82×10^6	3.92×10^6	3.87×10^6	60.47
	50	2.04×10^6	2.10×10^6	2.07×10^6	32.34

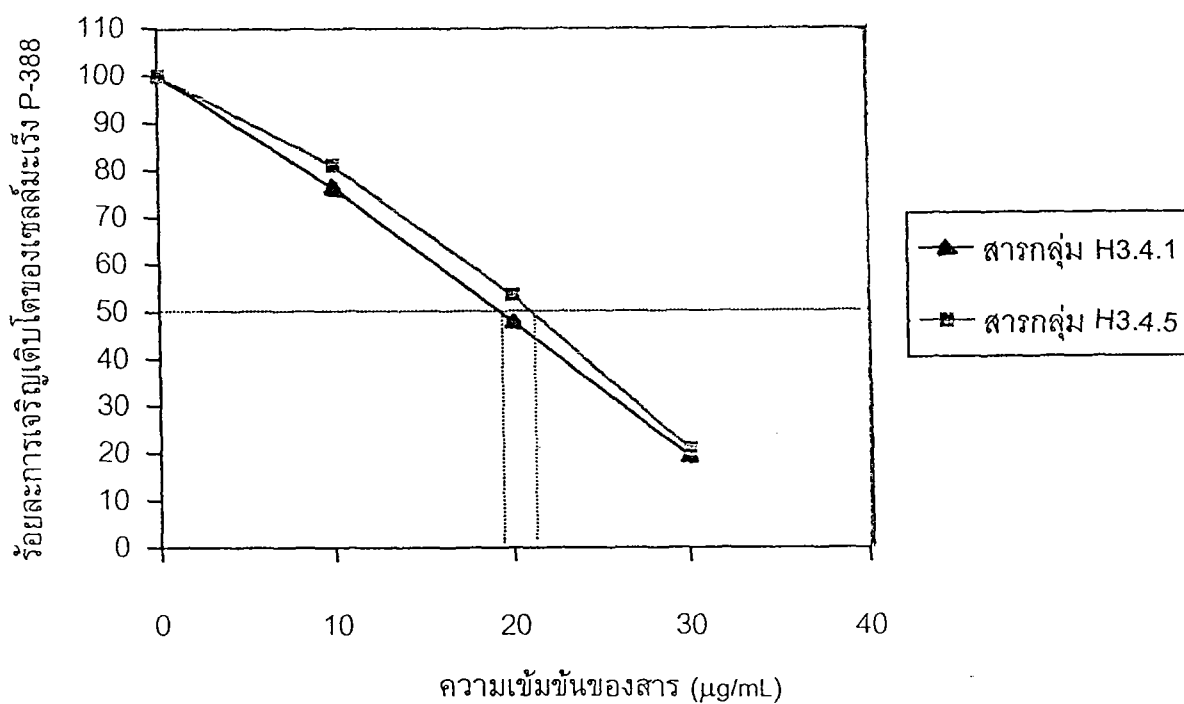
3.3.6 เนื่องจากสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.2.13 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารกลุ่มอื่น ๆ จึงนำสารทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาค่า ED_{50} พบว่าค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.2.13 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 เท่ากับ 19.00 และ 21.50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 24 และภาพประกอบ 21

ตาราง 24 ผลการหาค่า ED_{50} ของสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.2.13

สารสกัด	ความเข้มข้น ของสาร ($\mu\text{g/mL}$)	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตใน 1 ขวด			ร้อยละการ เจริญเติบโตของ เซลล์ P388
		ขวดที่ 1	ขวดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
กลุ่มควบคุม	-	4.98×10^6	4.84×10^6	4.91×10^6	100.00
สารกลุ่ม H3.4.1	10	3.82×10^6	3.68×10^6	3.75×10^6	76.37
	20	2.46×10^6	2.26×10^6	2.36×10^6	48.07
	30	9.20×10^5	9.80×10^5	9.50×10^5	19.35
สารกลุ่ม H3.2.13	10	3.80×10^6	4.16×10^6	3.98×10^6	81.11
	20	2.68×10^6	2.58×10^6	2.63×10^6	53.52
	30	9.80×10^4	1.08×10^5	1.03×10^5	20.98



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารประกอบ A และสารประกอบ B ต่อเซลล์มะเร็ง P388

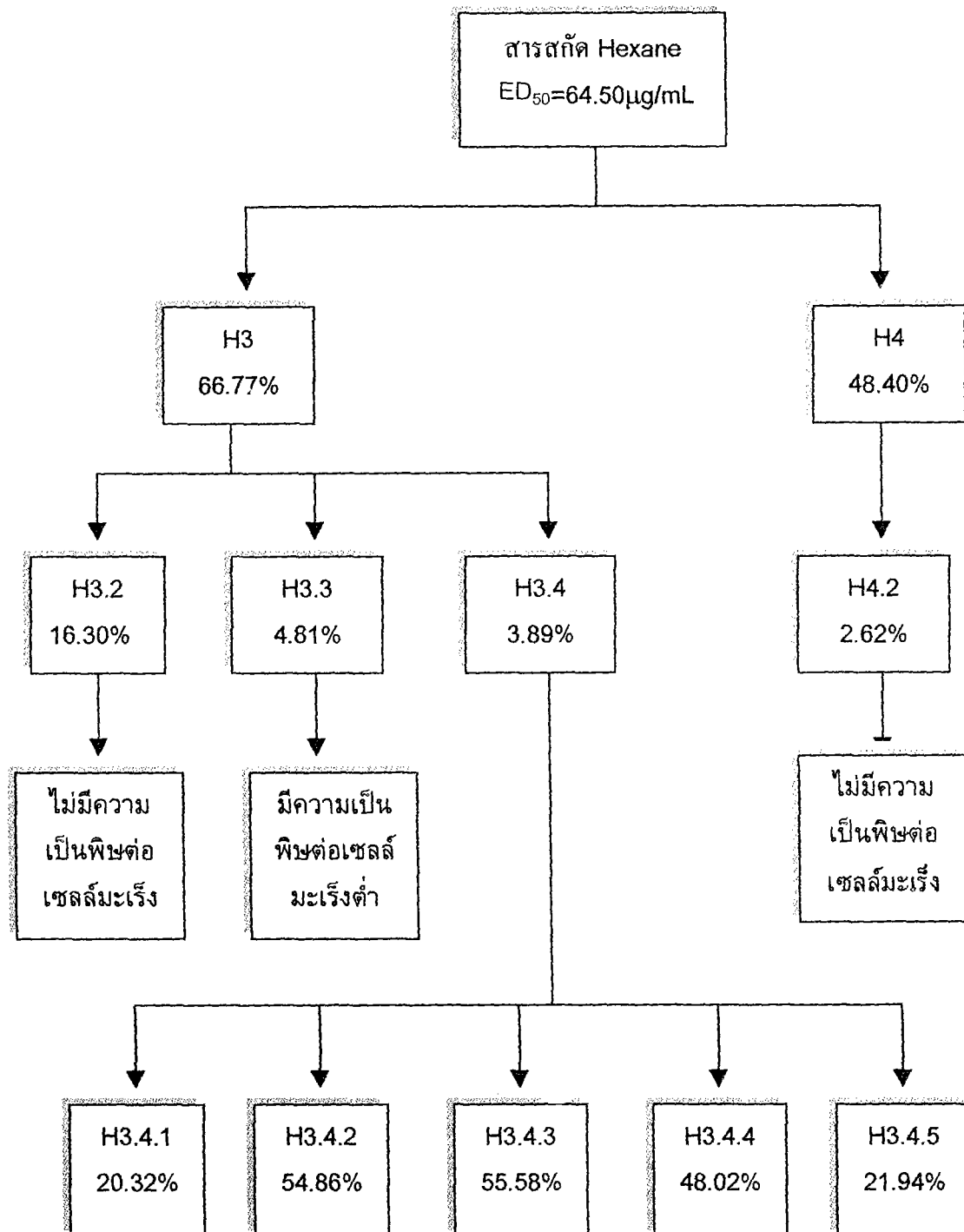


ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงค่า ED₅₀ ของสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388

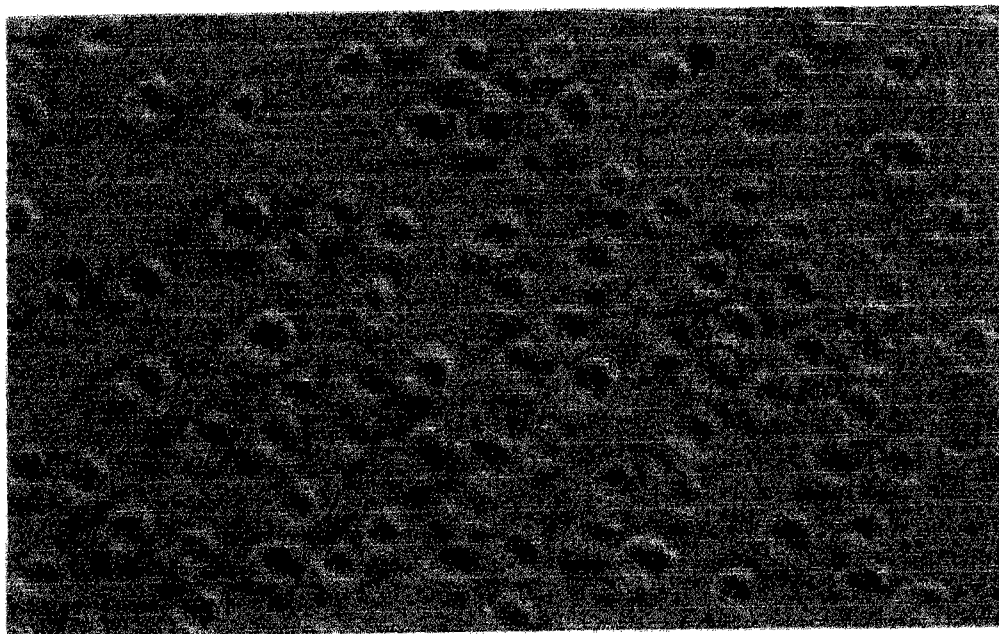
ตาราง 25 ค่าร้อยละการเจริญเติบโตและค่า ED₅₀ ของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาต่อเซลล์มะเร็ง P388

สารประกอบ -Fractions	ร้อยละการ เจริญเติบโต ของเซลล์ มะเร็ง	ED ₅₀ (µg/mL)	สารประกอบ -Fractions	ร้อยละการ เจริญเติบโต ของเซลล์ มะเร็ง	ED ₅₀ (µg/mL)
สารสกัด hexane	101.88	64.50	สารสกัด ethanol	89.08	>100
H1	95.37	>30	H2	93.45	>30
H3	66.77	>30	H4	48.40	~30
H3.1	90.30	>30	H3.2	16.30	<30
H3.3	4.81	<30	H3.4	3.89	<30
H3.5	50.19	>30	H3.6	68.87	>30
H3.2.1	67.98	>30	H3.2.2	98.92	>30
H3.2.3	80.93	>30	H3.2.4	67.99	>30
H3.3.1	67.99	>30	H3.3.2	61.15	>30
H3.3.3	57.19	~30	H3.3.4	65.11	>30
H3.4.1	20.32	19.00	H3.4.2	54.86	~30
H3.4.3	55.58	~30	H3.4.4	48.02	~30
H3.4.5	21.94	21.50	H4.1	91.82	>30
H4.2	2.62	<30	H4.3	75.15	>30
H4.4	67.28	>30	H4.5	68.67	>30
H4.2.2	67.98	>30	H4.2.3	98.92	>30
H4.2.5	94.42	>30	H4.4.2	80.93	>30
H4.4.6	61.15	>30	สารประกอบ A	-	55.50
สารประกอบ B	60.74	37.50			

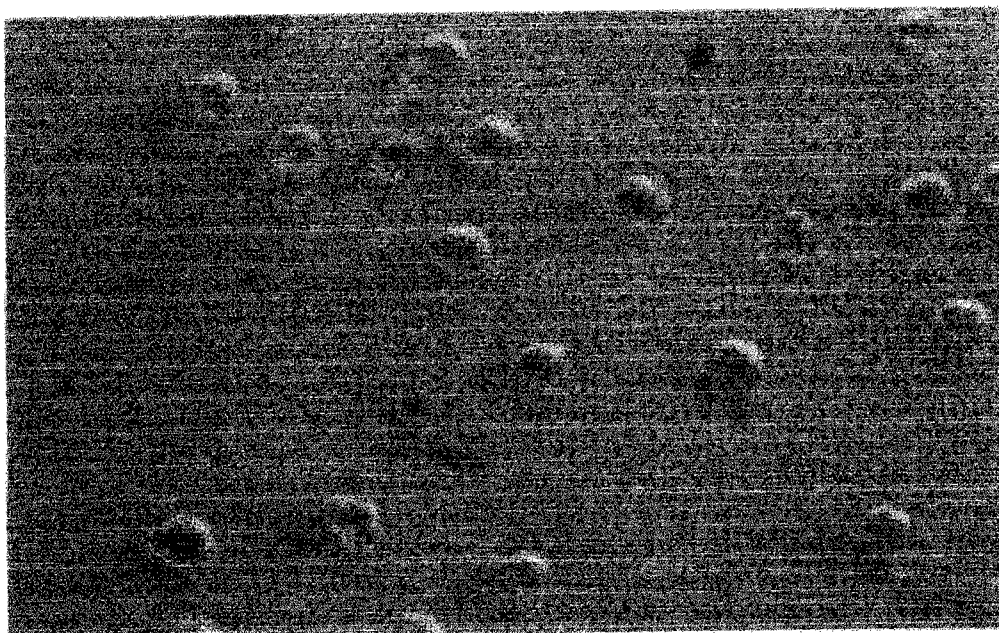
หมายเหตุ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใช้สารที่ความเข้มข้น 30 µg/mL



