รายงานผลการดำเนินงาน
ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง
สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นเข็มพระราม

ผู้รับผิดชอบโครงการ

รองศาสตราจารย์ ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

"สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นเข็มพระราม"

Anticancer compounds with topoisomerase I inhibitory activity from *Chassalia curviflora* stems

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง อารีรัตน์ ลออปักษา
รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.รุทธ์ สุทธิศรี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ตลอดจนภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

เข็มพระราม จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae ซึ่งขึ้นในพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ต้นเข็มพระรามได้ถูกนำมาศึกษาและพบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเททมีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอชนิด supercoil ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จะส่งผลรบกวนกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาพัฒนาเพื่อค้นหายารักษาโรคมะเร็งได้ คณะผู้ดำเนินการวิจัยได้แยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นเข็มพระรามด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี แล้วทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ด้วยวิธี Yeast cell-based assay ซึ่งใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ RS190 ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมโดยการแทนที่ยีนเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของยีสต์ด้วยยีนจากพืช *Arabidopsis thaliana* ผลการวิจัยสามารถแยกสารบริสุทธิ์ในกลุ่มไทรเทอปีน คือสารบีทูลิน จากต้นเข็มพระรามได้เป็นครั้งแรก อย่างไรก็ตามสารบีทูลินที่สกัดแยกได้ไม่มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187, MCF7 และ KB และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ซึ่งควรจะสกัดแยกหาสารชนิดอื่นต่ออีก

คำสำคัญ: เข็มพระราม, วงศ์ Rubiaceae, ต้านมะเร็ง, โทโพไอซอเมอเรส I

Abstract

Chassalia curviflora Wall. is in the Rubiaceae family. It was collected from Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Siridhorn, Samaesarn Island, Chonburi Province. Ethyl acetate extract of *Chaetocarpus castanocarpus* stem exhibited anticancer with topoisomerase inhibitory activity. Topoisomerase I used for relaxing supercoiled DNA in the DNA replication step. Bioassay-guided fractionation with yeast cell-based assay has been used for isolation of bioactive compounds. *Saccharomyces cerevisiae* RS190 inserted with topoisomerase I from *Arabidopsis thaliana* was used for yeast screening. A triterpenoid compound, betulin, was isolated from stem of *C. curviflora* for the first time. However, betulin failed to show cytotoxicity against three cancer cell lines, NCI-H187, MCF7, and KB. Extraction and isolation for other compounds from *C. curviflora* stem should be further performed.

Keywords: *Chaetocarpus castanocarpus*, Euphorbiaceae, anticancer, topoisomerase I

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการศึกษา	5
- การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากต้นเข็มพระราม	5
- การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	9
สรุปและวิจารณ์ผล	12
เอกสารอ้างอิง	13
ประวัติผู้วิจัย	15

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ค่า 13C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้เทียบกับสาร betulin (in CDCl3)	8
ตารางที่ 2	ผลการทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ของ betulin ด้วยวิธี resazurin microplate assay	9
ตารางที่ 3	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของ 1% DMSO และ camptothecin ซึ่งใช้เป็น vehicle control และ positive control ตามลำดับ	11
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของ betulin	12

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะการ spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	4
ภาพที่ 2	การเตรียมสารสกัดหยาบต้นเข็มพระรามด้วยตัวทำละลาย	5
ภาพที่ 3	TLC สารสกัดหยาบด้วย hexane (H) สารสกัดหยาบด้วย EtOAc (E) และสารสกัดหยาบด้วย MeOH (M) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ hexane:acetone (4:1) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) ซึ่งตรวจสอบโดย UV 254 nm (a), UV 365 nm (b) และ anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent และให้ความร้อน 110 °C เป็นเวลา10 นาที (c)	6
ภาพที่ 4	แผนภูมิแสดงการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ EtOAc ด้วยวิธี column chromatography	7
ภาพที่ 5	โครงสร้างทางเคมีของ betulin	9

สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นเข็มพระราม

Anticancer compounds with topoisomerase I inhibitory activity from *Chassalia curviflora* stems

สุชาดา สุขหร่อง อารีรัตน์ ลออปักษา รุทธ์ สุทธิศรี
Suchada Sukrong, Areerat Laorpaksa, Ruth Sutthisri

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลกระทรวงสาธารณสุขพบว่าคนไทยมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับหนึ่ง และมีแนวโน้มว่าจะมีผู้ป่วยเพิ่มขึ้น โรคมะเร็งจัดเป็นโรคค่าใช้จ่ายสูงและโรคเรื้อรัง อีกทั้งยังเป็นกลุ่มโรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิตจากการเจ็บป่วย ส่งผลไปถึงทำให้เพิ่มรายจ่ายด้านสุขภาพของครัวเรือน สังคม ตลอดจนเป็นภาระค่าใช้จ่ายโดยรวมของประเทศ ถ้าสามารถศึกษาเพื่อค้นพบยาหรือสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าวก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยเป็นอย่างมาก

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นเซลล์มะเร็งย่อมมีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) สูงตามไปด้วย ซึ่งขั้นตอนของการจำลองตัวที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งขั้นตอนหนึ่ง คือ การคลายเกลียวของดีเอ็นเอซนิด supercoil (supercoiled DNA relaxation) โดยเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ คือ เอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (topoisomerase I) ซึ่งจะทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยกด้วยการทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับไฮโดรเจนของสายดีเอ็นเอ ดังนั้นเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัด เนื่องจากหากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว เซลล์ก็จะไม่สามารถแบ่งตัวได้ เซลล์มะเร็งซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวสูงก็จะได้รับผลกระทบมากกว่าเซลล์ปกติ ในปัจจุบันมีการใช้ยารักษาโรคมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยังเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว ได้แก่ camptothecin และ อนุพันธ์ของ camptothecin คือ Irinotecan® และ Topotecan® ในการรักษาโรคมะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ และมะเร็งปากมดลูก

