



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งจากใบประยงค์  
Evaluation of Anticancer Activity from *Aglaia odorata* Lour.  
Leaves

นางสาวพัชณี เจริญยิ่ง

๖๐๐๒๗๔๑๐๓

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งจากใบประยงค์  
แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์  
ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท  
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558  
หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. พชนี เจริญยิ่ง  
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบประยงค์ โดยนำสารสกัดหยาบเมทานอล มาทำการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent partitioning extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2), เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P-388) และเซลล์ปกติจากไตของลิง (Vero) ด้วยวิธี MTT assay จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดี เมื่อทำการแยกสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบทั้งสองด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์พบว่าสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซน  $H_6F_4$  และ  $H_7F_5$  มีฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดี มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ  $29.17 \pm 2.61$  และ  $56.42 \pm 3.05$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นอกจากนี้ได้ทำการแยกสารบริสุทธิ์, ออโดรีน, จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตและนำมาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29), เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7), เซลล์มะเร็งตับ (HepG-2), เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก (KB), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P-388) และเซลล์ปกติจากไตของลิง (Vero) จากการทดลองพบว่าออโดรีนแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ในระดับต่ำ

คำสำคัญ: ประยงค์ สารสกัด โครมาโทกราฟี ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

**Research Title:** Evaluation of Anticancer Activity from *Aglaia odorata* Lour. Leaves  
**Researcher:** Asst. Prof. Dr. Patchanee Charoenying  
**Faculty:** Faculty of Science      **Department:** Department of Chemistry

## ABSTRACT

The research aim was to evaluate the cytotoxicity of crude extracts of *Aglaia odorata* L. leaves (Meliaceae) from solvent-solvent partitioning extraction. The methanol extract was separated into *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol extracts. These extracts were investigated the cytotoxicity in 6 cell lines: human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human breast carcinoma cell line (MCF-7), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), murine leukemia cell line (P-388) and African green monkey kidney (Vero) by MTT assay. The results revealed that the hexane extract and ethyl acetate extracts showed the strongest cytotoxicity against human cancer cell lines. The active crude extracts were isolated to sub-fraction by chromatography technique. The resulting sub-fractions were then tested on their cytotoxicity. Results found that the hexane sub-fractions H<sub>6</sub>F<sub>4</sub> and H<sub>7</sub>F<sub>5</sub> and the ethyl acetate sub-fraction EA<sub>11</sub>F<sub>3</sub> showed the highest percentage of cytotoxicity. For the H<sub>6</sub>F<sub>4</sub> and H<sub>7</sub>F<sub>5</sub> sub-fractions exhibited inhibition of MCF-7 at CC<sub>50</sub> 29.17±2.61 and 56.42±3.05 µg/mL, respectively.

Furthermore, the pure compound, odorine, was isolated from ethyl acetate extract and then was tested for its cytotoxicity against 6 cell lines: human colon adenocarcinoma cell line (HT-29), human breast carcinoma cell line (MCF-7), human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2), oral human epidermal carcinoma cell line (KB), murine leukemia cell line (P-388) and African green monkey kidney (Vero). Results found that odorine exhibited low percentage of cytotoxicity.

**Keywords :** *Aglaia odorata*, Crude Extract, Chromatography, Cytotoxicity, Anticancer

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามความตั้งใจในระดับหนึ่งด้วยการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประเภททุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่พิจารณาเห็นคุณค่าของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่เอื้อเฟื้อความสะดวกตลอดการทำงานวิจัยนี้



พัชนี เจริญยิ่ง

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
คำย่อ / สัญลักษณ์	VII
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 คำสำคัญของการวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แนวคิดและทฤษฎี	4
2.2 สารสำคัญในพืชสมันไพร	5
2.3 การสกัดสารจากพืช	15
2.4 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมะเร็ง (Anticancer)	16
2.5 ประยงค์	20
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง	26
3.2 สารเคมีและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง	26
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	26
3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์	28
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบใบประยงค์	31
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์	31
4.3 ผลการแยกสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	34
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย H <sub>1</sub> -H <sub>10</sub> ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	35

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลการแยกสารส่วนย่อย $H_6$ และ $H_7$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	36
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $H_6F_2$ - $H_6F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_6$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	37
4.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $H_7F_1$ - $H_7F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_7$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	38
4.8 ผลการแยกสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	39
4.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $EA_{11}$ - $EA_{11}$ ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	40
4.10 ผลการแยกสารส่วนย่อย $EA_{11}$ ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต จากใบประยงค์	41
4.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $EA_{11}F_1$ - $EA_{11}F_4$ ของสารส่วนย่อย $EA_{11}$ จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	42
4.12 ผลของระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อย $H_6F_4$ , $H_7F_5$ และ $EA_{11}F_3$ ที่ยับยั้ง การเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์	43
4.13 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิล แอซิเตต	44
4.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Ordorine 68	44
<b>บทที่ 5</b> สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	46
<b>บทที่ 6</b> สรุปผลผลิตงานวิจัย	48
บรรณานุกรม	49
ประวัติผู้วิจัย	51

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ	31
4.2 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์	32
4.3 ค่า $CC_{50}$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต	33
4.4 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	34
4.5 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	35
4.6 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย $H_6$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	36
4.7 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย $H_7$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	37
4.8 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย $H_6F_2-H_6F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_6$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	37
4.9 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย $H_7F_1-H_7F_5$ ของสารส่วนย่อย $H_7$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์	38
4.10 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	40
4.11 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	41
4.12 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย $EA_{11}$ จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	42
4.13 เพอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย $EA_{11}F_1-E_{11}F_4$ ของสารส่วนย่อย $EA_{11}$ ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์	43
4.14 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อย $H_6F_4$ , $H_7F_5$ และ $EA_{11}F_3$ ในแต่ละสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เพอร์เซ็นต์	44
4.15 แสดงค่า Chemical shift ( $\delta$ (ppm), $CDCl_3$ ) ของ odorine 68	45

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ไบประยงค์	21
4.1 เซลล์ไลน์ MCF-7, HepG-2, KB, P-388 และ Vero หลังการเติม MTT ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซีเตต	33
4.2 โครงสร้างของ odorine 68	45



## คำย่อ / สัญลักษณ์

DNA	กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก
FDA	องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา
PGE <sub>2</sub>	พรอสตาแกลนดิน ชนิด E2
CC <sub>50</sub>	ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50%
DMEM	อาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	fetal bovine serum
DMSO	ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์
MMC	ไมโทไมซิน ซี
EDTA	กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตระแอะซีติก
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-y]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
SDS	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต
DCM	ไดคลอโรมีเทน
AG	ใบประยงค์ ( <i>Aglaia</i> )
EA	เอทิล แอซีเตต
H	เฮกเซน
F	ส่วนย่อย
R <sub>f</sub>	Rate of flow
RT	รีเทนชัน ไทม์
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FT-NMR	Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance
$\delta$	Chemical shift
<i>J</i>	Coupling constant
<sup>1</sup> H-NMR	Proton-1 Nuclear Magnetic Resonance
<sup>13</sup> C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
TLC	Thin Layer Chromatography

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product) เป็นสารชีวเคมีที่เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ภายในต้นพืชและสัตว์หรืออาจเกิดจากแร่ธาตุก็ได้ สำหรับพืชสมุนไพรจัดเป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่สามารถผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ เห็นได้จากตำราพื้นบ้านหรือจากคำบอกเล่าสืบทอดกันมาทำให้ทราบว่าพืชสมุนไพรมีสรรพคุณและประโยชน์ต่างๆมากมาย จากรายงานการวิจัยพบว่าส่วนใหญ่ของพืชสมุนไพรจะใช้ประโยชน์ในด้านการรักษาโรคเช่น เบ้าน้อย ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหาร กระเทียม ช่วยลดคลอเรสเตอรอล แพงพวยฝรั่ง ใช้รักษาโรคมะเร็ง ควินิน ใช้รักษาไข้จับสั่น มะขามแขก ใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น [1] แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานการตรวจสอบสรรพคุณและวิธีการใช้สมุนไพรอย่างแน่ชัด จึงทำให้นักวิจัยสนใจที่จะศึกษาและพิสูจน์สรรพคุณของสมุนไพรด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ได้อย่างปลอดภัย และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาสมุนไพรในด้านการแพทย์และเภสัชกรรมเพื่อผลิตยารักษาโรค รวมทั้งยังทราบว่าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเป็นสารกลุ่มใดและสามารถออกฤทธิ์ต่อโรคและรักษาอาการต่างๆได้อย่างไร ซึ่งจะเป็แนวทางนำไปสู่การค้นคว้าวิจัยและพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ดียิ่งขึ้นและสามารถพัฒนาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากการนำสมุนไพรเป็นองค์ประกอบหนึ่งเป็นยารักษาโรคของมนุษย์และสัตว์ หรือเป็นอาหารเสริมบำรุงร่างกายคลายความเครียด วิวัฒนาการของการใช้สมุนไพรได้มีวิวัฒนาการเพื่อให้มีรูปแบบนำใช้และให้ผลการรักษาแน่นอน นักวิจัยจึงได้การสกัดสารสำคัญในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามาใช้เป็นยาในรูปสารบริสุทธิ์เช่น การแยกสารแซนทีน สารธรรมชาติกลุ่มแอลคาลอยด์ สามารถแสดงฤทธิ์กระตุ้นสมองส่วนบน หรือ  $\beta$ -sitosterol สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มสเตียรอยด์ที่ใช้เป็นยาเกี่ยวกับหลอดเลือด เป็นต้น

จากความสำเร็จของงานวิจัยของผู้วิจัยร่วมกับคณะเทคโนโลยีการเกษตรเกี่ยวกับประยงค์ ทีมงานของผู้วิจัยสามารถนำสารสกัดจากใบประยงค์ไปใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชธรรมชาติเพื่อใช้กำจัดวัชพืชในแปลงนาข้าวได้จริงและสามารถผลิตออกมาเพื่อการค้า ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาประยงค์ในด้านเภสัชวิทยาเพื่อเน้นคุณสมบัติของพืชสมุนไพรชนิดนี้ในด้านการรักษาโรคได้ โดยเฉพาะโรคมะเร็งซึ่งเป็นโรคที่คร่าชีวิตคนไทยในอันดับต้นๆ ประยงค์มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Aglaia odorata* Lour. หรือชื่อเรียกทั่วไปว่า Chinese rice flower อยู่ในวงศ์ Meliaceae พบได้ทั่วไปในประเทศเขตตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว พม่า และไทย ประยงค์มีชื่อเรียกในประเทศไทยหลายชื่อเช่น ประยงค์ใบใหญ่ (ภาคกลาง) หอมไกล (ภาคใต้) และชะยง ชะยม พะยงค์หรือ ยง (ภาคเหนือ) นิยมปลูกเป็นไม้ประดับตามสวนสาธารณะ วัด และสถานที่ราชการ ประโยชน์ทั่วไปพบว่าส่วนดอกมีฤทธิ์ช่วยเร่งการคลอด แก้อาเจียน วิงเวียนศีรษะ ส่วนใบและก้าน ช่วยเจริญอาหาร ผลฝิ่นอง รักษาแกมโรค ส่วนราก ใช้ถอนพิษยาเบื่อ[2] มากกว่า 50 ปี ที่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับประยงค์อย่างต่อเนื่อง รวมทั้งการแยกสกัดสารธรรมชาติจากส่วนต่างๆของต้นประยงค์ รวมทั้งการสกัด การแยกสารบริสุทธิ์ และนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดและแยกสารธรรมชาติรวมถึงการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่างๆของประยงค์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ยุค ได้แก่ ยุคแรก ช่วงปี พ.ศ. 2507-2537 (ค.ศ. 1964-1994) เป็นยุคที่เริ่มมีการศึกษาวิจัยทางด้านการสกัดสารด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากส่วนต่างๆของประยงค์เช่น ใบ กิ่ง และราก เป็นต้น รวมทั้งการพิสูจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกลักษณ์และโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11] ยุคกลาง ช่วงปี พ.ศ. 2525-2544 (ค.ศ. 1982-2001) ได้ให้ความสนใจในการนำสารสกัดที่ได้จากใบประยงค์มาประยุกต์ใช้โดยมุ่งไปทางการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต และในด้านความเป็นพิษต่อแมลง[12, 13, 14, 15, 16] และในยุคปัจจุบัน พ.ศ. 2544 (ค.ศ. 2001) ถึงปัจจุบัน การวิจัยให้ความสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบประยงค์ในด้านการควบคุมวัชพืช เพื่อนำไปพัฒนาเป็นสารกำจัดวัชพืชที่ได้จากสารธรรมชาติทดแทนสารสังเคราะห์[17, 18] เมื่อคำนึงถึงประโยชน์และงานวิจัยในอดีตโดยเฉพาะงานวิจัยของ Hayashi และคณะ[12] ได้รายงานถึงสารสกัดจากใบและกิ่งของประยงค์ด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิด P-388 ในหนูเพศผู้ ซึ่งเป็นแรงจูงใจที่ทำให้คณะผู้จัดทำโครงการพิเศษให้ความสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของประยงค์ โดยเลือกศึกษาเฉพาะส่วนของใบ ซึ่งประกอบด้วยฤทธิ์การต้านเชื้อมะเร็ง (Anticancer) ในมนุษย์ จากที่กล่าวมานี้จึงเป็นมูลเหตุจูงใจให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะทำการวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของประยงค์ทางเภสัชวิทยา ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลใหม่ของสารธรรมชาติในการต้านเซลล์มะเร็งและสามารถนำไปพัฒนาให้ใช้ได้จริงตามที่ตั้งสมมุติฐานไว้ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบประยงค์
2. เพื่อแยกสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากใบประยงค์
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดและโครงสร้างของสารธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการต้านเซลล์มะเร็ง

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. สกัดแยกสารจากใบประยงค์ โดยใช้วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์
2. แยกสารธรรมชาติที่มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบส่วนย่อย และสารธรรมชาติในรูปของสารบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ
4. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมีและโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

## 1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน กล่าวโดยสรุปดังนี้

**ขั้นตอนที่ 1** การเตรียมสารสกัดหยาบด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ (Solvent Partition Extraction) พืชที่ใช้ในการทดลองคือส่วนใบของต้นประยงค์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงพัฒนาประยงค์เพื่อการเกษตรแบบยั่งยืนของ รศ.ดร. จำรูญ เล้าสินวัฒนา จังหวัดสมุทรสาคร โดยคัดเลือกใบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคและแมลงรบกวน และเป็นใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ทำความสะอาดใบพืชตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งลมให้แห้งในที่ร่ม และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า และนำมาสกัดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการหมักด้วยเมทานอล กรองสารละลาย และระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศจะได้สารสกัดหยาดชั้นเมทานอล จากนั้นนำสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยเรียงลำดับความมีขี้ของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ

#### ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

**การทดลองที่ 2.1** สารสกัดหยาดที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 1 ถูกส่งไปทดสอบ ณ หน่วยบริหารจัดการทรัพยากรจุลินทรีย์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ไลน์ของเซลล์มะเร็งเต้านม (Human breast adenocarcinoma, MCF-7), เซลล์ Hepatocellular carcinoma (HepG2), เซลล์ Human colon adenocarcinoma (HT-29), เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB Human oral cavity carcinoma), เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (P388 Murine leukemia) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (African green monkey kidney fibroblast, Vero)

**การทดลองที่ 2.2** การแยกสารส่วนย่อยและการทดสอบฤทธิ์ของสารส่วนย่อย

นำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพที่สุดจากการทดลองที่ 2.1 มาทำการแยกสารออกฤทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีและทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารส่วนย่อยที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

**การทดลองที่ 2.3** การแยกสารบริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

นำสารส่วนย่อยที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากการทดลองที่ 2.2 มาดำเนินการแยกสารบริสุทธิ์โดยละเอียดอีกครั้งหนึ่งด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.1

#### ขั้นตอนที่ 3 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติและโครงสร้างสารออกฤทธิ์

หลังจากทำการแยกสารและตรวจสอบการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์แล้วนั้น สารสำคัญจะถูกนำมาศึกษาโครงสร้างของสารสำคัญโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ FT-IR และ FT-NMR spectroscopy และ Mass spectrometry

### 1.5 คำสำคัญของการวิจัย

ประยงค์ สารสกัด โครมาโทกราฟี ความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสกัดแยกสารธรรมชาติที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์
2. ทราบถึงชนิดสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แนวคิดและทฤษฎี