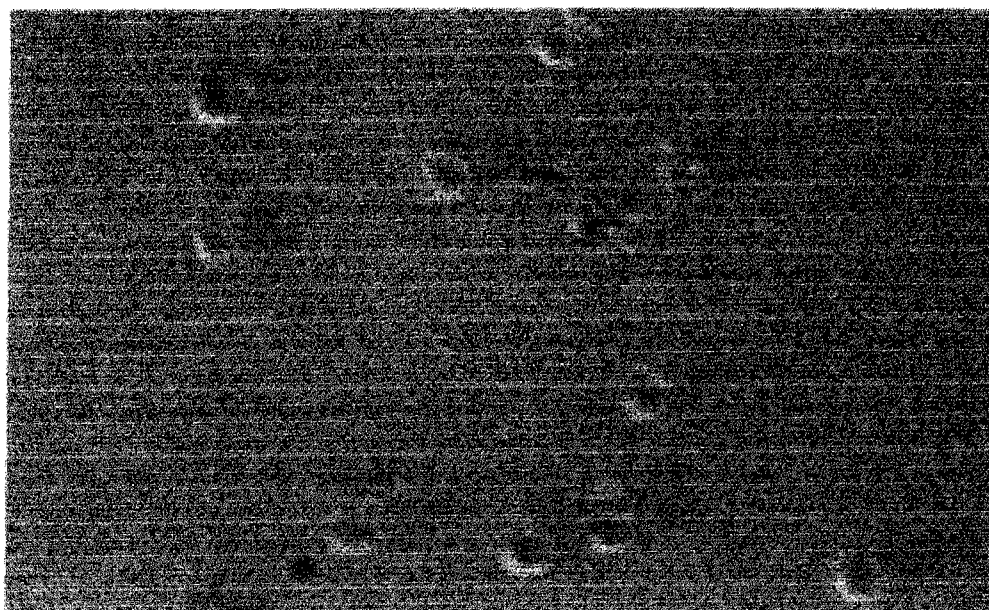
ภาพประกอบ 22 แผนภูมิร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยก
ได้จากสารสกัด hexane



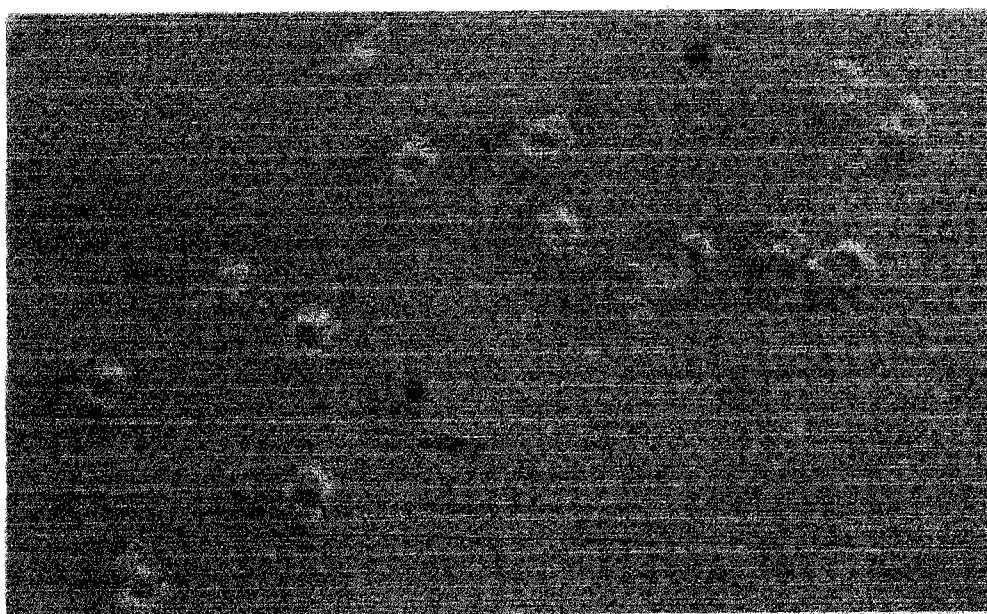
ภาพประกอบ 23 Negative Control ต่อเซลล์ P388 ในวันที่ 4 (ขยาย 100 เท่า)



ภาพประกอบ 24 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารประกอบ B ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ (ขยาย 100 เท่า)



ภาพประกอบ 25 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารกลุ่ม H3.4.1 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ ความเข้มข้น 30 µg/mL (ขยาย 100 เท่า)



ภาพประกอบ 26 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของสารกลุ่ม H3.4.5 ต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ ความเข้มข้น 30 µg/mL(ขยาย 100 เท่า)

4. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สารประกอบ A

สารประกอบ A เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 4.12 g จุดหลอมเหลวเท่ากับ 164-166 °C ค่า $R_f = 0.62$ (hexane : ethyl acetate 70 : 30)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 27)

3,423	OH
2,936	CH
1,466	CH ₂
1,382	CH ₃

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: (ภาพประกอบ 28)

0.68-1.02	18H (6 x CH ₃)
1.02-2.31	25H (9 x CH ₂ , 7 x CH)
3.51 m	1H (H-3)
5.05 dd	1H (H-23)
5.15 dd	1H (H-22)
5.35 s	1H (H-6)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) $\delta(\text{ppm})$: (ภาพประกอบ 30)

37.24 (C-1)	31.64 (C-2)	71.80 (C-3)
42.20 (C-4)	140.74 (C-5)	121.71 (C-6)
31.89 (C-7)	31.89 (C-8)	50.14 (C-9)
36.49 (C-10)	21.07 (C-11)	39.73 (C-12)
42.29 (C-13)	56.85 (C-14)	24.35 (C-15)
28.91 (C-16)	56.08 (C-17)	12.03 (C-18)
19.42 (C-19)	40.49 (C-20)	21.07 (C-21)
138.31(C-22)	129.25 (C-23)	51.23 (C-24)
31.80 (C-25)	18.97(C-26)	21.20 (C-27)
25.40 (C-28)	12.24 (C-29)	

สารประกอบ B

สารประกอบ B เป็นของแข็งสีขาว น้ำหนัก 342.4 mg จุดหลอมเหลวเท่ากับ 202-204 °C ค่า $R_f = 0.38$ (hexane : ethyl acetate 73 : 30)

FT IR (cm^{-1}) (KBr) : (ภาพประกอบ 32)

3,482	OH
2,956	CH
1,683	C=O

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta(\text{ppm})$: (ภาพประกอบ 33-34)

0.74-0.92		15H (5 x CH_3)
1.38		3H (CH_3)
4.35	t	1H (H-6, $J=2.5\text{Hz}$)
5.05	dd	1H (H-23, $J=8.66\text{Hz}$)
5.15	dd	1H (H-22)
5.81	s	1H (H-4)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) $\delta(\text{ppm})$: (ภาพประกอบ 35-36)

38.52 (C-1)	43.23 (C-2)	201.20 (C-3)
126.25 (C-4)	168.67 (C-5)	73019 (C-6)
37.97 (C-7)	45.49 (C-8)	53.59 (C-9)
37.05 (C-10)	21.08 (C-11)	39.68 (C-12)
42.47 (C-13)	56.02 (C-14)	24.18 (C-15)
28.22 (C-16)	55.91 (C-17)	12.18 (C-18)
19.80 (C-19)	40.46 (C-20)	20.94 (C-21)
138.10 (C-22)	129.44 (C-23)	51.22 (C-24)
31.85 (C-25)	18.97 (C-26)	21.16 (C-27)
25.38 (C-28)	12.23 (C-29)	

EI MS (% relative intensity) : (ภาพประกอบ 26และ41)

426 287(11) 269(18) 245(17) 227(46) 152(100)

สารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5

สารกลุ่ม H3.4.1 เป็นของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน ข้อมูล FT IR แสดงในภาพประกอบ 42

สารกลุ่ม H3.4.5 เป็นของเหลวเหนียวสีน้ำตาลอ่อน ข้อมูล FT IR แสดงในภาพประกอบ 43

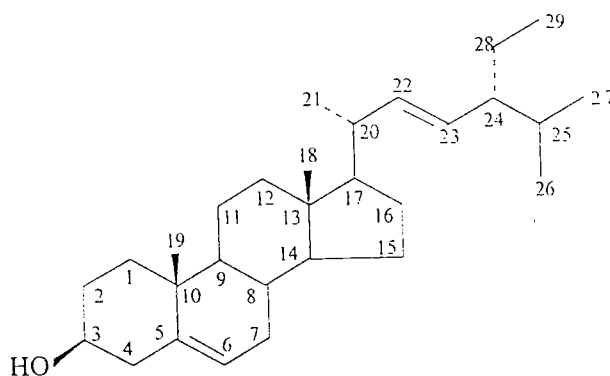
บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาดอกสีแดง โดยนำมาสกัดด้วย hexane และ ethanol ตามลำดับ ได้สารสกัด hexane และ ethanol เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารสกัด ethanol จึงนำสารสกัด hexane มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมเป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดเป็นของแข็งสีขาวและสารผสมที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 กลุ่มเป็นของเหลวสีน้ำตาล

สารประกอบ A



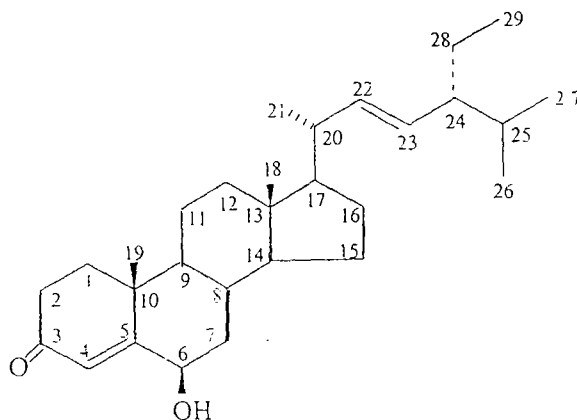
FT IR spectrum ของสารประกอบ A ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ $3,433\text{ cm}^{-1}$ (OH) $2,936\text{ cm}^{-1}$ (C-H) $1,466\text{ cm}^{-1}$ (CH_2) และ $1,382\text{ cm}^{-1}$ (CH_3) (ภาพประกอบ 27)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 6 หมู่ที่ δ 0.68 - 1.02 หมู่ CH_2 และ CH ปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 1.02 - 2.31 สัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 3.51 เป็นของ H-3 ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.05 เป็นของ H-23 และ δ 5.15 เป็นของ H-22 สำหรับ H-6 ปรากฏสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.35 (ภาพประกอบ 28)

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 29 พีคเป็นของคาร์บอน 29 คาร์บอนในโมเลกุล (ภาพประกอบ 30)

จากข้อมูลสารประกอบ A เปรียบเทียบกับข้อมูล ^1H และ ^{13}C ของ stigmasterol (Pouchert and Behke. 1993 : 569) สรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ stigmasterol (24α -ethylcholesta-5,22-dien- 3β -ol)

สารประกอบ B



FT IR spectrum ของสารประกอบ B ให้แถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ hydroxyl ที่ $3,482\text{ cm}^{-1}$ และ $1,683\text{ cm}^{-1}$ เป็นแถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของหมู่ carbonyl ของ α,β -unsaturated ketone ($\text{C}=\text{O}$) (ภาพประกอบ 32)

^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 400 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของหมู่ CH_3 5 หมู่ที่ δ 0.74 – 0.92 และที่ δ 1.38 เป็นของ CH_3 ที่ตำแหน่ง 19 สัญญาณเรโซแนนซ์ของ H-6 ปรากฏที่ δ 4.35 เป็น triplet (t) มีค่า J เท่ากับ 2.5 Hz เกิดจากการ coupling กับ H-7 α และ H-7 β ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 5.05 ลักษณะเป็น doublet of doublet (dd) เป็นสัญญาณของ H-23 มีค่า J เท่ากับ 8.66 Hz ที่ δ 5.15 ปรากฏเป็น dd เป็นสัญญาณของ H-22 ส่วนสัญญาณที่ δ 5.81 ลักษณะเป็น singlet (s) เป็นสัญญาณของ H-4 (ภาพประกอบ 33-34)

^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 100 MHz) ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ 29 พิกัดเป็นของคาร์บอน 29 คาร์บอนในโมเลกุล จาก DEPT-90 และ DEPT-135 spectra ให้สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH 11 หมู่ที่ δ 126.25 (C-4), 73.19 (C-6), 45.79 (C-8), 53.59 (C-9), 56.02 (C-14), 55.91 (C-17), 40.46 (C-20), 138.10 (C-22), 129.44 (C-23), 51.22 (C-24), 31.85 (C-25) ส่วนสัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_2 8 หมู่ปรากฏที่ δ 38.52 (C-1), 34.23 (C-2), 37.05 (C-7), 21.08 (C-11), 39.57 (C-12), 24.13 (C-15), 28.16 (C-16), 25.38 (C-28) สัญญาณเรโซแนนซ์ของ CH_3 6 หมู่ปรากฏที่ δ 11.99 (C-18), 19.80 (C-19), 20.94 (C-21), 18.97 (C-26), 19.47 (C-27), 12.18 (C-29) และมีสัญญาณเรโซแนนซ์ของ quaternary carbon ที่ δ 201.10 ($\text{C}=\text{O}$), 168.67 (C-5), 37.05 (C-10) และ 42.47 (C-13) ดังตาราง 25

ตาราง 26 ข้อมูล ^{13}C และ DEPT NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ_c)	DEPT-90 (δ_c)	DEPT-135 (δ_c)
1	38.52 (CH_2)		38.52
2	34.23 (CH_2)		34.23
3	201.10 ($\text{C}=\text{O}$)		
4	126.25 (CH)	126.25	126.25
5	168.67 (C)		
6	73.19 (CH)	73.19	73.19
7	37.07 (CH_2)		37.07
8	45.79 (CH)	45.79	45.79
9	53.59 (CH)	53.59	53.59
10	37.05 (C)		
11	21.08 (CH_2)		21.08
12	39.57 (CH_2)		39.57
13	42.47 (C)		
14	56.02 (CH)	56.02	56.02
15	24.13 (CH_2)		24.13
16	28.16 (CH_2)		28.16
17	55.91 (CH)	55.91	55.91
18	11.99 (CH_3)		11.99
19	19.80 (CH_3)		19.80
20	40.46 (CH)	40.46	40.46
21	20.94 (CH_3)		20.94
22	138.10 (CH)	138.10	138.10
23	129.44 (CH)	129.44	129.44
24	51.22 (CH)	51.22	51.22
25	31.85 (CH)	31.85	31.85
26	18.97 (CH_3)		18.97
27	19.47 (CH_3)		19.4

ตาราง 26 (ต่อ)

ตำแหน่ง	^{13}C NMR (δ_c)	DEPT-90 (δ_c)	DEPT-135 (δ_c)
28	25.38	(CH ₂)	25.38
29	12.18	(CH ₃)	12.18

ตาราง 27 ข้อมูลHMQC NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B

δ_c	δ_H	ตำแหน่งของ C และ H
138.10	5.15	CH-22
129.44	5.05	CH-23
126.25	5.81	CH-4
73.19	4.35	CH-6