จากการคัดกรองฤทธิ์ต้านมะเร็งของสมุนไพรที่ขึ้นในบริเวณพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯเกาะแสมสาร พบว่าส่วนต้นของเข็มพระรามแสดงฤทธิ์ดังกล่าว จึงน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อ

เข็มพระราม (*Chassalia curviflora* Wall.) จัดอยู่ในวงศ์ Rubiaceae (เต็ม สมิตินันทน์, 2544) เป็นไม้พุ่ม ไม่ค่อยแตกกิ่งก้าน ใบออกตรงข้าม มีก้านใบ เนื้อใบบางคล้ายเยื่อหรือคล้ายกระดาษ ช่อดอกออกที่ปลายยอด มีหลายช่อกระจุก ดอกมีส่วนต่างๆอย่างละ 4-5 เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงปลายเป็นพูเล็ก กลีบดอกสีขาวหรือมีแต้มสีชมพูหรือสีม่วงอ่อน คอดอกมักมีสีเหลือง โค้งเล็กน้อย โคนเป็นท่อปากแตร ผลมีกลีบเลี้ยงติดแน่นเป็นวงรอบที่ปลาย เป็นผลแบบมีเนื้อสีดำ เมล็ดแข็ง 2 เมล็ด

ปัจจุบันยังมีรายงานการใช้เข็มพระรามเป็นสมุนไพรพื้นบ้านโดยใช้รากต้มหรือตำผสมสุรา แก้พิษเบื่อเมา ดับพิษ ขับลม แก้จุกเสียดแน่น ใบใช้ตำถูนวดแก้ฟกช้ำ รักษาอาการแขนขาเคล็ด และมีรายงานวิจัยพบว่า สารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Proteus vulgaris* สารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi* (Raja *et al.*, 2011)

เข็มพระรามเป็นพืชที่ขึ้นในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร ซึ่งยังมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก มีเพียงรายงานฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบเฮกเซนและเมทานอล แต่ยังไม่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากต้นเข็มพระราม รวมถึงยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์หรือฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชชนิดนี้มาก่อน ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาศักยภาพในการต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นเข็มพระราม พืชที่ขึ้นในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร และทำการสกัดแยกสารเพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมี เพื่อค้นหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I นั้น มีรายงานการใช้ยีสต์เป็นตัวทดสอบการใช้ยีสต์เป็นตัวทดสอบจัดเป็น cell-based assay วิธีหนึ่ง และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี (Sangmalee *et al.*, 2012) โดยใช้สารมาตรฐาน camptothecin เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) เนื่องจากสาร camptothecin เป็นสารที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (Bjornsti, 1991; Hsiang *et al.*, 1995; Sirikantaramas *et al.*, 2008; Reid *et al*, 1998) เหตุที่ใช้ยีสต์เพราะยีสต์เป็น eukaryote เช่นเดียวกับมนุษย์ ทำให้การแปลผลข้อมูลเพื่อการนำไปใช้ทางการแพทย์สำหรับมนุษย์มีความเป็นไปได้สูงกว่า

ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ใช้ในการทดสอบเป็นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้วเป็นยีสต์ที่ถูกตัดยีนโทโพไอซอเมอเรส I ของตัวเองออกแล้วถูกแทนที่ด้วยยีนโทโพไอซอเมอเรส I ของพืช *Arabidosis thaliana* ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนโทโพไอซอเมอเรส I ให้มากขึ้นได้ (โดยใช้ galactose-induced system) ทำให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้มากขึ้นจนสามารถใช้ในการคัดกรองได้ เหตุที่เลือกใช้ *A. thaliana* เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ของพืชดังกล่าวตอบสนองได้ดี (sensitive) ต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (Sirikantaramas *et al.*, 2008) ผลการทดลองจะวัดจากการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ถูกนำมาเลี้ยงร่วมกับสารที่แยกได้จากต้นเข็มพระรามที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งหากสารที่เรานำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ ยีสต์ก็จะไม่เจริญเติบโตหรือเติบโตน้อยกว่าตัวควบคุม แต่หากสารที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวยีสต์ก็จะเจริญเติบโตได้ตามปกติ

ข้อมูลสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่แยกได้จากต้นเข็มพระรามจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของพืชไทยในการใช้ประโยชน์ทางยาต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทางยาจากต้นเข็มพระราม สกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญจากต้นเข็มพระรามที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารที่แยกได้จากต้นเข็มพระรามเพื่อใช้ประโยชน์ทางยาและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้สนใจจะทำการวิจัยต่อ นอกจากนี้โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของต้นเข็มพระรามอาจใช้เป็น lead compound ในการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่

