

รายงานผลโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2544

เรื่อง

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว  
ของสารสกัดจากสมุนไพรราชดำ  
Cytotoxicity of Extract from *Brucea amarissima* Desv.  
Against Leukemia Cells

อาจารย์ชวรงค์ เอื้อสุขอารี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH

OK

495

559

61806

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 39610  
วัน, เดือน, ปี..... 8 สิงหาคม 2544

b.....  
.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สำหรับการใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของสารสกัดจากสมุนไพรราชดำ

Cytotoxicity of Extract from *Brucea amarissima* Desv. Against Leukemia Cells

อาจารย์ชวงค์ เอื้อสุขอารี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

ในพืชสกุลราชดำ (*Brucea amarissima* Desv. หรือ *Brucea javanica* Merr.) พบว่ามีสารประกอบประเภท quassinoid หลายชนิด เช่น Bruceine, Bruceatin และ Brusatol ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB cell ในระดับหลอดทดลอง (*In vitro*) ในการทดลองครั้งนี้ใช้สารสกัดอย่างหยาบจากผลของราชดำต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากผลราชดำมีค่า ED<sub>50</sub> (ความเข้มข้นของยาที่มีผลลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงเหลือครึ่งหนึ่ง) เท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าสารสกัดอย่างหยาบจากผลราชดำยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 แต่มีผลเพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ P388 เท่านั้น

### Abstract

Some plants in the same family of a *Brucea amarissima* Desv. or *Brucea javanica* Merr. are found many quassinoid compounds such as Bruceine, Bruceantin and Brusatol, which have an cytotoxicity against KB cells *in vitro*. In this study, the crude extract from *Brucea amarissima* fruits was examined for their cytotoxic activity against leukemia cells P388. The 50% effective dose (ED<sub>50</sub>) for this crude extract is 26.21 mg/ml. This result revealed that the crude extract from *Brucea amarissima* showed no significant cytotoxic activity but only inhibited the growth of P388 cells.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการรักษาต่างๆ ซึ่งอาจจะสามารถช่วยยืดอายุผู้ป่วยให้ยืนยาวขึ้นและดำรงชีวิตได้เช่นคนปกติซึ่งในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีเช่น 1. เคมีบำบัด 2. การฉายรังสี 3. การใช้ยาต้านมะเร็ง แต่เนื่องจากวิธีที่กล่าวมานั้นมีผลข้างเคียงสูง ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงและไม่มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย นักวิทยาศาสตร์เริ่มให้ความสนใจมาสังเคราะห์ขึ้น โดยการศึกษาสารต้านมะเร็งจากธรรมชาติได้แบ่งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ในระดับต่างๆ ดังนี้

1. สารเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity agents) หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro* culture)
2. สารต้านเนื้องอก (antitumor หรือ antineoplastic agents) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกและมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)
3. สารต้านมะเร็ง (anticancer agents) หมายถึง สารที่ให้ผลในการต้านมะเร็งในการทดลองขั้นคลินิกในคนเท่านั้น (human clinical trials)

โดยในโครงการวิจัยนี้จะทำการทดสอบสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยจะทดสอบจากสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) จากผลแห้งของราชดัด (*Brucea amarissima* Desv.) กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 เนื่องจากพบว่าพืชสกุลเดียวกับสมุนไพรชนิดนี้มีสารประเภท quassinoid เช่น Bruceantin (Kupchan, S.M. และคณะ, 1973) Bruceine A, B, C (Polonsky, J. และคณะ, 1967) Bruceine D, E (Xie, J.X. และคณะ, 1981) และ Brusatol (Eigebaly, S.A. และคณะ, 1979) ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด KB cell ได้ (Anderson, M.M. และคณะ, 1991)

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388
2. เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ทดสอบในระดับสิ่งมีชีวิตต่อไป
3. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาว่าสารชนิดใดในสมุนไพรราชดัดที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388
4. เพื่อเป็นการแนวทางในการพัฒนาการใช้สมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง

### ขอบเขตของโครงการวิจัย

สกัดสารสกัดอย่างหยาบจากผลแห้งของสมุนไพรราชดัด *Brucea amarissima* Desv. แล้วนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อหาความเข้มข้นของยาที่มีผลลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงเหลือครึ่งหนึ่ง (50% Effective dose, ED<sub>50</sub>)

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยให้เห็นถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากราชดัดที่เหมาะสมต่อการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388
2. เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาราชดัดเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง
3. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาทางด้านมะเร็งจากสมุนไพรในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สมุนไพรที่มีประวัติในการรักษาโรคมะเร็ง

มีการนำสมุนไพรนานาชนิดมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเป็นเวลาหลายร้อยปีแล้ว ตัวอย่าง ได้แก่ โปโดไฟลัม (podophyllum) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในประเทศจีนมากกว่า 2,000 ปี จากการศึกษาสารประกอบในยางจากรากของ *Podophyllum hexandrum* และรากของ May-apple (*P. peltatum*) พบสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเป็นสารจำพวกลิแกน (lignan) ทั้งในรูปแบบอิสระและรูปกลัยโคไซด์ แม้ว่าสารสำคัญคือ phyllotoxin และ peltatins จะมีความเป็นพิษสูงไม่สามารถนำไปใช้เป็นยาได้โดยตรงแต่อนุพันธ์ 2 ชนิดของ podophyllotoxin คือ etoposide และ teniposide เป็นยารักษาโรคมะเร็งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

สมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ใช้รักษามะเร็งมาตั้งแต่สมัย ค.ศ. 180 คือ Woody nightsade (*Solanum dulcamara*) สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกจากสมุนไพรนี้เป็นกลัยโคไซด์ของสเตอรอยด์แอลคาลอยด์ คือ  $\beta$ -solamarine

ยาด้านมะเร็งจากพืชชั้นสูงที่มีความสำคัญที่สุดในปัจจุบัน ได้แก่ แอลคาลอยด์จากแพงพวยฝรั่ง (Madagascar periwinkle, *Catharanthus roseus*) จากการศึกษาพบแอลคาลอยด์พวก dimeric indole หลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว ในจำนวนนี้มีแอลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ วินบลาสติน (vinblastine, VLB) และ วินคริสติน (vincristine, VCR) ซึ่งมีการสกัดในเชิงพาณิชย์เพื่อนำมาใช้เป็นยาด้านมะเร็งในปัจจุบัน (เอมอร์ โสมนะพันธ์, 2536)

### การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute; NCI) ได้ใช้คำนิยามเพื่อแบ่งสารที่ออกฤทธิ์ในระดับต่างๆ ดังนี้

1. สารเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity agents) หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro culture*)
2. สารต้านเนื้องอก (antitumor หรือ antineoplastic agents) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกและมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)
3. สารต้านมะเร็ง (anticancer agents) หมายถึง สารที่ให้ผลในการต้านมะเร็งในการทดลองขั้นคลินิกในคนเท่านั้น (human clinical trials)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบัน NCI ใช้การทดสอบเบื้องต้นโดยผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งทำให้เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 และใช้กระบวนการในหลอดทดลอง (9 KB หรือ 9 PS) เป็นแนวทางในการแยกสารออกฤทธิ์ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวให้ผลดีพอสมควร

ในการทดสอบสารที่แยกได้นั้น ถือว่าสารมีฤทธิ์เมื่อมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งต่ำกว่า 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ( $ED_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ ) เมื่อทำการทดสอบกับ KB เซลล์ในหลอดทดลอง
2. มีอัตราส่วนสัตว์ที่รอดชีวิตในกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 120% หรือมากกว่า ( $T/C \geq 120\%$ ) เมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง (เอมอร์ โสมนะพันธุ์, 2536)

#### เทคนิคการสกัดสารจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่ (นันทวัน บุญยะประภัสร์, 2536)

1. **Marceration** เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก
2. **Percolation** เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลาย
3. **Soxhlet Extractor** เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในพลาสติกระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับการเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปพลาสติกด้วยวิธีการกาลักน้ำ พลาสติกนี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในพลาสติก ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วงเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว
4. **Liquid-liquid Extractor** เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนต่อไปเป็นการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (adsorption, partition, ion-exchange, gel filtration) แล้วจึงนำส่วนที่ออกฤทธิ์มาแยกออกด้วย TLC, HPLC หรือ GC เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ การพิสูจน์โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทำได้โดยการใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี (MS, NMR, IR และ UV) รวมทั้ง X-ray crystallography (เอมอร์ โสมนะ พันธุ์, 2536)

### ราชดัด

มีชื่อสามัญอื่นๆ อีกว่า กะดัด ฉะดัด กาจับหลัก เท้ายายม่อมน้อย มะดีควาย ดิคน พญาดาบหัก (ตราด) ฯลฯ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Brucea amarissima* Desv. หรือ *Brucea javanica* (Linn.) Merr. อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีถิ่นกำเนิดในอินเดีย จีนตอนใต้ มาเลเซีย และออสเตรเลีย