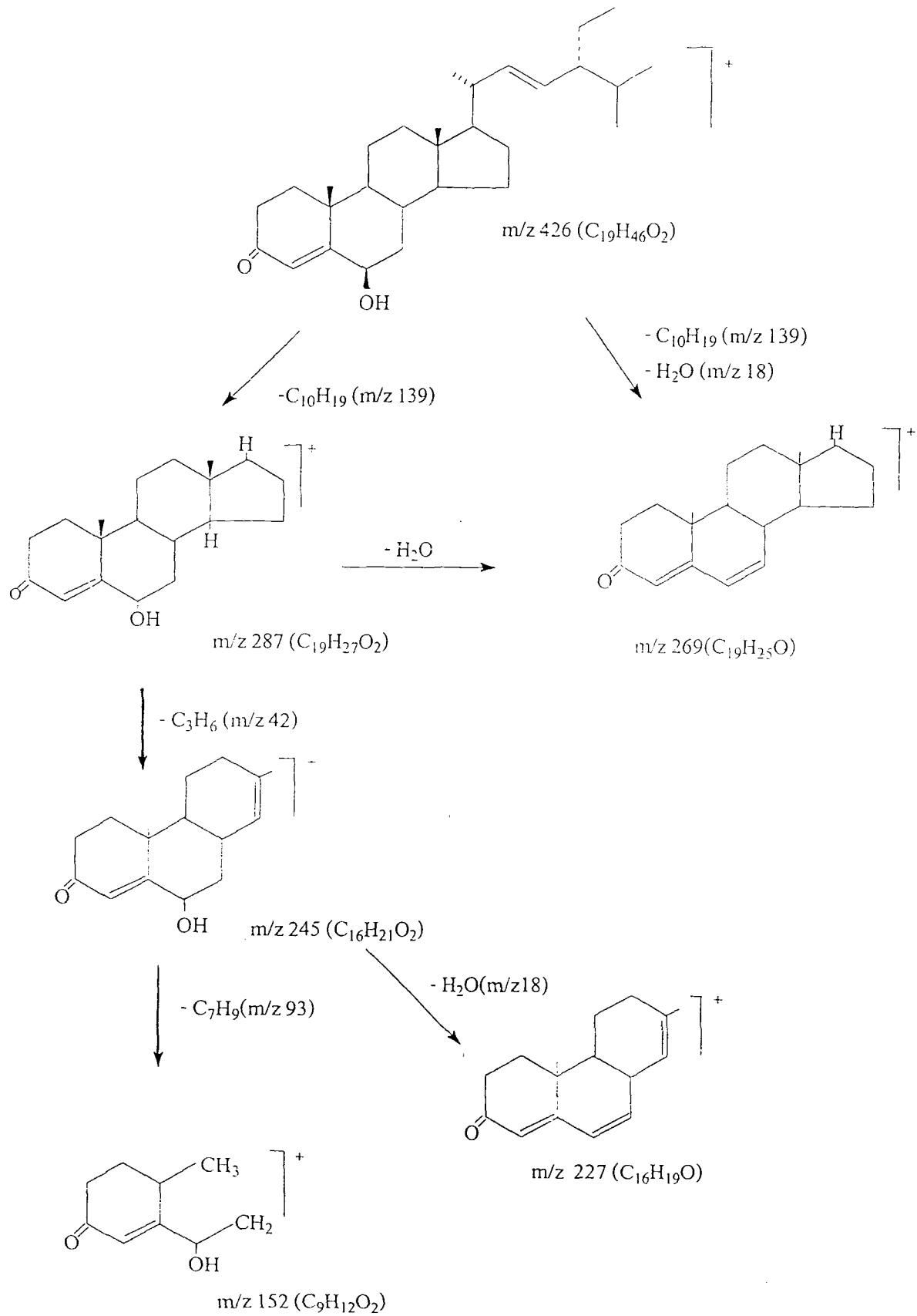
EIMS ของสารประกอบ B ให้สัญญาณ m/z (% relative intensity)

ที่ 426 (M^+ , $C_{29}H_{46}O_2$) 287 (11) $[M-C_{10}H_{19}]^+$ 269 (18) $[M-C_{10}H_{19} - H_2O]^+$

245 (17) $[M-C_{10}H_{19} - 42]^+$ 227 (46) $[M-C_{10}H_{19} - 42 - H_2O]^+$ และ

152 (100) $[M-C_{10}H_{19} - 42 - 93]^+$ สัญญาณที่ m/z 245 227 และ 152 เป็นสัญญาณที่แสดง

ลักษณะเฉพาะของ 3-keto-6-hydroxy- Δ^4 steroid (Khan and Malik. 1989 : 2859-2861)(ภาพประกอบ 27)



ภาพประกอบ 27 การแตกพันธะของสารประกอบ B

จากข้อมูลสารประกอบ B นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ 6 β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3 one (Katsui, et al. 1972 : 223-226) และ 6 α -hydroxystigmast-4-en-3 one (Khan and Malik. 1989 : 2859-2961) สรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ 6 β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3 one (stigmasta-4,22-dien-6 β -ol-3-one)

สารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5

สารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 เป็นของเหลวเหนียวสีน้ำตาล เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา Liebermann – Burchard ให้สีเขียวเข้ม แสดงว่าสารทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวเป็นสารประเภท steroid

สารกลุ่ม H3.4.1 : FT IR spectrum ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ที่ 3,423 cm⁻¹ (OH) 1,719 cm⁻¹ (C=O) 1,459 cm⁻¹ (CH₂) และ 1,377 cm⁻¹ (CH₃) (ภาพประกอบ 42)

สารกลุ่ม H3.4.5

FT IR spectrum ปรากฏแถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรด ที่ 3,429 cm⁻¹ (OH) 1,720 cm⁻¹ (C=O) 1,465 cm⁻¹ (CH₂) และ 1,379 cm⁻¹ (CH₃) (ภาพประกอบ 43)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์มะเร็ง P388 เป็น cell suspension ที่เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ โดยการนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธีการย้อมสี trypan blue ปลอยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที เซลล์ที่ตายจะติดสีของ trypan blue จึงไม่มีผลต่อการนับเซลล์ที่มีชีวิต ผลที่ได้จากการนับเซลล์ที่มีชีวิตของสารตัวอย่างนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด hexane และสารสกัด ethanol พบว่าค่า ED₅₀ ของสารสกัด hexane เท่ากับ 64.5 μ g/mL สารสกัด ethanol มีค่า ED₅₀ > 100 μ g/mL จากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า สารสกัด hexane และสารสกัด ethanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานของ NIC ของสหรัฐอเมริกา กำหนดไว้ว่า สารสกัดหยาบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า ED₅₀ $\leq$ 30 μ g/mL

เนื่องจากสารสกัด hexane มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าสารสกัด ethanol จึงนำสกัด hexane 29 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ได้สารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 2 กลุ่มคือ H3.4.1 และ H3.4.5 น้ำหนัก 108.90 และ 96.20 mg ตามลำดับ และ

สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ stigmasterol และ 6β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one น้ำหนัก 4.21 g และ 342.40 mg ตามลำดับ เมื่อนำสารกลุ่ม H3.4.1 H3.4.5 stigmasterol และ 6β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าค่า ED_{50} เท่ากับ 19.00 21.50 55.50 และ 37.50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูง เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่มมีปริมาณน้อยและมีสารผสมกันอยู่หลายชนิด จึงไม่ได้นำมาแยกต่อให้บริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ stigmasterol และ 6β -hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งต่ำ ซึ่งจากเกณฑ์มาตรฐานของ NCI ของสหรัฐอเมริกากำหนดไว้ว่า สารบริสุทธิ์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งจะต้องมีค่า $ED_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$

เมื่อนำสารสกัดจากเหง้าพุทธรักษามาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/mL}$ พบสารหลายกลุ่มได้แก่ H3.2 H3.3 H3.4 และ H3.8 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมาก โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 83.70 95.19 96.11 และ 97.38 ตามลำดับ และเมื่อนำสารกลุ่ม H3.4 มาแยกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้น พบสารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 79.68 และ 78.06 หรือค่า ED_{50} เท่ากับ 19.00 และ 21.50 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

จากการนำสมุนไพรตำรับที่มีเหง้าพุทธรักษาประกอบอยู่ไปรักษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งของนายแพทย์ สมหมาย ทองประเสริฐ ซึ่งเชื่อกันว่าให้ผลในการรักษามะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะมะเร็งเต้านมและจากการศึกษาเบื้องต้นของดัลิต พรศิริประเสริฐและ เกศรา ณ บ้างช้าง ดยนำสารสกัดของสมุนไพรตำรับนี้ไปศึกษาในหนูทดลองโดยทำให้หนูทดลองเป็นมะเร็งเต้านมพบว่าสามารถยืดอายุของหนูทดลองได้ ดังนั้นผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 ของสารที่แยกได้จากเหง้าพุทธรักษาที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งนี้ อาจเป็นการสนับสนุนให้การรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งของนายแพทย์ สมหมาย ทองประเสริฐสามารถใช้ร่วมกับสมุนไพรชนิดอื่นๆ ในการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งต่อไปได้และเป็นการสนับสนุนให้งานวิจัยของดัลิต พรศิริประเสริฐและเกศรา ณ บ้างช้าง ว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหนูได้จริง ดังนั้นเหง้าพุทธรักษาจึงเป็นสมุนไพรที่ควรนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองและในผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง สารกลุ่ม H3.4.1 และ H3.4.5 พบว่ามีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งและสารกลุ่ม H3.4.2 H3.4.3 และ H3.4.4 ที่มีความเป็นพิษปานกลางจึงควรนำมาศึกษาต่อเพื่อแยกได้สารบริสุทธิ์ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง P388 หรืออาจนำไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งชนิดอื่น

2. ควรศึกษาองค์ประกอบหลักและ/หรือสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในสารสกัดหายาอื่น ๆ เช่น ใน ethyl acetate ethanol เป็นต้น

บรรณานุกรม

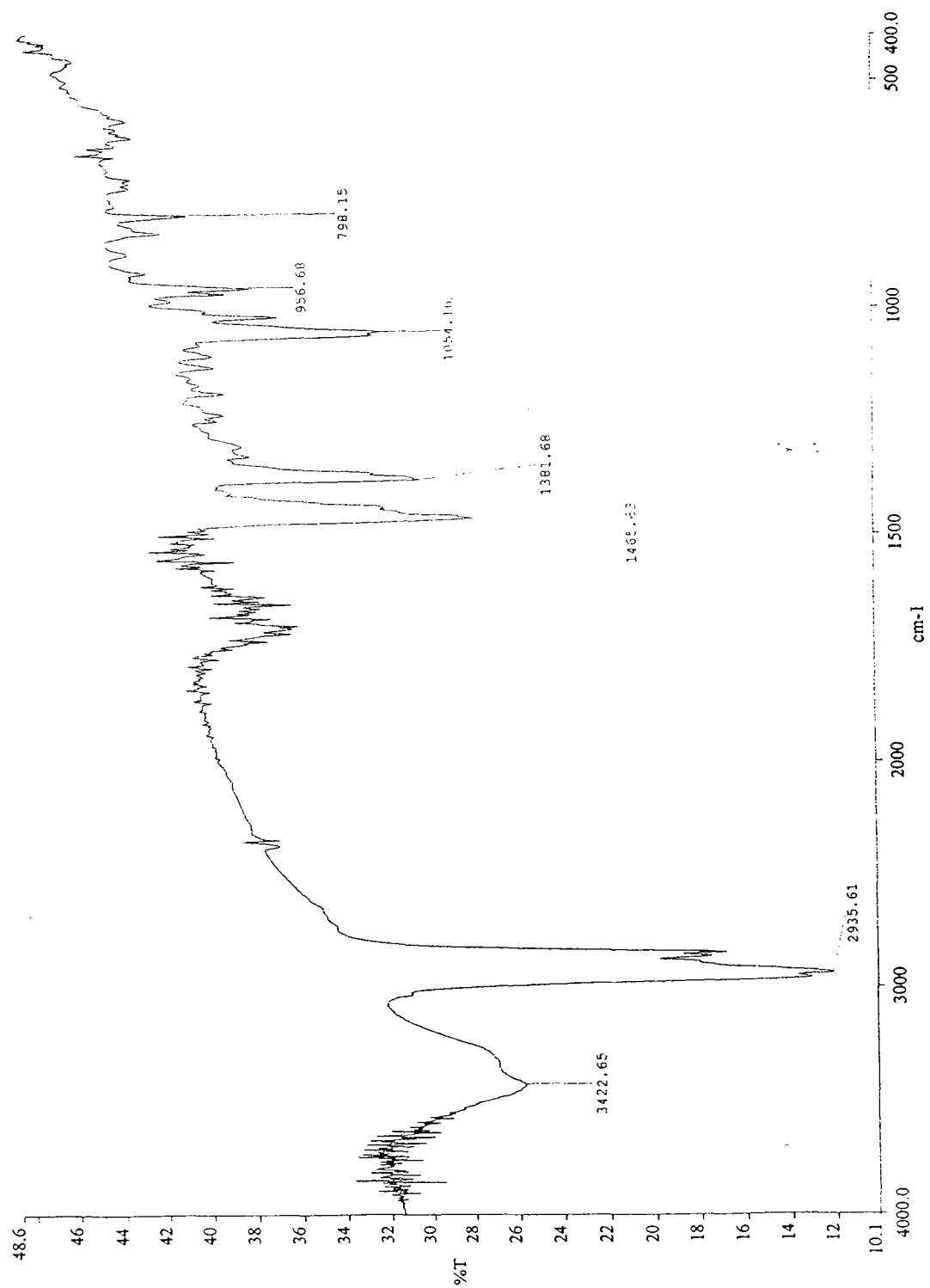
บรรณานุกรม

- ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธและคณะ. (2522). การใช้สมุนไพร. กรุงเทพฯ : สารมวลชน.
- ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. (2529). สมุนไพรหมอชาวบ้าน. กรุงเทพฯ : สารมวลชน.
- นักรบ บิณشري. (2529). ตำรายาสมุนไพร แก้ก้อนไปหาแพทย์(ยากกลางบ้าน ของใกล้มือ)
กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.
- เทอดชัย ดีสมเลิศและเทอดศักดิ์ ศรีสุระพัตร. (2533). ฤทธิ์ต้านมะเร็งปากมดลูกของนมผึ้งใน
หนูไกรน์. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เภสัชศาสตร์). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- ปริญญา รัตนพิมาน. (2534). การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมีน้ำ(*Ganoderma
lucidum* (Fr.) Karst.). วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ :
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- ไมตรี สุทธจิตต์. (2541). "อาหารและมะเร็ง : จงกินอาหารให้เป็นยา," ใน การดูแลสุขภาพแบบ
ธรรมชาติ. บรรณาธิการโดย ปัจจุบัน เหมหงษา. หน้า 74-100. กรุงเทพฯ : องค์การ
สงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- เรวัต พันธุ์วิเชียร และ วรชัย รัตนธรร. (2538). "Principles of Chemotherapy," ใน ตำราการ
รักษาโรคมะเร็ง. กรุงเทพฯ : โอจิสติกส์ พับลิชชิง.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. (2542). พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.
พรินติ้งเฮาส์.
- วีณา จิรจรรย์ยากุล. (2534). ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย
มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วุฒิ วุฒิธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย-รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ :
โอ.เอส. พรินติ้งเฮาส์.
- _____. (2542). หลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ : เอ็น.พี.สกรีนพรินติ้ง จำกัด
- สุมิตรรา ทองประเสริฐ. (2536). "หลักการรักษาโรคมะเร็ง," ใน การรักษาโรคมะเร็งด้วยเคมี
บำบัด. เชียงใหม่ : ธนบรรณการพิมพ์.
- อาทร รุ่งไพบูลย์. (2530). การแยกสารด้านการเจริญของเซลล์จากเปลือกต้นจำปีป่า. วิทยา
นิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- เอมอร โสมนะพันธุ์. (2534). "สารธรรมชาติกับโรคมะเร็งและโรคเอดส์," ใน ยาและผลิตภัณฑ์
จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