วิธีดำเนินการวิจัย

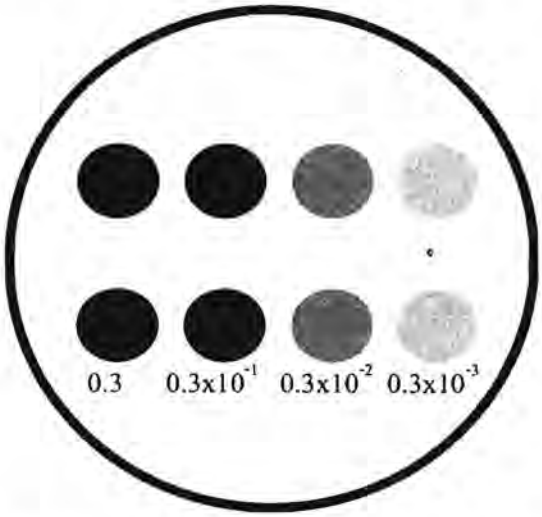
1. เก็บตัวอย่างต้นเข็มพระรามจากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์
2. เตรียมตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimen) เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. อบแห้งที่อุณหภูมิราว 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วลดขนาด
4. เตรียมสารสกัดหยาบจากต้นเข็มพระราม โดยแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย เริ่มจาก hexane ซึ่งมีความมีขั้วต่ำสุด ตามด้วย ethyl acetate (EtOAc) และ methanol (MeOH) ตามลำดับ โดยสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้งๆ ละประมาณ 3 ลิตร
5. สารสกัดหยาบที่ได้จากการแช่หมักในตัวทำละลายแต่ละครั้งถูกนำมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นภายใต้ความดันต่ำ
6. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของสารสกัดทั้งสามส่วน เลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการศึกษาต่อ
7. ศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นด้วยวิธี thin layer chromatography พร้อมกับพัฒนาระบบตัวทำละลายเพื่อทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของต้นเข็มพระรามที่ถูกสกัดออกมาในสารสกัด EtOAC
8. สกัดแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography
9. พิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทาง spectroscopy เช่น UV, IR, NMR, MS
10. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I โดยใช้เซลล์ยีสต์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จะทำการทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ RS190 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส ยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C โดยที่ก่อนนำยีสต์มาใช้ทดสอบจะต้องทำการ subculture ยีสต์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลักษณะเอียงเป็นแนวลาด (slant agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

<u>ขั้นตอนการเตรียมยีสต์มาใช้ในการทดสอบ</u>

1) subculture จาก slant agar ที่เก็บไว้ในตู้เย็น ลงบน slant agar อันใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2) subculture ยีสต์จาก slant agar ลงใส่ลงในอาหารเหลว (broth) จากนั้นนำไปเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3) ตรวจดูความสมบูรณ์ของยีสต์ โดยย้อมสียีสต์ด้วย nigrosin แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า
4) วัด OD ของ broth ที่มียีสต์ ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.3
5) เจือจางความเข้มข้นยีสต์ลง 10 เท่าด้วย broth ได้เป็น serial dilution มีความเข้มข้นที่ 0.3, $0.3x10^{-1}$, $0.3x10^{-2}$ และ $0.3x10^{-3}$ OD/ml
6) spot ยีสต์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 5 µl ในลักษณะดัง**ภาพที่ 1**



ภาพที่ 1 ลักษณะการ spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

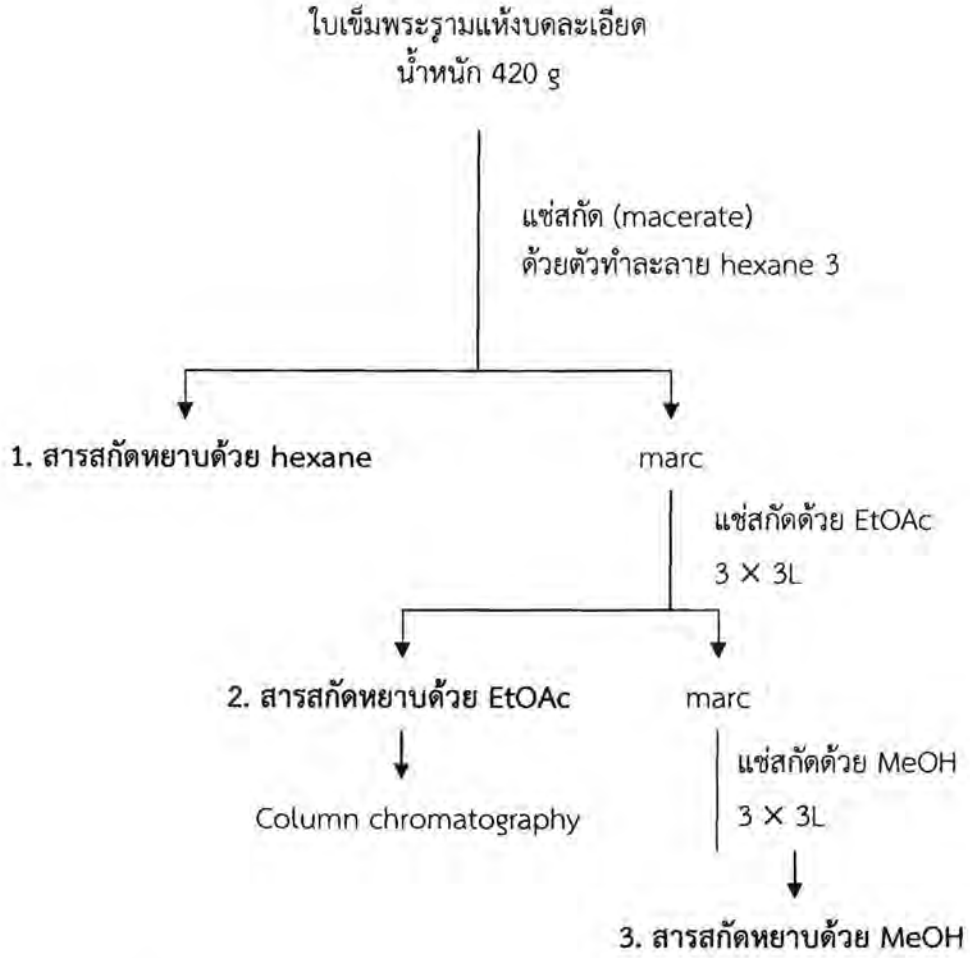
1) เตรียม stock solution ของสารสกัดและแคมป์โทเธซิน (camptothecin-CPT) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย
2) เจือจาง stock solution ด้วย DMSO ให้ได้เป็นความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ
3) นำสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 100 µl ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 10 ml
4) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารทดสอบแล้วลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วจึง spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5) วิเคราะห์ผลที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ ถ้ายีสต์สามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตรกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรกาแลคโตส แสดงว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง TOP1 โดยในการทดสอบนี้จะใช้แคมป์โทเธซินเป็นตัวควบคุมผลบวกและ DMSO เป็น vehicle control