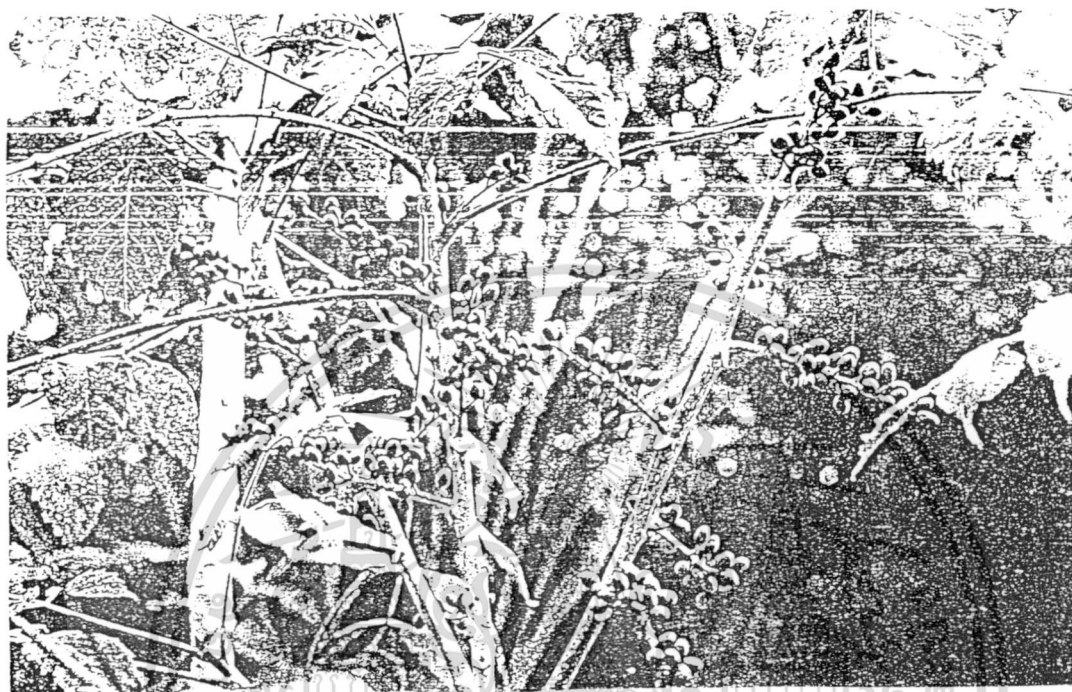
ราชดัดมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูง 2-4 เมตร ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับวนรอบกิ่ง ใบย่อยเป็นรูปไข่แกมหอก กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 5-10 เซนติเมตร ขอบใบหยัก ผิวใบมีขนนุ่มทั้งสองด้าน ดอกเป็นช่อออกที่ซอกใบแบบ panicle ยาว 10-40 เซนติเมตร สีน้ำตาลแดง ขนาดเล็ก แยกเพศ มีต้นที่พบเฉพาะช่อดอกตัวผู้ และต้นที่มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในช่อเดียวกัน ดอกย่อยมีขนาดเล็กสีน้ำตาลแดง มีขนปกคลุม ผลเป็นผลสดสีเขียว (รูปที่ 2.1) เมื่อแห้งมีสีน้ำตาลดำคล้ายเมล็ดมะละกอแห้ง เนื้อในมีสีขาว (รูปที่ 2.2 และ 2.3) รสขมมาก (สมุนไพรรสวนศิริรุกชาติ, 2535)

### ประโยชน์ของราชดัด

ในตำรายาไทยใช้ประโยชน์จากราชดัดในหลายรูปแบบ เช่น ใช้ผลแห้งเป็นยาบำรุงน้ำดี แก้ไข้ แก้บิด ใบใช้เป็นยาพอกสำหรับรักษาโรคกลาก ผลสดใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ

ในผลแห้งพบสาร bruceantin, bruceine A-E, yadanzolid A, F, I ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และเชื้อบิดในหลอดทดลอง (Pavanand, K และคณะ, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 ต้น ใบ และผลราชดัด  
(จาก สมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ หน้า 67, 2535)



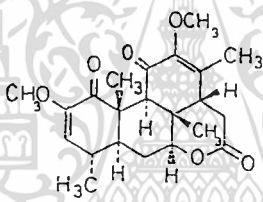
รูปที่ 2 ผลราชดัดแห้ง (จากสมุนไพรสวนสิริรุกษชาติ หน้า 67, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญในราชดัด**