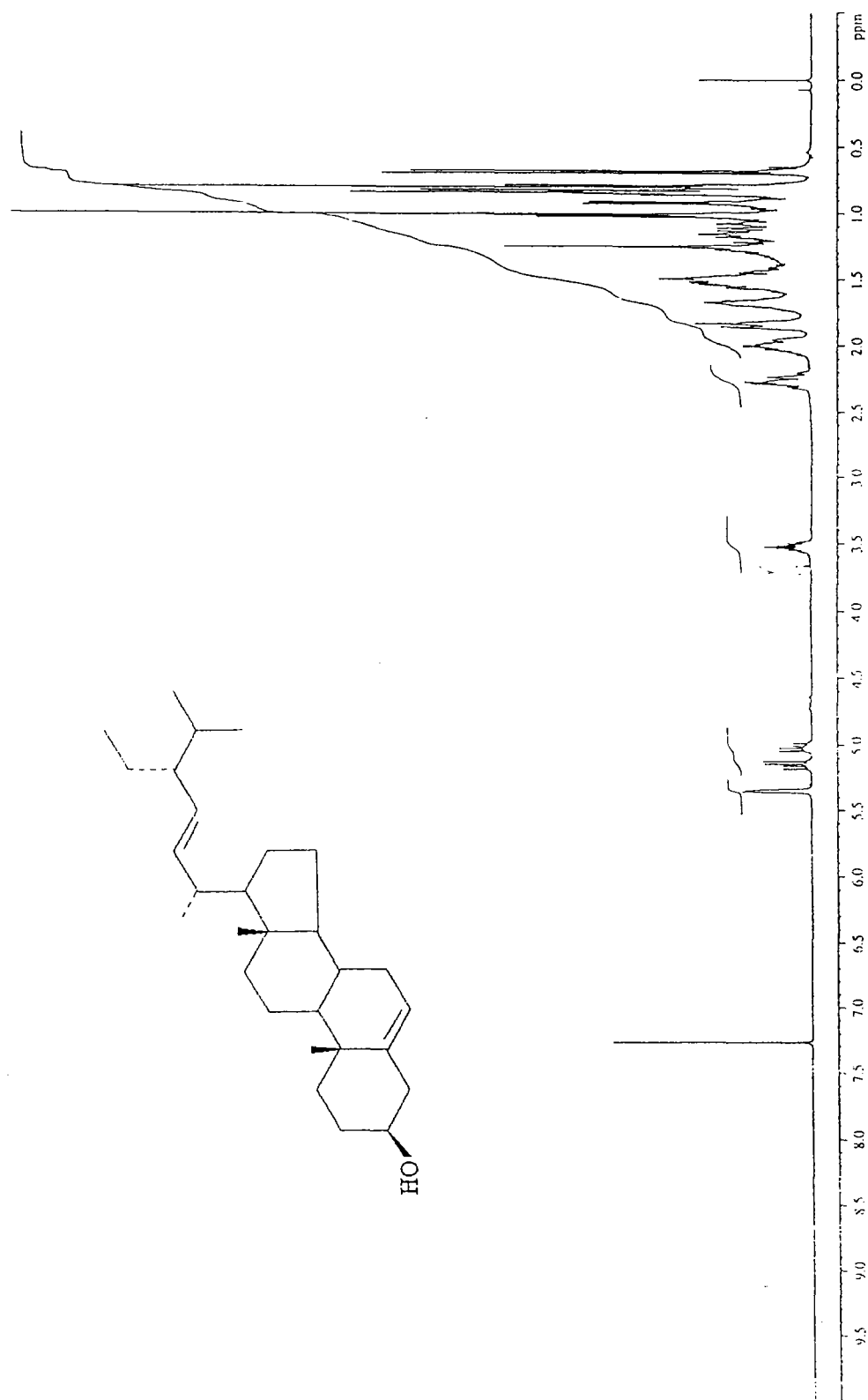
- Bailey, L.H. et al. (1969). *Manual of Cultivated Plants*. U.S.A : The Macmillan.
- Chihara, G. et al. (1969). "Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk) sing," *Nature*. 222 : 689.
- Eilber, F.R. (1985). "Principles of Radiation Oncology," in *Cancer Treatment* 2nd ed. Philadelphia : W.B.Saunders.
- Geran, R.I. et al. (1972). "Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and other Biological System," *Cancer Chemotherapy Report*. 3 : 7-17.
- Haskell, C.M. (1980). *Cancer Treatment*. Philadelphia : W.B.Saunders.
- Holdsworth, D.K. (1990). "Traditional Medicinal Plants of Rarotonga, Cooks Islands Part 1," *Journal of Crude Drug Research*. 28(3) : 209-218.
- Jork, H., Funk, W., and Wimmer, H. (1990). *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods Vol 1a*. Germany :VCH-Verlag, Weinheim.
- Kanchanapoom, T. (1996). *Investigation and Structure Elucidation of Active Compounds from Eurycoma longifolia Jack Root*. Thesis, M.Sc. (Pharmacy). Bangkok : Mahidol University. Photocopied.
- Katsui, N. et al. (1972). "Phytosterols and Triterpenes in the Roots of the Kidney Bean *Phaseolus vulgaris* L.," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 45 : 223-226.
- Khan, A.Q. and Malik, A. (1989). "A Steroids from *Calotropis procera*," *Phytochemistry* 28 : 2859-2861.
- Liao, L.L., Kupchan, S.M. & Horwitz, S.B. (1976). "Mode of Action of The Antitumor Compound Bruceatin, an Inhibitor of Protein Synthesis," *Molecular Pharmacology*. 12(1) : 167-176.
- Merh, P.S., Daniel, M. and Sabnis, S.D. (1986). "Chemistry and Taxonomy of Some Members of The Zingiberales," *Current Science*. 5(55) : 835-839.
- Monton, D.L. and Giuliano, A.E. (1985). "Cancer Immunology and Immunotherapy," in *Cancer Treatment* 2nd ed. Philadelphia : W.B. Saunders.
- Motawe, H.M. (1994). "Cannagenin : A new Molluscicidal Agent from *Canna indica* Linn.," *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2(4) : 3-10.
- Mukhopadhyay, S. et al. (1981). "Anticancer Indole Alkaloids of *Rhazya stricta*," *Journal of Natural Products*. 44(6) : 696-700.
- Na Bangchang, K. (1987). *Study on Anticancer Activity of A Well-Known Thai*

- Remedy*. Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok : Mahidol University.
Photocopied.
- Parker, G.R. (1985). "Principles of Radiation Oncology," in *Cancer Treatment* 2nd ed.
Philadelphia : W.B. Saunders.
- Pavia, D.L. et al. (1995). *Organic Laboratory Techniques* 2nd. Philadelphia : Saunders
College Publishing.
- Pornsiriprasert, D. (1986). *Study on Anticancer Activity of Medicinal Plant Extract of
A Well- Known Thai Folkloric Remedy*. Thesis M.Sc.(Pharmacology).
Bangkok : Mahidol University. Photocopies.
- Pouchert, J.C. and Behke, J. (1993). *The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra*
vol 3. Wisconsin : Aldrich Chemical.
- Raaphorst, G.P. (1990). "Fundamental aspects of hyperthermic biology," in *An
Introduction to the Practical Aspects of Clinical Hyperthermia*. London : Taylor
and Francis
- Ramathibodi Cancer Registry. (1999). *Annual Report 1999*. Puangtong Kaiphikul editor.
Bangkok : Ramathibodi.
- Thisoda, P. (1995). *Study on Immunostimulating Effect of a Well-Known Thai Folkloric
Remedy in Breast Cancer Patients*. Thesis, M.Sc. (Pharmacology). Bangkok :
Mahidol University. Photocopied.
- Wattanasillapapreecha, S. (1998). *A Study of Anti-Mutagenic and Antineoplastic Effects
of Processed and Non-Processed Teas in Thailand*. Thesis M.Sc.
(Biopharmaceutical Sciences) Bangkok : Mahidol University. Photocopied.
- Yoshida, S., Tazaki, K., and Minamikawa, T. (1975). "Occurrence of Shikimic and
Quinic acids in Angiosperms," *Phytochemistry*. (14) : 195-197.
- Zhao, G. et al. (1991). "Cytotoxic Cleradane Diterpens from *Polyalthia longifolia*," *Planta
Med*. 57 : 380-383.

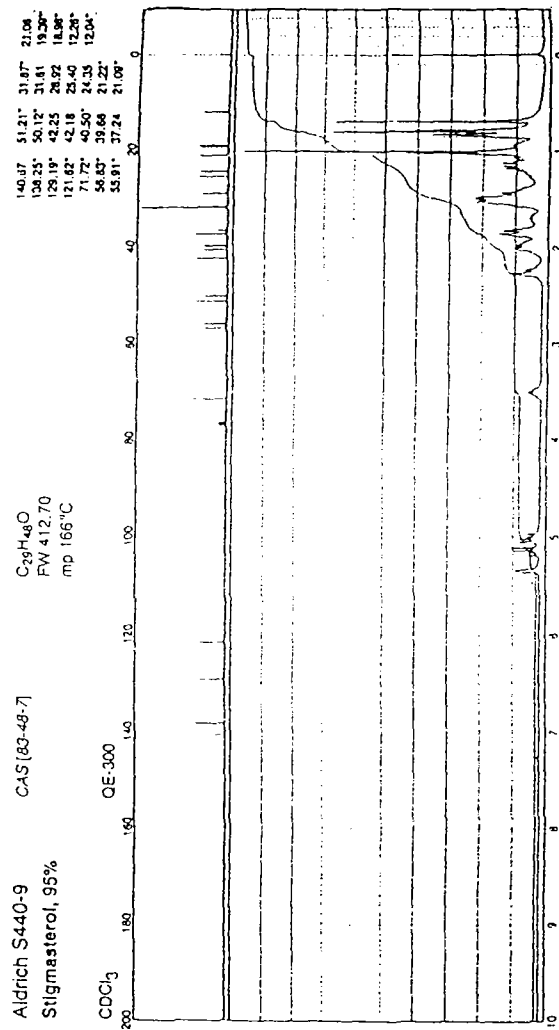
ภาคผนวก



ภาพประกอบที่ 28 FTIR สเปกตรัมของสารประกอบ A (KBr)

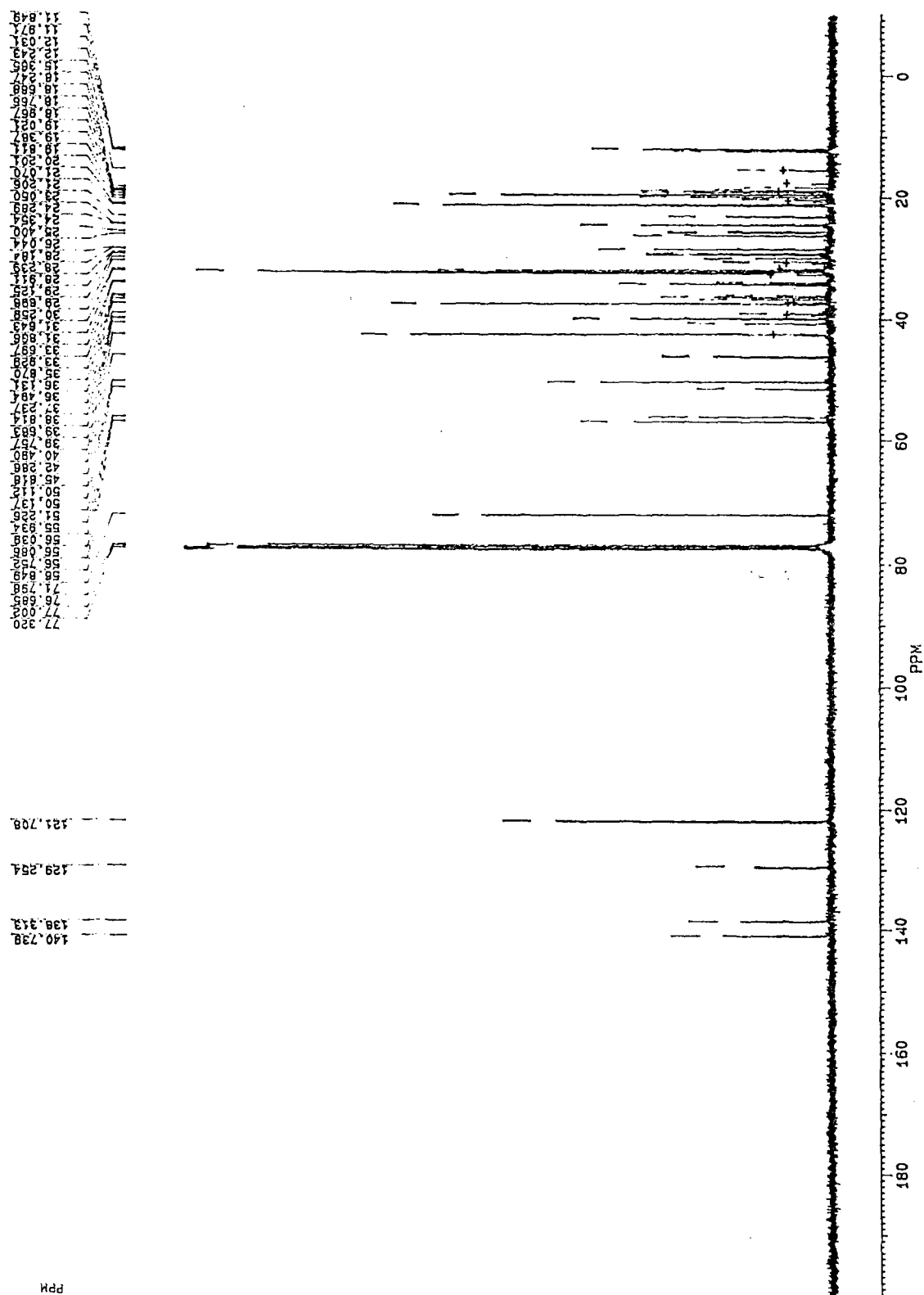


ภาพประกอบ 29 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ A (CDCl_3 , 400 MHz)