11. ทดสอบฤทธิ์เป็นพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดด้วยวิธี resazurin microplate assay (REMA) (O'Brien *et al.*, 2000)

ผลการศึกษา

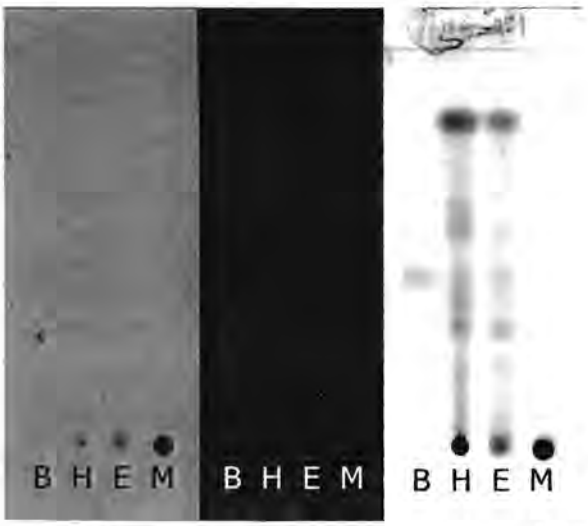
การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากต้นเข็มพระราม

ใบเข็มพระราม อบแห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 °C ก่อนจะนำไปบดละเอียด ได้น้ำหนักทั้งสิ้น 420 กรัม ห่อผงพืชตัวอย่างดังกล่าวด้วยผ้าขาว แล้วแช่สกัดในตัวทำละลาย hexane, ethylacetate (EtOAc) และ methanol (MeOH) ตามลำดับ จำนวน 3 รอบๆละ 3 ลิตร สารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละครั้งถูกนำมารวมกัน แล้วระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporatorได้สารสกัดหยาบด้วย hexane สารสกัดหยาบด้วย EtOAc และสารสกัดหยาบด้วย MeOH น้ำหนักสารสกัดหยาบ 9.90 g, 6.80 g และ 26.80 g คิดเป็น 2.36, 1.62, 6.38 % yield ตามลำดับ (**ภาพที่ 2**)



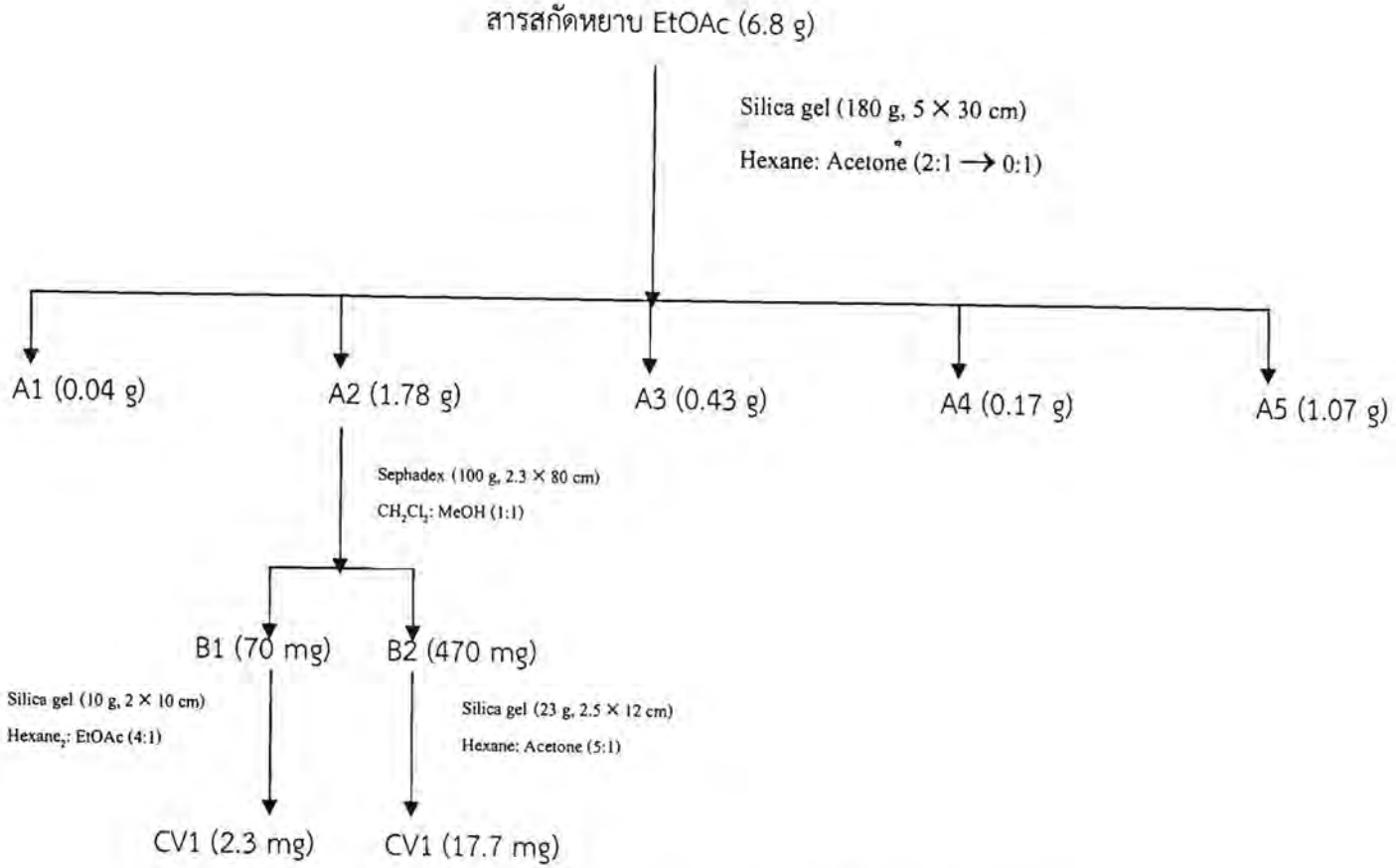
ภาพที่ 2 การเตรียมสารสกัดหยาบต้นเข็มพระรามด้วยตัวทำละลาย

ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ EtOAC ด้วยวิธี TLC และในการวิจัยนี้ได้เพิ่มการใช้สารมาตรฐานซึ่งเป็นสารในกลุ่ม steroid คือ สาร β-sitosterol เป็นสารเปรียบเทียบร่วมด้วย (**ภาพที่ 3**) สารนี้เป็นสารซึ่งมีฤทธิ์ชีวภาพและมักพบในสารสกัดจากพืชในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ จากผลการวิจัยพบว่าในสารสกัดหยาบน่าจะมี สาร β-sitosterol เป็นองค์ประกอบด้วย



ภาพที่ 3 TLC สารสกัดหยาบด้วย hexane (H) สารสกัดหยาบด้วย EtOAc (E) และสารสกัดหยาบด้วย MeOH (M) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ hexane:acetone (4:1) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) ซึ่งตรวจสอบโดย UV 254 nm (a), UV 365 nm (b) และ anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent และให้ความร้อน 110 °C เป็นเวลา 10 นาที (c)

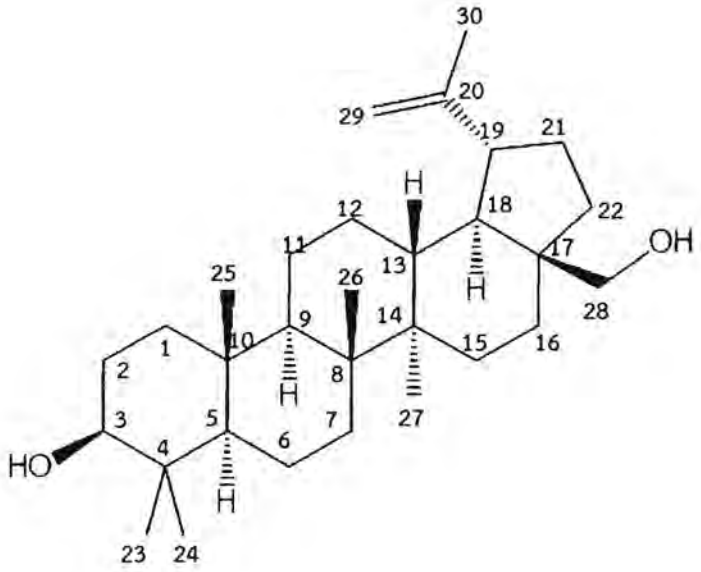
จากนั้นทำการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ EtOAc ตามแผนภูมิดัง**ภาพที่ 4** ผลจากการแยกสารสกัดหยาบ EtOAc โดยผ่าน column chromatography ปัจจุบันพบสารสำคัญ 1 ชนิด คือสาร CV1 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ผลการคัดกรองทางเคมีพบว่าให้ผลบวกกับ anisaldehyde reagent และ 10% H_2SO_4 ได้สีม่วง และนำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) และพบว่าสารนี้ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 30 อะตอมสอดคล้องกับสารกลุ่ม triterpenoid เมื่อเปรียบเทียบค่า chemical shift (δ) จาก ^{13}C-NMR spectrum ของสารพบว่าตรงกับสาร betulin (**ภาพที่ 5**) ที่เคยมีรายงานมาก่อนตามเอกสารอ้างอิง (**ตารางที่ 1**) ประกอบกับลักษณะของ ^{1}H-NMR spectrum ซึ่งแสดงลักษณะของโปรตอน H-3 ที่ตำแหน่ง δ3.16 เป็น doublet of doublets โปรตอน H-29a และ H-29b ที่ตำแหน่ง δ4.66 และ δ4.56 ตามลำดับเป็น doublet และโปรตอน H-30 ที่ตำแหน่ง δ1.66 เป็น singlet



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ EtOAc ด้วยวิธี column chromatography

ตารางที่ 1 ค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้เทียบกับสาร betulin (in $CDCl_3$)

Position	CV2		Betulin (Tijjani *et al*, 2012)	
	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C	δ_H (mult., *J* in Hz)	δ_C
1		38.7		38.9
2		27.4		27.5
3α	3.16 (dd, 11.0, 5.0)	79.0	3.18 (dd, 5.3)	79.2
4		38.9		38.8
5		55.3		55.4
6		18.3		18.4
7		34.2		34.3
8		40.9		41.0
9		50.4		50.5
10		37.2		37.4
11		20.8		20.9
12		25.2		25.3
13		37.3		37.2
14		42.7		42.8
15		27.0		27.1
16		29.2		29.2
17		47.8		47.9
18		47.8		47.9
19		48.8		48.8
20		150.5		150.6
21		29.7		29.8
22		34.0		34.1
23	0.96 (s)	28.0	0.96 (s)	28.1
24	0.74 (s)	15.4	0.75 (s)	15.4
25	0.80 (s)	16.1	0.80 (s)	16.2
26		16.0		16.1
27	1.00 (s)	14.8	0.99 (s)	14.8
28a	3.78 (d, 10.8)	60.6	3.79 (d, 10.8)	60.6
28b	3.31 (d, 10.8)		3.33 (d, 10.8)	
29a	4.66 (brs)	109.7	4.70 (d)	109.8
29b	4.56 (brs)		4.58 (d)	
30	1.66 (s)	19.1	1.67 (s)	19.2