ปัจจุบันประเทศไทยให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง เนื่องจากเริ่มตระหนักถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษของสิ่งสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น ทำให้มีการวิจัยค้นคว้ายาตัวใหม่ๆ จากพืชสมุนไพร เช่น อนุพันธ์ อาร์ทิมิซินิน (Artemisinin derivative) ได้แก่ อาร์เตซูนเนต (Artesunate) และอาร์เตเมเธอร์ (Artemether) เป็นสารพวกแล็กโตน (Lactone) จากต้นชิงเฮา (*Artemisia annua* L.) ใช้เป็นยาต้านมาลาเรียที่ออกฤทธิ์รวดเร็วและมีความเป็นพิษต่ำ โดยออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium*) หรือสารในกลุ่มไพเรทริน (Pyrethrin) ที่สกัดได้จากดอกไพเรทรัม (*Pyrethrum cinerariifolium* Trev.) ใช้เป็นยาฆ่าแมลง ไพเรทรินจะสลายตัวได้ง่าย ทำให้ไม่มีปัญหาพิษตกค้างเหมือนยาฆ่าแมลงแบบสังเคราะห์ หรือเพลลาโนทอล (Plaunotol) เป็นสารจำพวกไดเทอร์เพนแอลกอฮอล์ (Diterpenealcohol) แยกได้จากใบเปล้าน้อย (*Croton sublylatus* Kurz.) ใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ มีฤทธิ์ข้างเคียงน้อยกว่ายาสังเคราะห์ เป็นต้น ทำให้สมุนไพรเป็นแหล่งสำคัญของสารประกอบเคมีที่จำนวนมหาศาลที่มีประโยชน์ทั้งการแพทย์และอุตสาหกรรม แม้ว่าปัจจุบันยังคงมีการสังเคราะห์สารเคมีขึ้นมาเพื่อใช้เป็นยาจำนวนมาก แต่ตัวยาคำคัญๆ หลายชนิดก็ยังคงได้จากการสกัดจากพืชสมุนไพร เช่น จิงโกไลด์ บี (Ginkgolide B) เป็นสารจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba* L.) ซึ่งนิยมใช้กันมากในการแพทย์ทั่วโลก ช่วยป้องกันและรักษาความสมบูรณ์ของผนังเม็ดเลือดฝอย ปรับระบบหมุนเวียนของเลือดและต่อต้านการอักเสบ การบวม จึงใช้ในผู้ป่วยที่เลือดไปเลี้ยงสมองไม่พอผนังเส้นเลือดแดงทำงานไม่ปกติ ป้องกันการเกิดอัมพาต วงการแพทย์ปัจจุบันต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ยาจากธรรมชาติเพื่อเป็นแหล่งผลิตยาในการบำบัดโรคคนนอกจากนี้สมุนไพรในรูปอาหารเสริมสุขภาพ (Healthy foods) ประเภทต่างๆ ที่มาจากธรรมชาติก็เป็นที่ยอมรับกันมากเช่น โสม (*Panax ginseng* C.A. Meyer) เชื่อว่าจะทำให้สุขภาพแข็งแรง กระชุ่มกระชวย มีกำลังวังชาหรือช่วยให้ร่างกายปรับเข้ากับสภาวะต่างๆ ได้ดี หรือเลซิทิน (Lecithin) ซึ่งพบมากในถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) และไข่แดง เป็นสารอาหารที่มีคุณสมบัติช่วยบำรุงผิวพรรณให้นุ่มนวลสดใส ปราศจากริ้วรอย ช่วยละลายไขมันในกระแสเลือด ป้องกันการรวมตัวของคอเลสเตอรอลเป็นก้อนป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้มีการใช้องค์ประกอบเคมีที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยาด้วยกรรมวิธีทางเคมี เช่น ยาชาเฉพาะที่ (Local anesthetic) มีสูตรพื้นฐานของโคเคน (Cocaine) ซึ่งพบในใบโคคา (*Erythroxylum coca* Lamarck) เป็นต้น ยาแผนปัจจุบันส่วนหนึ่งได้จากการใช้เชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงสูตรเคมีให้กลายเป็นยา (Partial synthesis) เช่น สเตียรอยด์ฮอร์โมน (Steroid hormone) ที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในปัจจุบันเครื่องสำอางส่วนใหญ่มีพืชสมุนไพรเป็นองค์ประกอบแทบทั้งสิ้น เช่น กรดแอลฟาไฮดรอกซี (AHAs) ซึ่งเป็นสารสกัดจากผลไม้ธรรมชาติ จะช่วยเร่งการหลุดลอกของเซลล์ชั้นบนสุดที่เสื่อมรวมทั้งรอยเหี่ยวย่นต่างๆ พร้อมทั้งเสริมสร้างเซลล์ใหม่ จึงทำให้ผิวพรรณสดใส แลดูเนียน นิยมใช้มากในผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่และเครื่องสำอางบำรุงผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 สารสำคัญในพืชสมุนไพร[19]

พืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมียู่มากมายหลายชนิด คุณภาพของพืชสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่าง ในยาสมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งมักเรียกว่าเป็นสารสำคัญ (Active constituent) สามารถนำมาใช้เป็นยา ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่มดังนี้

1. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (Carbon) ไฮโดรเจน (Hydrogen) และออกซิเจน (Oxygen) สร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสงและเก็บสะสมไว้ คาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์คาร์โบไฮเดรตที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น

- แบ่งใช้เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาณ (Diluent) และสารช่วยการแตกตัวยาเม็ด (Disintegrating agent)

- น้ำผึ้งประกอบด้วยกลูโคส (Glucose) และฟรุกโทส (Fructose) ใช้เป็นส่วนประกอบในยาแก้ไอ

- น้ำตาลทรายพบมากในบีทรูท (*Beta vulgaris* L.) และอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) ใช้เป็นสารแต่งรสหวานและใช้เตรียมน้ำเชื่อม

- เซลลูโลส (Cellulose) และอนุพันธ์เซลลูโลส จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) ในทางเภสัชกรรมใช้อนุพันธ์ของเซลลูโลส ได้แก่ เมทิลเซลลูโลส (Methyl cellulose) และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose) เป็นยาระบาย

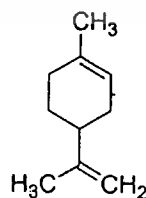
2. ไขมัน (Lipids) เป็นเอสเทอร์ (Ester) ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาวจับกับแอลกอฮอล์ นำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น

- น้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันข้าวโพดใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับยาฉีดและใช้เตรียมอิมัลชัน (Emulsion)

- น้ำมันมะกอกใช้เป็นสารหล่อลื่น (Emollient) และใช้เป็นยาระบาย

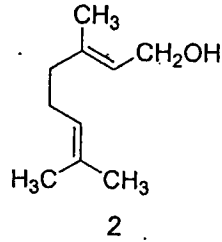
3. น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils หรือ essential oils) พบได้ในส่วนต่างๆของพืช มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่าย ไม่มีสี อาจจำแนกตามชนิดขององค์ประกอบได้ดังนี้

3.1 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (Hydrocarbon volatile oils) เช่น ลิโมนีน (Limonene) 1 ในน้ำมันกระวาน (Cardamom oil)

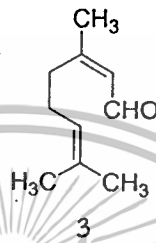


1

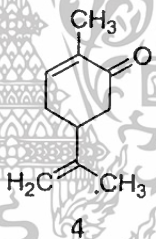
3.2 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก (Alcohol volatile oils) เช่น จีรานีออล (Geraniol) 2 ในน้ำมันดอกกุหลาบ (Rose oil)



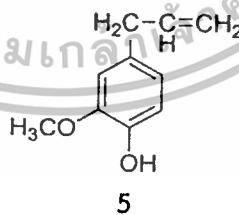
3.3 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกอัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก (Aldehyde volatile- oils) เช่น จิโทรเนลลาล (Citronellal) 3 ในน้ำมันตะไคร้หอม (Citronella oil)



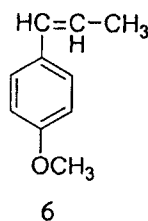
3.4 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโตนเป็นองค์ประกอบหลัก (Ketone volatile oils) เช่น คาร์วอน (Carvone) 4 ในน้ำมันเทียนตากับ (Caraway oil)



3.5 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก (Phenol volatile oils) เช่น ยูจีนอล (Eugenol) 5 ในน้ำมันกานพลู (Clove oil)

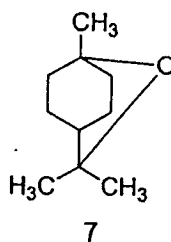


3.6 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลิกอีเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (Phenolic ether volatile oils) เช่น อะนิโทล (Anethole) 6 ในน้ำมันจันทน์แปดกลีบหรือน้ำมันโป๊ยกั๊ก (Anise oils)

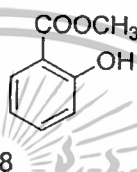


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก (Oxide volatile oils) เช่น ยูคาลิปตอล (Eucalyptus) 7 ในน้ำมันยูคาลิปตัส (Eucalyptus oils)



3.8 น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก (Ester volatile oils) เช่น เมทิลซาลิไซเลต (Methyl salicylate) 8 ในน้ำมันระกำ (Wintergreen oils)

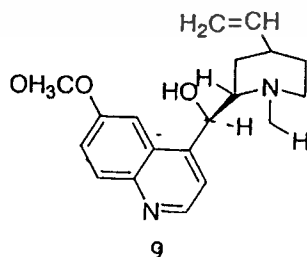


4. เรซินและบาลซัม (Resins and balsams) สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเรซินและสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ

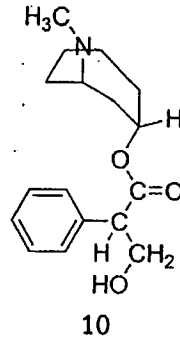
- เรซิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสารเคมีหลายชนิดรวมกัน ได้แก่ กรดเรซิน (Resin acids), เรซินแอลกอฮอล์ (Resin alcohols), เรซิน (Resene) และเอสเทอร์ (Ester)
- โอเลโอเรซิน เป็นสารผสมของเรซินกับน้ำมันหอมระเหย
- โอเลโอแกมเรซิน เป็นสารผสมระหว่างแกมและโอเลโอเรซิน
- บาลซัม เป็นสารผสมเรซิน ประกอบด้วยกรดเบนโซอิก (Benzoic acid) หรือกรดซินนามิก (Cinnamic acid) หรือของกรดทั้งสองชนิดนี้

5. แอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (Organic nitrogen compound) มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ดังนี้

5.1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย เช่น ควินิน (Quinine) 9 จากเปลือกต้นชิงโคนา (*Cinchona succirubra* Pav.) ใช้รักษาเชื้อมาลาเรียจากเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*)

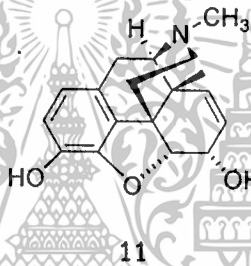


5.2 มีฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น อะโทรปีน (Atropine) 10 จากใบเบลลาดอนนา (*Atropa belladonna* L.) มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบ จึงใช้เป็นยารักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้

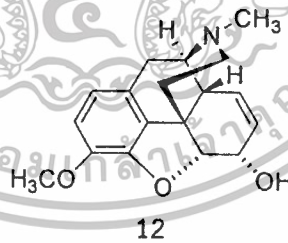


5.3 ใช้ต้านมะเร็ง (Anticancer) เช่น วินบลาสทีนซัลเฟต (Vinblastine sulfate) และ วินคริสทีนซัลเฟต (Vincristine sulfate) จากลำต้นเหนือดินของแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.)

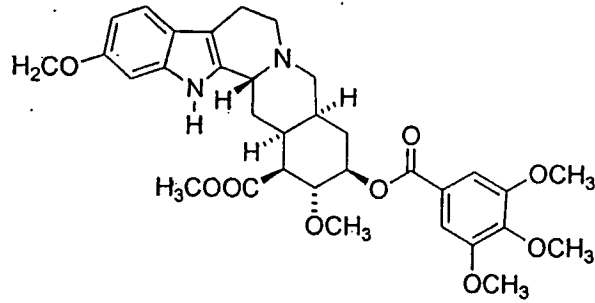
5.4 ฤทธิ์ระงับอาการปวด (Analgesic) เช่น มอร์ฟีน (Morphine) 11 จากยางฝิ่น (*Papaver somniferum* L.) ใช้ระงับอาการปวดในการผ่าตัดต่างๆ และใช้กับผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะสุดท้าย แต่มีฤทธิ์เสพติด



5.5 ฤทธิ์ระงับอาการไอ เช่น โคดีอีน (Codeine) 12 จากยางฝิ่น ออกฤทธิ์กดศูนย์ไอในสมอง มีฤทธิ์เสพติด

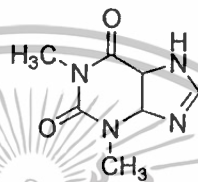


5.6 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต เช่น เรสเซอเฟน (Reserpine) 13 จากรากต้นระย่มน้อย (*Rauvolfia serpentina* Benth. Ex Kurz.)



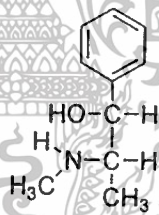
13

5.7 ฤทธิ์ขยายหลอดลม (Bronchodilator) เช่น ทีโอฟิลลีน (Theophylline) 14 จากยอดและใบของชา (*Camellia sinensis* O. Kunze)



14

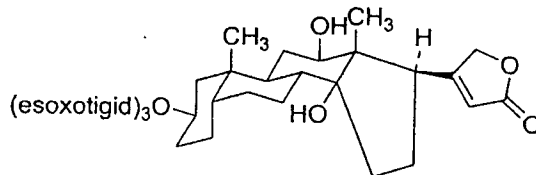
5.8 ฤทธิ์ลดน้ำมูก แก้วหวัด (Decongestant) เช่น อีพรีดรีน (Ephedrine) 15 จากต้นของมั่วอั้งหรือมาฮวง (*Ephedra equisetina* Bunge)



15

6. โกลโคไซด์ (Glycosides) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยส่วนอะไกลโคโคน (Aglycone) หรือจีนิน (Genin) จับกับน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลหรือเรียกส่วนไกลโคโคน (Glycone) การจำแนกโกลโคไซด์ตามสูตรโครงสร้างแบ่งได้หลายกลุ่มดังนี้

6.1 คาร์ดิแอกโกลโคไซด์ (Cardiac glycoside) มีฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น ดิจอกซิน (Digoxin) 16 จากใบของพืชสกุลดิจิทาลิส (*Digitalis lanata* Ehrh.) ใช้บำบัดรักษาอาการโรคหัวใจที่มีการเต้นผิดปกติ

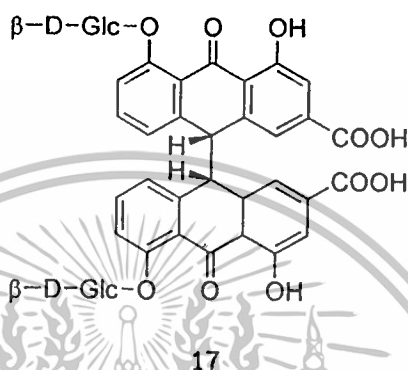


16

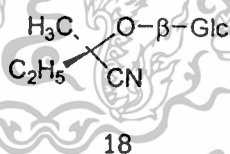
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 ซาโปนินไกลโคไซด์ (Saponin glycoside) เช่น ไดออสซิน (Dioscin) เป็นสเตียรอยด์ลซาโปนิน (Steroidal saponin) จากเมล็ดลูกชืด (*Trigonella foenum-graecum* L.) ใช้เป็นสารกึ่งกลางในขบวนการสังเคราะห์ยาคุมกำเนิดและผลิตภัณฑ์ฮอร์โมนเพศ

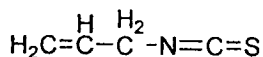
6.3 แอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Anthraquinone glycosides) มีอะไกลโคนเป็นอนุพันธ์ของแอนทราซีน (Anthracene) คุณสมบัติทางเคมีคือจะเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างแอนโทรน (Anthrone) และแอนทรานอล (Anthranol) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (Laxative) และยาถ่าย (Purgative) เช่น เซนโนไซด์-บี (Sennoside-B) 17 จากใบและฝักของต้นมะขามแขก (*Cassia amgustifolia* Vahl.)



6.4 ไซยาโนเจนิคไกลโคไซด์ (Cyanogenic glycosides) ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ เมื่อถูกไฮโดรไลซิสด้วยกรดเจือจางหรือเอนไซม์ที่มีอยู่ในพืชเองให้กรดไฮโดรไซยานิก (Hydrocyanic acid) หรือไซยาไนด์ (Cyanide) เมื่อกินเข้าไปจะเกิดอันตรายได้ ทำให้หัวใจล้มเหลวและเสียชีวิตได้ แต่อาจจัดกรดไซยานิกก่อนรับประทาน โดยผ่านความร้อน เช่น โลทาอสเตรอลิน (Lotaustralin) 18 จากรากมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz)



6.5 ไอโซไทโอไซยาเนตไกลโคไซด์ (Isothiocyanate glycosides) เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ที่ถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ไทโอกลูโคซิเดส (Thioglucosidase) หรือเรียกชื่ออื่นว่าไมโรซิเนส (Myrosinase) เอนไซม์นี้เกิดอยู่ในพืชต้นเดียวกัน เกิดเป็นสารประกอบไอโซไทโอไซยาเนต น้ำตาลกลูโคส และสารประกอบซัลเฟตเกิดขึ้น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เด่น คือ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น ซินิกริน (Sinigrin) 19 พบในเมล็ดมัสตาร์ดดำ (*Brassica nigra*- L. Koch)



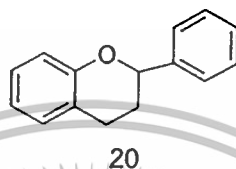
19

6.6 ฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ (Flavonoid glycoside) จัดเป็นสารประกอบเคมีที่สำคัญกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่ได้จากพืช มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารประกอบจำพวกฟลาโวนอยด์เชื่อมเกาะอยู่กับไกลโคน ส่วนมากเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลิก (Polyphenolic compounds) ที่พบในส่วนต่างๆของพืช

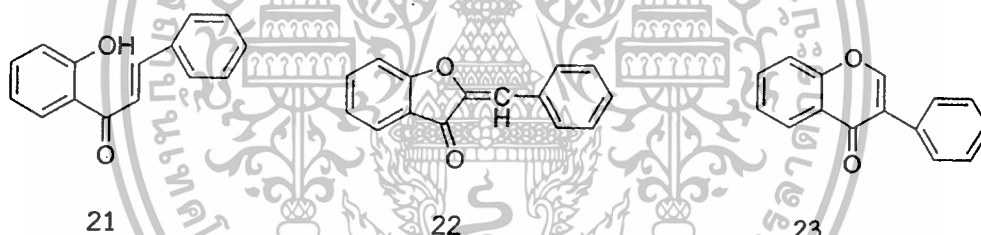
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะในดอก ทำให้ดอกไม้มีสีสวยงาม สูตรโครงสร้างพื้นฐานเป็นหมู่  $C_6$  จำนวน 2 หมู่มาเชื่อมต่อกันด้วยลูกโซ่ (Aliphatic chain) ของอะตอมคาร์บอน 3 อะตอม ( $C_6 - C_3 - C_6$ ) หากมีการเพิ่มอะตอมของออกซิเจนเข้าไปที่ลูกโซ่ของอะตอมคาร์บอน 3 อะตอมหรือเพิ่มวงแหวน (Oxygen-heterocyclic rings) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl groups) ในตำแหน่งต่างๆ กันทำให้ได้สารประกอบฟลาโวนอยด์ 2 กลุ่มใหญ่ คือ

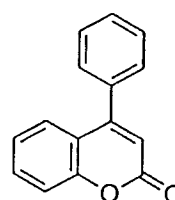
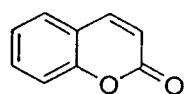
-สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างฟลาโวนอยด์แท้ (True flavonoids structure) สารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มนี้มีนิวเคลียสเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน (2-phenylbenzopyrone) 20 กล่าวคือมีวงแหวนไพแรน (Pyran ring) เชื่อมติดกับวงแหวนเบนซีน (Benzene ring)



-สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างสัมพันธ์ (Related compounds) สารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มนี้ไม่มีนิวเคลียสเป็นฟีนิลเบนโซไพโรน แต่มีความเกี่ยวพันกันเพราะว่าโครงสร้างหลักยังคงประกอบด้วย  $C_6 - C_3 - C_6$  ได้แก่ ซาโคน (Chalcones) 21 ออโรน (Aurones) 22 และไอโซฟลาโวน (Isoflavones) 23