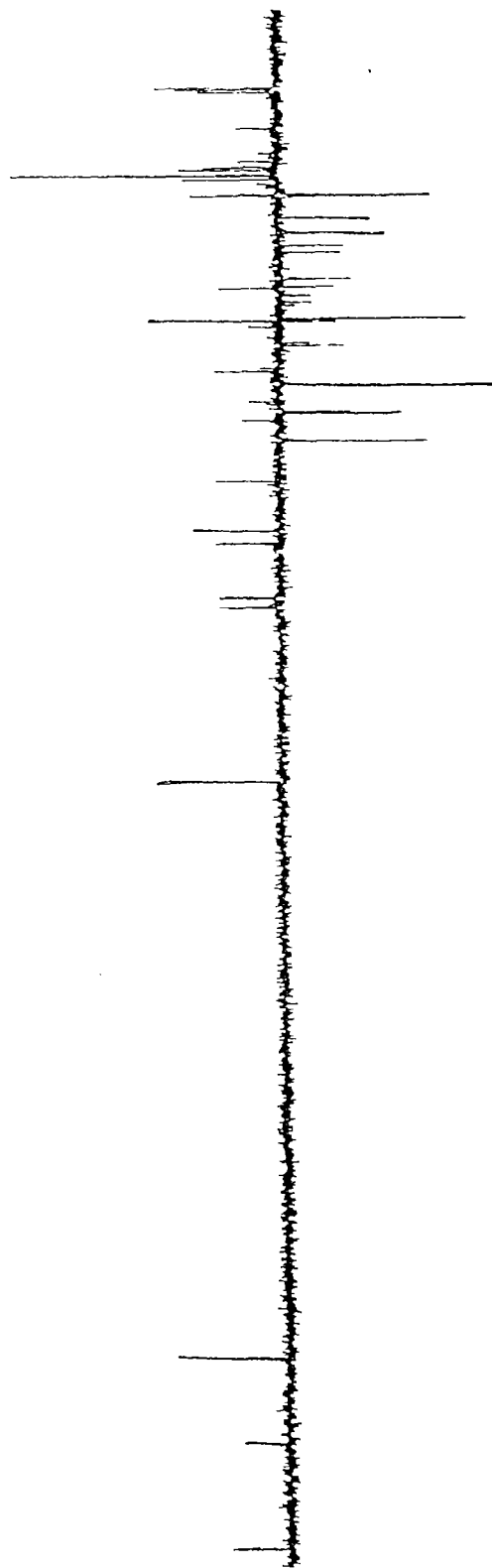


ที่มา : Pouchert & Behke. (1993). The Aldrich library of ^{13}C and 1H FT NMR spectra
vol 3. Wincosin : Aldrich Chemical. 569.

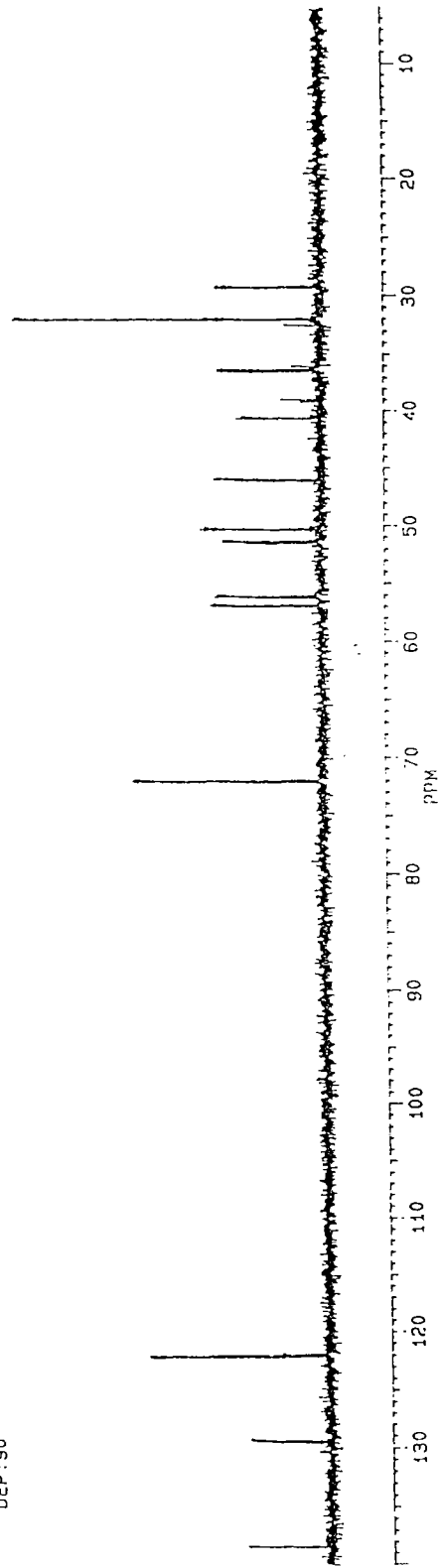
ภาพประกอบ 30 1H NMR สเปกตรัมของ stigmasterol