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ betulin

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

เมื่อสกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร betulin แล้วได้นำสารที่สกัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ 3 ชนิดได้แก่ เซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (NCI-H187) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) และเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) ทดสอบด้วยวิธี resazurin microplate assay (O'Brien et al, 2000) มีสารควบคุมผลบวก (positive control) คือ ellipticine และ doxorubicin และ สารควบคุมผลลบ (negative control) คือ 0.5% DMSO โดยใช้ความเข้มข้นที่ 50 µg/ml หากมีร้อยละของการยับยั้งการเจริญเติบโต (%inhibition) มากกว่าร้อยละ 50 ให้เป็นผลบวก ผลการทดสอบสาร betulin แสดงดัง**ตารางที่ 2** พบว่าไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด

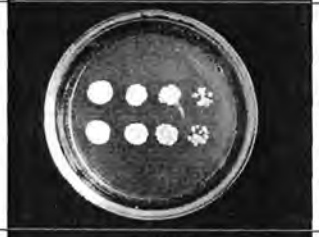
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ betulin ด้วยวิธี resazurin microplate assay

ชนิดของเซลล์มะเร็ง	ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโต
เซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (NCI-H187)	10.24
เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7)	-2.94
เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB)	-2.39

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส ใช้เซลล์ยีสต์ Saccharomyces cerevisae สายพันธุ์ RS190 (ATCC208354, MATa, top1) ซึ่งได้รับการถ่ายโอนหน่วยพันธุกรรมเอนไซม์ topoisomerase I จากพืช Arabidopsis thaliana โดยมี expression vector ที่ใช้ในการแสดงออกคือ pYES-DEST52 ซึ่งประกอบด้วย selectable marker คือ URA3 และ strong inducible promoter คือ pGAL1 ที่ถูกชักนำได้ด้วยน้ำตาลกาแลคโตสทำให้ยีสต์ตอบสนองต่อ camptothecin หรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I ชนิด poison (Sirikantaramas *et al*, 2008)

การทดสอบใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ synthetic complete media lacking uracil (S.C.Ura-) จำนวน 2 สูตรคือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ (มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ) และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ (มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ) มีสารควบคุมผลบวก (positive control) คือ camptothecin และ สารควบคุมผลลบ (negative control) คือ 1% DMSO ยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์จะไม่ตอบสนองต่อ camptothecin แต่ยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์จะตอบสนองต่อตัวยาดังกล่าว (**ตารางที่ 3**) ผลการทดสอบพบว่าสาร betulin ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ที่ความเข้มข้น 400, 200, 100 และ 50 µM (**ตารางที่ 4**)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของ 1% DMSO และ camptothecin ซึ่งใช้เป็น vehicle control และ positive control ตามลำดับ

	ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกลูโคส	ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแลคโตส
1% DMSO		
camptothecin 25 µM		
camptothecin 12.5 µM		
camptothecin 6.25 µM		

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของ betulin

	ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมกลูโคส	ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมแลคโตส
betulin 400 µM		
betulin 200 µM		
betulin 100 µM		
betulin 50 µM		

จากผลการทดสอบพบว่าสาร betulin ที่สกัดแยกได้ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I

สรุปและวิจารณ์ผล

สารสกัดส่วนต้นของเข็มพระรามด้วย EtOAc มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ได้ดี จึงทำการแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากสารสกัดส่วนนี้ ซึ่งสามารถแยกได้สารบริสุทธิ์ CV1 มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เมื่อนำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยใช้ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) พบว่าสารนี้ประกอบด้วยคาร์บอนจำนวน 30 อะตอม จากข้อมูล spectrum ต่างๆ นั้นสอดคล้องกับสารกลุ่ม triterpenoid ชนิด lupane ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ดังกล่าวที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ EtOAc เป็นสาร betulin ซึ่งเป็นการรายงานถึงการพบสาร betulin จากเข็มพระรามและพืชในสกุล *Chassalia* เป็นครั้งแรก

ถึงแม้ว่าสาร betulin ที่สกัดแยกได้ไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อเซลล์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ และไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I แต่จากรายงานที่เคยมีมาก่อนพบว่าสารอนุพันธ์บาง

ชนิดของ betulin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I เช่น betulinic acid (Chowdhury *et al.*, 2002) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารอนุพันธุ์ของ betulin ชนิดอื่นในสารสกัดหยาบเข็มพระรามอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I แต่มีปริมาณอยู่น้อยจึงไม่สามารถสกัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ จึงควรที่จะเพิ่มปริมาณวัตถุดิบสมุนไพรให้มากขึ้นและศึกษาเพิ่มเติมในเซลล์มะเร็งมากชนิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิติ นันทน์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ:บริษัทประชาชน จำกัด. 2544.
2. Tijjani A., Ndukwe I. G., Ayo R.G. Isolation and characterization of lup-20(29)-ene-3, 28-diol (Betulin) from the stem-bark of *Adenium obesum* (Apocynaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2012; 11(2): p. 259-262.
3. O'Brien, J., Ian, W., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 2000. 267(17): p. 5421-5426.
4. Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., Saito, K. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(18): p. 6782-6786.
5. Chowdhury, A.R., Mandal, S., Mittra, B., Sharma, S., Mukhopadhyay, S., Majumder, H. K. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Medical Science Monitor*, 2002. 8(7): p. BR254-BR260.
6. Sangmalee S, Laorpaksa A, Sukrong S. (2012). A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.
7. Bjornsti MA. (1991). DNA topoisomerases. Current Opinion in Stuctural Biology. 1: 99-103.
8. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, and Liu LF. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. The Journal of Biological Chemistry. 260(27): 14873-14878.
9. Raja RDA, Jeeva S, Prakash JW, Marimuthu J, Irudayaraj V. (2011). Anitibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 4(5): 375-378.
10. Reid RJD, Benedetti P, Bjornsti MA. (1998). Review yeast as amodel organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. Biochemica et Biophysica Acta. 1400: 289-300.