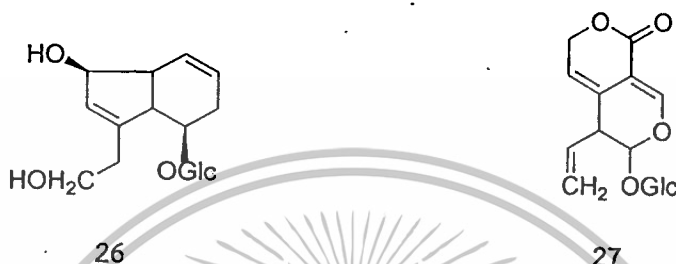


6.7 คูมารินไกลโคไซด์ (Coumarin glycosides) เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ที่มีโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างเบนโซแอลฟาไพโรน (Benzo- $\alpha$ -pyrone) 24 จัดอยู่ในกลุ่มของพวกสารประกอบแล็กโทน (Lactones) มีลักษณะเฉพาะตัวคือ เป็นสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมในธรรมชาติอาจอยู่ในสภาพอิสระหรือสภาพไกลโคไซด์ พบได้มากมายในพืชชั้นสูงทั้งหลายฤดูที่ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบคูมารินจะขึ้นกับส่วนของอะไกลโคโคนเป็นหลัก เช่น 4-ฟีนิลคูมาริน (4-phenylcoumarin) 25 จากดอกสารภี (*Ochrocarpus siamensis* T. Anders) ในวงศ์กัททิเฟอรา (Guttiferae) มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เป็นต้น

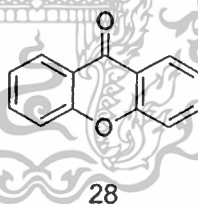


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.8 อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (Iridoid glycosides) เป็นสารประกอบไกลโคไซด์ที่มีส่วนโครงสร้างไซโคลเพนเทน (Cyclopentane) เป็นส่วนอะไกลโคนและมีส่วนน้ำตาลหรือไกลโคนเกาะเชื่อมกับระบบวงแหวนนี้ ชื่ออิริดอยด์มาจากอิริโดเมอเมคซ์ (*Iridomyrmex*) เป็นชื่อสกุลของพวกมดที่ขับสารออกมาเพื่อป้องกันตัว ปัจจุบันพบสารอิริดอยด์เกือบ 300 ตัว ส่วนมากพบในรูปไกลโคไซด์ เช่น ออคิวบิน (Aucubin) 26 จากต้นผักกาดน้ำ (*Plantago major* Linn.) ในวงศ์แพลนทาจิโนเซีย (Plantaginaceae) มีฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพ เป็นต้น ถ้าวางแหวนไพแรนเปิดออกเรียกว่า ซีโคอิริดอยด์ (Seco-iridoids) เช่น เจนทิโอพิโครไซด์ (Gentiopicroside) 27 เป็นต้น



6.9 แซนโทนไกลโคไซด์ (Xanthone glycosides) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นแซนโทนอยด์ คือ มีโครงสร้างของนิวเคลียสแซนโทน 28 อยู่ในโมเลกุล เป็นอะไกลโคนเชื่อมกับน้ำตาล ณ ตำแหน่งต่างๆ ของแซนโทน โครงสร้างทางเคมีจะสัมพันธ์ใกล้ชิดกับฟลาโวนอยด์ เช่น แมงโกสติน (Mangostin) และอนุพันธ์ จากเปลือกผลของมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) มีฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) และรักษาแผล (Anti-ulcer) ในหนู นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus* เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น



6.10 สติลบินไกลโคไซด์ (Stilbene glycosides) ประกอบขึ้นด้วยโครงสร้างสติลบิน (Stilbene) เป็นส่วนอะไกลโคนเชื่อมกับน้ำตาล โครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบสติลบินจะประกอบด้วย  $C_6 - C_2 - C_6$  ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบสติลบินที่ได้รับความสนใจคือ สารประกอบชนิดนี้มีความเป็นพิษค่อนข้างสูงต่อเชื้อรา ปลา แมลง และหนูถีบจักร

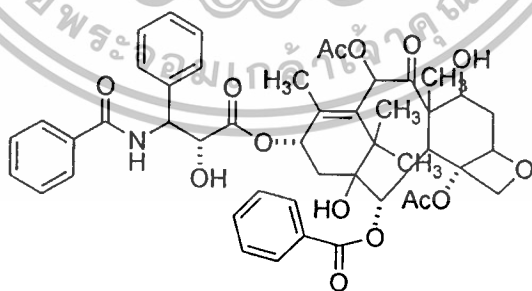
7. แทนนิน (Tannins) เป็นสารพวกพอลิฟีนอล (Polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อนพบได้ในพืชหลายชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ใช้ในการอุตสาหกรรมฟอกหนัง สมุนไพรที่มีแทนนิน เช่น เปลือกทับทิม

8. เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) เป็นสารประกอบที่ประกอบด้วยหน่วยที่เรียกว่า หน่วยไอโซพรีน (Isoprene units) ซึ่งเป็นโซ่แขนง (Branched chain) ของคาร์บอน 5 ตัว มีพันธะไม่อิ่มตัว (Unsaturated bonds) 2 พันธะ โครงสร้างของสารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์สร้างขึ้นมาจากหน่วยไอโซพรีนที่เชื่อมเข้าด้วยกันแบบหัวไปหาง (Head to tail) ทำให้มีรูปแบบของวงแหวนต่างๆกัน จำนวนของหน่วยไอโซพรีนที่เชื่อมเข้าด้วยกันใช้ในการแบ่งประเภทของสารประกอบเทอร์พีนอยด์ดังนี้

- โมโนเทอร์พีนอยด์ (Monoterpenoids) ประกอบด้วย 2 หน่วยไอโซพรีน (10 C-atoms) มีสูตรโครงสร้าง  $C_{10}H_{16}$
- เซสควิเทอร์พีน (Sesquiterpene) ประกอบด้วย 3 หน่วยไอโซพรีน (15 C-atoms) มีสูตรโครงสร้าง  $C_{15}H_{24}$
- ไดเทอร์พีน (Diterpene) ประกอบด้วย 4 หน่วยไอโซพรีน (20 C-atoms) มีสูตรโครงสร้าง  $C_{20}H_{32}$
- ไตรเทอร์พีน (Triterpene) ประกอบด้วย 6 หน่วยไอโซพรีน (30 C-atoms) มีสูตรโครงสร้าง  $C_{30}H_{48}$
- เตตระเทอร์พีน (Tetraterpene) ประกอบด้วย 8 หน่วยไอโซพรีน (40 C-atoms) มีสูตรโครงสร้าง  $C_{40}H_{64}$
- พอลิเทอร์พีน (Polyterpene) ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีนมากกว่า 8 หน่วย

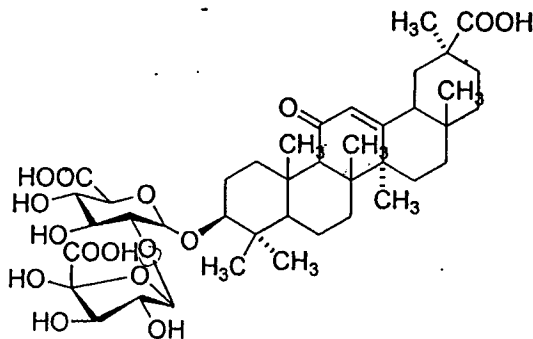
สารประกอบประเภทเทอร์พีนอยด์พบกระจายอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในพืชชั้นสูง นอกจากนี้ยังพบในเชื้อรา แมลง จุลินทรีย์ (Microorganisms) และสิ่งมีชีวิตในทะเล (Marine organisms) เป็นกลุ่มสารมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ปัจจุบันจึงได้รับความสนใจมาก นอกจากนี้ยังพบเป็นองค์ประกอบในสารประกอบที่เกิดจากภาวะเครียด (Stress compounds) หรือสารที่สร้างขึ้นเป็นพิเศษเมื่อพืชได้รับอันตราย (Defense agents) เช่น ไฟโตอเล็กซิน (Phytoalexins) ซึ่งปัจจุบันสารพวกนี้มีความสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา น้ำมันหอมระเหยจัดเป็นสารเทอร์พีนอยด์ที่มีองค์ประกอบเป็นพวก โมโนเทอร์พีนอยด์และเซสควินอยด์เป็นส่วนใหญ่ อาจพบสูตรโครงสร้างพวกไตรเทอร์พีนอยด์และเฮมิเทอร์พีนอยด์ (Hemiterpenoids) บาง นอกจากนี้ยังพบสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ในกลุ่มแอลคาลอยด์, สเตียรอยด์, คาร์ดิแอกไกลโคไซด์, ซาโปนิน, เรซินและอื่นๆ ตัวอย่างสารเทอร์พีนอยด์ที่ได้รับความสนใจคือ

- แทคซอล (Taxol) 29 เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนจากเปลือกไม้ของพืชสกุลแทคซัส (*Taxus brevifolia*. Nutt) ในวงศ์แทคซาซีอี (Taxaceae) ใช้เป็นยาต้านมะเร็ง



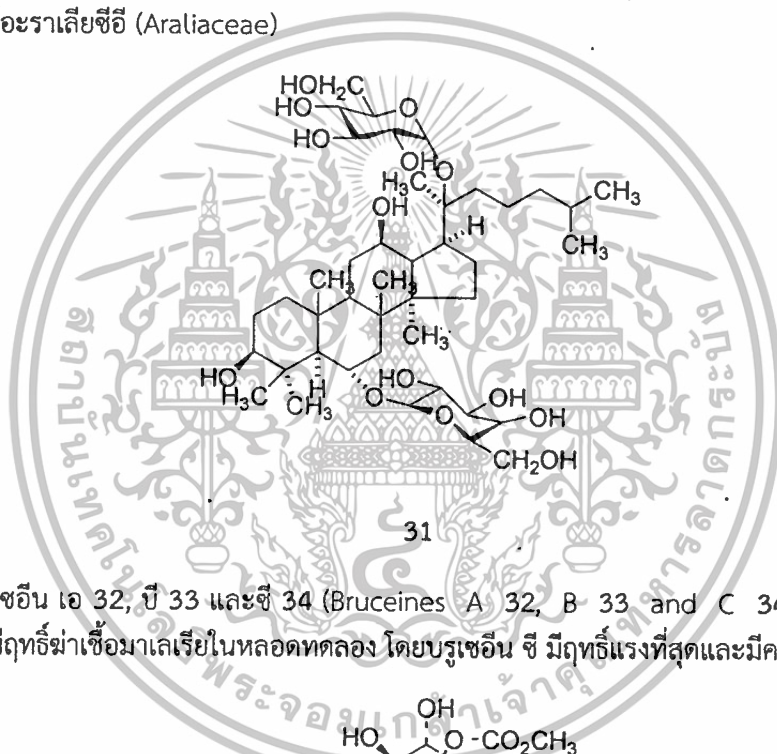
29

-กลีเซโรซิซิน 30 เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน พบในรากชะเอม มีฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะ ลดความดันโลหิต ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด



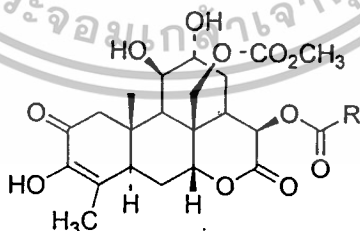
30

- จินเซนโนไซด์ อาร์จีวัน (Ginsenoside Rg<sub>1</sub>) 31 เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนพบในโสม (*Panax* spp.) ในวงศ์อะราเลียซีอี (Araliaceae)



31

- บรูเซอีน เอ 32, บี 33 และซี 34 (Bruceines A 32, B 33 and C 34) เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาเลเรียในหลอดทดลอง โดยบรูเซอีน ซี มีฤทธิ์แรงที่สุดและมีความเป็นพิษสูงด้วย

32: R=CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>33: R=CH<sub>3</sub>34: R=CH=C(CH<sub>3</sub>)-C(OH)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 การสกัดสารจากพืช[19]

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธีโดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใดหรือใช้ตัวทำละลายใด จะต้องประกอบเป็นของผสมหรือของสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพรโดยน้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (Solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically active constituent) ซึ่งถูกเรียกว่า สารสำคัญ (Active constituent) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically inactive constituent) ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (Inert substances) ชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัด จะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพร คือ

- เพื่อสกัดแยกเอาสารสำคัญออกจากสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง
- เพื่อลดขนาด (Dose) ของการใช้สมุนไพรให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

### 2.3.1 ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมการสกัด ได้แก่ น้ำ (Water), แอลกอฮอล์ (Alcohol) หรือ สารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้อาจใช้กรด-ด่าง เติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

1. น้ำ (Water) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่ายและราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ น้ำระเหยได้ดีที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่ น้ำออกไป ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมใช้น้ำเดี่ยวๆ เป็นน้ำยาสกัด แต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่นๆ เช่น แอลกอฮอล์หรือกรด

2. แอลกอฮอล์ (Alcohol) จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับแอลกอฮอล์มีข้อดีกว่าได้แก่ มีความจำเพาะ (Selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และหากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่าย

3. น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (Hydroalcoholic mixture) เป็นน้ำยาสกัดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่างๆ ในการสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในกรณีที่ใช้ น้ำอย่างเดียวในการสกัด

### 2.3.2 การเลือกตัวทำละลาย

หลังจากทำการเตรียมตัวอย่างพืชสมุนไพรสำหรับการสกัดแล้วควรเลือกน้ำยาสกัดให้เหมาะสมกับชนิดของสารที่ต้องการสกัด โดยน้ำยาสกัดควรมีคุณสมบัติดังนี้ มีความสามารถในการละลายสารสำคัญมากที่สุดและไม่ละลายหรือละลายองค์ประกอบอื่นๆ ได้น้อย (Selectivity) ในการเลือกน้ำยาสกัดมักมีกฎทั่วไปว่า สิ่งที่มีเหมือนกันย่อมละลายในกันและกัน (like dissolve like) เช่นคุณสมบัติสารสำคัญมีขี้ ก็ควรเลือกตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัดที่มีขี้เช่นเดียวกันในการสกัด นอกจากนั้นควรมีความคงตัวดี หาง่าย ราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย และไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป

### 2.3.3 วิธีการสกัด

หลักการเบื้องต้นของการสกัดคือ Solid-liquid extraction มีทฤษฎีพื้นฐานคือการละลาย คุณสมบัติเบื้องต้นของการละลายคือความมีขั้ว (Polarity) ตัวถูกละลาย (Solute) จะละลายได้ดีที่สุดในตัวทำละลาย ตามหลักการที่เรียกว่า Like Dissolve Like และนอกจากตัวถูกละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกันแล้ว ตัวทำละลายยังสามารถละลายตัวถูกละลายที่มีขั้วต่ำกว่าได้ด้วย ยกเว้นน้ำซึ่งจะละลายได้เฉพาะตัวถูกละลายที่มีขั้วสูงเท่านั้น การสกัดโดยเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลาย มักเริ่มจากสกัดด้วยแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากแอลกอฮอล์นี้ไปทำให้เข้มข้นก่อนที่จะนำมาพาร์ทิชัน (Partition) กับตัวทำละลายที่มีขั้วต่างๆ กันโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Non-polar solvent) ไปถึงตัวทำละลายมีขั้ว (Polar solvent) เช่น

เฮกเซน (Hexane) > เอทิล แอซิเตต (Ethyl acetate) > บิวทานอล (Butanol)

### 2.3.4 การทำให้สารสกัดเข้มข้น (Concentration)

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีต่างๆ กันดังนี้

1. การระเหย (Free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแผ่นความร้อน (Hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรงบนแผ่นความร้อน อาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuo) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (Rotary evaporator)

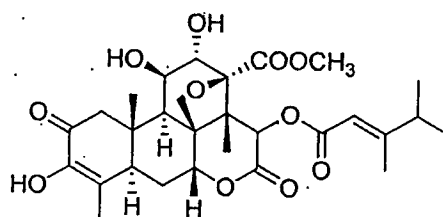
3. การทำให้แห้ง (Drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็ง มีหลายวิธีเช่น การใช้ความเย็น (Lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (Spray dryer) ฯลฯ

4. อัลตราฟิลเทรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (Membrane) ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000

## 2.4 สารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer)[20]

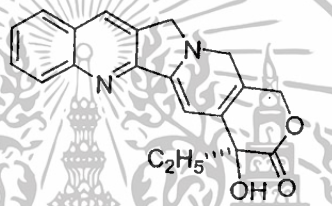
เนื้องอกชนิดร้ายเกิดเนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกลายเป็นก้อนเนื้อใหญ่ หรือ ที่เรียกกันว่าเนื้องอก (Tumors) ถ้าเป็นเนื้องอกชนิดร้ายจะมีการเจริญเติบโตรุกราน (Invasion) และแพร่กระจาย (Metastasis) ไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะอื่นๆ ได้

Bruceantin 34 ได้จาก *Brucea antidysenterica* และ *B. javanica* (ราชตัด) เป็นสารประกอบพวก Quassinoid มีฤทธิ์ในการ ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่ในปริมาณต่ำมาก ได้ผลในการรักษาน้อย กลไกการออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการสังเคราะห์ Polyphenylalanine ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เกิดผลกระทบต่อ การสังเคราะห์ DNA



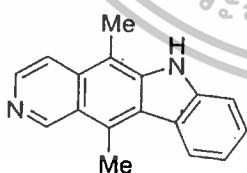
34

Camptothecin 35 ได้จากสมุนไพรจีน *Camptotheca acuminata* วงศ์ Nyssaceae ซึ่งจีนใช้สมุนไพรนี้รักษามะเร็งชนิดต่างๆ มาแต่โบราณ ปัจจุบันผลิตได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยของ *C. acuminata* และยังสามารถได้จากต้น *Mappia foetida* อีกด้วย ได้มีการทดลองทางคลินิกในโรค มะเร็ง กระเพาะอาหาร และ Malignant อื่นๆ ซึ่งได้ผลพอสมควรในสหรัฐอเมริกา แต่ก็พบอาการข้างเคียงไม่พึงประสงค์ การทดลองในจีนพบว่าใช้ได้ผลดีกับมะเร็งตับ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์เจาะจงต่อ Topoisomerase I