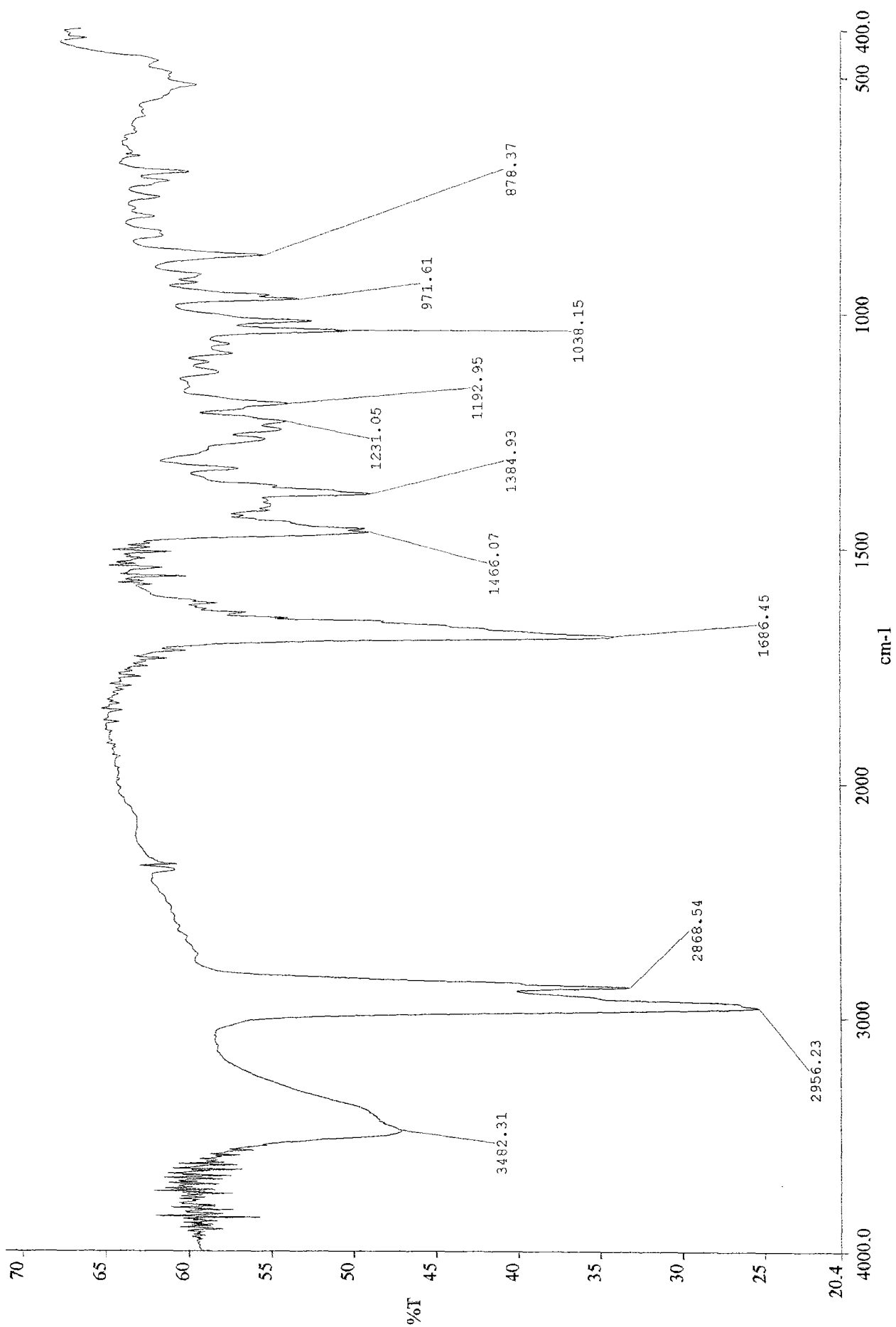
DEPT 135



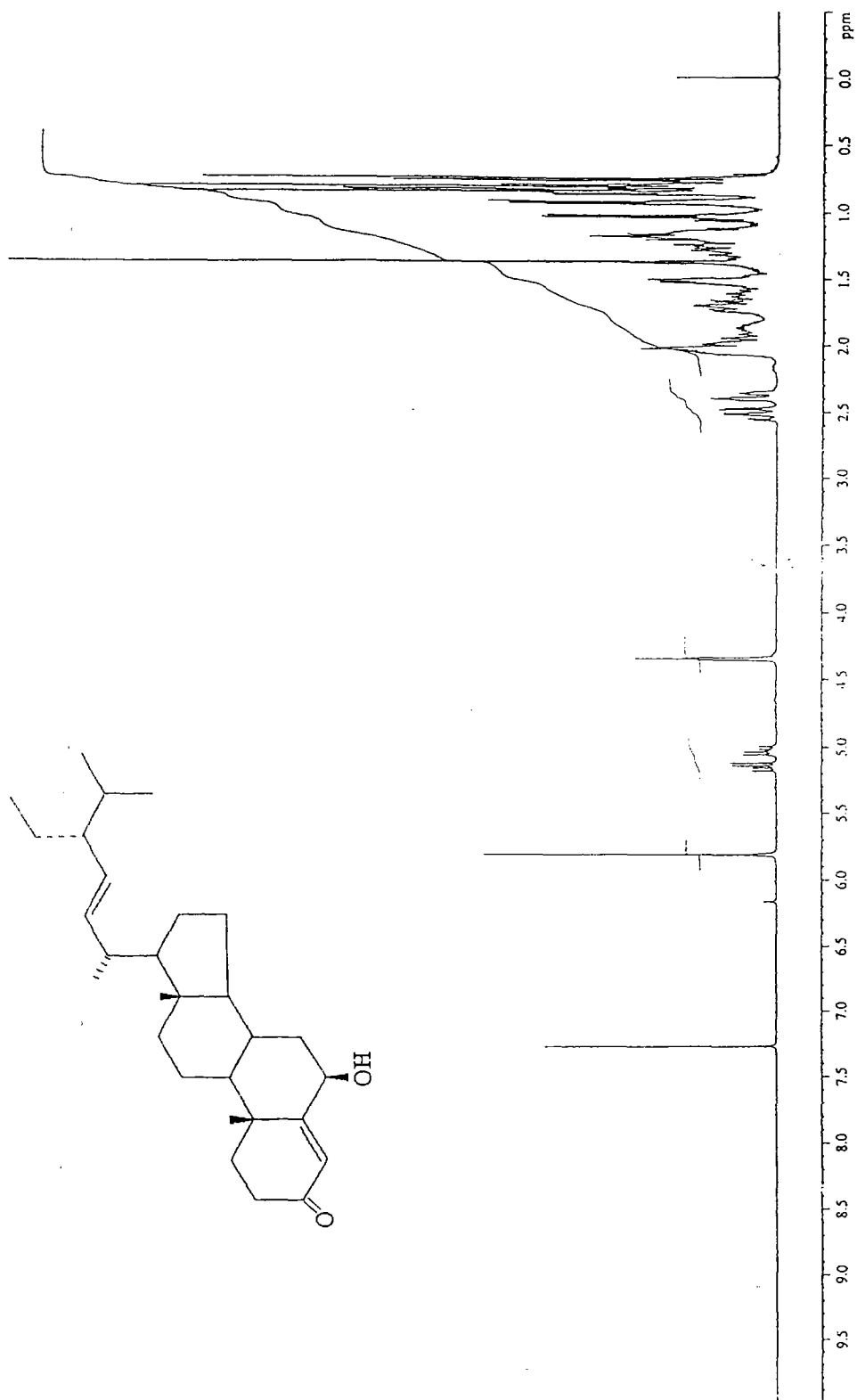
DEPT 90



ภาพประกอบ 32 DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ A

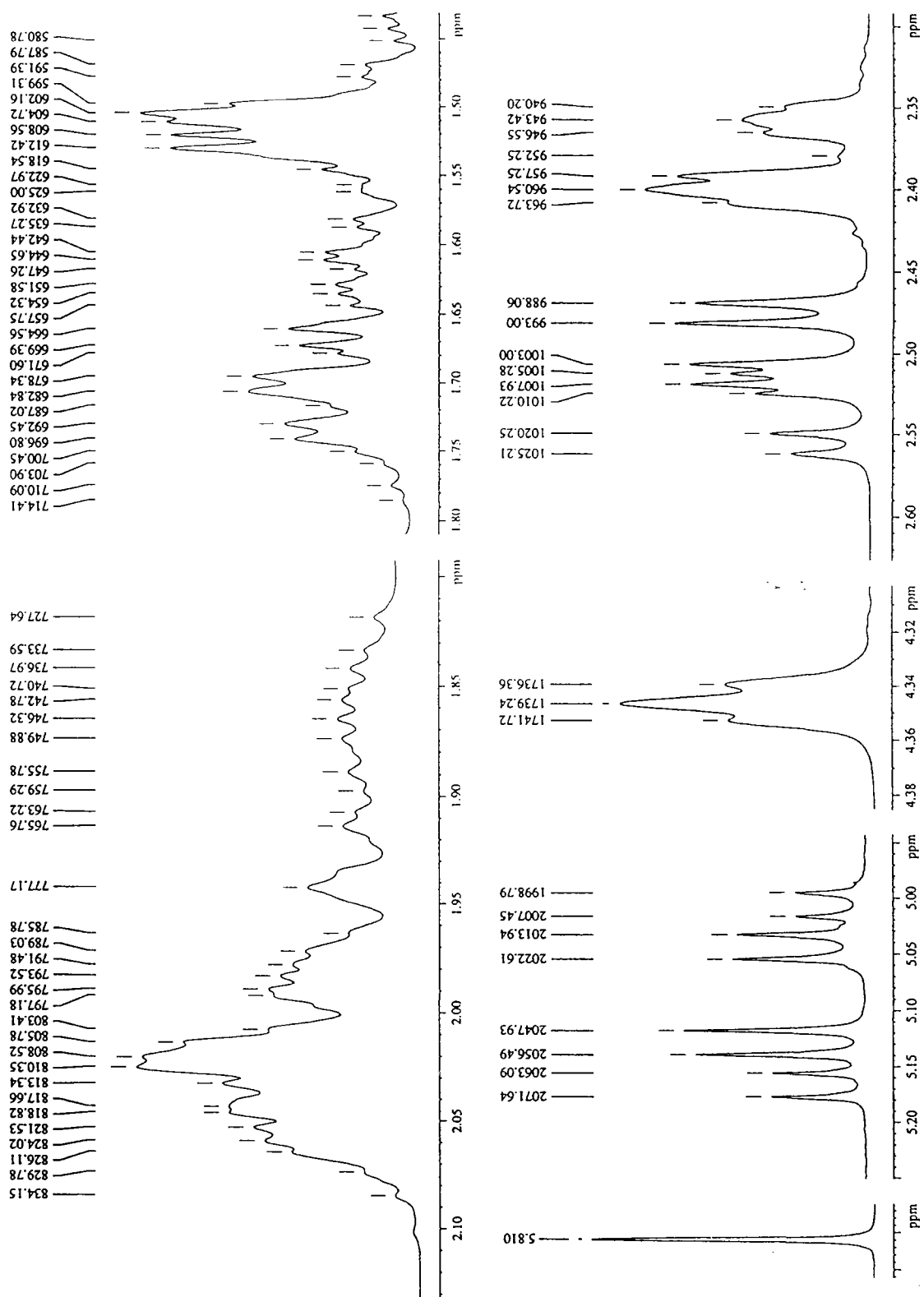


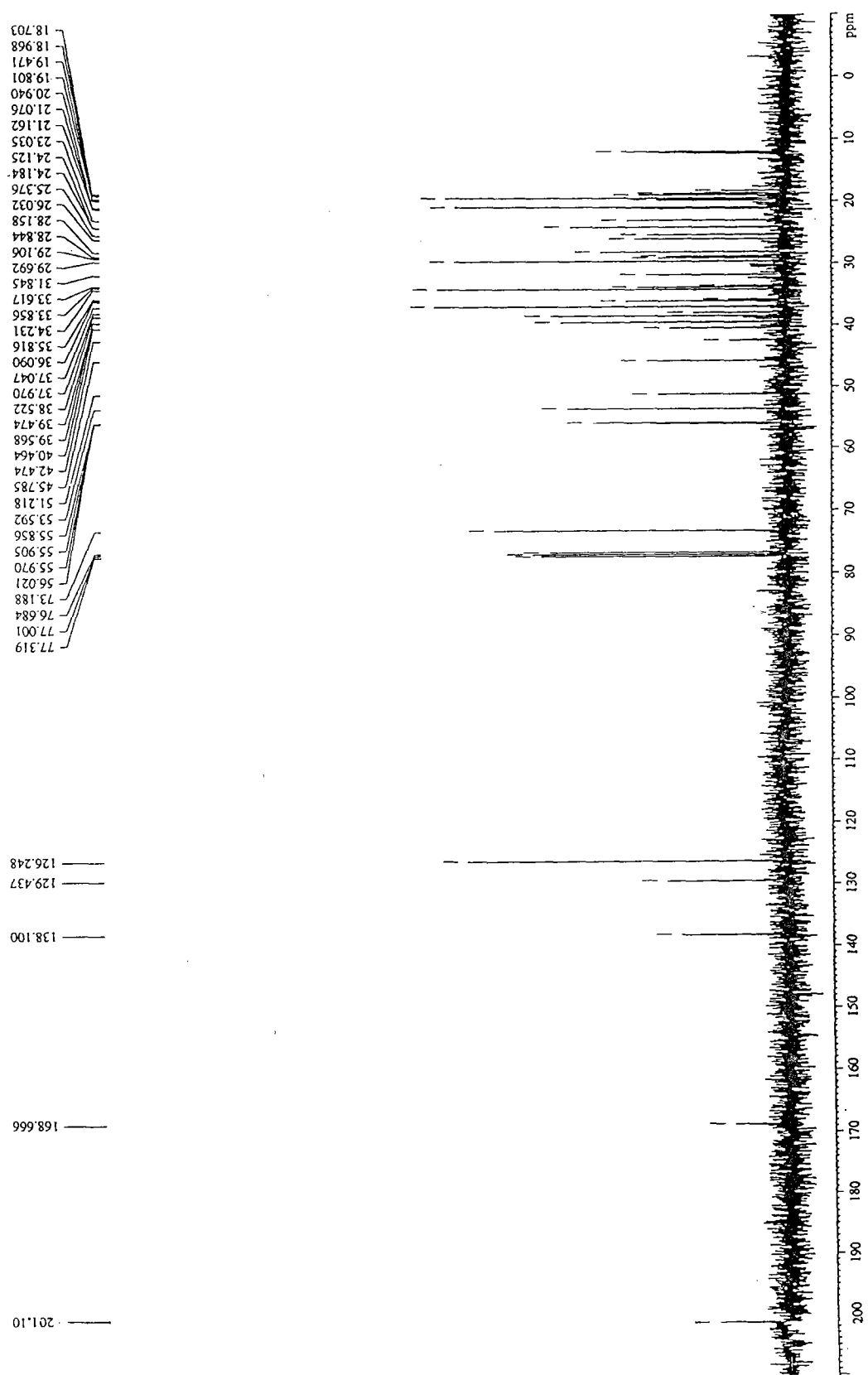
ภาพประกอบ 33 FT IR สเปกตรัมของสารประกอบ B (KBr)



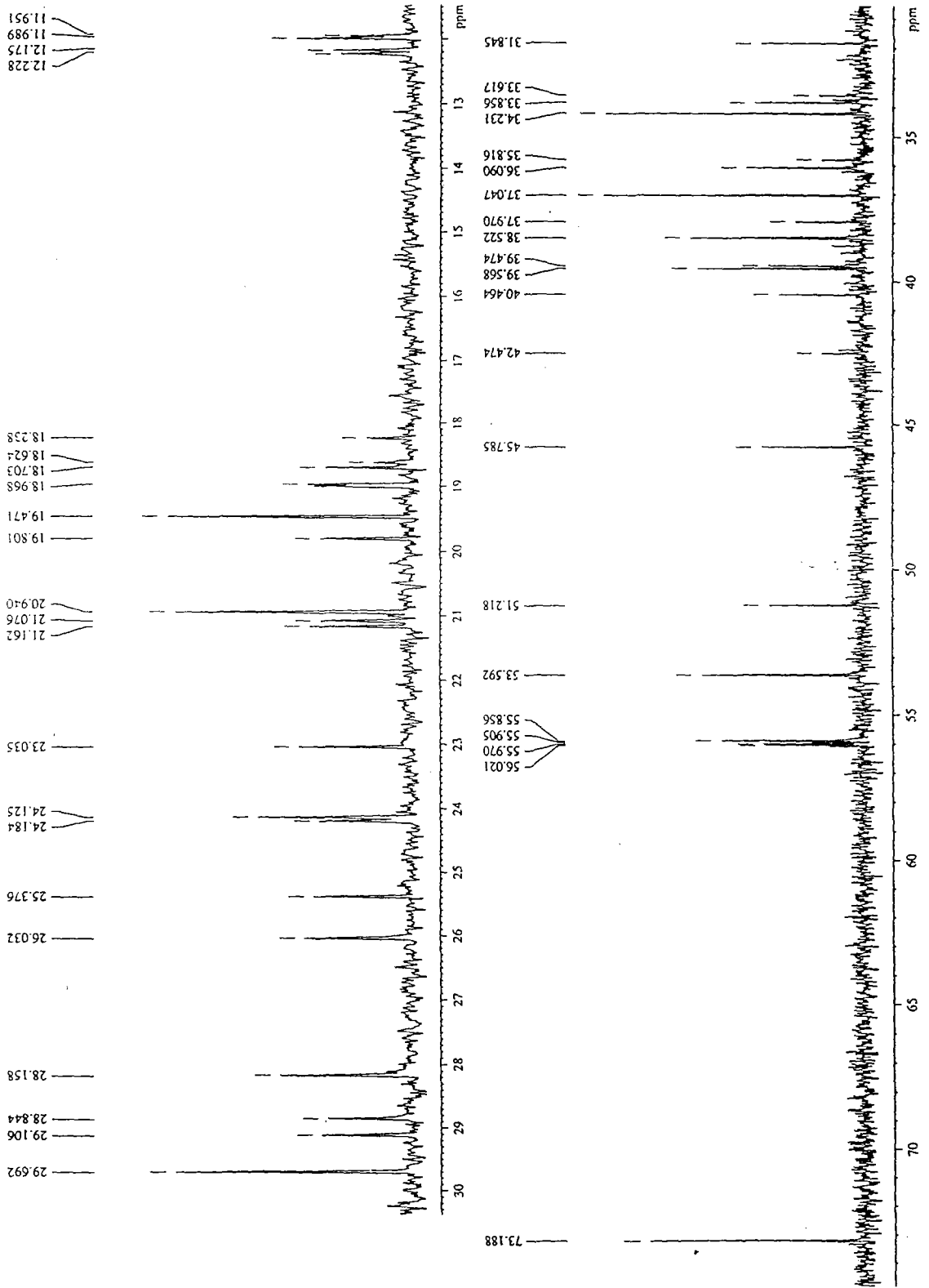
ภาพประกอบ 34 ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B (CDCl_3 , 400 MHz)

ภาพประกอบ 35 ขยายสัญญาณ ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B

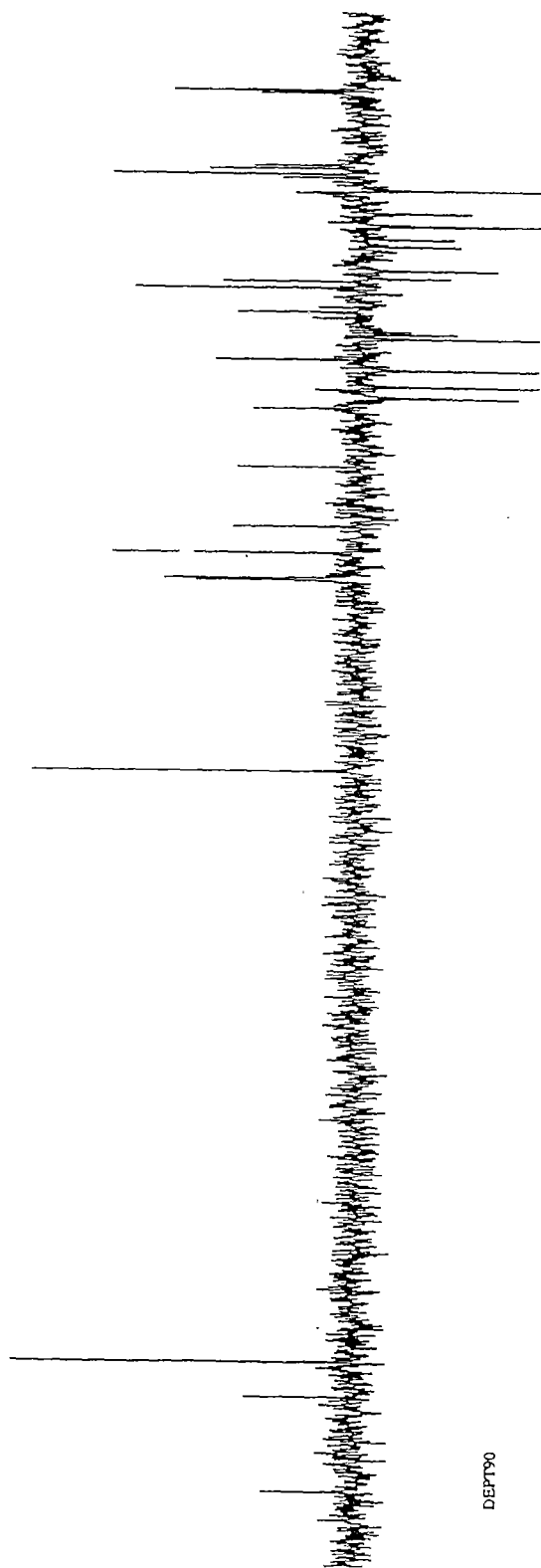




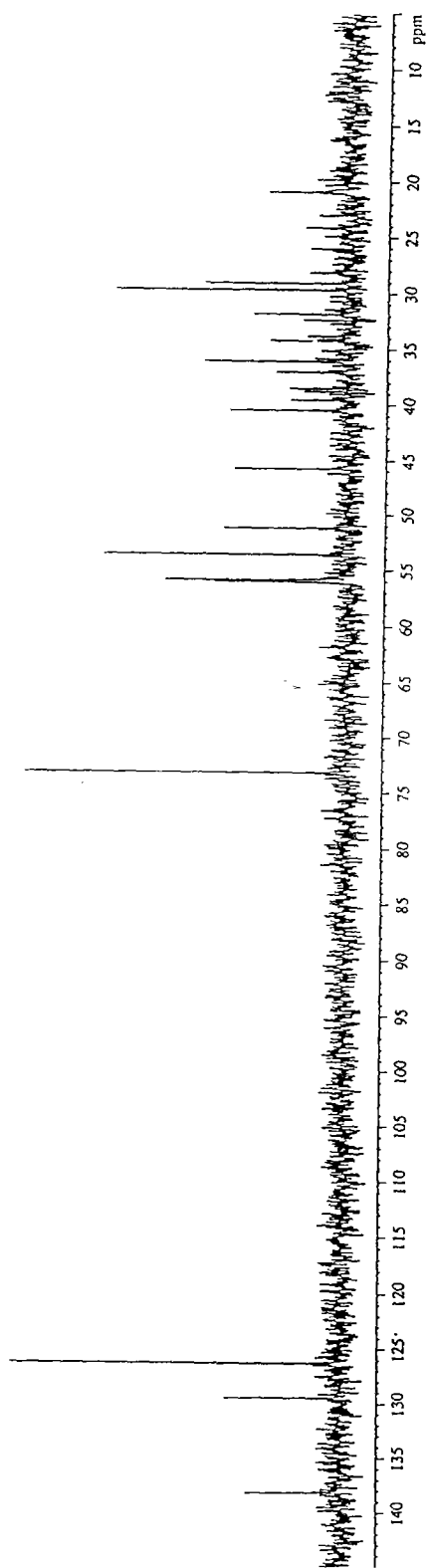
ภาพประกอบ 37 ขยายสัญญาณ ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบ B