ร.ต.อ.หญิง

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร. สุชาดา สุขหร่อง)
หัวหน้าโครงการ
15 ตุลาคม 2558

ประวัติคณะผู้วิจัย

ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Suchada Sukrong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1206 00099 48 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
   เงินเดือน 56,620 บาท
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 6 ชั่วโมง : สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8364 081-8196742, โทรสาร: 02-218-8349
   Email : suchada.su@chula.ac.th

   ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2533
ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Ph.D.	Plant Molecular Biology U. Of Kentucky, U.S.A.		2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Bioactivity of natural products, Plant tissue culture
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย -
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
   7.2.1 ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556
   7.2.2 การศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่สร้างอัลคาลอยด์ต้านมะเร็ง: แคมโททีซิน, ทุนวิจัยทุนวิจัยเซเรบอส Cerebos Award (Thailand) 2008, ปี 2551
   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

1. Jabsuwan A, **Sukrong S**, Swasdison S, Towiwat P. **2015.** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanolic extract of *Curcuma* aff. *amada*. Chiang Mai J Sci. (in press)
2. Petpiroon N, Suktap C, Pongsamarta S, Chanvorachote P, **Sukrong S. 2015.** Kaempferol-3-*O*-rutinoside from *Afgekia mahidoliae* promotes keratinocyte migration through FAK and Rac1 activation. J Nat Med. 69(3):340–348.

3. Ausawasamrit A, Itthiwarapornkul N, Chaotham C, **Sukrong S**, Chanvorachote P. **2015.** Lupalbigenin from *Derris scandens* Sensitizes Detachment-induced Cell Death in Human Lung Cancer Cells. Anticancer Res. 35(5):2827-34.
4. Khanthapok P, Muangprom A, **Sukrong S. 2015.** Antioxidant activity and DNA protective properties of rice grass juices. ScienceAsia. 41(2):119–129.
5. Ketmongkhonsit P, Chaichantipyuth C, Palanuvej C, Thitikornpong W, and **Sukrong S. 2015.** A validated TLC-image analysis method for detecting and quantifying bioactive phyllanthin in *Phyllanthus amarus* and commercial herbal drugs. Songklanakarin J Sci Technol. 37(3):319-326.
6. Pornprasertpol A, Sereemaspun A, Sooklert K, Satirapipatkul C, **Sukrong S. 2015**. Anticancer activity of selected *Colocasia gigantia* fractions. J Med Assoc Thai. Suppl 1:S98-106.
7. Boonyarikpunchai W, **Sukrong S**, Towiwat P. **2014**. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of roamarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 124:67-73.
8. Wiriyakaruna S, Zhu S, Komatsu K, **Sukrong S. 2014.** The use of cycleave PCR for the differentiation of the rejuvenating herb species *Pueraria candollei* (White Kwao Khruea), *Butea superba* (Red Kwao Khruea), and *Mucuna macrocarpa* (Black Kwao Khruea), and the simultaneous detection of multiple DNA targets in a DNA admixture. Nat Prod Commun. 9(1):111-117.
9. Vimolmangkang S, Somkhanngoen C, **Sukrong S. 2014.** Potential pharmaceutical uses of silkworm excreta. Chiang Mai J Sci. 41(1): 97-104.
10. Suwanchaikasem P, Chaichantipyuth C, **Sukrong S. 2014.** Antioxidant-guided isolation of rosmarinic acid, a major constituent from *Thunbergia laurifolia*, and its use as a bioactive marker for standardization. Chiang Mai J Sci. 41(1): 117-127.
11. Wiriyakarun S, Yodpetch W, Komatsu K, Zhu S, Ruangrungsi N, Sukrong S. **2013**. The discrimination of the rejuvenating herbs *Pueraria candollei* (White Kwao Khruea), *Butea superba* (Red Kwao Khruea), and *Mucuna collettii* (Black Kwao Khruea) using PCR-RFLP. J Nat Med. 67(3):562-570.
12. Phoolcharoen W, Sukrong S. **2013**. Molecular analysis of *Vitex* species using candidate DNA barcoding and PCR-RFLP of the *mat*K gene for authentication of *Vitex glabrata*. Nat Prod Commun. 8(1):125=128.
13. Suwanchaikasem P, Phadungcharoen T, Sukrong S. **2013**. Authentication of the Thai medicinal plants known as 'Rang Chuet': *Thunbergia laurifolia, Crotalaria spectabilis*, and *Curcuma* aff. *amada* by combined techniques

of TLC, PCR-RFLP fingerprints and antioxidant activities. ScienceAsia. 39(2):124-133.

14. Sukrong S, Yun KY, Stadler P, Kumar C, Facciuolo T, Moffatt BA, Falcone DL. **2012.** Improved growth and stress tolerance in the *Arabidopsis oxt*1 mutant triggered by altered adenine metabolism. Mol Plant. 5(6): 1310-1332.
15. Sangmalee S, Laorpaksa A, Sukrong S. **2012.** A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. J Ethnopharmacol. 142(2):432-437.
16. Boonsom T, Waranuch N, Ingkaninan K , Denduangboripant J, Sukrong S. **2012.** Molecular analysis of the genus *Asparagus* based on matK sequences and its application to identify *A. racemosus*, a medicinally phytoestrogenic species. Fitotherapia. 83(5):947-953.
17. Suwanchaikasem P, Chaichantipyut C, Amnuoypol S, Sukrong S. **2012.** Random amplified polymorphic DNA analysis of *Thunbergia laurifolia* Lindl. and its related species. J Med Plant Res. 6(15):2955-2961.
18. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A. **2012.** Synergistic growth of lactic acid bacteria and photosynthetic bacteria for possible use as a biofertilizer. African J of Microbiol Res. 6(3): 504-511.
19. Ya-ut P, Chareonsap P, Sukrong S. **2011.** Micropropagation of hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. Biotech Letters. 33(12): 2519-2526.
20. Viraporn V, Yamazaki M, Saito M, Denduangboripant J, Chuanasa T, Sukrong S. **2011.** Correlation of camptothecin-producing ability and phylogenetic relationship in the genus *Ophiorrhiza* (Rubiaceae). Planta Med. 77(7):759-764.
21. Thitikornpong W, Phadungcharoen T, Sukrong S. **2011.** Pharmacognostic evaluations of *Lagerstroemia speciosa* leaves. J of Med Plant Res. 5(8):1330-1337.
22. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A. **2010.** Selection of photosynthetic bacteria producing 5-aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. African J of Microbiol Res. 4(17): 1848-1855.
23. Manissorn, J, Sukrong, S, Ruangrungsi, N, and Mizukami, H. **2010.** Molecular phylogenetic analysis of *Phyllanthus* species in Thailand and the application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *Phyllanthus amarus* identification. Biol Pharm Bull. 33(10): 1723-1727.

24. Manissorn, J, Ruangrungsi, N, Phadungcharoen, T, and Sukrong, S. **2010**. DNA fingerprinting of selected Thai *Phyllanthus* species by RAPD analysis. J Health Res. 24(2): 73-79.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

7.4.1 โครงการยุทธศาสตร์วิจัยเชิงลึก เรื่อง "การค้นคว้าและพัฒนาสารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการรักษาโรคมะเร็ง" โดยเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย เรื่อง "สมุนไพรและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง" แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2558-2559 ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 50

7.4.2 โครงการบูรณาการงานวิจัยสู่นานาชาติประเภททุนส่งเสริมนักวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช เรื่อง "จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เพื่อประยุกต์ใช้ทางด้านเภสัชกรรม อาหาร เครื่องสำอาง เกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม" โดยเป็นหัวหน้าโครงการวิจัยย่อย เรื่อง "การคัดกรองโดยใช้จุลินทรีย์เพื่อค้นพบสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ" แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2558-2560 ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 20

7.4.3 โครงการสนองพระราชดำริ เรื่อง "องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของชิงช้าสะแกราช" โดยเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย แหล่งทุน: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2559 ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 20

นางอารีรัตน์ ลออปักษา

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง อารีรัตน์ ลออปักษา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Areerat Laorpaksa
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 100202296 711
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
   เงินเดือน 74,980 บาท
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 4 ชั่วโมง : สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
   หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8382 086-7621692, โทรสาร : 02-218-8381
   Email : lareerat@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2522
ภ.ม.	จุลชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
พท.บ	แพทย์แผนไทยบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช	2552

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   วัคซีน สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ไม่มี
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
      1. การศึกษาการใช้และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กับเครื่องมือแพทย์ในสถานพยาบาลโดยความร่วมมือกับกระทรวงสาธารณสุขปี 2540
      2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากสมุนไพรไทย ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปี 2546

   ผู้ร่วมโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
      1. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2551
      2. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์topoisomerase I II โดยการใช้เซลล์ยีสต์เป็นเกณฑ์ , กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2553

   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

7.3.1 Sangmalee S , Laorpaksa A, Sukrong S. 2012. A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.

7.3.2 WimonPothiwong, AreeratLaorpaksa, NopadonPirarat, SujinSirisawadi, JantimaIntarapanya,SureeJianmongkol. 2007.Autoxidation of Brain Homogenates from Various Animals as Measured by Thiobarbituric Acid Assay. Journal of Pharmacological and ToxicologicalMethods. 56:336-338.

7.3.3 AreeratLaorpaksa,WimonPothiwong, SureeJianmongkol. 2008.Antimicrobial activity ofendophytic bacteria isolated from Thai medicinal plant.Thai Journal Pharmaceutical Sciences. 32(1-2):21-32.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด: ไม่มี

นายรุทธ์ สุทธิศรี

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายรุทธ์ สุทธิศรี
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Rutt Suttisri
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1904 00223 82 5
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
   เงินเดือน 48,190 บาท
   เวลาที่ใช้ทำวิจัย 4 ชั่วโมง : สัปดาห์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8353 โทรสาร : 02-218-8357
   Email : rutt.s@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปีที่ได้รับ
เภสัชศาสตรบัณฑิต	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2528
Ph.D.	Pharmacognosy	U. of Illinois at Chicago, U.S.A.	2536

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   การสกัดและแยกสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ (โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)
   - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ไม่มี
   - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
   - 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : (ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)
     1. Somwong P, Suttisri R, Buakeaw A. 2011. A new 1,3-diketofriedelane triterpene from Salaciaverrucosa. Fitoterapia 82: 1047-1051.
     2. Phongmaykin J, Kumamoto T, Ishikawa T, Saifah E, Suttisri R. 2011. Biologically active constituents of Aglaiaerythrosperma. Nat Prod Res. 25: 1621-1628.
     3. Tantisira MH, Tantisira B, Patarapanich C, Suttisri R, Luangcholatan S, Mingmalairak S, Wanasuntronwong A, Saifah E. 2010. Effects of a standardized extract of CentellaasiaticaECa 233 on learning and memory impairment induced by transient bilateral common carotid artery occlusion in mice. Thai J Pharmacol. 32: 22-33.

4. งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่า ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด -

---