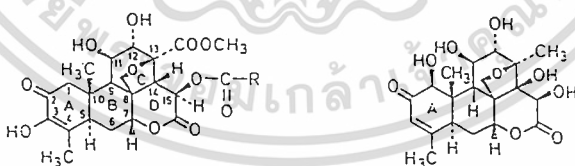
มีการพบสารประเภท quassinoid หลายชนิดในราชดัด quassinoid เป็นสารประกอบซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้าย quassin (รูปที่ 2.4) หรือเป็นอนุพันธ์ของ quassin (2, 12-Dimethoxypicrasa-2, 12-diene-1, 11,-16-trione.; 3aβ, 6aβ, 7, 7α, 8, 11a, 11bα, 11c-octahydro-2, 10-dimethoxy-3, 8α, 11aβ-tetramethylphenanthro [10, 1-bc]pyran-1, 5, 11(4H)-trione)

bruceine A, B, C, D, bruceantin และ brusatol มีฤทธิ์ในการยับยั้ง KB cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งชนิด epidermoid carcinoma ของมนุษย์ โดยมีความเข้มข้นที่สามารถลดจำนวนเซลล์เหลือครึ่งหนึ่ง(50% effective dose ,ED<sub>50</sub>) ของ bruceine A, B, C, D, bruceantin และ brusatol เป็น 0.098 μg/ml, 0.55 μg/ml, 0.021 μg/ml, 1.158 μg/ml, 0.008 μg/ml และ 0.102 μg/ml ตามลำดับ (Anderson และคณะ, 1991)



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ quassin (Windholz, M. in The Merck Index, 1983)

สาร quassinoid ที่พบในราชดัด ได้แก่ bruceine A, B, C, D, E, bruceantin, bruceoside D, E, F และ brusatol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.5



R	
1	bruceine A
2	bruceine B
3	bruceine C
4	bruceantin
5	brusatol
6	bruceoside (parent alcohol)

รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างของสารประกอบพวก quassinoid บางชนิดที่พบในราชดัด

(Anderson และคณะ from *Planta Med.* 57(1991))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### P388 lymphocytic leukemic cell

เซลล์ P388 ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการหาสารต้านมะเร็งจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ สารกึ่งสังเคราะห์ และสารสังเคราะห์ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ P388 ได้ทั้งในระดับหลอดทดลอง (*In vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*In vivo*)

สารสกัดอีเทอร์จาก *Rhaphidophora korthalsii* สารสกัดแอลกอฮอล์จากรากของ *Melia azedarach* และสารสกัดจาก pericarp ของ *Mallotus japonicus* มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ P388 ในระดับหลอดทดลอง สารสกัดเอทานอลของ *Geigeria alata* แสดงศักยภาพว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 น้ำมันหอมระเหยจาก *Geigeria alata* หรือ  $\alpha$ -pinene มีผลกระทบต่อเซลล์ P388 ในระดับหลอดทดลอง สารกึ่งสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง (antitumor) ที่แยกได้จากเห็ดพิษ illudin S (6-Hydroxymethylacylfulvene) ก็แสดงผลเป็นพิษต่อเซลล์ P388 เช่นกัน (Teaktong, T.,1999)

เซลล์ P388 เป็นเซลล์ที่เริ่มแรกแยกได้มาจากหนูที่เป็นมะเร็ง เราสามารถเลี้ยงเซลล์นี้โดยการปลูกถ่ายลงในหนูหรือเลี้ยงในอาหารเหลวก็ได้ ในอาหารเหลวเราสามารถเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารต่างๆ เช่น RPMI 1640, Fischer's medium และ Eagle's medium โดยเติมด้วย fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะ เช่นเดียวกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เซลล์นี้ก็ต้องการกรดอะมิโนอย่างน้อย 13 ชนิด ได้แก่ arginine, cystine, glutamine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine และ valine ในการอยู่รอดและการเจริญเติบโต นอกจากนี้เซลล์ P388 ก็ยังต้องการโพรวูเวทสำหรับปฏิกิริยาการสร้างและสลายสารประกอบของเซลล์ด้วย

fetal bovine serum ถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10% ซึ่งซีรัมเป็นส่วนผสมของสารประกอบทางชีววิทยาซึ่งประกอบด้วยปัจจัยการเจริญของเซลล์ (cell growth factor) โปรตีนขนส่ง (transport protein) ฮอร์โมน แร่ธาตุ และไขมัน ถ้าไม่เติมซีรัมลงในอาหารจะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร

สำหรับยาปฏิชีวนะนั้นเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และจาก mycoplasma ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งยาปฏิชีวนะมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะออกฤทธิ์แตกต่างกัน

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### อุปกรณ์

1. งานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
2. เครื่องแก้วต่างๆ
3. ตู้ปลอดเชื้อ
4. ตู้ควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ
5. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
6. เครื่องชั่ง
7. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)
8. Hemacytometer

#### สารเคมี

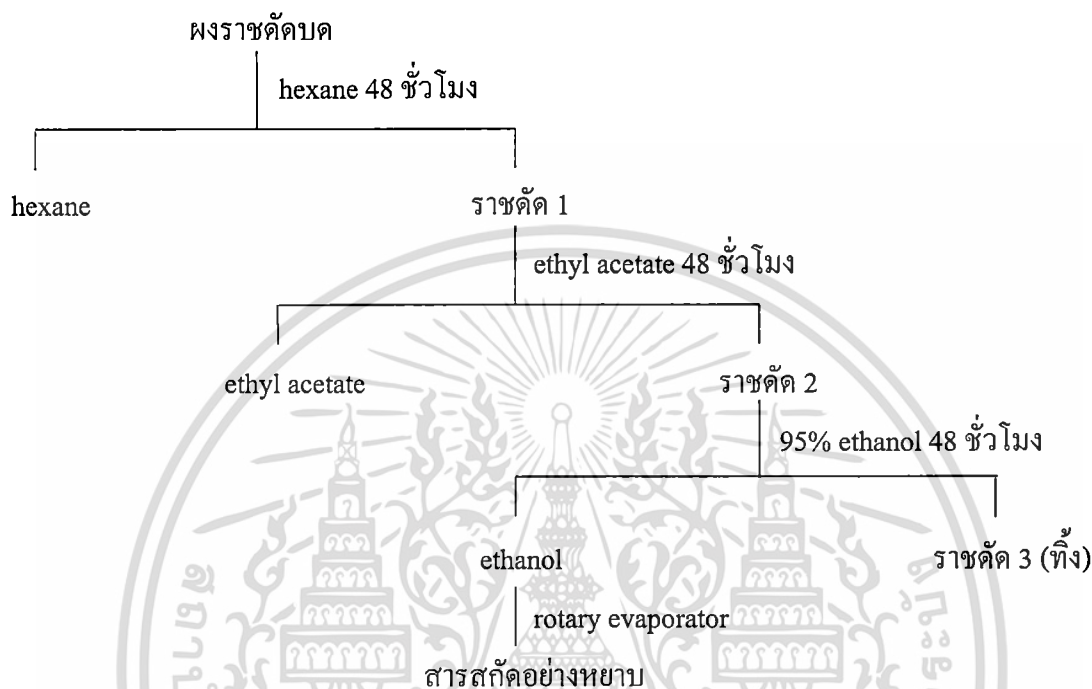
1. อาหาร RPMI 1640 จาก Gibco BRL #31800-022
2. fetal bovine serum จาก Gibco BRL #10270-098
3. hexane
4. ethyl acetate
5. 95% ethanol
6. 0.85% normal saline
7. trypan blue 0.25%

### การสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด

นำผลราชดัดไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้เป็นผงชั่งน้ำหนักแห้ง สกัดผงราชดัดแห้งด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet ด้วย hexane ที่ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำกากของราชดัดที่เหลือมาสกัดด้วย ethyl acetate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 95% ethanol ที่ 60 องศาเซลเซียสอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดที่ต้องการจะละลายอยู่ในชั้นของ ethanol นำส่วนของ ethanol นี้ไประเหยภายใต้ความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดอยู่ในลักษณะของแข็ง (รูปที่ 3.1) นำไปชั่งน้ำหนัก



รูปที่ 5 การเตรียมสารสกัดอย่างหยาบจากราชตัด นำผลราชตัดบดมาสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย และนำส่วนของราชตัดที่เหลือซึ่งจะนำมาสกัดต่อด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นนำส่วนของราชตัดที่เหลือไปสกัดต่อด้วย ethanol แล้วนำสารละลาย ethanol นี้ไประเหยก่อนเพื่อให้ได้สารสกัดอย่างหยาบจากราชตัด

#### การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบกับเซลล์

นำสารสกัดในรูปของแข็งที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอนเพื่อแยกของแข็งที่ไม่ละลายออก ชั่งน้ำหนักของแข็งที่ได้ คำนวณความเข้มข้นของตัวยาที่เหลือ ทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ด้วยวิธีการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน เก็บตัวยาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อยังไม่ได้ใช้

#### เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 ได้รับมาจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (The National Cancer Institute of Thailand) เลี้ยงเซลล์ P388 ในอาหาร RPMI 1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

kanamycin 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในงานเพาะเลี้ยง บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5%

ทำการย้ายเซลล์ที่เจริญเติบโตและเริ่มแอ็ดในงานเพาะเลี้ยงสู่อาหารใหม่ (subculture) ประมาณทุกๆ 3 วันเพื่อรักษาเซลล์ไว้ให้อยู่ในช่วง log phase เสมอ

### วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์

ใส่เซลล์ P388 ลงในงานเพาะเลี้ยงซึ่งมีอาหาร RPMI 1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum และ kanamycin 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของเซลล์  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยการบ่มเซลล์กับสารสกัดจากราชาดที่มีความเข้มข้น 0 20 25 30 35 40 45 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% วัดการเจริญของเซลล์ทุกวันเป็นเวลาเดียวกันเป็นเวลา 7 วัน โดยการนับเซลล์มีชีวิตที่ย้อมด้วยสารละลาย trypan blue ความเข้มข้น 0.25% ใน 0.85% normal saline

### การนับเซลล์

Trypan blue เป็นหนึ่งในสีย้อมที่นิยมใช้ในการย้อมเพื่อนับเซลล์มีชีวิต วิธีนี้มีหลักการที่ว่า เซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมขณะที่เซลล์ตายจะติดสีย้อมเนื่องจากเกิดช่องที่เชื่อมหุ้มเซลล์ทำให้สามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้

ใช้สารละลาย trypan blue 0.25% และ hemacytometer ในการนับเซลล์ในแต่ละงานเพาะเลี้ยง โดยดูดสารละลาย trypan blue 0.2 มิลลิลิตร และตัวอย่างเซลล์ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง วางกระจกปิดสไลด์ (cover-slip) ลงบน hemacytometer ดูดตัวอย่างใส่ใน chamber ของ hemacytometer นับเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสี) ในช่องขนาด 1 ตาราง มิลลิเมตรตรงกลาง และช่องที่มุมทั้งสี่ของตาราง จากนั้นคำนวณหาจำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ 1 ช่อง

## ผลการทดลอง

### ผลของสารสกัดจากราชดัดต่อลักษณะทั่วไปของเซลล์ P388

ลักษณะทั่วไปของเซลล์ P388 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัดจะมีลักษณะกลม เซลล์มีความแววมและใส เซลล์จะมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เริ่มมีรูปร่างไม่กลม ในวันที่ 5 เริ่มมีจำนวนลดลง ในขณะที่วันที่ 7 พนังเซลล์จะเริ่มไม่เรียบ เซลล์ไม่ใส

ส่วนลักษณะทั่วไปของเซลล์ที่ถูกเติมด้วยสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เซลล์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันแรกหลังจากเติมยา โดยจะมีรูปร่างผิดปกติและไม่ใส ในวันที่ 2 จำนวนเซลล์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด และพณังเซลล์จะมีลักษณะผิดปกติมากขึ้น หลังจากวันที่ 3 แทบมองไม่เห็นพณังเซลล์ ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไปจะแทบไม่สามารถพบเซลล์ได้เลย

### ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อเลี้ยงเซลล์ P388 ในอาหาร RPMI 1640 เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้เซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิตร ได้ผลเป็นปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ดังตารางที่ 4.1

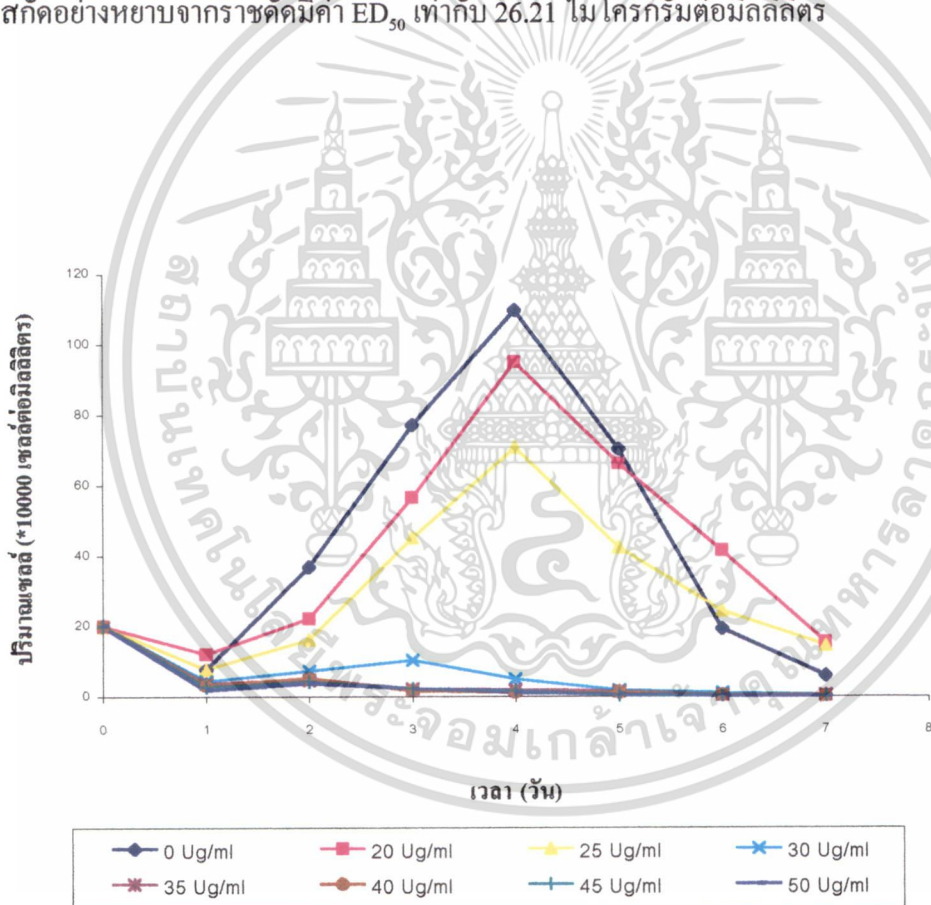
ตารางที่ 1 ตารางแสดงปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ในแต่ละวันในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณเซลล์เฉลี่ยในแต่ละวัน ( $\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิตร)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
0	7.80	36.80	77.10	109.60	70.30	19.10	5.90
20	12.00	22.10	56.40	95.10	66.00	41.40	15.30
25	7.70	16.10	45.00	70.70	42.20	24.23	14.40
30	4.40	7.30	10.20	4.90	1.80	0.90	0.30
35	3.60	4.70	2.20	1.90	1.40	0.40	0.30
40	3.00	5.10	1.80	1.20	1.00	0.40	0.00
45	2.75	4.20	2.25	1.60	0.30	0.20	0.00
50	1.80	3.70	2.10	1.00	0.60	0.20	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างผลของสารสกัดจากราชคัตแต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์กับการเจริญของเซลล์เมื่อไม่ได้เติมสารสกัดจากราชคัต (control) ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) (สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์, 2534) ได้ผลว่า สารสกัดจากราชคัตทุกความเข้มข้นมีผลต่อเซลล์ต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P < 0.05$ )

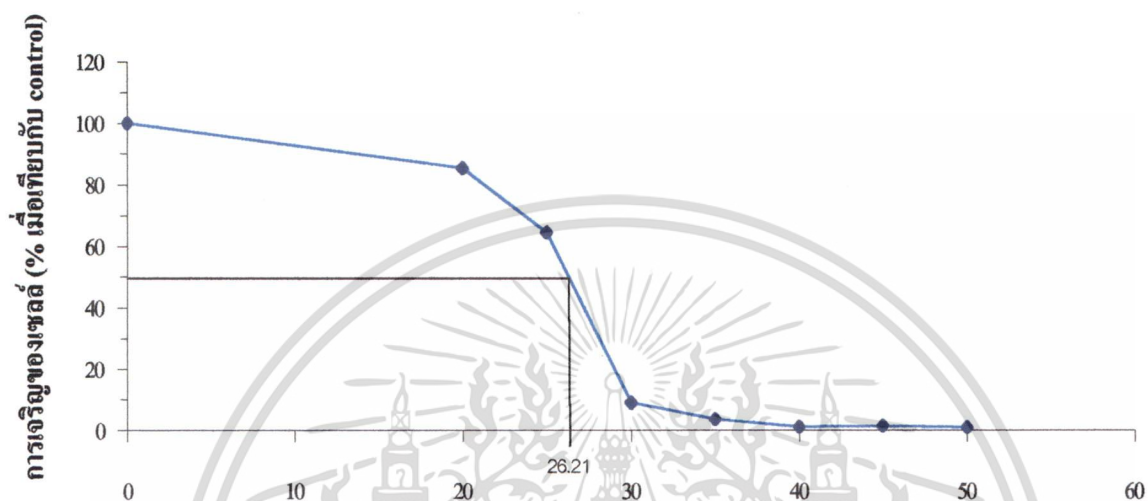
ผลการเจริญของเซลล์แสดงอยู่ในรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าเซลล์จะมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 4 นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างของสารสกัดจากราชคัตแต่ละความเข้มข้นเมื่อเทียบกับ control ในทางสถิติมากที่สุดอีกด้วย เราจึงใช้ข้อมูลของวันที่ 4 นี้ในการคำนวณหาค่า  $ED_{50}$  ซึ่งได้ผลว่าสารสกัดอย่างหายจากราชคัตมีค่า  $ED_{50}$  เท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 6 แผนภูมิเส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์และเวลาหลังจากเติมสารสกัดจากราชคัตความเข้มข้นต่างๆ แล้ว

(ปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชคัตทุกความเข้มข้นในแต่ละวันมีปริมาณเซลล์แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ค่า  $P < 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ความเข้มข้นของสารสกัดจากราชดัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

รูปที่ 7 แผนภูมิเส้นแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ในวันที่ 4 เมื่อเทียบกับ control ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากราชดัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

### สรุปผลของความเป็นพิษของสารสกัดจากผลราชดัดต่อเซลล์ P388

เซลล์ P388 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเริ่มมีลักษณะผิดปกติตั้งแต่วันที่ 1 หลังจากเติมสารสกัดลงไป และมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากเติมสารสกัดลงไป 2 วัน แตกต่างจากเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติซึ่งเริ่มมีลักษณะผิดปกติเพียงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 4 และเริ่มมีปริมาณลดลงตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหายาจากผลราชดัดต่อเซลล์ P388 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0 20 25 30 35 40 45 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเซลล์  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวัดปริมาณเซลล์ทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วันพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากราชดัดที่มีผลลดจำนวนเซลล์ลงเหลือครึ่งหนึ่ง ( $ED_{50}$ ) มีค่าเท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดจากราชดัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 เนื่องจากสารสกัดจากพืชที่ถือว่ามีพิษต่อเซลล์จะต้องมีค่า  $ED_{50} < 20$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดจากราชดัดจึงมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของเซลล์ P388 เท่านั้น

### วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากราชดัด แม้จะพบว่าสารสกัดนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 ได้ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดนี้กับเซลล์ปกติด้วย และนอกจากนี้ยังควรศึกษาถึงวิธีสกัดหาสารประกอบซึ่งเป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ P388 เพราะถ้าเราสามารถสกัดสารให้มีความบริสุทธิ์มากกว่านี้ก็น่าจะทำให้ค่า  $ED_{50}$  ลดลง เพื่อที่จะได้นำไปพัฒนาการใช้สารสกัดนี้ทดสอบกับสิ่งมีชีวิตต่อไป และเป็นแนวทางการนำสารจากธรรมชาติไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้จริง

### เอกสารอ้างอิง

นันทวัน บุญยะประภัสร์ ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 2 เล่มที่ 1 หน้า 99-136

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 2536.

สมุนไพรสวนสิริรุกชาติ (พร้อมจิตร ศรีลัมพ์, บรรณาธิการ) พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 67

อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ป. 2535.

สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์ สถิติเพื่อการวิจัยทางพืชศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์เพื่อนชีวิต

กรุงเทพฯ 2534.

เอมอร โสมนะพันธ์ ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 2 เล่มที่ 2 หน้า 202-227

ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 2536.

Anderson, M.M., O's neill, M.J., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. 1991. *In Vitro* Cytotoxicity of a Series of Quassinoids from *Brucea javanica* Fruits Against KB Cells. *Planta Med.* 57 : 62-64.

Eigebaly, S.A., Hall, I.H., Lee, K.H., Sumida, Y., Imakura, Y., Wu, R.Y. 1979. Antitumor agents. XXXV : Effects of brusatol, bruceoside A, and bruceantin on P-388 lymphocytic leukemia cell respiration. *J. Pharm Sci.* 68(7) : 887-890.

Kupchan, S.M., Britton, R.W., Ziegler, M.F., Sigel, C.W. 1973. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. *J Org Chem.* 38(1): 178-179.

Pavanand, K., Nutakul, W., Dechatiwongse, T., Yoshihira, K., Yongvanitchit, K., Scovill, J.P., Flippen-Anderson, J.L., Gilardi, R., George, C., Kanchanapee, P., et al. 1986. In vitro antimalarial activity of *Brucea javanica* against multi-drug resistant *Plasmodium falciparum*. *Planta Med.* (2): 108-111

Polonsky, J., Baskevitch, Z., Gaudemer, A., Das, B.C. 1967. Bitter constituents of *Brucea amarissima*; structures of bruceins A, B and C. *Experientia.* 23(6): 424-426.

Teaktong, T. "The Effects of *Garnoderma lucidum* Extracts on P388 Leukemic Cells" M.Sc. Thesis, Department of Pharmacology, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1999.

Windholz, M. The Merck Index, 10<sup>th</sup> ed., Merck & co, N.J., U.S.A., 1983.

Xie, J.X., Ji, Z. 1981. The chemical constituents of the Chinese drug "Yadanzi" I. Isolation and identification of daucosterol, brucein D and brucein E. Yao Hsueh Hsueh Pao. 16(1): 53-55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้