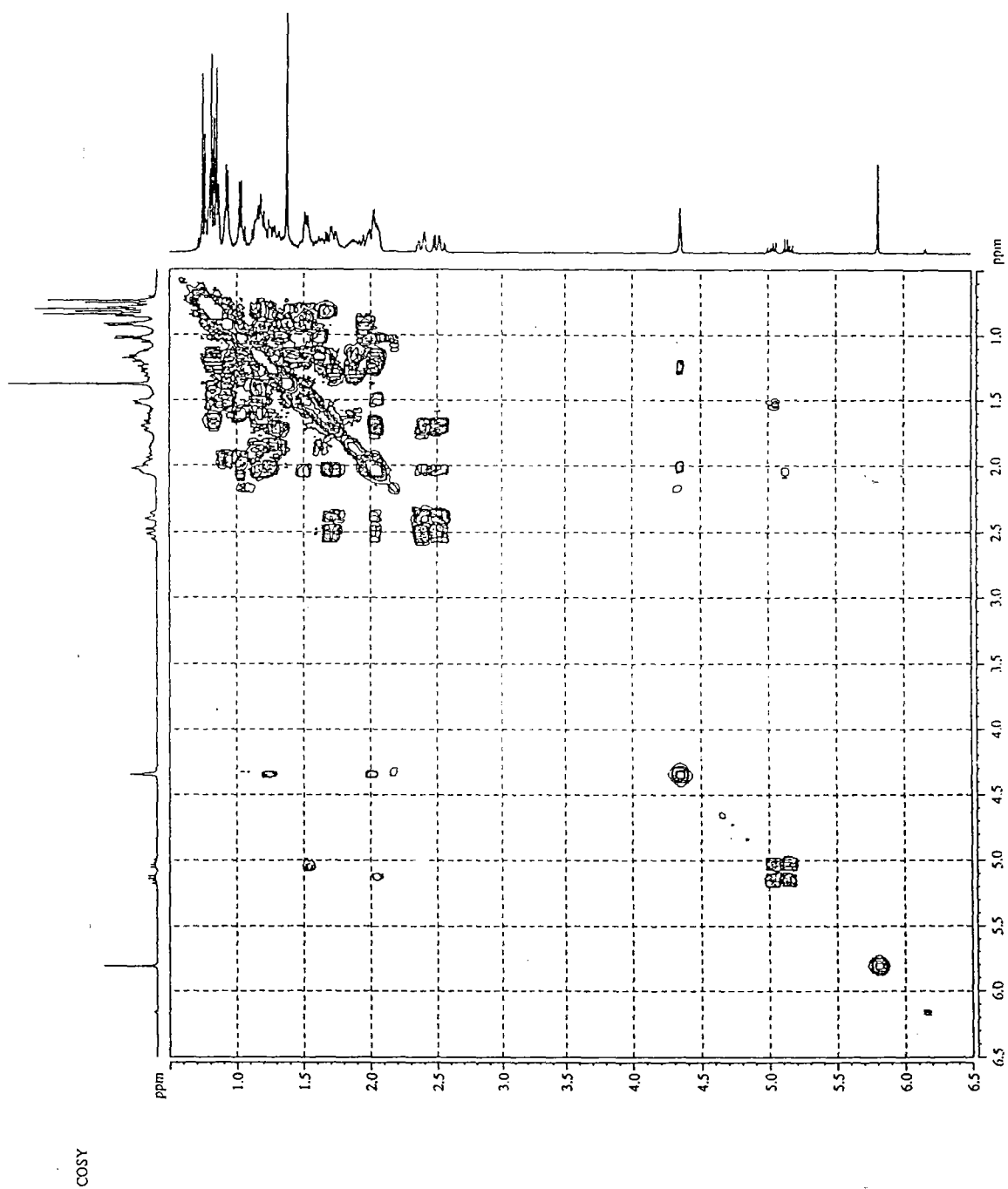
DEPT135



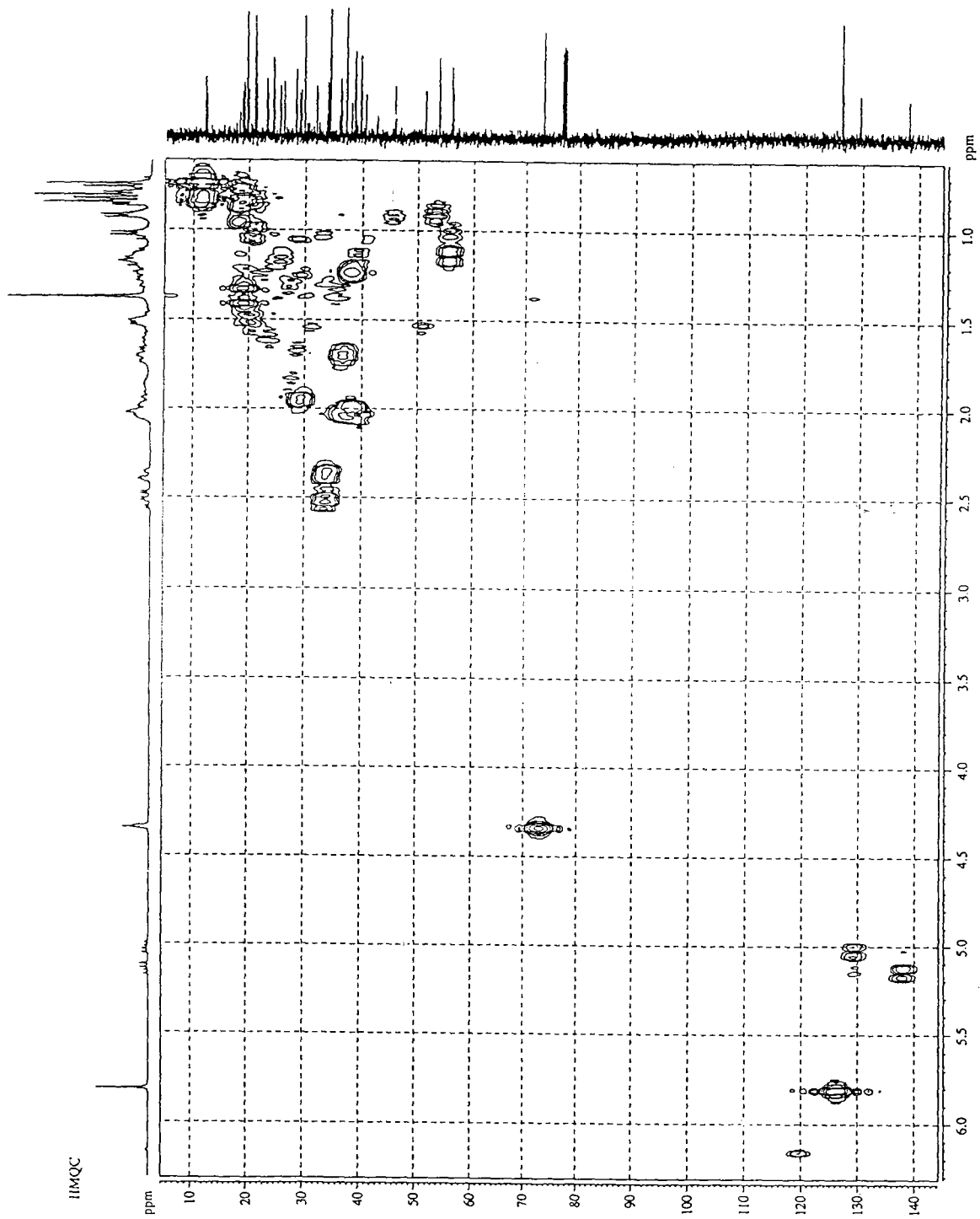
DEPT90



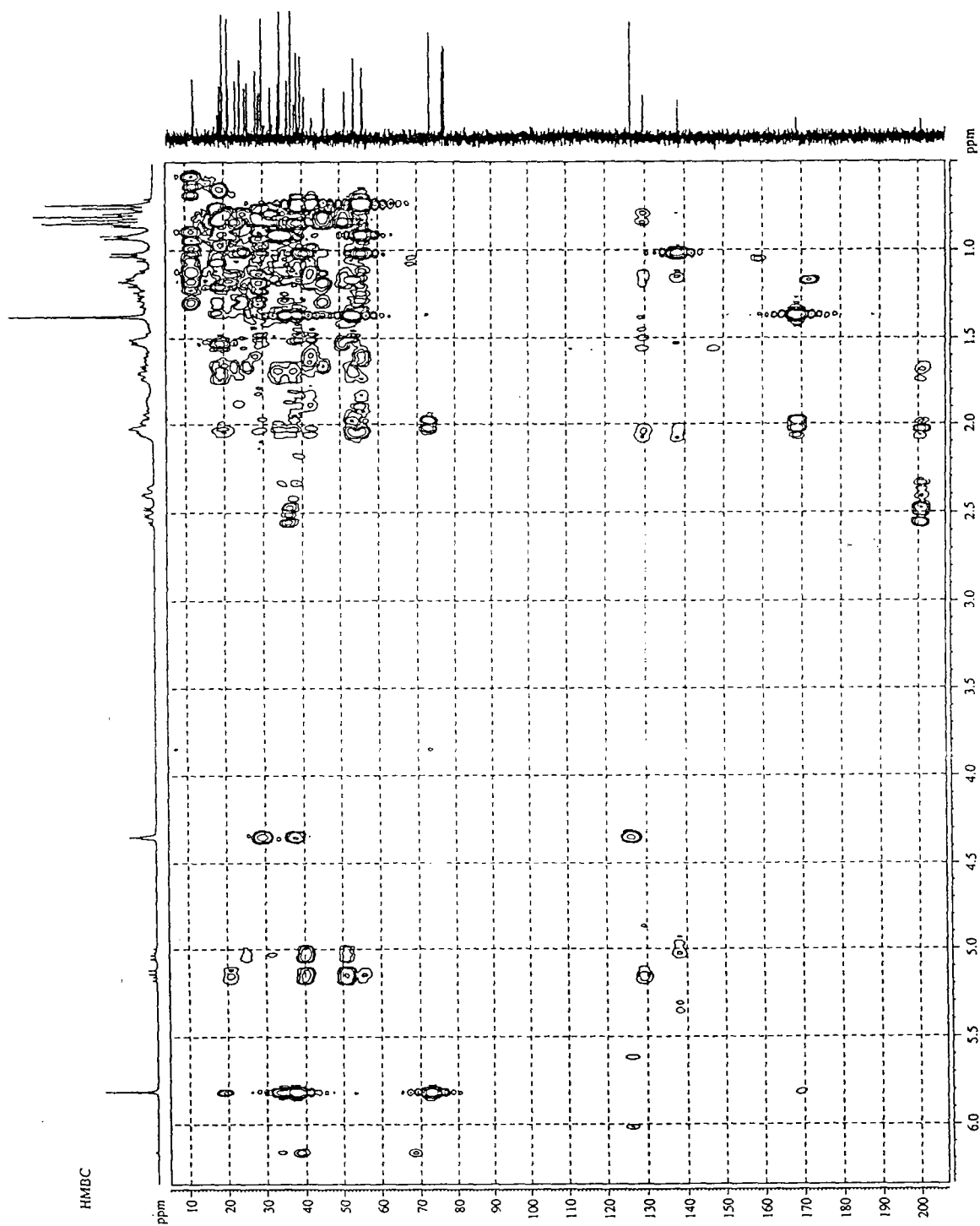
ภาพประกอบ 38 DEPT 90 และ DEPT 135 ของสารประกอบ B