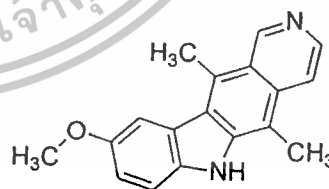


35

Ellipticine 36 และ 9-methoxyellipticine 37 ได้จาก *Ochrosia elliptica O.moorei* และ *Bleekeria coccinea* วงศ์ Apocynaceae เมื่อถูก Metabolize ในร่างกายได้ 9-hydroxyellipticine ซึ่งเป็นสารแสดงฤทธิ์ สารนี้ให้ผลดีในการรักษามะเร็งเต้านมและมีผลตอบสนองกับมะเร็งที่ไต ด้วยกลไกการออกฤทธิ์เนื่องจากโมเลกุลสามารถแทรกตัวเข้าไประหว่าง Base pair ใน DNA ได้เป็น Intercalation และยังใช้ร่วมกับยาอื่นที่มีฤทธิ์ Myelotoxic ได้ เนื่องจากไม่มีฤทธิ์กดไขกระดูก



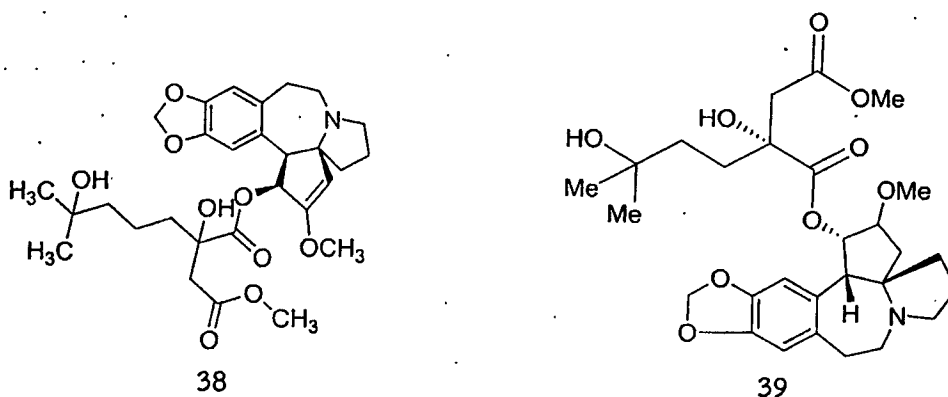
36



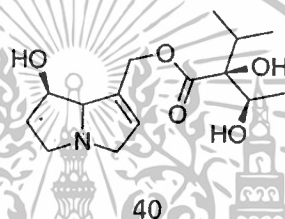
37

Homoharringtonine 38 และ Harringtonine 39 ได้จากพืชสกุล *Cephalotaxus* ที่มีในประเทศไทยคือ *C. griffithii* Hook หรือ มะขามป้อมดง และจากสมุนไพรจีนคือ *C. harringtonia* สารดังกล่าวเป็น Ester ของ Cephalotaxine ซึ่งใช้ได้ผลในภาวะ Myeloblastic leukemia และ Monoblastic leukemia ชนิดเฉียบพลัน ในประเทศจีนได้รายงานว่ามีผู้ป่วยที่ทานยารักษามะเร็งเม็ดโลหิตชนิดอื่นมีการตอบสนองทางการรักษาที่ดีต่อสารทั้งสองนี้ กลไกการออกฤทธิ์พบว่าสารพวกนี้เป็น Cell cycle nonspecific phase

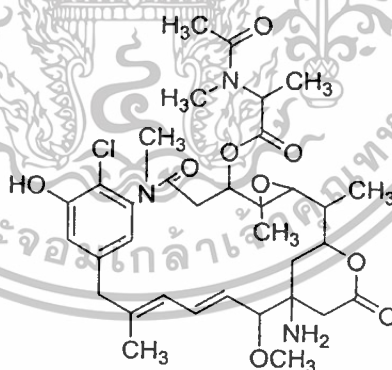
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Indicine-N-oxide 40 ได้จาก *Heliotropium indicum* หรือ หนุ่ยวงช้าง มีฤทธิ์ต่อมะเร็งเม็ดเลือดขาว ชนิดเฉียบพลัน และคาดว่าจะได้ผลกับมะเร็งลำไส้ใหญ่ผลจากการศึกษาในระยะที่ II พบว่าให้ผลดีกับ Acute leukemia แต่มีพิษต่อดับ

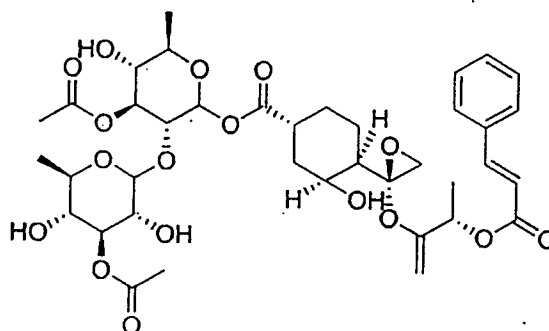


Maytansine 41 ได้จาก *Maytenus serrata* วงศ์ Celastraceae เป็นสาร Macrolide ที่มีผลต่อ Neoplasm ขนาดที่ใช้ต่ำ กลไกการออกฤทธิ์เป็น Antimitotic คล้ายแอลคาลอยด์ของแพงพวยฝรั่ง



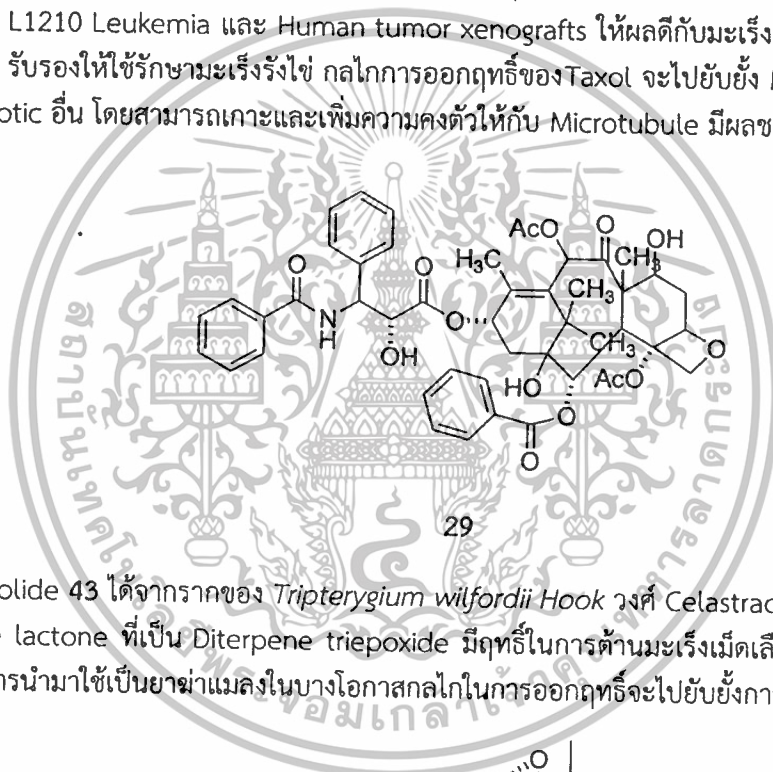
Phyllanthoside 42 ได้จากราก *Phyllanthus acuminatus* วงศ์ Euphorbiaceae มีรสขม เดียวกับลูกใต้ใบ มะยม โครงสร้างอยู่ในรูปไกลโคไซด์ของ Sesquiterpene มีฤทธิ์ต้าน B16 melanoma phyllanthoside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



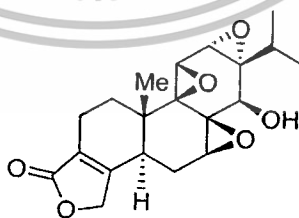
42

Taxol 29 ได้จากเปลือกต้น *Taxus brevifolia* Nutt วงศ์ Taxaceae เป็นสารประเภท Diterpene ที่เป็น Tricyclic 6-8-6 ring system มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งหลายชนิดรวมทั้ง B6-melanoma, L1210 Leukemia และ Human tumor xenografts ให้ผลดีกับมะเร็งรังไข่ และมะเร็งเต้านม โดย FDA รับรองให้ใช้รักษามะเร็งรังไข่ กลไกการออกฤทธิ์ของ Taxol จะไปยับยั้ง Mitosis ที่ไม่เหมือนสาร Antimitotic อื่น โดยสามารถเกาะและเพิ่มความคงตัวให้กับ Microtubule มีผลชะลอการแบ่งตัวของเซลล์



29

Triptolide 43 ได้จากรากของ *Tripterygium wilfordii* Hook วงศ์ Celastraceae โครงสร้างเป็นสาร Terpene lactone ที่เป็น Diterpene triepoxide มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว แต่มีความเป็นพิษสูง มีการนำมาใช้เป็นยาฆ่าแมลงในบางโอกาสกลไกในการออกฤทธิ์จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA

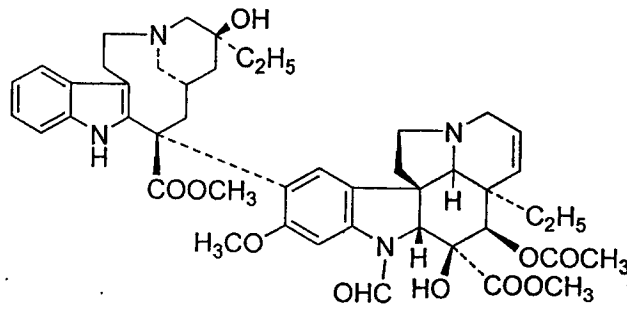


43

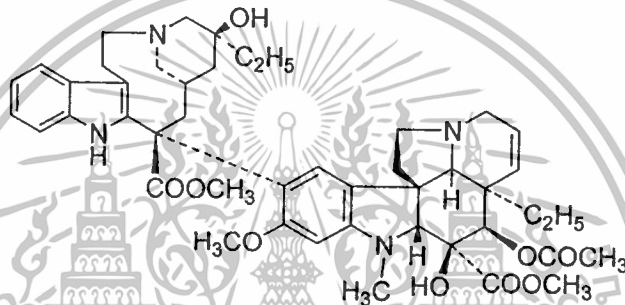
Vincristine 44 และ Vinblastine 45 ได้จาก *Madagascan periwinkle* หรือ พวงพวยฝรั่ง เป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะมาดากัสการ์มีปลูกอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดแอลคาลอยด์ Vincristine ในรูป  $SO_4$  ใช้ได้ผลดีในการรักษา มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันในเด็ก ส่วน Vinblastine ใช้ร่วมกับ Bleomycin cisplatin ใช้ในการรักษา Disseminated nonseminomatous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

testicular cancer กลไกในการออกฤทธิ์เป็น Antimitotic agent และเป็น M-phase specific ในวงจรชีวิต



44



45

## 2.5 ประยงค์[3, 4, 5]

ประยงค์ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Aglaia odorata* Lour. อยู่ในวงศ์ MELIACEAE ชื่อสามัญคือ Chinese Rice flower และมีชื่อเรียกตามท้องถิ่นอื่นๆได้แก่ ขะยง ขะยม พะยงค์ ยม (ภาคเหนือ), ประยงค์บ้าน ประยงค์ใบใหญ่ (ภาคกลาง) และหอมไกล (ภาคใต้)

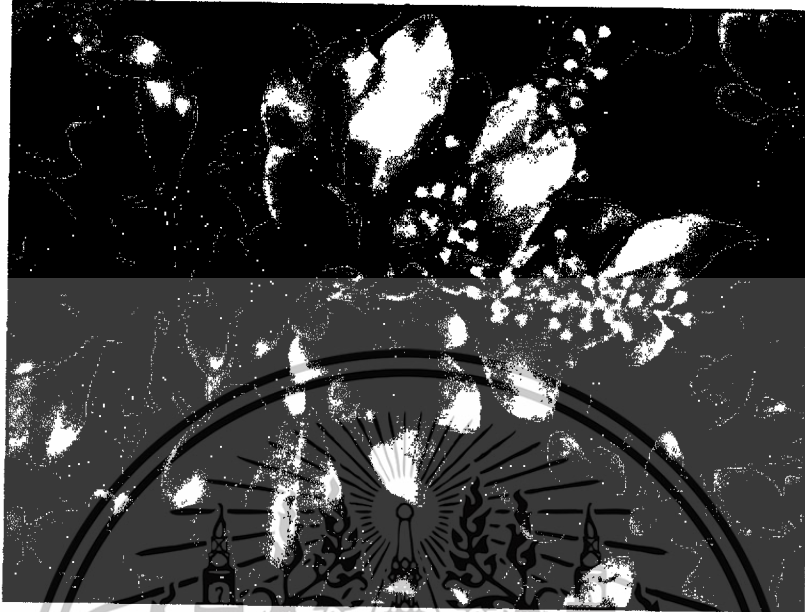
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

ใบประยงค์ เป็นใบประกอบแบบขนนก ออกเรียงสลับใบย่อยมี 5 ใบ (บางใบอาจมีใบย่อยเพียง 3 ใบ) ลักษณะของใบเป็นรูปรีหรือรูปไข่กลับ ปลายใบมน โคนใบแหลม ส่วนขอบใบเรียบเป็นคลื่นเล็กน้อย ใบมีขนาดกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2-4 เซนติเมตร ผิวใบเป็นสีเขียวเข้ม หลังใบและท้องใบเรียบ ก้านใบแผ่ออกเป็นปีก

ดอกประยงค์ ออกดอกเป็นช่อสั้นๆ ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร โดยจะออกตามซอกใบและปลายกิ่ง ในแต่ละช่อดอกจะประกอบไปด้วยดอกย่อยขนาดเล็กมากกว่า 10 ดอก ดอกย่อยเป็นสีเหลืองและมีกลิ่นหอมแรง ลอยไปได้ไกล (แม้ดอกแห้งก็ยังมีกลิ่นหอมอยู่) มีกลีบดอก 6 กลีบ กลีบดอกซ้อนกันไม่บานออก ลักษณะเป็นรูปทรงกลมเล็กคล้ายไข่ปลาสีเหลือง สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ส่งกลิ่นหอมอ่อนๆ ตลอดทั้งวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลประยงค์ ลักษณะของผลเป็นรูปทรงกลมรี มีขนาดประมาณ 1-1.2 เซนติเมตร ผิวผลเรียบเป็นมัน ผลอ่อนเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อสุกแล้วจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มเกือบดำ ภายในผลมีเมล็ดสีน้ำตาล 1-2 เมล็ด



รูปที่ 2.1 ใบประยงค์

#### ประโยชน์ของประยงค์ :

ประยงค์เป็นสมุนไพรที่แพทย์พื้นบ้านชาวไทยรู้จักดีมานาน เพราะใช้ประโยชน์ได้หลายส่วน เช่นดอกแห้ง: กลิ่นหอม รสขม เผื่อน เร่งการคลอด แก้กษัย ฟอกปอด ทำให้หูตาสว่าง แก้ก้อน ตับ กระหาย แก้อึดอัดแน่นหน้าอก ไอ รังเวียนศีรษะ ช่วยให้จิตใจปลอดโปร่ง ดอกแห้งของประยงค์ใช้อบกลิ่นชาเช่นเดียวกับดอกมะลิแห้ง ชาวจีนนิยมกินมากในชาใช้ดอกประยงค์แห้งอบเสื้อผ้าให้มีกลิ่นหอม ใบและก้านรสเผื่อน แก้แผลบวมฟกช้ำ ผีมีหนอง รากรสเย็นเผื่อน ทำให้อาเจียน นอกจากดอกที่หอมทนและหอมไกลแล้ว ทรงพุ่มของประยงค์ยังคงงาม เหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้ประดับได้ดี นอกจากนี้ยังแข็งแรง ทนทาน ปลูกง่าย อายุยืนยาวเหมาะกับการปลูกเอาไว้ในบริเวณบ้านหรืออาคารต่างๆ

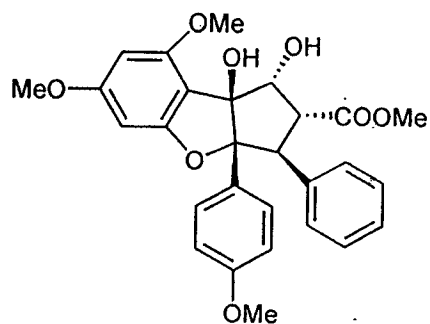
#### ข้อควรระวังในการใช้สมุนไพรประยงค์ :

สตรีมีครรภ์ห้ามดื่ม เพราะอาจทำให้แท้งบุตรได้

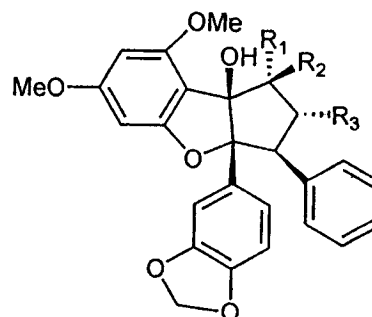
## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

T. Santisuk และคณะ[21] ทำการสกัดลำต้นและผลของประยงค์ *A. elliptica* ได้สารกลุ่ม 1H-cyclopenta [b] benzofuran จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Methyl rocaglate 46, สารอนุพันธ์ 47-50 และ Dammarane triterpenoids จำนวน 3 ชนิด เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็ง Oral epidermoid carcinoma (KB cell line) พบว่า สาร 46-50 มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งมากกว่าสารในกลุ่ม Dammarane triterpenoid

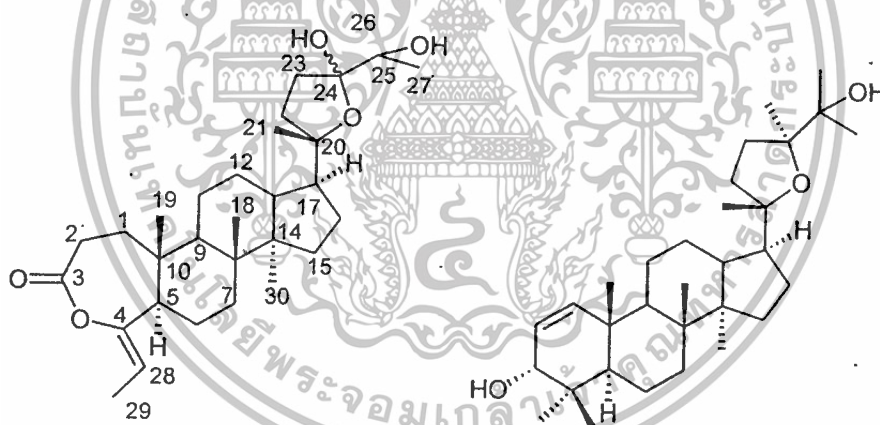
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



46

47:  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{COOMe}$ 48:  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$ 49:  $R_1 = \text{O}$ ,  $R_3 = \text{H}$ 50:  $R_1 = \text{OCHO}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{COOMe}$ 

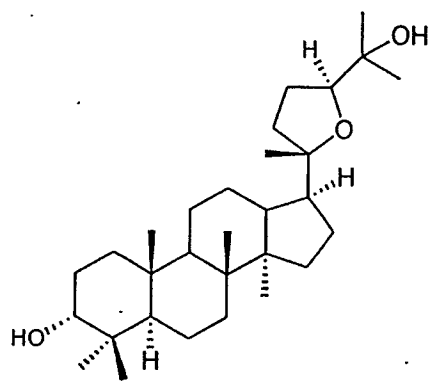
D. Harneti และคณะ[22] ทำการสกัดเปลือกของ *A. eximia* และนำไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P-388 cell) พบว่าสารประกอบ 51-55 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว มีค่า  $\text{IC}_{50}$  เท่ากับ 11.42, 4.26, 29.10, 45.96 และ 52.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



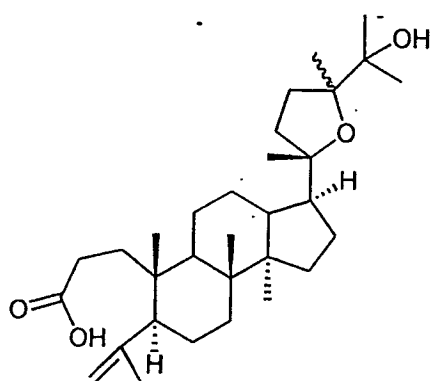
51

52

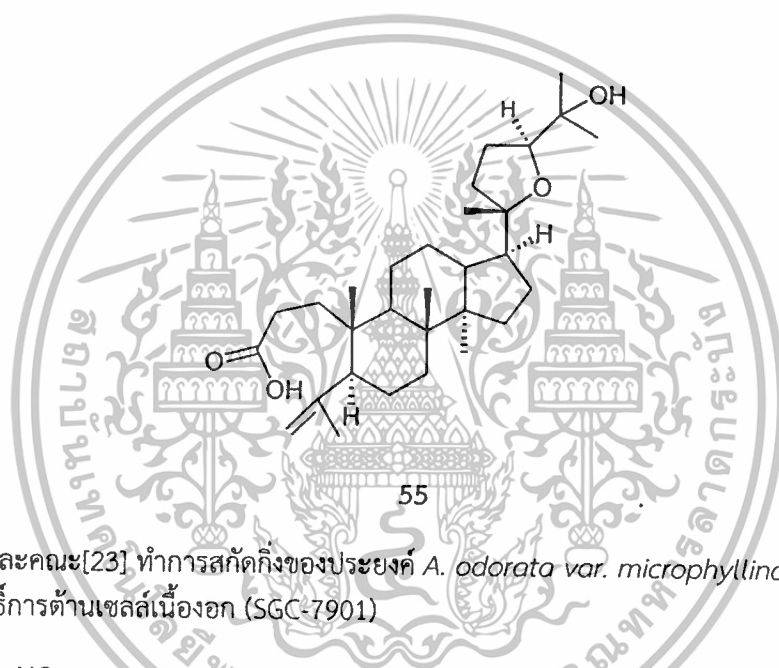
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



53

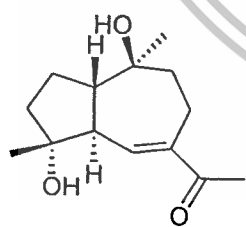


54

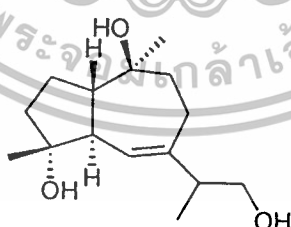


55

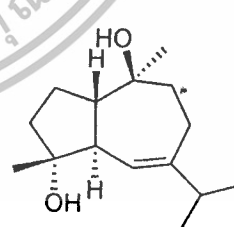
S. Liu และคณะ[23] ทำการสกัดกิ่งของประยงค์ *A. odorata* var. *microphyllina* พบสาร 56, 57 และ 58 มีฤทธิ์การต้านเซลล์เนื้องอก (SGC-7901)



56



57

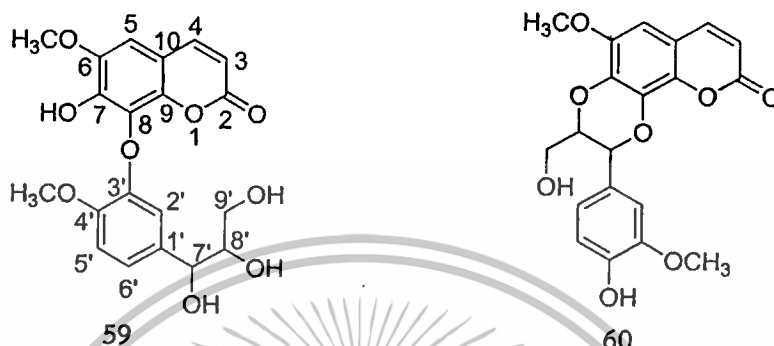


58

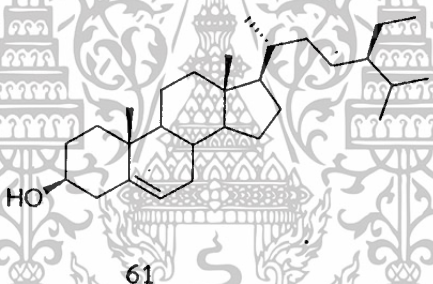
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H. Zhang และคณะ[24] ได้ทำการศึกษาโครงสร้างของสารองค์ประกอบที่สกัดแยกได้จากใบประยงค์ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

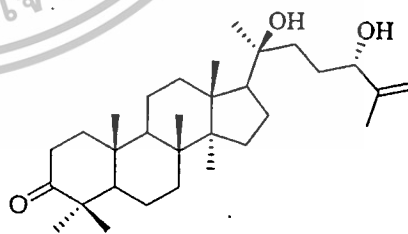
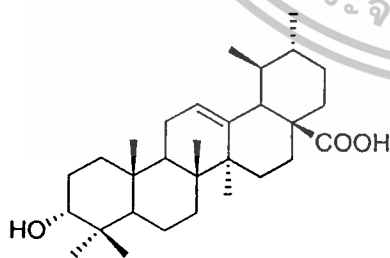
กลุ่มที่ 1 Coumarino-lignoids เช่น 8-(7',8',9'-propanetriol-4'-methoxy-3'-O-phenylpropanoid)-7-hydroxy-6-methoxycoumarin 59 และ Cleomiscosin A 60



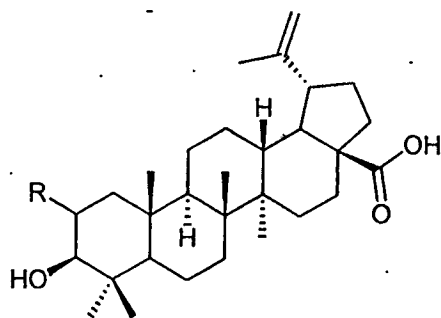
กลุ่มที่ 2 Sterol เช่น  $\beta$ -Sitosterol 61



กลุ่มที่ 3 Triterpenoids เช่น Ursolic acid 62, 20(S),24(S)-Dihydroxy-dammar-25-en-3-one 63, Betulinic acid 64 และ Alphitolic acid 65



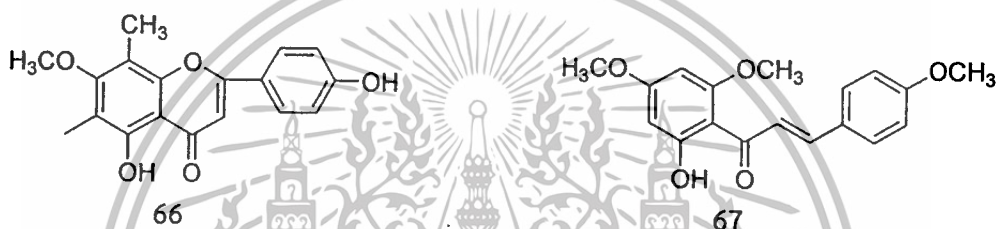
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



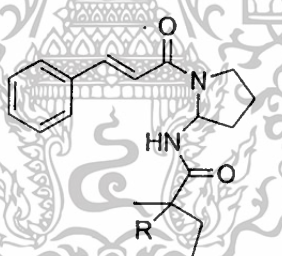
64: R = H

65: R = OH

กลุ่มที่ 4 Flavonoids เช่น Sideroxylin 66 และ 2'-Hydroxy-4,4',6'-trimethoxy-trans-chalcone 67



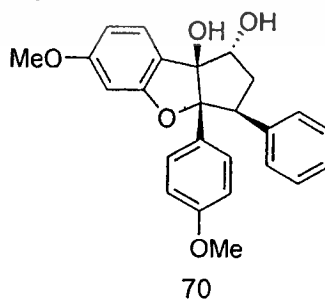
กลุ่มที่ 5 Bis-amides เช่น Odorine 68 และ Odorinol 69



68: R = H

69: R = OH

กลุ่มที่ 6 Flavagline เช่น Roaglaol 70



70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

### 3.1 แหล่งของพืชที่ใช้ในการทดลอง

พืชทดสอบ : ใบของต้นประยงค์ (*Aglaia odorata* Lour.) โดยคัดเลือกใบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคหรือแมลงรบกวน และเป็นใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ ได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงพัฒนา ประยงค์เพื่อการเกษตรแบบยั่งยืนของ รศ.ดร.จำรูญ เล้าสินวัฒนา จังหวัดสมุทรสาคร

### 3.2 สารเคมีและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทำโครมาโทกราฟี ได้แก่ เฮกเซน, เอทิล แอซิเตต และ เมทานอล ทำการกลั่นแบบธรรมดา ณ ที่อุณหภูมิจุดเดือดของตัวทำละลายแต่ละชนิด ก่อนนำมาใช้ในแต่ละการทดลอง การแยกจัดกลุ่มสารสำคัญและการแยกสารให้บริสุทธิ์ทำโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ตัวดูดซับคือ ซิลิกาเจล ของ Scharlau GE 0048 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร และใช้ซิลิกาเจล ขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร สำหรับคลุกสารสกัดหยาบก่อนการบรรจุลงในคอลัมน์ ส่วนThin layer chromatography (TLC) เป็นซิลิกาเจล 60 F<sub>254</sub> บนแผ่นอะลูมิเนียม จุดของสารสำคัญพิสูจน์ด้วยการดูคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และใช้ anisaldehyde reagent ป้ายบนแผ่น TLC แล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นนำความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นจุดสีเฉพาะของสารสำคัญแต่ละชนิด

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 3.3.1 การสกัดสารจากใบประยงค์

##### 3.3.1.1 การเตรียมตัวอย่างใบประยงค์

นำตัวอย่างใบประยงค์มาล้างน้ำให้สะอาดเพื่อกำจัดเศษดินและแมลง คัดใบที่เน่าเสีย ออก ฝักรวมให้แห้งแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน หรือจนกว่าใบจะแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชที่อบแห้งแล้วมาบดหยาบ และบดที่ก้นน้ำหนักแห้ง

##### 3.3.1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบประยงค์

วิธีการสกัดจะสกัดด้วยวิธีการหมัก (Maceration) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Greger และคณะ[25] โดยนำตัวอย่างใบประยงค์ 1.00 กิโลกรัม มาห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ในขวดโหล แช่ด้วยเมทานอล 10 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง และทำการคนของผสมทุกวันกรองแยกสารละลายชั้นเมทานอลและกากของใบประยงค์ แล้วทำการระเหยเมทานอลโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบเมทานอล (ทำการสกัดซ้ำโดยการแช่กากใบประยงค์ ในเมทานอลอีก 2 ครั้ง และนำสารละลายรวมกับการสกัดครั้งแรก) หลังจากทำการระเหยเมทานอลแล้วปล่อยให้เมทานอลที่เหลือระเหยออกไปในตู้วันจนแห้ง สารสกัดหยาบเมทานอลจะมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเขียว บดที่ก้นน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ จากนั้นนำสารสกัดหยาบเมทานอล 221.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร มาสกัดต่อด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent partitioning extraction) โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน, เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1 นำสารละลายของสารสกัดหยาบที่ได้แต่ละชั้นไปสกัดด้วยสารละลายไซโตลิมคลอไรด์อิมิตัวเพื่อดูน้ำบางส่วนออกจากสารละลาย ไซชั้นสารละลายไซโตลิมคลอไรด์อิมิตัวทิ้ง จากนั้นนำสารละลายแต่ละชั้นมาดูน้ำด้วยแอนไฮดรัสไซโตลิมซัลเฟต กรองแยกสารละลายและแอนไฮดรัสไซโตลิมแล้วทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

### 3.3.1.3 การจัดกลุ่มสารของสารสกัดหยาบโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

1. แบ่งสารสกัดหยาบชั้นที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดมาหาระบบตัวทำละลายด้วยเทคนิค TLC (Thin Layer Chromatography) โดยสังเกตจากการแยกของสารชัดเจนที่สุด (พิจารณาให้ค่า  $R_f$  มีค่าใกล้เคียง 0.3) และเก็บสารสกัดหยาบนี้ไว้ สำหรับเปรียบเทียบจุดบนแผ่น TLC ของสารส่วนย่อยในการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป
2. ทำการตัดแผ่น TLC ขนาด 2x5 เซนติเมตร ทำการขีดเส้นจากปลายขอบบนและขอบล่าง ของแผ่น TLC จากนั้นทำการจุดสารที่ได้จากสารสกัดหยาบที่แยกได้จากการระเหยตัวทำละลายออกแล้วแบ่งออกมาใส่ในขวดเก็บสาร และทำการจุดสารลงบนแผ่น TLC
3. เตรียม TLC แทงค์ (TLC chamber) โดยทำให้ตัวทำละลายในแทงค์อิมิตัว
4. ทำการทดสอบอัตราส่วนของสารละลายผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มจากสารละลายที่มีขั้วต่างกันเช่น เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วน 90 : 10 จากนั้นวางแผ่น TLC ลงใน TLC แทงค์ ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นที่กำหนดไว้ จากการแยกสารที่เกิดขึ้นจะเห็นได้จากถ้าสามารถแยกได้ดี จะเป็นจุดที่ชัดเจน ถ้าการแยกของสารไม่ชัดเจนให้ทำการเพิ่มหรือลดอัตราส่วนของตัวทำละลายในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อที่จะได้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร
5. นำแผ่น TLC มาทดสอบการดูดกลืนแสงอัตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร จากนั้นทำการจุดที่เห็นเป็นสารเรืองแสง
6. ป้าย anisaldehyde reagent ให้ทั่วแผ่น TLC แล้วนำไปวาง บนแผ่นให้ความร้อน (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะเกิดจุดเกิดสีเฉพาะตัวของสาร สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในบริเวณที่ได้วงไว้ ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลง
7. เมื่อได้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว จะนำมาใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

#### 3.3.1.4 วิธีการเตรียมคอลัมน์และแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์แบบ Slurry โดยใช้ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.02-0.06 มิลลิเมตร ทำให้เป็นของเหลวชั้นในตัวทำละลาย
2. ใช้สำลีที่ชุ่มด้วยตัวทำละลายอุดที่ปลายคอลัมน์ เทซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ ทำการปรับผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบและแน่นทำการป้องกันผิวของซิลิกาเจลโดยใส่ทรายละเอียด
3. ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบแล้วละลายด้วยตัวทำละลายลงไปเล็กน้อยจากนั้นใส่ซิลิกาเจลขนาด 0.06-0.2 มิลลิเมตร คนให้เข้ากันแล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมดแล้วเทลงในคอลัมน์
4. ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์จากนั้นทำการเพิ่มขั้วของตัวทำละลายทีละน้อยอย่างต่อเนื่องเพื่อให้สารที่ต้องการออกจากคอลัมน์

5. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ตรวจสอบสารด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพร้อมทำการตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

6. รวมสารส่วนย่อยที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

### 3.3.1.5 การแยกส่วนย่อยจากชั้นสารสกัดหยาบโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1. เตรียมคอลัมน์ตามวิธีในหัวข้อที่ 3.5.1.4

2. นำสารสกัดหยาบที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์โดยไม่ต้องทำการกั้วขวดกันกลม ใช้ตัวทำละลายเฮกเซนประมาณ 700 มิลลิลิตร เป็นตัวชะจากนั้นทำการเพิ่มหัวของตัวทำละลายอย่างต่อเนื่องด้วยเอทิล แอซิเตตเพื่อให้สารที่ต้องการเคลื่อนที่จากคอลัมน์เมื่อสารที่ถูกชะอยู่ห่างจากปลายคอลัมน์ประมาณ 5 เซนติเมตรให้ทำการเก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์

3. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วยขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร เก็บปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นจดหมายเลขพร้อมกับการตรวจสอบสารในแต่ละขวดด้วยเทคนิค TLC โดยทำการเพิ่มหัวของสารละลายและทำการตรวจสอบด้วยการส่องด้วยแสงแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และทดสอบด้วย anisaldehyde reagent

4. เมื่อสารที่ต้องการแยกออกมาให้ทำการจดบันทึกเมื่อสารเริ่มออกจากขวดที่เท่าใดและจำนวนเท่าใดรวมกลุ่มสารย่อยด้วยแผ่น TLC ถ้าสารออกมาเหมือนกันให้ทำการรวมสารละลายที่แยกออกมาได้เข้าด้วยกันแล้วทดสอบด้วย TLC อีกครั้งจึงระเหยตัวทำละลายออก

5. การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีจะดำเนินการวิธีตามหัวข้อ 3.3.1.4 และ 3.3.1.5

## 3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์[26]

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่

1. เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line)
2. เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line)
3. เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line)
4. เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line)
5. เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P-388 (Murine leukemia cell line)
6. เซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney)

### วิธีการทดลองสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. เตรียมเซลล์ไลน์ที่ต้องการทดสอบในอาหาร DMEM เสริมด้วย 10% FBS โดยเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร จำนวนปริมาณเซลล์มีชีวิตเพื่อใช้ทดสอบให้เพียงพอกับการทดลองแต่ละครั้ง

2. เตรียม Stock สารสกัดที่ใช้ทดสอบ โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นตั้งต้น ประมาณ 10,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีช่องผ่านขนาด 0.2 ไมโครเมตร และใส่ขวดแก้วที่ปลอดเชื้อ หุ้มขวดแก้วด้วยแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ (aluminum foil) เพื่อป้องกันแสง จากนั้นเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เตรียมละลาย MTT (50 มิลลิกรัม) ใน PBS 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของ MTT เท่ากับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลายที่ได้มีสีเหลือง ทำการกรองด้วยชุดกรองสารขนาดช่องผ่าน 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารละลายในขวดที่ปราศจากเชื้อ ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม ฟอยล์ และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. เตรียมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ที่ต้องการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ความเข้มข้นดังกล่าวอาจได้จากเอกสารอ้างอิงเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารนั้นที่มีต่อสัตว์ (*In vivo*) หรือทำการทดสอบเบื้องต้น เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่ครอบคลุมความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC<sub>50</sub>)

4. วางแผนการทดสอบ โดยเตรียมแผนผังตามรูปแบบของภาชนะเพาะเลี้ยง ในที่นี้ใช้จานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม (96-well plate) ปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์มีชีวิตขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ทดสอบ 3 ซ้ำ นำจานเพาะเลี้ยงที่ปลูกเซลล์เรียบร้อยแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 1 คืน หรือ 24 ชั่วโมง

5. นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ออกจากตู้บ่ม แล้วเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6. เตรียมสารละลายซึ่งมีส่วนผสมระหว่าง DMSO : 10% SDS (9:1) สำหรับละลายผลึกฟออร์มาซาน

7. เมื่อบ่มเซลล์ในสารสกัดครบ 24 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงไปในแต่ละหลุมที่ทดสอบ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8. จากนั้นดูดสารละลาย MTT ทิ้ง แล้วเติมสารละลาย DMSO : 10% SDS 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุม เพื่อละลายผลึกฟออร์มาซาน จะได้สารละลายสีม่วง

9. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครโอดอเมตริกเพลทรีดเดอร์ ที่ความยาวคลื่นของแผ่นกรองแสงเท่ากับ 570 นาโนเมตร ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง ต้องตั้งโปรแกรมการเขย่า นาน 5 นาที เพื่อให้ผลึกฟออร์มาซานละลายทั้งหมด และความเข้มข้นของสีกระจายทั่วทั้งหลุม บันทึกค่าการดูดกลืนแสง

10. คำนวณหาค่า %cytotoxicity ของแต่ละความเข้มข้นดังนี้ คือ

$$\% \text{Cytotoxicity} = \left[ \frac{A-B}{A} \right] \times 100$$

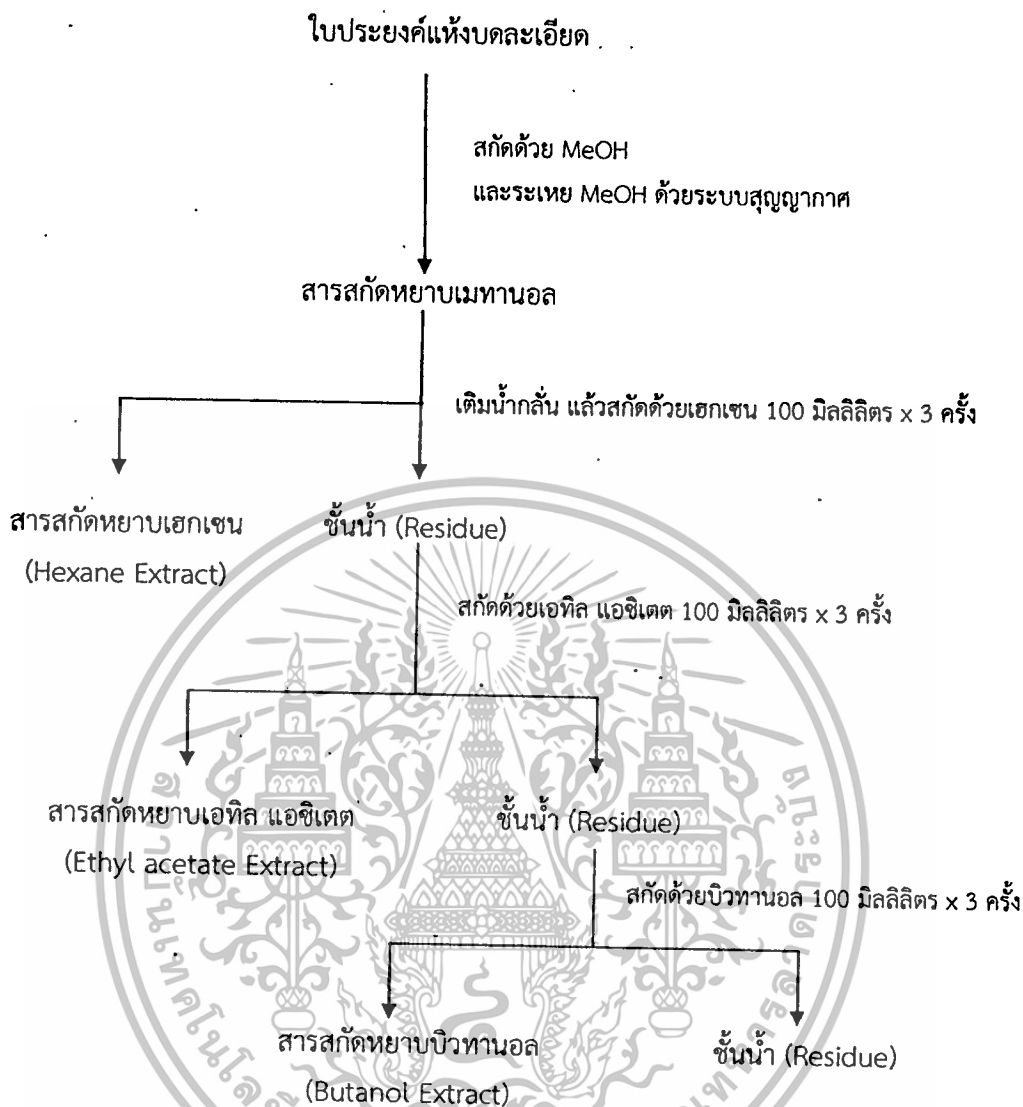
A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารสกัดแต่ละความเข้มข้น

โดยค่า A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (ในที่นี้ คือหลุมที่เติมสารละลาย DMSO : 10% SDS) มาหักออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น

11. นำผลการคำนวณค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) บันทึกลงในตารางเพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่เป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 (CC<sub>50</sub>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



แผนภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบประยงค์ด้วยวิธี  
Solvent Partitioning Extraction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบใบประยงค์

วิธีการเตรียมสารสกัดจากใบประยงค์จะดำเนินการด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้ใบประยงค์แห้งบดละเอียดน้ำหนักเท่ากับ 1.00 กิโลกรัม แช่ในเมทานอลเป็นเวลา 7 วัน กรองแยกกากและของเหลว ผลกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วทำการระเหยเมทานอลออกได้สารสกัดหยาบเมทานอล มีลักษณะของเหลวหนืดเกือบเป็นของแข็งสีเขียวเข้ม มีน้ำหนักเท่ากับ 242.23 กรัม และร้อยละผลผลิตคิดเป็น 24.22 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของใบประยงค์แห้ง จากนั้นทำการจัดกลุ่มสารสำคัญโดยนำสารสกัดหยาบเมทานอลน้ำหนัก 221.08 กรัม มาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิด คือ เฮกเซน, เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ เมื่อทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบของตัวทำละลายอินทรีย์ 4 ชนิดได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน, สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต และสารสกัดหยาบบิวทานอล มีค่าเท่ากับ 21.28, 30.37 และ 17.92 กรัม มีผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 9.63, 13.73 และ 8.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สารสกัดหยาบทั้งหมดถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้น 1,000, 500, 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC<sub>50</sub>)

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักสารสกัดและผลได้เป็นร้อยละ

สารสกัดหยาบ	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
เฮกเซน	21.28	9.63
เอทิล แอซิเตต	30.37	13.73
บิวทานอล	17.92	8.11

#### 4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P-388 (Murine leukemia cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT วัดค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ แล้วนำผลการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ หรือทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ( $CC_{50}$ ) โดยพิจารณาจากค่า  $CC_{50}$  ถ้าค่า  $CC_{50}$  ของสารสกัดหยาบให้ค่า  $CC_{50}$  ในระดับ คาดว่าสารสกัดหยาบนั้นน่าจะมีสารสำคัญที่มีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ในการศึกษานี้จะใช้ตัวทำละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO และตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt เป็นชุดควบคุม

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ P-388 มากที่สุด แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 99.17 เปอร์เซ็นต์ และมีผลต่อเซลล์ไลน์ KB, Vero, MCF-7 และ HepG-2 โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 96.73, 94.13, 95.14 และ 78.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซน ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ HT-29 โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 33.29 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิด โดยสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากที่สุด โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 96.40 เปอร์เซ็นต์ และมีผลต่อเซลล์ไลน์ Vero, P-388, KB, HepG-2 และ HT-29 โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ เท่ากับ 94.16, 93.66, 92.71, 91.53 และ 84.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบบิวทานอลและสารสกัดหยาบเมทานอล ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่าร้อยละ 50

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบประยงค์

สารสกัดหยาบ	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์)					
	HT-29	MCF-7	HepG-2	KB	P-388	Vero
เฮกเซน	33.29	95.14	78.61	96.73	99.17	94.13
เอทิล แอซิเตต	84.87	96.40	91.53	92.71	93.66	94.16
บิวทานอล	8.49	24.20	22.86	1.71	7.62	1.38
เมทานอล	3.94	40.34	22.60	6.90	84.57	7.62

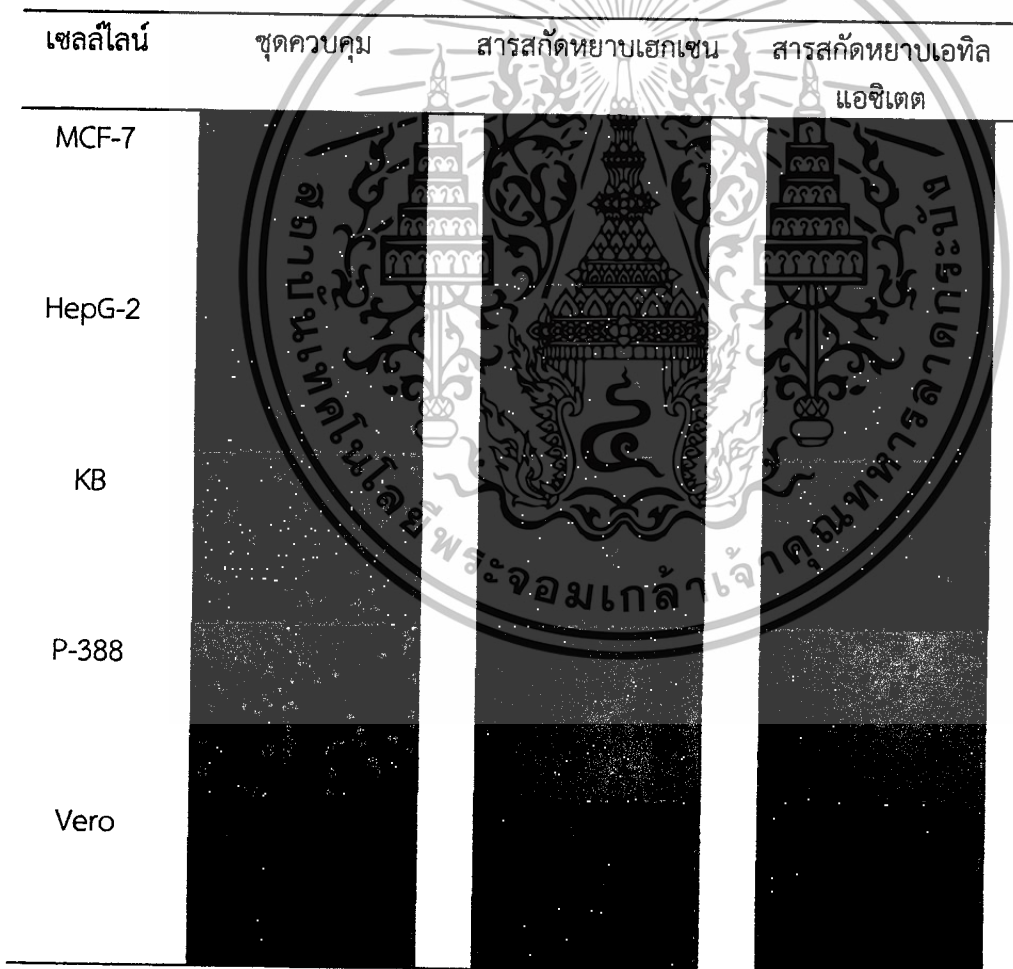
จากผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ที่มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไปวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง (antagonist) 50 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี MTT assay ( $CC_{50}$ ) และเมื่อคำนวณหาค่า  $CC_{50}$  พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนมีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 มากที่สุด โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ  $61.306 \pm 0.67$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเซลล์ไลน์ Vero, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ KB และเซลล์ไลน์ HepG-2 โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ  $380.336 \pm 13.48$ ,  $455.754 \pm 32.57$ ,  $562.736 \pm 18.58$  และ  $713.651 \pm 32.01$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 มากที่สุด โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ  $79.784 \pm 0.97$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเซลล์ไลน์ Vero, เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ KB, เซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ HepG-2 โดยมีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ  $182.672 \pm 11.18$ ,  $183.007 \pm 1.73$ ,  $277.595 \pm 4.54$ ,  $419.166 \pm 15.25$  และ  $711.274 \pm 8.07$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่า  $CC_{50}$  ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต แสดงในตารางที่ 4.3 การศึกษาในขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการแยกกลุ่มสารที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยจะทำการแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีและจัดกลุ่มสารสำคัญด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

ตารางที่ 4.3 ค่า  $CC_{50}$  ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต

ชนิดของเซลล์ไลน์	ค่า $CC_{50}$ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
	สารสกัดหยาบเฮกเซน	สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต
HT-29	-	183.007±1.73
MCF-7	455.754±32.57	419.166±15.25
HepG-2	713.651±32.01	711.274±8.07
KB	562.736±18.58	277.595±4.54
P-388	61.306±0.67	79.784±0.97
Vero	380.336±13.48	182.672±11.18



รูปที่ 4.1 เซลล์ไลน์ MCF-7, HepG-2, KB, P-388 และ Vero หลังการเติม MTT ของสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ผลการแยกสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

นำสารสกัดหยาบเฮกเซนมาทำการทดสอบเพื่อหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) โดยเริ่มจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 1:1 จากนั้นจึงค่อยเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลาย เมื่อทำการ develop แผ่น TLC แล้ว จะนำแผ่น TLC ไปผ่านแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ถ้าจุดใดมีการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เห็นเป็นจุดสีม่วง แสดงว่าสารสำคัญนั้นมีโครโมฟอร์ เช่น พันธะคู่ (double bond) หรือ วงแอมโรมาติก (aromatic ring)[27] ในที่นี้สารสกัดหยาบเฮกเซนปรากฏจุดเรืองแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จำนวน 7 จุด เมื่อนำแผ่น TLC ไปย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent โดยการป้ายให้ทั่วทั้งแผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะปรากฏจุดสีขึ้น ภาพจำลองจุดสีของสารที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบเฮกเซน แสดงดังรูปที่ 4.2 ซึ่งเป็นสีเฉพาะของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent ตัวอย่างของจุดสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดหยาบเฮกเซนให้จุดสีเป็นสีม่วงกับ anisaldehyde reagent คาดว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์มีสารสำคัญในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์หรือสเตียรอยด์ เป็นต้น[28]

เมื่อหาระบบด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบเฮกเซนแล้ว จะทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับคือ ซิลิกาเจล ใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต ในอัตราส่วนต่างๆ กัน โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวชะโดยการเพิ่มเอทิล แอซิเตต น้ำหนักเริ่มต้นของสารสกัดหยาบเฮกเซน เท่ากับ 21.28 กรัม สามารถแยกสารส่วนย่อยได้ทั้งหมด 10 ส่วน (ใช้รหัสคือ H<sub>1</sub>-H<sub>10</sub>) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 จากนั้นนำสารส่วนย่อยทั้งหมดมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.4 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

สารส่วนย่อย	ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต	ลักษณะของสารส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
H <sub>1</sub>	94 : 6	ของเหลวหนืดสีส้มของแข็งปน	1697.7	7.9
H <sub>2</sub>	90 : 10	ของเหลวหนืดสีเหลืองปนกับของแข็งสีขาว	1306.9	6.1
H <sub>3</sub>	85 : 15	ของเหลวหนืดสีเหลืองปนกับของแข็งสีขาว	1480.0	6.9
H <sub>4</sub>	80 : 20	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้มปนกับของแข็ง	2341.1	11
H <sub>5</sub>	75 : 25	ของเหลวหนืดสีเขียว	541.8	2.5
H <sub>6</sub>	60 : 40	ของเหลวหนืดสีเขียว	2034.7	6.9
H <sub>7</sub>	55 : 45	ของเหลวหนืดสีเขียว	1654.8	7.7
H <sub>8</sub>	40 : 60	ของเหลวหนืดสีเขียว	795.3	3.7
H <sub>9</sub>	35 : 65	ของเหลวหนืดสีเขียว	992.8	4.6
H <sub>10</sub>	20 : 80	ของเหลวหนืดสีเขียวปนกับของแข็ง	1008.9	4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย H<sub>1</sub>-H<sub>10</sub> ของสารสกัด หยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซนทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero เนื่องจากค่า CC<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 713.651±32.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเฮกเซนต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 น้อยกว่าเซลล์ไลน์ชนิดอื่นจึงไม่นำมาทดสอบ การทดลองนี้จะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวยา Mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย H <sub>1</sub> -H <sub>10</sub> ของสารสกัดหยาบเฮกเซน				
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>
HT-29	91.90±5.19	95.16±2.71	94.46±2.06	95.16±2.96	97.94±0.13
MCF-7	93.32±4.49	94.81±4.49	93.57±1.12	94.69±1.40	97.12±1.82
P-388	89.35±2.38	89.45±3.10	95.13±1.70	92.55±1.79	94.61±1.19
Vero	54.69±22.47	78.53±17.22	84.35±12.00	79.38±7.65	87.61±7.29

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเฮกเซนจาก  
ใบประยงค์ (ต่อ)

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย H <sub>1</sub> -H <sub>10</sub> ของสารสกัดหยาบเฮกเซน				
	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>9</sub>	H <sub>10</sub>
HT-29	94.02±5.37	95.23±2.32	93.95±2.08	95.56±0.92	96.62±1.14
MCF-7	97.62±0.82	96.31±2.28	93.32±1.97	91.14±3.61	91.20±4.84
P-388	96.16±0.78	92.44±2.49	87.39±0.20	89.55±0.78	94.09±1.01
Vero	87.78±13.16	76.30±3.00	73.72±5.22	81.27±2.10	80.58±12.63

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเฮกเซน (H<sub>1</sub>-H<sub>10</sub>) พบว่าสารส่วนย่อยทั้งหมดมีผลต่อเซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และเซลล์ไลน์ Vero โดยสารส่วนย่อย H<sub>5</sub> มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละเปอร์เซ็นต์เหมือนเซลล์ไลน์นั้นตายอย่างสมบูรณ์ รองลงมาคือ สารส่วนย่อย H<sub>6</sub> และ H<sub>7</sub> จากผลการทดลองนี้จะทำการ

แยกสารส่วนย่อย  $H_6$  และ  $H_7$  สาเหตุที่เลือกสารส่วนย่อยทั้งสองนี้จะคำนึงถึงผลจากการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ ถึงแม้ว่า  $H_5$  จะมีฤทธิ์ที่ต่ำกว่าแต่จะมีปริมาณน้อยกว่ามากและความเป็นพิษของสารส่วนย่อย  $H_6$  และ  $H_7$  มีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ใกล้เคียงกับสารส่วนย่อย  $H_5$

#### 4.5 ผลการแยกสารส่วนย่อย $H_6$ และ $H_7$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อย  $H_6$  และ  $H_7$  ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์ มาจัดกลุ่มสารส่วนย่อยที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ เพื่อนำไปสู่การแยกสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น การดำเนินการจัดกลุ่มและแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ซึ่งวิธีการทดลองจะดำเนินการเช่นเดียวกับการแยกสารสกัดหยาบเฮกเซน ดังที่กล่าวแล้วในหัวข้อที่ 4.4 ผลการทดลองการแยกสารส่วนย่อย  $H_6$  น้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 2034.7 มิลลิกรัม พบจุดสารจุดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต 11 จุดเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ ทั้งหมด 10 ส่วนย่อย (ใช้รหัสคือ  $H_6F_0-H_6F_{10}$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย  $H_6$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

สารส่วนย่อย	ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิล แอซิเตท	ลักษณะของสารส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
$H_6F_0$	90 : 10	เป็นไขใสไม่มีสี	16.5	0.8
$H_6F_{1.1}$	86 : 14	เป็นไขใสไม่มีสี	35.2	1.7
$H_6F_{1.2}$	82 : 18	เป็นไขใสไม่มีสี	1239.0	60
$H_6F_2$	82 : 18	เป็นไขใสไม่มีสี	486.0	23
$H_6F_3$	82 : 18	ของเหลวหนืดสีเขียวปนกับของแข็งสีขาว	205.7	10
$H_6F_4$	82 : 18	ของเหลวหนืดสีเขียว	260.5	12
$H_6F_5$	80 : 20	ของเหลวหนืดสีเขียว	35.7	1.7
$H_6F_6$	78 : 22	เป็นไขใสไม่มีสี	114.5	5.6
$H_6F_7$	72 : 28	เป็นไขสีเขียว	22.5	1.1
$H_6F_8$	70 : 30	ของเหลวหนืดสีเขียวปนกับของแข็ง	6.7	0.3
$H_6F_9$	68 : 32	ของเหลวหนืดสีเขียว	6.8	0.3
$H_6F_{10}$	66 : 34	ของเหลวหนืดสีเขียว	161.3	7.9

ส่วนผลการทดลองการแยกสารส่วนย่อย  $H_7$  น้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 1654.8 มิลลิกรัม พบจุดสารจุดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต 7 จุด เมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย (ใช้รหัสคือ  $H_7F_1-H_7F_8$ ) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 สารส่วนย่อยจากส่วนย่อย  $H_6$  และ  $H_7$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซน จะถูกนำไปทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย  $H_7$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

สารส่วนย่อย	ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต	ลักษณะของสารส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
$H_7F_1$	96 : 4	ของเหลวหนืดสีเขียว	32.3	1.9
$H_7F_2$	96 : 4	ของแข็งสีขาว	8.9	0.5
$H_7F_3$	96 : 4	ของแข็งสีขาว	1765.6	106
$H_7F_4$	96 : 4	ผลึกสีเขียวอ่อน	25.2	1.5
$H_7F_5$	96 : 4	ผลึกสีขาวปนกับผลึกสีเขียว	14.3	0.8
$H_7F_6$	96 : 4	ของเหลวหนืดสีเขียวปนกับของแข็งสีขาว	19.9	1.2
$H_7F_7$	94 : 6	ของเหลวหนืดสีเขียวปนกับของแข็งสีขาว	542.9	32
$H_7F_8$	92 : 8	เป็นไขใสสีเขียว	320.7	19

#### 4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $H_6F_2$ - $H_6F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_6$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อย  $H_6F_2$ - $H_6F_8$  ของสารส่วนย่อย  $H_6$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซนมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero ในการทดลองนี้จะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวยา Mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $H_6F_2$ - $H_6F_8$  ของสารส่วนย่อย  $H_6$  ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย $H_6F_2$ - $H_6F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_6$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซน				
	$H_6F_2$	$H_6F_3$	$H_6F_4$	$H_6F_5$	$H_6F_6$
MCF-7	27.91±8.77	70.94±6.16	96.69±0.32	95.91±1.03	28.12±2.07
P-388	97.14±1.63	90.10±0.94	98.12±0.27	98.51±0.07	96.76±0.78
Vero	58.75±5.61	81.64±2.43	97.02±0.82	90.22±1.45	53.86±8.32

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $H_6F_2$ - $H_6F_6$  ของสารส่วนย่อย  $H_6$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซน พบว่าสารส่วนย่อยทั้งหมดมีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละเปอร์เซ็นต์เหมือนเซลล์ไลน์นั้นตายอย่างสมบูรณ์ จากการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปได้ว่า สารส่วนย่อย  $H_6$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซนมีผลต่อเซลล์ไลน์มากที่สุด โดยเมื่อนำมาแยกเป็นสารส่วนย่อย  $H_6F_2-H_6F_6$  เมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $H_6$  จะยังคงพบว่าสารส่วนย่อยทั้งหมดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ใกล้เคียงกับสารส่วนย่อย  $H_6$  แต่ถ้าคำนึงถึงการนำไปใช้ในลักษณะที่อยู่ในรูปสารส่วนย่อยหรือสารสกัดหยาบเฮกเซนนั้น พบว่ายังไม่เหมาะสมเนื่องจากสารส่วนย่อย  $H_6F_2-H_6F_6$  แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์โตจึงปกติคือเซลล์ Vero ได้เท่ากับเซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ P-388

#### 4.7 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย $H_7F_1-H_7F_8$ ของสารส่วนย่อย $H_7$ จากสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_8$  ของสารส่วนย่อย  $H_7$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซนมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero ในการทดลองนี้จะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวยา Mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ตารางที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_5$  ของสารส่วนย่อย  $H_7$  ของสารสกัดหยาบเฮกเซนจากใบประยงค์

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย $H_7F_1-H_7F_5$ ของสารส่วนย่อย $H_7$ ของสารสกัดหยาบเฮกเซน				
	$H_7F_1$	$H_7F_2$	$H_7F_3$	$H_7F_4$	$H_7F_5$
MCF-7	96.59±0.27	-10.66±1.52	82.11±2.58	7.75±4.68	77.56±3.68
P-388	97.23±1.38	65.77±9.74	94.15±3.07	59.02±2.90	94.07±1.19
Vero	97.02±0.55	23.10±5.90	90.46±2.27	17.86±3.61	15.71±0.25

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_5$  ของสารส่วนย่อย  $H_7$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซน พบว่าสารส่วนย่อย  $H_7F_1$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 96.59±0.27, 97.23±1.38 และ 97.02±0.55 เปอร์เซ็นต์ สารส่วนย่อย  $H_7F_2$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 65.77±9.74 และ 23.10±5.90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 สารส่วนย่อย  $H_7F_3$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 เซลล์ไลน์ P-388 และเซลล์ไลน์ Vero โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 82.11±2.58, 94.15±3.07 และ 90.46±2.27 เปอร์เซ็นต์ สารส่วนย่อย  $H_7F_4$  มีผลต่อ เซลล์ไลน์ P-388 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 59.02±2.90 เปอร์เซ็นต์ สารส่วนย่อย  $H_7F_5$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ P388 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 77.56±3.68 และ 94.07±1.19 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า สารส่วนย่อย  $H_7$  จากสารสกัดหยาบเฮกเซน มีผลต่อเซลล์ไลน์ใกล้เคียงกับสารส่วนย่อย  $H_6$  นั้นเมื่อนำมาแยกเป็นสารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_5$  และนำมาเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $H_7$  พบว่าสารส่วนย่อยทั้งหมดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $H_7$  โดยเฉพาะกับเซลล์ไลน์ MCF-7 จะเห็นว่าสารส่วนย่อย  $H_7F_4$  แสดงค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าการณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และรวมทั้งสารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_5$  ก็ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน คือมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $H_7$  ทำนองเดียวกับผลการทดลองของเซลล์ Ver0 สารส่วนย่อย  $H_7F_1-H_7F_5$  ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $H_7$  ส่วนเซลล์ไลน์ P-388 ที่มีค่าความเป็นพิษที่ยังคงค่อนข้างสูงอาจจะต้องพิจารณาถึงปัจจัยอื่น เช่น ธรรมชาติความอ่อนแอของเซลล์ไลน์เอง

#### 4.8 ผลการแยกสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

วิธีการทดลองจะดำเนินการตามหัวข้อที่ 4.4 โดยนำสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มาทำการทดสอบเพื่อหาระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) โดยเริ่มจากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 1:1 จากนั้นจึงค่อยเพิ่มหรือลดความเข้มข้นของตัวทำละลาย เมื่อทำการ develop แผ่น TLC แล้ว จะนำแผ่น TLC ไปผ่านแสงอัลตราไวโอเล็ตเพื่อดูการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ถ้าจุดใดมีการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เห็นเป็นจุดสีม่วง แสดงว่าสารสำคัญนั้นมีโครโมฟอร์ เช่น พันธะคู่ (double bond) หรือวงแอโรมาติก (aromatic ring)[27] ในที่นี้สารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ปรากฏจุดเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร จำนวน 7 จุด เมื่อนำแผ่น TLC ไปย้อมด้วยสารละลาย anisaldehyde reagent โดยการป้ายให้ทั่วทั้งแผ่น ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปให้ความร้อนบนแผ่นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จะปรากฏจุดสีซึ่งเป็นสีเฉพาะของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent ตัวอย่างของจุดสีที่ปรากฏบนแผ่น TLC ของสารสกัดเฮกเซนให้จุดสีเป็นสีม่วงกับ anisaldehyde reagent เหมือนกับสารสกัดหยาบเฮกเซนแต่มีจุดสีส้มเกิดปะปนซึ่งหมายถึงอาจมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ [28] ในสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต

เมื่อหาระบบด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต แล้วจะทำการแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวดูดซับคือ ซิลิกาเจลและใช้ตัวชะเป็นตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิล แอซิเตต ในอัตราส่วนต่างๆกัน เพิ่มความเข้มข้นของตัวชะโดยการเพิ่มเอทิล แอซิเตต น้ำหนักเริ่มต้นของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต เท่ากับ 25.41 กรัม สามารถแยกสารส่วนย่อยได้ทั้งหมด 11 ส่วน (ใช้รหัสคือ EA<sub>1</sub>-EA<sub>11</sub>) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 จากนั้นนำสารส่วนย่อยทั้งหมดมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป

ตารางที่ 4.10 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

สารส่วนย่อย	ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต	ลักษณะของสารส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
EA <sub>1</sub>	100 : 0	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	1138.9	4.4
EA <sub>2</sub>	60 : 40	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	1050.0	4.2
EA <sub>3</sub>	55 : 45	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	1782.1	7.0
EA <sub>4</sub>	50 : 50	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม	1918.7	7.5
EA <sub>5</sub>	45 : 55	ของเหลวหนืดสีเขียว	1530.1	6.0
EA <sub>6</sub>	40 : 60	ของเหลวหนืดสีเขียว	1328.0	5.2
EA <sub>7</sub>	40 : 60	ของเหลวหนืดสีเขียว	709.9	8.7
EA <sub>8</sub>	40 : 60	ของเหลวหนืดสีเขียว	1408.7	5.8
EA <sub>9</sub>	35 : 65	ของเหลวหนืดสีเขียว	5381.7	2.1
EA <sub>10</sub>	30 : 70	ของเหลวหนืดสีเขียวมีผลึก	4267.7	16.7
EA <sub>11</sub>	20 : 80	ของเหลวหนืดสีเขียว	4263.0	16.8

#### 4.9 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย EA<sub>1</sub>-EA<sub>11</sub> ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ทั้งหมดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบเฮกเซน เนื่องจากค่า CC<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ HepG-2 มีค่ามากที่สุดเท่ากับ 711.274±8.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงถึงการมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต ต่อเซลล์ไลน์ HepG-2 น้อยกว่าเซลล์ไลน์ชนิดอื่นจึงไม่นำมาทดสอบ การทดลองนี้จะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวยา Mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบ  
ประยงค์

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย EA <sub>1</sub> -EA <sub>11</sub> ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต					
	EA <sub>1</sub>	EA <sub>2</sub>	EA <sub>3</sub>	EA <sub>4</sub>	EA <sub>5</sub>	EA <sub>6</sub>
	HT-29	96.02±0.12	96.11±0.37	28.88±12.99	97.17±0.25	23.23±4.99
MCF-7	97.57±1.58	97.57±1.36	96.43±0.42	96.92±0.11	61.05±1.05	79.91±5.47
P-388	96.15±0.55	96.85±0.11	98.66	97.48±0.22	97.95±0.33	95.52±0.99
Vero	93.44±2.84	94.64±2.03	72.95±10.03	92.90±0.19	36.54±0.57	59.83±0.37

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบ  
ประยงค์ (ต่อ)

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย EA <sub>1</sub> -EA <sub>11</sub> ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต				
	EA <sub>7</sub>	EA <sub>8</sub>	EA <sub>9</sub>	EA <sub>10</sub>	EA <sub>11</sub>
	HT-29	54.24±2.62	93.02±0.49	21.02±5.49	32.15±0.24
MCF-7	89.55±4.53	96.19±1.53	60.56±10.11	91.65±2.23	82.34±4.30
P-388	95.83±0.66	96.38±2.99	97.25±1.22	97.25±0.11	98.42±1.55
Vero	87.14±3.59	90.22±0.75	37.48±2.46	29.04±0.75	28.38±1.70

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อยจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต (EA<sub>1</sub>-EA<sub>10</sub>) พบว่าสารส่วนย่อย EA<sub>1</sub>, EA<sub>2</sub>, EA<sub>4</sub> และ EA<sub>8</sub> มีผลต่อเซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และ เซลล์ไลน์ Vero มีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แต่สารส่วนย่อย EA<sub>3</sub>, EA<sub>5</sub>, EA<sub>9</sub>, EA<sub>10</sub> และ EA<sub>11</sub> ไม่มีผลต่อเซลล์ HT-29 และ สารส่วนย่อย EA<sub>9</sub>, EA<sub>10</sub> และ EA<sub>11</sub> ไม่มีผลต่อเซลล์ Vero จากผลการทดลองนี้การศึกษาในขั้นตอนต่อไปจะดำเนินการแยกสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> สาเหตุที่เลือกสารส่วนย่อยนี้จะคำนึงถึงผลจากการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ที่มีค่าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และเซลล์ P-388 ในระดับที่ดีและมีปริมาณมากกว่าสารสกัดส่วนย่อยส่วนอื่นๆ

#### 4.10 ผลการแยกสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต จากใบประยงค์มาจัดกลุ่มสารส่วนย่อยที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์เพื่อนำไปสู่การทำสารออกฤทธิ์ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น การดำเนินการจัดกลุ่มและแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นจะใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี ซึ่งวิธีการทดลองจะดำเนินการเช่นเดียวกับการแยกสารสกัดหยาบเฮกเซน ดังที่กล่าวแล้วในหัวข้อที่ 4.4 ผลการทดลองการแยกสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> น้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 4267.0 มิลลิกรัม พบจุดสารจุดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต 2 จุด ลากเอกสาร์นี้เป็นเอกสาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นทางยาว (Tailing) ซึ่งแสดงถึงความมีขั้วสูงของสารที่เป็นองค์ประกอบเมื่อทำปฏิกิริยากับ anisaldehyde reagent และสามารถแยกสารส่วนย่อยได้ ทั้งหมด 9 ส่วนย่อย (ใช้รหัสคือ EA<sub>11</sub>F<sub>0</sub>-EA<sub>11</sub>F<sub>8</sub>) ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 แสดงระบบตัวทำละลาย ลักษณะ และจำนวนสารส่วนย่อยจากสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

สารส่วนย่อย	ระบบตัวทำละลาย เฮกเซน : เอทิล แอซิเตต	ลักษณะของสารส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ผลได้เป็นร้อยละ
EA <sub>11</sub> F <sub>0</sub>	85 : 15	เป็นไขไม่มีสี	42.4	0.9
EA <sub>11</sub> F <sub>1</sub>	30 : 70	ของเหลวหนืดสีเขียว	28.2	0.6
EA <sub>11</sub> F <sub>2</sub>	30 : 70	ของเหลวหนืดสีเขียว	59.5	1.3
EA <sub>11</sub> F <sub>3</sub>	30 : 70	ของเหลวหนืดสีเขียว	95.2	2.2
EA <sub>11</sub> F <sub>4</sub>	30 : 70	ของเหลวหนืดสีเขียว	79.1	1.8
EA <sub>11</sub> F <sub>5</sub>	25 : 75	ของเหลวหนืดสีเขียว	41.1	0.9
EA <sub>11</sub> F <sub>6</sub>	20 : 80	ของเหลวหนืดสีเขียว	34.4	0.8
EA <sub>11</sub> F <sub>7</sub>	15 : 85	ของเหลวหนืดสีเขียว	16.6	0.3
EA <sub>11</sub> F <sub>8</sub>	10 : 90	ของเหลวหนืดสีเขียว	23.2	0.5

#### 4.11 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub>F<sub>1</sub>-EA<sub>11</sub>F<sub>4</sub> ของสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตจากใบประยงค์

นำสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub>F<sub>1</sub>-EA<sub>11</sub>F<sub>4</sub> ของสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และเซลล์ไลน์ Vero ในการทดลองนี้จะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ตัวยา Mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมเชิงบวกและใช้สารละลาย DMSO 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวควบคุมเชิงลบ

ตารางที่ 4.13 เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ - $E_{11}F_4$  ของสารส่วนย่อย  $EA_{11}$  ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตดจากใบประยงค์

เซลล์ไลน์	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ (เปอร์เซ็นต์) ของสารส่วนย่อย $EA_{11}F_1$ - $E_{11}F_4$ ของสารส่วนย่อย $EA_{11}$ ของสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตด			
	$EA_{11}F_1$	$EA_{11}F_2$	$EA_{11}F_3$	$EA_{11}F_4$
	MCF-7	86.73±5.20	90.61±5.68	82.50±2.40
P-388	85.49±2.40	89.71±0.85	81.43±2.78	81.94±7.32
Vero	51.60±6.30	46.59±3.12	34.97±6.30	43.97±10.02

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ - $EA_{11}F_4$  ของสารส่วนย่อย  $EA_{11}$  จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตด พบว่าสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ - $EA_{11}F_4$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ MCF-7 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 86.73±5.20, 90.61±5.68, 82.50±2.40 และ 82.88±5.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า เมื่อนำสารส่วนย่อย  $EA_{11}$  จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตด เมื่อนำมาแยกเป็นสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ - $EA_{11}F_4$  พบว่าสารส่วนย่อยทั้งหมดแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $EA_{11}$  โดยเฉพาะกับเซลล์ไลน์ MCF-7 จะเห็นว่าสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_3$  แสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และรวมทั้งสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ ,  $EA_{11}F_2$  และ  $E_{11}F_4$  ก็ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันคือ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $EA_{11}$  ยกเว้นสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_1$ - $EA_{11}F_4$  มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ P-388 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารส่วนย่อย  $EA_{11}$

#### 4.12 ผลของระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อย $H_6F_4$ , $H_7F_5$ และ $EA_{11}F_3$ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

การคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ ( $CC_{50}$ ) ทำโดยการนำสารส่วนย่อยที่มีผลต่อเซลล์มากที่สุด ซึ่งในที่นี้ได้เลือกสารส่วนย่อย  $H_6F_4$ ,  $H_7F_5$  และ  $EA_{11}F_3$  และเลือกใช้เซลล์ไลน์ที่สารส่วนย่อยทั้งหมดมีผลคือ เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ P-388 และเซลล์ไลน์ Vero จากนั้นทำการทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ที่ระดับความเข้มข้น 150, 125, 100, 75, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำข้อมูลมาพลอตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์กับความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ แล้วนำมาหาค่าความชันของกราฟ จากผลการทดลองเมื่อคำนวณค่า  $CC_{50}$  พบว่าสารส่วนย่อย  $H_6F_4$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 มากที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ HT-29 และเซลล์ไลน์ Vero มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 29.17±2.61, 67.09±8.91, และ 114.70±24.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารส่วนย่อย  $H_7F_5$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 มากที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเซลล์ไลน์ MCF-7 และเซลล์ไลน์ HT-29 มีค่า  $CC_{50}$  เท่ากับ 56.42±3.05, และ 146.36±9.43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารส่วนย่อย  $EA_{11}F_3$  มีผลต่อเซลล์ไลน์ P-388 มากที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงระดับความเข้มข้นของสารส่วนย่อย  $H_6F_4$ ,  $H_7F_5$  และ  $EA_{11}F_3$  ในแต่ละสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์

เซลล์ไลน์	ความเข้มข้นของสารส่วนย่อยที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	$H_6F_4$	$H_7F_5$	$EA_{11}F_3$
HT-29	67.09±8.91	146.36±9.43	-
MCF-7	29.17±2.61	56.42±3.05	-
P-388	<25	<25	<25
Vero	114.70±24.60	-	-

หมายเหตุ <25 หมายถึง ความเข้มข้นของสารส่วนย่อยมีค่าน้อยกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

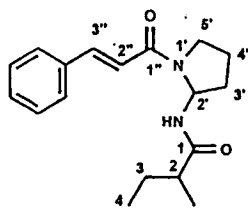
#### 4.13 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้นเอทิล แอซิเตต

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์คือ ordorine 68 โดยทำการทดสอบเฉพาะสารที่เป็นสารหลักที่แยกออกมาได้ในปริมาณที่มากโดยเลือกจากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต (น้ำหนักสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต เท่ากับ 139.95 กรัม แยก ordorine 68 ได้น้ำหนักเท่ากับ 1.82 กรัม) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อน ตรวจสอบด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลายเฮกเซน : เอทิล แอซิเตต อัตราส่วนเท่ากับ 4 : 6 มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.46 และเมื่อทำการตรวจสอบโครงสร้างของ ordorine 68 ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์พบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Shienghong และคณะ[10] ดังแสดงในตารางที่ 4.15

#### 4.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ของ Ordorine 68

ทดสอบความเป็นพิษของ ordorine 68 ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักชนิด HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (Human breast carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งตับชนิด HepG-2 (Human hepatocellular carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเยื่อช่องปากและกระพุ้งแก้มชนิด KB (Oral human epidermal carcinoma cell line) เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในหนูชนิด P-388 (Murine leukemia cell line) และเซลล์ไตลิงปกติชนิด Vero (African green monkey kidney) โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบกับ ordorine 68 ที่ละลายด้วยตัวทำละลาย DMSO และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ตัวทำละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO และตัวยามาตรฐาน Vinblastine sulfate salt เป็นชุดควบคุม จากการทดสอบความเป็นพิษของ ordorine 68 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากตารางที่ 4.15 พบว่า ordorine 68 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิด ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีผลต่อเซลล์ไลน์ HT-29, KB, MCF-7, HepG-2 และ Vero โดยแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เท่ากับ 41.07, 25.38, 41.11, 40.54, 33.67 และ 38.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 โครงสร้างของ odorine 68

ตารางที่ 4.15 แสดงค่า Chemical shift ( $\delta$  (ppm),  $\text{CDCl}_3$ ) ของ odorine 68

ตำแหน่ง	ค่า $\delta$ ที่ได้จากรายงาน[10]		ค่า $\delta$ ที่ได้จากการทดลอง	
	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1		175.9		175.4
2, 3', 4'	1.60-2.20 (m)		1.61-2.22 (m)	
2-CH <sub>3</sub>	1.05 (d, $J = 6$ Hz)	17.4, 21.8, 27.1,	1.14 (d, $J = 6.8$ Hz)	17.3, 21.7, 27.1,
3	1.40 (m, $J = 6$ Hz)	34.6, 43.3	1.39 (m, $J = 7.1$ Hz)	34.6, 43.2
4	0.70 (t, $J = 6$ Hz)	11.8	0.78 (t, $J = 7.4$ Hz)	11.8
NH, 2'	5.80 (m)	62.8	6.17 (m)	62.6
5'	3.00-3.80 (m)	46.1	3.50-3.72 (m)	46.1
1''		166.2		165.8
2''	6.60 (d, $J = 15$ Hz)	143.0	6.96 (d, $J = 15.4$ )	142.9
3''	7.30 (d, $J = 15$ Hz)	118.2	7.68 (d, $J = 15.4$ )	118.1
aromatic	6.80-7.20 (m)	135.4, 128.8 (o-), 128.2 (m-), 129.8 (p-)	7.34-7.53 (m)	134.9, 128.8 (o-), 128.3(m-), 129.8 (p-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

ทำการสกัดจากใบประยงค์ด้วยวิธีการหมัก (maceration) โดยใช้ใบประยงค์แห้งบดละเอียดน้ำหนักเท่ากับ 1.00 กิโลกรัม หลังการสกัดได้สารสกัดหยาบเมทานอลของใบประยงค์ (242.23 กรัม) และร้อยละผลผลิตคิดเป็น 24.22 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของใบประยงค์แห้ง แล้วนำสารสกัดหยาบเมทานอลน้ำหนัก 221.08 กรัม มาสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Solvent Partitioning Extraction) ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เฮกเซน, เอทิล แอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ ได้น้ำหนักเท่ากับ 21.28, 30.37 และ 17.92 กรัม ตามลำดับ และผลได้เป็นร้อยละคิดเป็น 9.63, 13.73 และ 8.11 ตามลำดับ จากผลได้ร้อยละทั้ง 3 ตัวทำละลายได้ปริมาณสารสกัดจากใบประยงค์น้อยกว่าร้อยละ 50

เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบ เอทิล แอซิเตต สารสกัดหยาบบิวทานอล และสารสกัดหยาบเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตตมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบได้แก่ เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ HepG-2, เซลล์ไลน์ KB, เซลล์ไลน์ P-388 และเซลล์ไลน์ Vero โดยในที่นี้สารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีผลต่อเซลล์ไลน์ Hep-G2 น้อยที่สุด ซึ่งการศึกษาผลของสารสกัดต่อความเป็นพิษของเซลล์สอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ T. Santisuk และคณะ[21] ได้ศึกษาสารสกัดจากลำต้นและผลของ *A. elliptica* และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ KB พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์ไลน์ KB

เมื่อนำสารสกัดหยาบเฮกเซนและสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มาแยกเป็นสารส่วนย่อยและทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารส่วนย่อย H<sub>1</sub>-H<sub>10</sub> จากสารสกัดหยาบเฮกเซน มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ดี ส่วนสารส่วนย่อย EA<sub>1</sub>-EA<sub>11</sub> จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ดี แต่มีแนวโน้มต่ำกว่าสารส่วนย่อย H<sub>1</sub>-H<sub>10</sub> ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ D. Harneti และคณะ[22] ได้ศึกษาสารสกัดเปลือกประยงค์ *A. Smithii* (Meliaceae) ทดสอบฤทธิ์การต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (P-388 murine leukemia cell) พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาวหนู

และเมื่อนำสารส่วนย่อย H<sub>6</sub> และ H<sub>7</sub> จากสารสกัดหยาบเฮกเซน และสารส่วนย่อย EA<sub>11</sub> จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต มาแยกสารส่วนย่อยด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี สามารถจัดกลุ่มสารออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีที่สุด 3 ส่วนย่อย ได้แก่ สารส่วนย่อย H<sub>6</sub>F<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>F<sub>5</sub> และ EA<sub>11</sub>F<sub>3</sub> เมื่อนำสารส่วนย่อยทั้งสามมาทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อคำนวณค่า CC<sub>50</sub> พบว่าสารส่วนย่อย H<sub>6</sub>F<sub>4</sub> และ H<sub>7</sub>F<sub>5</sub> มีฤทธิ์การต้านเซลล์ MCF-7 ได้ในระดับที่ดี โดยมีค่า CC<sub>50</sub> เท่ากับ 29.17±2.61 และ 56.42±3.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่าสารส่วนย่อยทั้งสามยังมีผลต่อเซลล์ P-388 ที่ระดับความเข้มข้นน้อยกว่า 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลจากการทดลองเบื้องต้นนี้ทำให้ทราบว่าใบประยงค์มีสารสำคัญที่มีศักยภาพในการนำไปเป็นต้นแบบในการทำเป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ แต่ในการนำไปใช้ต้องมีข้อควรระวังคือ สารออกฤทธิ์ในใบประยงค์นั้นมีผลความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ค่อนข้างสูง ซึ่งการศึกษาในขั้นตอนต่อไปนั้นควรแยกสารสำคัญในรูปสารบริสุทธิ์แล้วนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ของสารเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับสารออกฤทธิ์เมื่ออยู่ในรูปของสารสกัดและการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ด้วยวิธี

MTT assay เป็นวิธีการทดสอบแบบหยาบ ซึ่งควรทำการทดสอบซ้ำหลายๆครั้ง และใช้วิธีการทดสอบแบบละเอียด เช่น วิธี Flow cytometry ร่วมด้วย

และเมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทิล แอซิเตต, ordorine 68 มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 6 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ เซลล์ไลน์ HT-29, เซลล์ไลน์ MCF-7, เซลล์ไลน์ HepG-2, เซลล์ไลน์ KB, เซลล์ไลน์ P-388, และเซลล์ไลน์ Vero แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ต่ำกว่าร้อยละ 50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6 สรุปผลงานวิจัย

สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

งานวิจัยเรื่องการประเมินฤทธิ์ต้านมะเร็งจากใบประยงค์ สามารถผลิตนักวิจัย ระดับปริญญาตรี  
วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมีอุตสาหกรรม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2557  
จำนวน 3 คน ได้แก่

1. นางสาวกัญญนันท์ จันทร์จันทร์
2. นายจิระศักดิ์ ศรีจันทร์
3. นางสาวจิราภรณ์ อินสว่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- [1] สมสุข มัจฉาชีพ. 2542. พืชสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : รุ่งเรืองศิลป์การพิมพ์.
- [2] นิจศิริ เรืองรังษี และรัชชัย มังคละคุปต์. 2547. สมุนไพรไทย 1. กรุงเทพฯ : ฐานการพิมพ์.
- [3] อารณ วีรสาร. 2507. "The Active Principles in *Aglaia odorata*." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [4] อุดม ก๊กผล. 2512. "การหาสูตรโครงสร้างของไดโอลและไฮดรอกซีคีโตนจากต้นประยงค์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [5] พิพัฒน์ การเที่ยง. 2516. "สูตรโครงสร้างของสารเตตระไฮคลิกเทอร์พีนที่มีอยู่ในใบประยงค์บ้าน." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [6] อารณ อึ้งภากรณ์. 2517. "การแยกสารและการหาสูตรโครงสร้างของสารประกอบไนโตรเจนจากใบประยงค์" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [7] Shienghong, D. Kokpol, U. Karntiang, P. and Massy-Westropp, R.A. 1974. "Triterpenoid constituents of Thai medicinal plants. II. Isomeric aglatriola and aglaidiol." *Tetrahedron*. Vol. 30 : 2211-2215.
- [8] Boar, R.B. and Damps K. 1977. "Triterpenoids of *Aglaia odorata* configuration of trisubstituted epoxides." *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*. 510-512.
- [9] เทพ เชียงทอง, พิพัฒน์ การเที่ยง, สุภา เทพยปฏิพัทธ์ และโสภณ เรืองสำราญ. 2522. "A Flavonoid Isolated from *Aglaia odorata* Lour." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [10] Shienghong, D. Ungphakorn, A. Lewis D.E. and Massy-Westropp, R.A. 1979. "Constituents of Thai medicinal plants-IV new nitrogenous compounds-odorine and odorinal." *Tetrahedron Letters*. Vol. 24:2247-2250.
- [11] Kokpol, U. Venaskulchai, B. Simpson J. and Weavers, R.T. 1994. "Isolation and X-ray structure determination of novel pyrimidinone of *Aglaia odorata*." *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*. Vol. 6 : 773-774.
- [12] Hayashi, N. Lee, K.H. Hall, I.H. Mcphail, A.T. and Huang H.C. 1982. "Structure and stereochemistry of (-)-odorinol, an antileukemic diamide from *Aglaia odorata*." *Phytochemistry*. Vol. 21(9) : 2371-2373.
- [13] Tan, G.T. Pezzuto, J.M. Kinghorn, A.D. and Hughes, S.H. 1991. "Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase." *Journal of Natural Products*. Vol. 54(1) : 143-154.
- [14] Janprasert, J. Satasook, C. Sukumalanand, P. Champagne, D.E. Isman, M.B. Wiriyachitra P. and Towers G.H.N. 1993. "Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaia odorata*." *Phytochemistry*. Vol. 32(1) : 67-69.
- [15] Ishibashi, F. Satasook, C. Isman, M.B. and Towers, G.H.N. 1993. "Insecticidal 1H-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- cyclopentafetrahydro[b]benzofurans from *Aglaia odorata*." *Phytochemistry*. Vol. 32(2) : 307-310.
- [16] Saifah, E. Puripattanavong, J. Likhitwitayawuid, K. Cordell, G.A. Chai, H. and Pezzuto, J.M. 1993. "Bisamide from *Aglaia* species : Structure analysis and Potential to reverse drug resistance with cultured cells." *Journal of Natural Products*. Vol. 56(4):473-477.
- [17] ยิ่งยง เมฆลอย. 2546. "การเปรียบเทียบผลทางอัลลีโลพาทีของสารสกัดด้วยน้ำจากใบพืชวงศ์ Meliaceae จำนวน 10 ชนิด." ปัญหาพิเศษปริญญาโท สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [18] บุญรอด ชาตียนานท์. 2544. "ผลของสารสกัดจากใบประยงค์ต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชบางชนิด." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชสวน บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [19] รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- [20] สุภรณ์ พงศกร. 2531. ยาต้านมะเร็ง. การใช้ยาในโรคติดเชื้อไวรัสและโรคมะเร็ง. กรุงเทพฯ: อักษรบัณฑิต
- [21] Santisuk, T. Cui, B. Chai, H. Reutrakul, V. Farnsworth, N.R. Cordell, G.A. Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D. 1997. "Novel Cytotoxic 1H-Cyclopenta[6]benzofuran Lignans from *Aglaia elliptica*." *Phytochemistry*. Vol. 53, No. 52:17625-17632.
- [22] Harneti, D. Supriadin, A. Ulfah, M. Safari, A. Supratman, U. Awang K. and Hayashi, H. 2014. "Cytotoxic constituents from the bark of *Aglaia eximia* (Meliaceae)." *Phytochemistry Letters*. 9:234-239.
- [23] Liu, S. Wang, H. Zuo, W.J. Zhao, Y.X. Li, X.N. Mei, W.L. and Dai, H.F. 2013. "Two new rocaglamide derivatives from twigs of *Aglaia odorata* var. *microphyllina*." *Fitoterapia*. 92:93-99.
- [24] Zhang, H. Xu, H.H. Song, Z.J. Chen, L.Y. and Wen, H.J. 2012. "Molluscicidal activity of *Aglaia duperreana* and the constituents of its twigs and leaves." *Fitoterapia*. 83:1081-1086.
- [25] Greger H., Pacher T., Brem B., Bacher M. and Hofer O. 2001. "Insecticidal flavaglines and other compounds from Fijian *Aglaia* species." *Phytochemistry*. 57:57-64.
- [26] อุ่นเรือน เพชรวัลย์ และ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม. 2555. "การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์." สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- [27] คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [online].  
Available : [www.chemistry.sc.chula.ac.th/course\\_info/2302275/chapter9.pdf](http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/course_info/2302275/chapter9.pdf)
- [28] บุปผาชาติ พดด้วง, ธัญวรรณ์ กางสงคราม, มณีรัตน์ มีพลอย และ พงศธร หลิมศิริวงษ์. 2546. "การวิจัยข้าวทกลมดง (1): การวิเคราะห์หากลุ่มสารหลัก." *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)*. 18, 4:81-86.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้วิจัย

## หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวพัชนี เจริญยิ่ง
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สังกัด	สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สาขา	สถานศึกษา
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ปริญญาโท	เคมีอินทรีย์	มหาวิทยาลัยมหิดล
ปริญญาเอก	เคมี (เคมีอินทรีย์)	University of York
สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ	เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ และสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	
Honors and Awards	Cerebos Award year 2003	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้