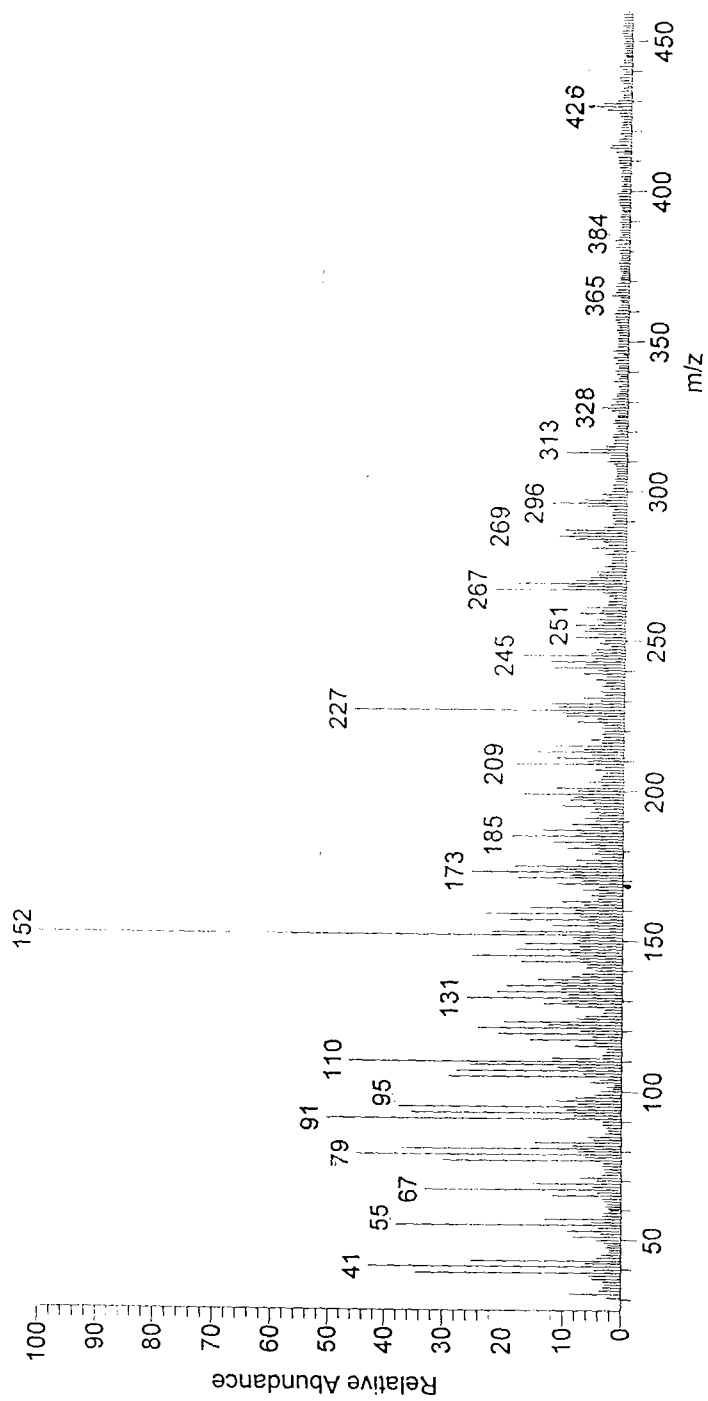
ภาพประกอบ 39 COSY สเปกตรัมของสารประกอบ B



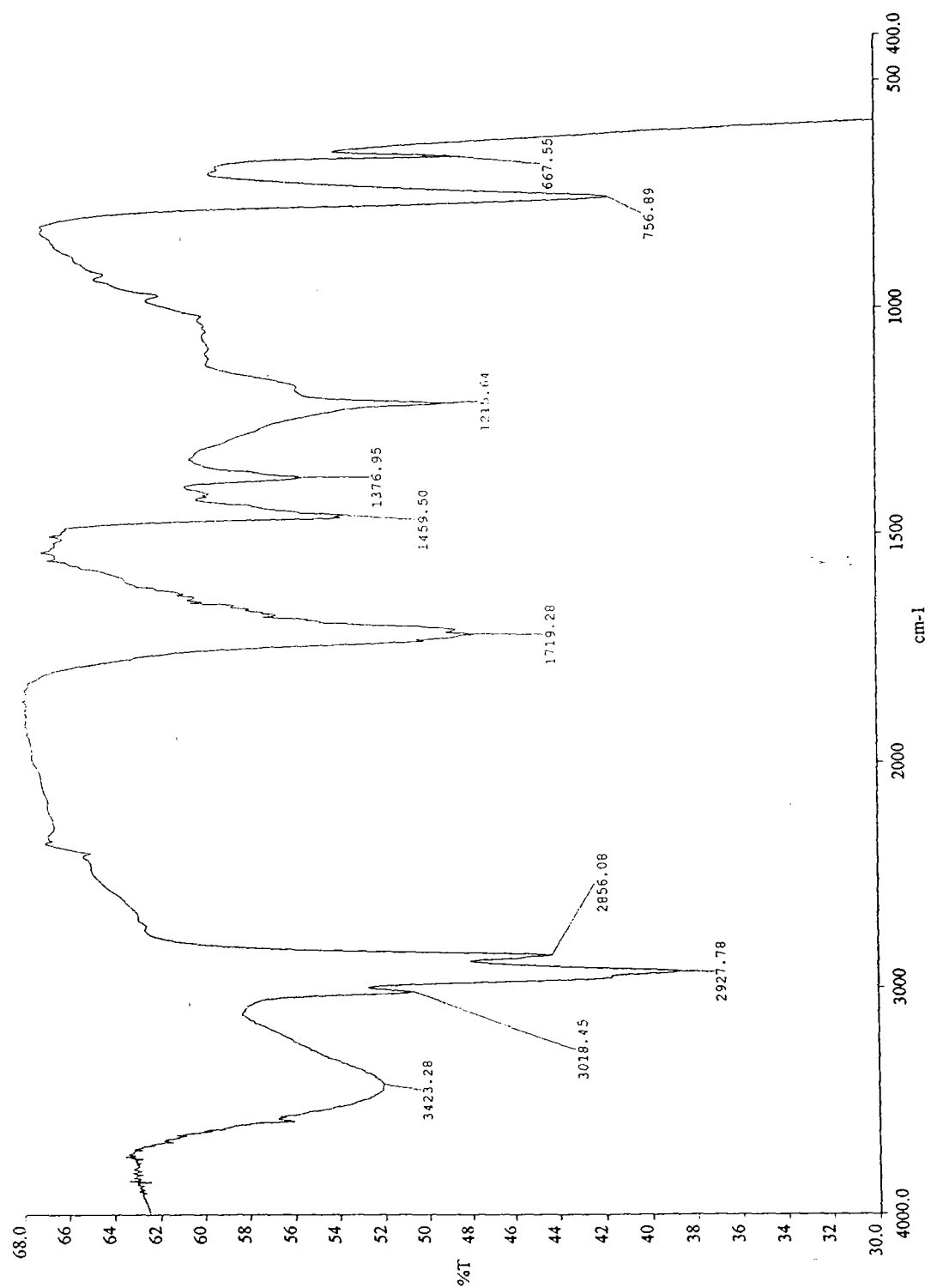
ภาพประกอบ 40 HMQC สเปกตรัมของสารประกอบ B



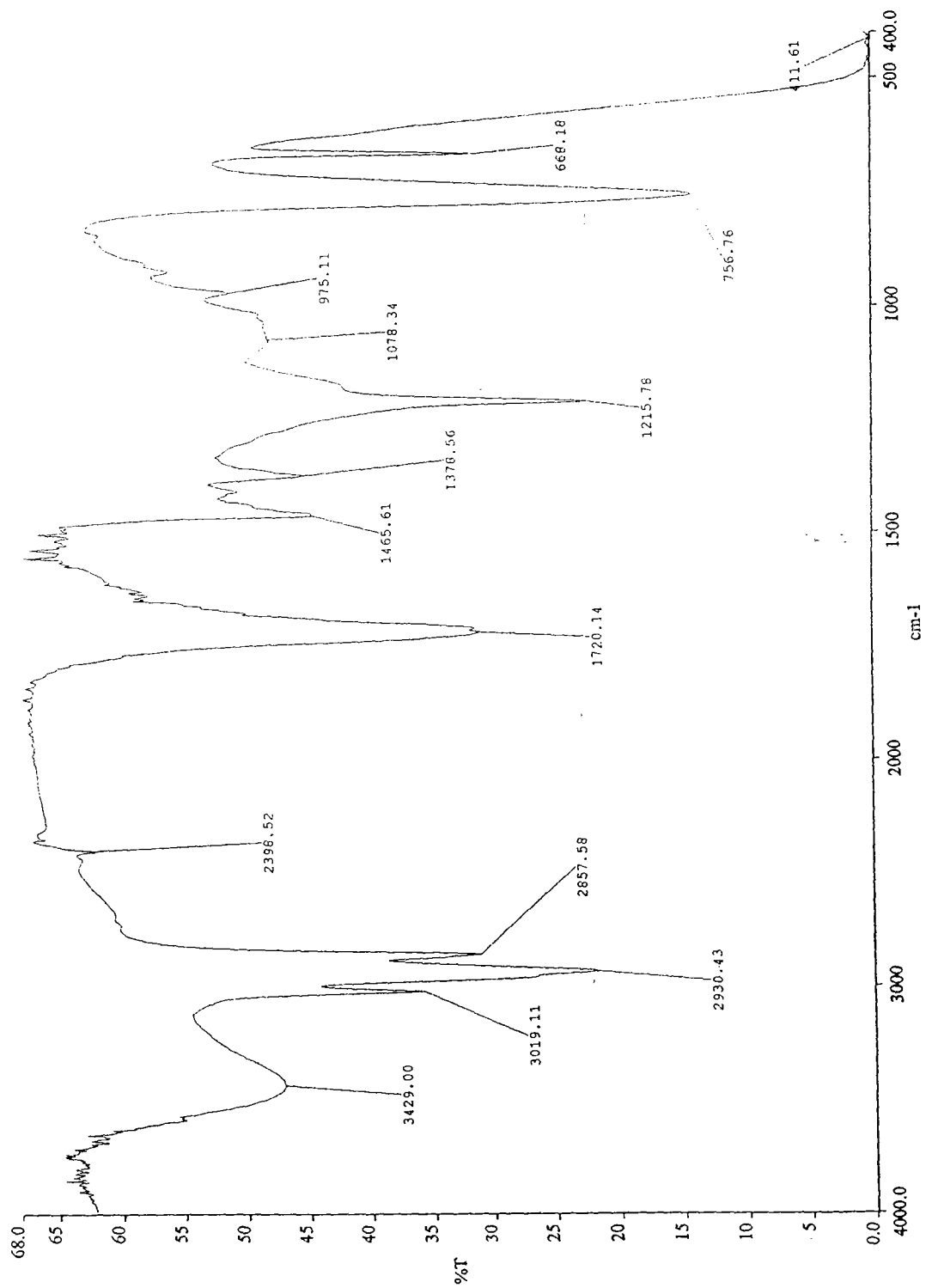
ภาพประกอบ 41 HMBC สเปกตรัมของสารประกอบ B



ภาพประกอบ 42 Mass Spectrum ของสารประกอบ B



ภาพประกอบ 43 FTIR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H3.4.1 (CHCl_3)



ภาพประกอบ 44 FTIR สเปกตรัมของสารกลุ่ม H3.4.5 (CHCl₃)

การเตรียมสารเคมี

1 การเตรียม Anisaldehyde-Sulfuric Acid Spray Reagent (Jork, Funk, and Wimmer. 1990 : 195-198)

conc. Sulfuric acid	8.00 cm ³
Anisaldehyde	0.50 cm ³
Methanol	85.00 cm ³
Glacial acetic acid	10.00 cm ³

ผสมสารดังกล่าวข้างต้นเข้าด้วยกันในอ่างน้ำแข็ง เก็บ reagent ที่เตรียมได้ในตู้เย็น

2 การเตรียม 4 % Trypan blue dye

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

ละลายสารดังกล่าวข้างต้นในน้ำกลั่น 90 cm³ นำไปต้มให้เดือดและคนด้วยแท่งคนแม่เหล็กตลอดเวลา เมื่อละลายดีแล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 - 7.3 ด้วย 1M NaOH และปรับปริมาตรให้เป็น 100 cm³ ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียม RPMI 1640 Media

RPMI Medium 1640 powder	20.90 g
Sodiumbicarbonate (NaHCO ₃)	2.00 g
HEPES	3.00 g
Sodium Penicillin G	0.40 cm ³
Streptomycin	1.00 cm ³
น้ำกลั่น	2.00 L

ละลาย RPMI Medium 1640 powder ในน้ำกลั่น คนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายใส เติม NaHCO₃ และ HEPES คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2 - 7.4 ด้วย 1M NaOH หรือ 1M HCl และปรับปริมาตรให้เป็น 2 L ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปกรองด้วย Millipore filter เพื่อให้ปราศจากเชื้อ เติม sodium penicillin G และ streptomycin เก็บ

สารละลายที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็นและก่อนนำไปใช้เติม 10% NCS เมื่อใช้แล้วนำมาเก็บในตู้เย็น

4. ปฏิกริยา Liebermann-Burchard (วิชา จิรัชญียกุล 2534 : 93-94)

การทดสอบด้วยปฏิกริยา Liebermann-Burchard ใช้ทดสอบสารประเภท steroids จะให้สีเขียวในระยะ 1 ชั่วโมง โดยสีจะเปลี่ยนจากชมพู – แดง – ม่วง – น้ำเงิน – เขียว (การเปลี่ยนสีอาจแตกต่างกันบ้างแล้วแต่ละชนิดของสาร)

วิธีการทดสอบ นำสารที่ต้องการทดสอบใส่ในหลอดทดลองอย่างละหลอด หยด acetic anhydride ลง 3 หยด เขย่าค่อย ๆ ให้สารละลายหมด แล้วค่อย ๆ หยด conc. H_2SO_4 1 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นและเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงจะได้สารละลายเป็นสีเขียว

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

UV	= Ultra violet
FT IR	= Infrared Spectra
^1H NMR	= Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	= Carbon Nuclear Magnetic Resonance
EIMS	= Electron Impact Mass Spectra
M^+	= Molecular ion
m/z	= mass to charge ratio
^1H - ^1H COSY	= H-relayed correlated spectroscopy
DEPT	= Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMQC	= ^1H -detctad Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMBC	= Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
MHz	= Mega Hertz
ν_{max}	= maximum absoption frequencies
cm^{-1}	= wave number
J	= coupling constant
s	= singlet
d	= doublet
dd	= doublet of doublet
t	= triplet
m	= multiplet
oct	= octet
br	= broad
ppm	= parts per million
CDCl_3	= deuteriochloroform
μg	= microgram
TLC	= Thin layer chlomatography
CC	= Column chlomatography
5-FU	= 5-Fluorouracil
ED_{50}	= a concentration of a compound which show 50% killing effect on cells when compared to that of a control

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นาย วินัย สุขราช
วันเดือนปีเกิด	13 ตุลาคม 2500
สถานที่เกิด	อำเภอหินบุรณ จังหวัดคำม่วน
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	90/5 บ้านอุดมวิลัย อ.คันทรี่ จ.สุวรรณเขต สปป.ลาว
ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	Savannakhet Teacher Training College Savannakhet Province Lao P.D.R. Tel : 007-856-41-212180 Fax : 007-856-41-212180
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2522	มัธยมศึกษาปีที่ 6 มัธยมคำม่วน
พ.ศ. 2526	การศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาเคมี-ชีววิทยา มหาวิทยาลัยสร้างกรุงโตก กำแพงนครเวียงจันทน์ สปป.ลาว
พ.ศ. 2539	Certificate in Intensive Thai Course and English Course คณะมนุษยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2543	กศ.ม. เเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร