รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
การคัดกรองพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ด้วยกลไกการยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I โดยใช้เซลล์ยีสต์ และการสกัดแยกสารสำคัญจากเปลือกต้นขี้หนอน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ

(Screening of anti-cancer with topoisomerase I inhibitory mechanism of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by yeast cells and bioassay-guided fractionation of *Zollingeria dongnaiensis* bark)

คณะผู้ดำเนินงาน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิงอารีรัตน์ ลออปักษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรสุรพงษ์ เก็งทอง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.รุทธ์ สุทธิศรี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

เนื่องจากเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I เป็นเป้าหมายของการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัด งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะค้นหาสารออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I จากสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้เซลล์ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนหน่วยพันธุกรรมเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I จากพืช *Arabidopsis thaliana* ซึ่งสามารถควบคุมการแสดงออกของหน่วยพันธุกรรมเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ได้โดยใช้โปรโมเตอร์ที่ถูกชักนำด้วยน้ำตาลกาแลคโตส จากการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ของตัวอย่างสมุนไพรไทยในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี จำนวน 40 ชนิด 45 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดเอทานอลจากตัวอย่างของสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกขี้หนอน *(Zollingeria dongnaiensis)* ใบเข็มขาว (*Ixora ebarbata*) ใบเปล้าใหญ่ (*Croton cf. kerrii*) และใบสำเภา (*Chaetocarpus castanocarpus*) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ซึ่งได้คัดเลือกเปลือกขี้หนอนมาทำการศึกษาต่อโดยการแยกสารสำคัญออกจากสารสกัดหยาบด้วยวิธีใช้ฤทธิ์เป็นตัวนำ พบสารสำคัญในกลุ่ม saponin glycosides ที่มี hederagenin เป็น aglycone จำนวน 6 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I

คำสำคัญ โทโพไอโซเมอเรส I, ยีสต์, ต้านมะเร็ง, โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ, ขี้หนอน, วงศ์ Sapindaceae, ซาพอนิน

Abstract

Topoisomerase I (top I) is one of the targets for chemotherapy. This study was to discover bioactive compounds having top I inhibitory effect from medicinal plants by using transformed yeast cells. Yeasts were inserted with *top* I gene from *Arabidopsis thaliana*. The top I expression level was controlled by galactose-inducible promoter. Out of 45 samples from 40 species collected from Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Maha Chakri Sirindthorn, Chonburi province, four methanol extracts showed top I inhibitory activity. There are barks of *Zollingeria dongnaiensis* and leaves of *Ixora ebarbata*, *Croton* cf. *kerrii*, and *Chaetocarpus castanocarpus*. Potentially used as anticancer, bioassay-guided fractionation should be performed. The extract of *Z. dongnaiensis* bark was analyzed for topoisomerase I inhibitory activity by bioassay-guided fractionation. The six active constituents are saponin glycosides with hederagenin as aglycone.

Keyword: Topoisomerase I, Yeast, Anticancer, Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn, *Zollingeria dongnaiensis*, Sapindaceae, saponin

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการศึกษา	8
สรุปและวิจารณ์ผล	27
เอกสารอ้างอิง	28
ประวัตินักวิจัยและคณะ	29

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ตัวอย่างและส่วนที่ใช้ของพืชที่เก็บได้จากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส	5
ตารางที่ 2	การแปลผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้เซลล์ยีสต์	7
ตารางที่ 3	เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE1 และ lupenone (in $CDCl_3$)	13
ตารางที่ 4	เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE2 และ lupeol (in $CDCl_3$)	14
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE3 และ stigmasterol (in $CDCl_3$)	15
ตารางที่ 6	เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZBA (1) และ stigmasterol glucoside (in C_5D_5N)	23
ตารางที่ 7	เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZBB (2), BC (3), ZCA (4), ZDA (5), ZEA (6) และ ZEB (7) และ hederagenin (in CD_3OD)	24

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	เวคเตอร์ pYES-DEST52 Gateway™ (Invitrogen Corporation, USA) ที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน	3
ภาพที่ 2	ลำต้นของขี้หนอน	3
ภาพที่ 3	ต้นขี้หนอนที่ถูกลอกเปลือก	4
รูปที่ 4	การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารละลาย DMSO และ camptothecin (CPT) ที่ความเข้มข้นต่างกัน	8
รูปที่ 5	การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลาย DMSO, camptothecin (CPT) และสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I	9
รูปที่ 6	การเจริญของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรจากเปลือกขี้หนอน *Zollingeria dongnaiensis* Pierre วงศ์ Sapindaceae	10
รูปที่ 7	ผังการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี column chromatography	11
รูปที่ 8	แสดง spots ของสารสกัดหยาบ hexane (E) ที่ถูกแยกบน TLC plate เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) และ lupeol (L)	12
รูปที่ 9	แสดงการแช่สกัดเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2	16
รูปที่ 10	แสดง spots ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (C) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) และ betulin (Be)	17
รูปที่ 11	แสดงการแช่สกัดเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย MeOH	18
รูปที่ 12	แสดง spots ของสารสกัดหยาบ MeOH (M) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (C)	19
ภาพที่ 13	แสดงการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ MeOH ด้วยวิธี column chromatography	21
ภาพที่ 14	แสดง spots ของสารสำคัญ ZBA (1), ZBB (2), ZBC (3), ZCA (4), ZDA (5), ZEA (6) และ ZEB (7) บน TLC plate	22
ภาพที่ 15	การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารสกัดจากขี้หนอน ที่ความเข้มข้นต่างๆ	26

ชื่อเรื่อง

ภาษาไทย การคัดกรองพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ฯ ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I โดยใช้เซลล์ยีสต์และการสกัดแยกสารสำคัญจากเปลือกต้นขี้หนอนโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ

ภาษาอังกฤษ Screening of anti-cancer with topoisomerase I inhibitory mechanism of medicinal plants in the Plant Genetic Conservation Project area under The Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn by yeast cells and bioassay-guided fractionation of *Zollingeria dongnaiensis* bark

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
รองศาสตราจารย์ ภญ.อารีรัตน์ ลออปักษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. สุรพงษ์ เก็งทอง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. วิเชียร จงบุญประเสริฐ

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลกระทรวงสาธารณสุขพบว่าคนไทยมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มว่าจำนวนผู้ป่วยโรคมะเร็งจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก จากข้อมูลล่าสุดในปี 2553 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็ง 62,000 ราย โดยในผู้ชายพบมะเร็งปอดมากที่สุดคือ 5,535 ราย รองลงมาคือมะเร็งตับ ส่วนผู้หญิงพบมะเร็งปากมดลูกมากที่สุดคือ 1,484 ราย รองลงมาคือ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม โรคมะเร็งจัดเป็นโรคที่มีค่าใช้จ่ายสูงและเป็นโรคเรื้อรัง อีกทั้งเป็นกลุ่มโรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิต เกิดความพิการจากการเจ็บป่วย ส่งผลไปถึงการเพิ่มรายจ่ายด้านสุขภาพของครัวเรือน สังคม ตลอดจนเป็นภาระค่าใช้จ่ายโดยรวมของประเทศ

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์สูงกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งในขั้นตอนการแบ่งเซลล์นั้นต้องผ่านขั้นตอนของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ และในขั้นตอนของการจำลองตัวของดีเอ็นเอจำเป็นที่จะต้องมีการคลายเกลียวของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น supercoiled โดยเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการคลายเกลียวได้แก่ เอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (topoisomerase I) ซึ่งจะทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยก (replication fork) ด้วยการทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับไฮโดเจนของสายดีเอ็นเอ ดังนั้นเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัด เพราะหากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว เซลล์ก็จะไม่สามารถแบ่งตัวได้ เซลล์มะเร็งซึ่งมีอัตราการแบ่งเซลล์สูงก็จะได้รับผลกระทบมากกว่าเซลล์ปกติ ในปัจจุบันมีการใช้ยารักษาโรคมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว ได้แก่ camptothecin และอนุพันธุ์ของ camptothecin ได้แก่ Irinotecan® และ Topotecan® ในการรักษาโรคมะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ และมะเร็งปากมดลูก

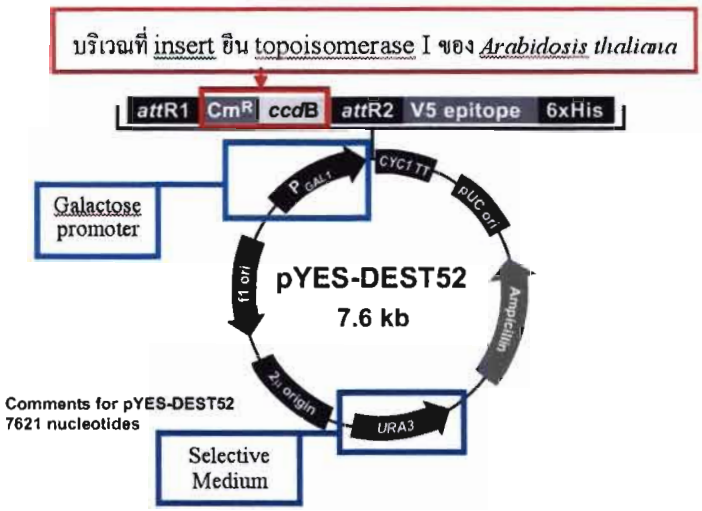
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I มีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ relaxation assay วิธีนี้วัดการคลายเกลียว (relaxation) ของ supercoiled plasmid ของแบคทีเรียในหลอดทดลอง โดยหากสารที่นำมาทำการทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I การคลายเกลียวของดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เมื่อนำมาวัดผลด้วยวิธีการแยกสารชีวโมเลกุลด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis) ก็จะพบระดับของการคลายเกลียว (degree of relaxation) ที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้สาร camptothecin

เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) เนื่องจากสาร camptothecin เป็นสารที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ด้วยวิธี relaxation assay ซึ่งทำในหลอดทดลองนั้น ก็เป็นเพียงการจำลองกระบวนการที่เกิดขึ้นเท่านั้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ที่เกิดขึ้นจริงๆในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยใช้เซลล์ยีสต์ (yeast cell-based assay) สาเหตุที่เลือกใช้ยีสต์เนื่องจากยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิด eukaryote เช่นเดียวกับมนุษย์ ทำให้การแปลผลข้อมูลเพื่อการนำไปใช้ทางการแพทย์สำหรับมนุษย์มีความเป็นไปได้สูงกว่าการใช้เซลล์แบคทีเรีย ผลการวิจัยจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไป

ยีสต์ที่นำมาใช้ในการคัดกรองเป็นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน สร้างโดยกลุ่มวิจัยที่มีผู้วิจัยร่วมอยู่ด้วย เริ่มจากการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* strain RS190 (genotype: a *top1-8 [top1::LEU2] ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100*) (American Type Culture Collection-catalog No. 208354) ซึ่งเป็นยีสต์ที่ไม่มียีนโทโพไอซอเมอเรส I จากนั้น insert ด้วยยีนโทโพไอซอเมอเรส I ของพืช *Arabidosis thaliana* ด้วยระบบ Gateway® Technology โดยใช้เวคเตอร์ pYES-DEST52 Gateway™ (Invitrogen, USA) เป็นพาหะ ซึ่งเวคเตอร์ดังกล่าวสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนโทโพไอซอเมอเรส I ได้ เนื่องจากมี P_{GAL1} เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (promoter) ดังนั้นภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลกาแลคโตสหรือเรียกว่าเป็น galactose-induced system ยีสต์จะผลิตเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้มากขึ้นจนสามารถใช้ในการคัดกรองได้ แต่ภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส ยีสต์จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ หรือเรียกว่า glucose-repressed system ในสภาวะนี้จะไม่มีผลใดๆ ต่อยีสต์ ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตตามปกติ นอกจากนี้ข้อดีของการใช้เวคเตอร์ pYES-DEST52 Gateway™ อีกประการหนึ่งคือเวคเตอร์มียีน *URA3* ทำให้มีคุณสมบัติในการสร้างกรดอะมิโนยูราซิล (uracil) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีความจำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตได้เอง จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกใช้เป็น auxotrophic marker ที่ใช้ในคัดเลือกว่าเป็นยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนหรือไม่ ถ้าเป็นยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนก็จะสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนยูราซิลได้ คุณสมบัติของเวคเตอร์แสดงดังภาพที่ 1 ส่วนการเลือก insert ด้วยยีนจาก *A. thaliana* เพราะมีรายงานว่าเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ของพืชดังกล่าวตอบสนองได้ดี (sensitive) ต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I

ผลการคัดกรองจะวัดจากการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ถูกนำมาเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งหากสารที่เรานำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ยีสต์ก็จะไม่เจริญเติบโตหรือเติบโตน้อยกว่าตัวควบคุมผลบวกซึ่งได้แก่ camptothecin แต่หากสารที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวยีสต์ก็จะเจริญเติบโตได้ตามปกติ จากการคัดกรองพืชในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ. ชลบุรีจำนวน 40 ชนิด 45 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเปลือกต้นขี้หนอน (*Zollingeria dongnaiensis* Pierre วงศ์ Sapindaceae) (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ได้ดีที่สุด จึงทำการศึกษาต่อโดยการแยกสารสำคัญออกจากสารสกัดหยาบด้วยวิธีใช้ฤทธิ์เป็นตัวนำ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกต้นขี้หนอนที่มีฤทธิ์ดังกล่าว



ภาพที่ 1 เวคเตอร์ pYES-DEST52 Gateway™ (Invitrogen Corporation, USA) ที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน

ภาพที่ 2 ลำต้นของขี้หนอน

ภาพที่ 3 ต้นขี้หนอนที่ถูกลอกเปลือก

วัตถุประสงค์

คัดกรองพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I และศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรเปลือกต้นขี้หนอนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ดีที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้จะช่วยเพิ่มความสามารถในการคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ให้สะดวกและมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นโดยการใช้เซลล์ยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และเป็นการเพิ่มศักยภาพของสมุนไพรไทยในการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยังเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับสารเคมีในสมุนไพรเปลือกต้นขี้หนอนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานในการเพิ่มศักยภาพของสมุนไพรในการใช้ประโยชน์เป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

วิธีดำเนินการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี จำนวน 40 ชนิด (species) น้ำหนักประมาณ 100 กรัม พร้อมทั้งตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของพืชดังกล่าว เก็บส่วนหนึ่งทำเป็นพรรณไม้แห้งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนที่เหลือนำมาหั่นให้เล็กลง อบแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแช่สกัดสารจากตัวอย่างโดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลายนาน 3 วัน กรองและระเหยแห้ง ได้เป็นสารสกัดหยาบ จำนวน 45 ตัวอย่าง **(ตารางที่ 1)**

ตารางที่ 1 ตัวอย่างและส่วนที่ใช้ของพืชที่เก็บได้จากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
1	หมัน	*Cordia cochinchinensis* Pierre	Boraginaceae	ใบ
2	ก้างปลา สามพันตา	*Cleistanthus gracilis* Hook.f.	Euphorbiaceae	ใบ
3	ประยงค์ป่า	*Aglaia odoratissima* Blume	Meliaceae	ใบ
4	ยอป่า	*Morinda coreia* Ham.	Rubiaceae	ใบ
5	ตะขบป่า	*Flacourtia indica* (Burm.f.)Merr.	Flacourtiaceae	ใบ
6	ช้างน้าว	*Ochna integerrima* Merr.	Ochnaceae	ใบ
7	บานไม่รู้โรยป่า	*Gomphrena celosioides* Mart.	Amaranthaceae	ทั้งต้น
8	***	***	Sterculiaceae	เปลือก
9	ลำป้าง	*Pterospermum littorale* Craib	Sterculiaceae	เปลือก
10	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Benth.	Annonaceae	ใบ
11	กระเจียน	*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Benth.	Annonaceae	เปลือก
12	หนามเกี่ยวไก่	*Capparis diffusus* Ridl.	Capparidaceae	ใบ
13	เขลง หยี	*Dialium cochinchinense* Pierre	Fabaceae	ใบ
14	พลองใบรี	*Mamecylon plebejum* Kurz. var. *ellipsoideum* Craib.	Melastomataceae	ใบ
15	เดสมอส***	***	***	ใบ
16	ผักเบี้ยทะเล	*Sesuvium portulacastrum* L.	Aizoaceae	ทั้งต้น
17	ช้างน้าว	*Ochna integerrima* Merr.	Ochnaceae	กิ่ง
18	สำเภา	*Chaetocarpus castanocarpus* (Roxb.)Thwaites	Euphorbiaceae	เปลือก
19	อบเชยเถา	*Atherolepis pierrei* Cost. var. *glaba* Kerr.	Asclepiadaceae	ทั้งต้น
20	มะนาวผี	*Atalantia monophylla* Corr.	Rutaceae	ใบ
21	สวอง สวองตีนนก	*Vitex pinnata* L.	Verbenaceae	ใบ
22	ลำไยป่า	*Dimocarpus longan* Lour. Var. *obtusus*	Sapindaceae	ใบ
23	เหมือดแอ	*Memecylon pauciflorum* Blume	Melastomaceae	ใบ
24	**ขี้หนอน**	***Zollingeria dongnaiensis* Pierre**	**Sapindaceae**	**เปลือก**
25	**เข็มขาว**	***Ixora ebarbata Craib***	**Rubiaceae**	**ใบ**
26	**เปล้าใหญ่**	***Croton* cf.*kerrii***	**Euphorbiaceae**	**ใบ**
27	ก้างปลา	*Cleistanthus gracilis* Hook.f.	Euphorbiaceae	ใบ
28	ปอแดง	*Sterculia hypochra* Pierre	Sterculiaceae	ใบ
29	เขลง	*Dialium cochinchinense* Pierre	Fabaceae	เปลือก
30	**สังเครียด**	***Aglaia elaeagnoidea* (Juss.) Benth.**	**Meliaceae**	**ใบ**
31	**สำเภา**	***Chaetocarpus castanocarpus***	**Euphorbiaceae**	**ใบ**

		(Roxb.)Thwaites		
32	เกด	*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dub.	Sapotaceae	ใบ
33	พลับดง	*Diospyros bejaudii* Lecompte	Ebenaceae	ใบ
34	ขี้หนอน	*Zollingeria dongnaiensis* Pierre	Sapindaceae	ใบ
35	อบเชยเถา	*Atherolepis pierrei* Cost. var. *glaba* Kerr.	Asclepiadaceae	ราก
36	กำแพงเจ็ดชั้น	*Salacia chinensis* L.		ใบ
37	ติ้วขน ติ้ว	*Cratoxylum formosum* (Jack.)Dyer. var. *formosum*	Clusiaceae	กิ่ง
38	พลองใบใหญ่	*Memecylon ovatum* J.E.Smith	Melastomataceae	ใบ
39	ติ้วขน ติ้ว	*Cratoxylum formosum* (Jack.)Dyer. var. *formosum*	Clusiaceae	ใบ
40	มะลิไส้ไก่	*Jasminum funale* Decne	Oleaceae	กิ่ง
41	มะลิไส้ไก่	*Jasminum funale* Decne	Oleaceae	ใบ
42	แจง	*Maerua siamensis*(Kurz.)Pax.	Capparidaceae	ใบ
43	โพทะเล	*Thespesia populnea* (L.)Soland.ex Corr.	Malvaceae	ใบ
44	พลองเหมือด	*Memecylon edule* Roxb.	Melastomataceae	กิ่ง
45	กระเจียง กระเจียน	*Polyalthia cerasoides* (Roxb.) Benth.	Annonaceae	ใบ

*** หมายถึงยังไม่สามารถระบุชื่อได้

2. คัดเลือกและเพิ่มจำนวนยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน (transformant yeast) เพื่อเตรียมสำหรับใช้ในการทดลอง โดยนำยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโทโพไอซอเมอเรส I จากพืช *A. thaliana* มาทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่จำเพาะ (solid selective medium) เพื่อแยกให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว แล้วนำมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (liquid selective medium) เพื่อเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากพอสำหรับใช้ในการทดลอง และแบ่งเก็บเป็น stock ไว้ใช้ในระยะยาวที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส

3. หากระบวนการที่เหมาะสมสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้เซลล์ยีสต์เป็นเกณฑ์ เช่น ภาชนะและอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงยีสต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงยีสต์ก่อนทำการ spot ลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จำนวนยีสต์ที่ใช้ในการ spot รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการอ่านผลการทดลอง เป็นต้น

4. คัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I

ในงานวิจัยนี้ใช้การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยวิธีที่เรียกว่า cell-based assay โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนโทโพไอซอเมอเรส I แล้ว เริ่มจากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงยีสต์แบบเหลวเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้นของยีสต์จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ได้ 0.3 และเจือจาง 10 เท่าด้วยอาหารเลี้ยงยีสต์ จำนวน 3 ครั้ง (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) หยดยีสต์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงยีสต์แบบแข็งที่ผสมน้ำตาลกาแลคโตสหรือน้ำตาลกลูโคสและสารสกัดหยาบจากสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ (ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดจากการเจริญเติบโตของยีสต์โดยเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะควบคุม ได้แก่ อาหารเลี้ยงยีสต์ที่ผสมแคมป์โทเธซิน (camptothecin) เป็นตัวควบคุมผลบวก (positive control) เนื่องจากเป็นสารที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I และมี DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดในการทดสอบ เป็น vehicle control ผลการคัดกรองจะวัดจากการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ถูกนำมาเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากสมุนไพร

การผสมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะแบบแข็ง (solid selective media) จะเตรียมเป็น 2 สภาวะ คือ สภาวะที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (glucose-repressed system) และสภาวะที่ใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (galactose-induced system) เนื่องจากระบบ Gateway® Technology ที่ใช้ในการถ่ายโอนยีน *top1* ของพืช *A. thaliana* เข้าสู่เซลล์ยีสต์มียีน *pGAL1* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์

ที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนโทโพไอซอเมอเรส I ที่ถ่ายโอนเข้าไปเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

การแปลผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จะเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคสและมีกาแลคโตส (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การแปลผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้เซลล์ยีสต์

สารที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ	การเจริญเติบโตของยีสต์		การแปลผล
	เมื่อมีกลูโคส	เมื่อมีกาแลคโตส	
Camptothecin (ตัวควบคุมผลบวก)	+	-	มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โทโพไอซอเมอเรส I
DMSO (vehicle control)	+	+	ไม่มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โทโพไอซอเมอเรส I
สารสกัดพืชชนิดที่ 1	+	+	ไม่มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โทโพไอซอเมอเรส I
สารสกัดพืชชนิดที่ 2	+	-	มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โทโพไอซอเมอเรส I
สารสกัดพืชชนิดที่ 3	-	-	อาจสรุปได้ว่า ไม่มี ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โทโพไอซอเมอเรส I การตายของเซลล์เกิดจากกลไกอื่น ต้องทำการทดลองอีกโดยลดความเข้มข้นของสารสกัดลง

หมายเหตุ + หมายถึง ยีสต์เจริญเติบโตได้
- หมายถึง ยีสต์ไม่เจริญเติบโต

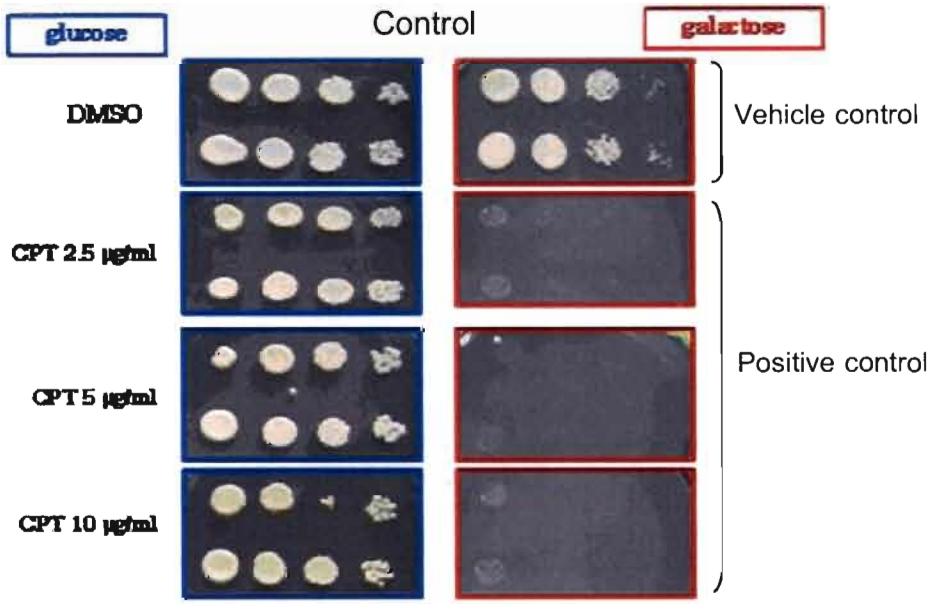
5. แยกสารสำคัญจากเปลือกต้นขี้หนอนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยวิธี column chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ fraction ย่อยๆ ของกลุ่มสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน fraction ย่อยเหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ (bioassay-guided fractionation) แล้วจึงนำ fraction ย่อยที่แสดงฤทธิ์มาแยกองค์ประกอบทางเคมี เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ พร้อมทั้งทำการแยก fraction อื่นๆที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ เพื่อนำสารที่สกัดแยกได้ทั้งหมดไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ทราบชนิดของสารด้วยวิธี spectroscopy ต่อไป

ผลการศึกษา

การทดสอบระบบคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน

การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I โดยการใช้เซลล์ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน พบว่ายีสต์เจริญได้ปกติในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม DMSO และแคมป์โทเธซินในความเข้มข้นต่างๆ กันซึ่งใช้เป็นสารควบคุมผลบวกโดยมีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน ทั้งนี้เนื่องมาจากกลูโคสไม่สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีนโทโพไอโซเมอเรส I ทำให้ไม่เกิดการจับกันเป็น suicide complex ระหว่างเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I, สายดีเอ็นเอ และแคมป์โทเธซิน จึงไม่มีผลต่อยีสต์ ยีสต์สามารถเจริญได้ตามปกติ

ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกาแลคโตสเป็นแหล่งของคาร์บอน จะเกิดการชักนำให้มีการแสดงออกของยีนโทโพไอโซเมอเรส I ส่งผลให้เกิดการจับกันเป็น suicide complex ระหว่างเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I, สายดีเอ็นเอ และแคมป์โทเธซิน ทำให้ยีสต์เจริญได้น้อยหรือตาย (ภาพที่ 4) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่ผสม DMSO (vehicle control) ยีสต์สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารที่ผสมกลูโคสและกาแลคโตส แสดงว่า DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายของสารสกัดสมุนไพร ไม่มีผลต่อระบบการคัดกรอง แสดงถึงการใช้ได้ของระบบคัดกรอง



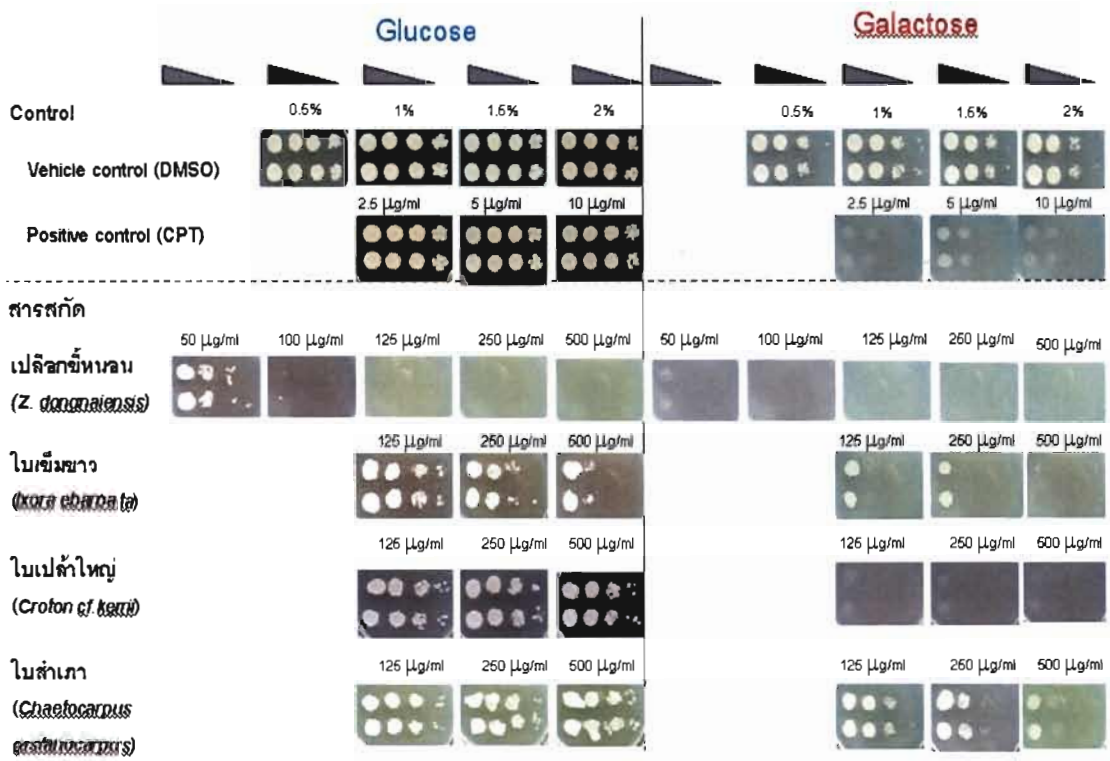
ภาพที่ 4 การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารละลาย DMSO และ camptothecin (CPT) ที่ความเข้มข้นต่างกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหยดยีสต์ 5 ไมโครลิตร ที่เจือจางความเข้มข้นของยีสต์ให้ลดลงทีละ 10 เท่า ตามลำดับจากซ้ายไปขวา; ภาพด้านซ้ายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน; ภาพด้านขวาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน; DMSO เป็น vehicle control; CPT เป็น positive control

การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I จากพืชสมุนไพร

การคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี โดยการใช้เซลล์ยีสต์ พบว่ายีสต์เจริญได้ปกติในอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบของสมุนไพรและมีกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน แต่ยีสต์เจริญได้ต่างกันใน

อาหารผสมสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดและมีกาแลคโตสเป็นแหล่งของคาร์บอน โดยที่ถ้ายีสต์ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดจากสมุนไพรและมีกาแลคโตสเป็นแหล่งของคาร์บอน นั่นหมายความว่าสารสกัดสมุนไพรนั้นสามารถยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้

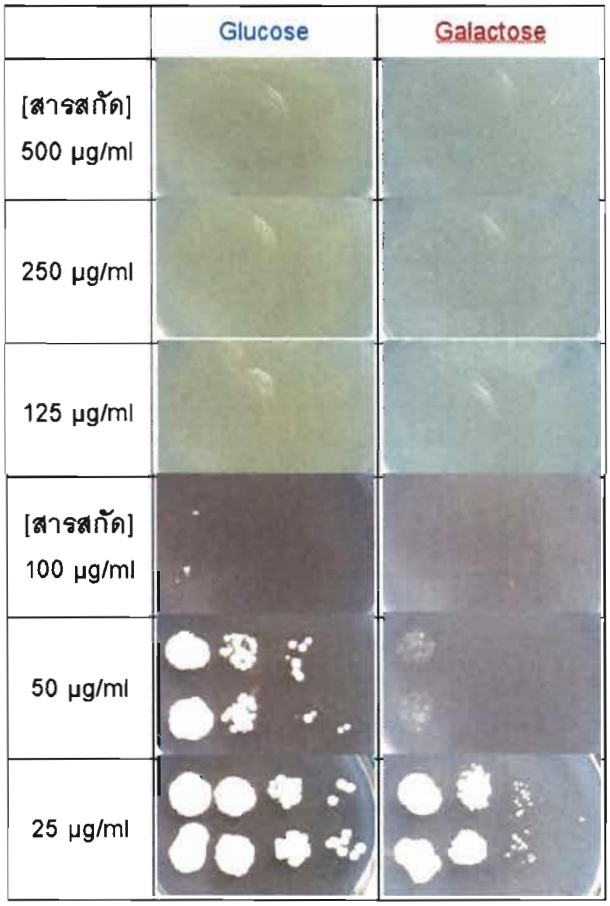
จากการคัดกรองสารสกัดสมุนไพรจำนวน 45 ตัวอย่าง พบ 4 ตัวอย่างที่ผ่านการคัดกรองในขั้นแรก (primary screening) คือที่มีฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกขี้หนอน *(Zollingeria dongnaiensis)*, ใบเข็มขาว (*Ixora ebarbata*), ใบเปล้าใหญ่ (*Croton cf.kerrii*) และใบสำเภา (*Chaetocarpus castanocarpus)* (ภาพที่ 5) โดยสารสกัดจากเปลือกขี้หนอนแสดงฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ได้ดีที่สุด จึงถูกคัดเลือกให้ศึกษาต่อถึงสารสำคัญโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ (bioassay-guided fractionation)



ภาพที่ 5 การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารละลาย DMSO, camptothecin (CPT) และสารสกัดสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I และผ่านการคัดกรองขั้นแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ; DMSO เป็น vehicle control; CPT เป็น positive control

ฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ของสารสกัดหยาบจากเปลือกขี้หนอน

ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I ซ้ำ โดยใช้วิธีดังข้างต้น พบว่าสารสกัดจากเปลือกขี้หนอนแสดงฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ได้ดี (ภาพที่ 6)

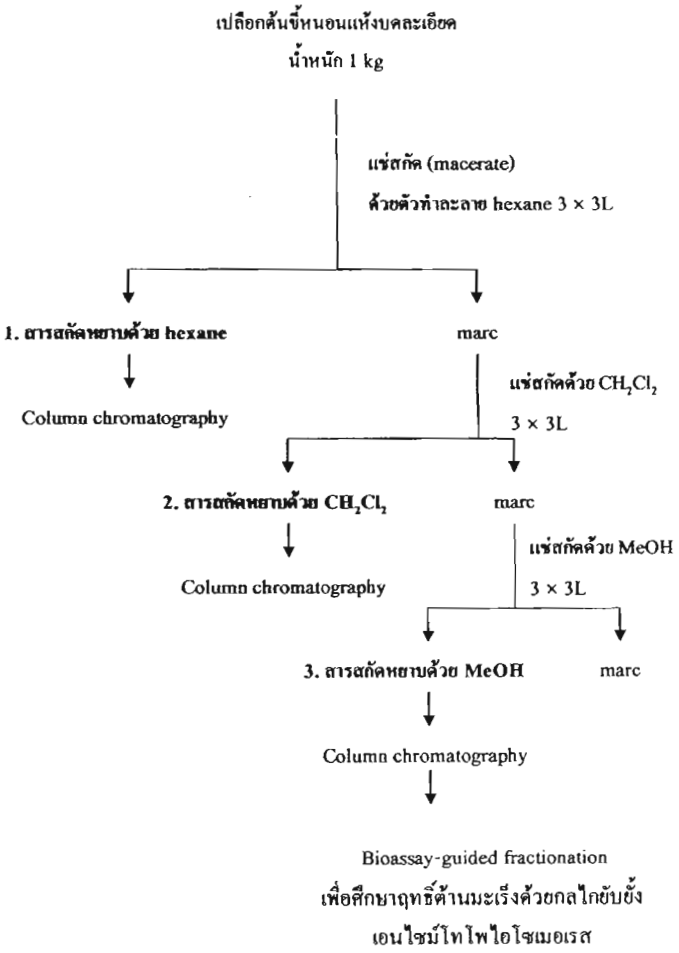


ภาพที่ 6 การเจริญของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรจากเปลือกขี้หนอน *Zollingeria dongnaiensis* Pierre วงศ์ Sapindaceae ที่ความเข้มข้นต่างกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหยดยีสต์ 5 ไมโครลิตร ที่เจือจางความเข้มข้นของยีสต์ให้ลดลงทีละ 10 เท่า ตามลำดับจากซ้ายไปขวา; ภาพด้านซ้ายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน; ภาพด้านขวาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

การแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี column chromatography

การสกัดสารสำคัญจากเปลือกต้นขี้หนอนเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (ภาพที่ 7) ดำเนินการโดยนำเปลือกต้นขี้หนอนมาอบแห้ง ก่อนจะนำไปบดละเอียด แล้วแช่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเรียงตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย เริ่มจาก hexane ซึ่งมีความมีขั้วต่ำสุด ตามด้วย CH_2Cl_2 และ MeOH ตามลำดับ โดยสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้งๆ ละประมาณ 3 ลิตร สารสกัดหยาบที่ได้จากการแช่หมักในตัวทำละลายแต่ละครั้งถูกนำมารวมกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นภายใต้ความดันต่ำก่อนจะนำสารสกัดหยาบในแต่ละขั้นมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) และแยกสารสำคัญ โดยวิธี column chromatography ด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ fraction ย่อยๆ ของกลุ่มสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน fraction ย่อยเหล่านี้จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ topoisomerase I แล้วจึงนำ fraction ย่อยที่แสดงฤทธิ์มาแยกองค์ประกอบทางเคมี เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ พร้อมทั้งทำการ

แยก fraction อื่นๆที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ เพื่อนำสารที่สกัดแยกได้ทั้งหมดไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ทราบชนิดของสารด้วยวิธี spectroscopy ต่อไป



ภาพที่ 7 ผังการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี column chromatography

การแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ hexane

นำสารสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane หนัก 9.60 g แยกผ่าน column chromatography ตามระบบดังนี้

Packing material: Silica gel 60 (230-400 mesh) column (250 g, 4.5 X 40 cm)

Eluting solvents: Hexane: Ethyl acetate (19:1 - 4:1) gradient elution

จากนั้นตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC ตามระบบดังนี้

Stationary phase: Silica gel GF254 (TLC plate 2.5 X 8 cm)

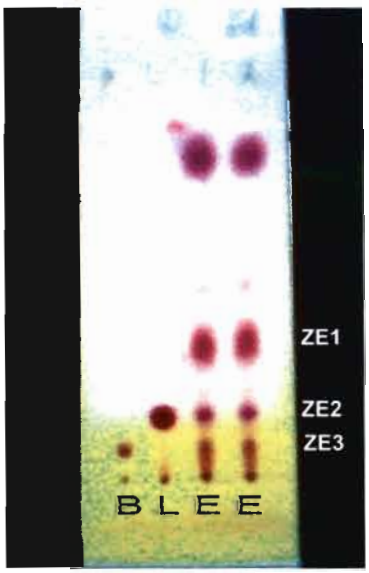
Mobile phase: Hexane-Ethyl acetate (95:5)

Detection: Anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent, ให้ความร้อน 110 °C (10 นาที)

ผลจากการแยกสารสกัดหยาบ hexane ผ่าน column chromatography พบสารสำคัญชนิด long chain alcohol, lupenone (ZE1), lupeol (ZE2) และ stigmasterol (ZE3) ซึ่งถูกตรวจสอบด้วยวิธี TLC **(รูปที่ 8)**

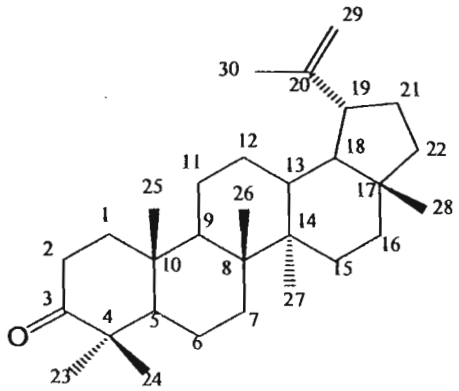
จากรูป สาร ZE2 ที่แยกจากสารสกัดหยาบ hexane (E) ด้วยระบบตัวทำละลาย hexane-ethyl acetate (95:5) มีค่า R_f = 0.16 ซึ่งตรงกับ spot ของสารมาตรฐาน lupeol (L) ในขณะที่ สาร ZE3 มีค่า R_f = 0.07 ซึ่งมี spot ตรงกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B)

นอกจากการตรวจสอบสารสำคัญที่แยกได้จาก column chromatography ด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีในห้องปฏิบัติการในเบื้องต้นแล้ว ยังตรวจสอบสารสำคัญดังกล่าวด้วยการพิสูจน์สูตรโครงสร้างเคมีเพื่อทราบชนิดของสารด้วยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR)



ภาพที่ 8 แสดง spots ของสารสกัดหยาบ hexane (E) ที่ถูกแยกบน TLC plate เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) และ lupeol (L)

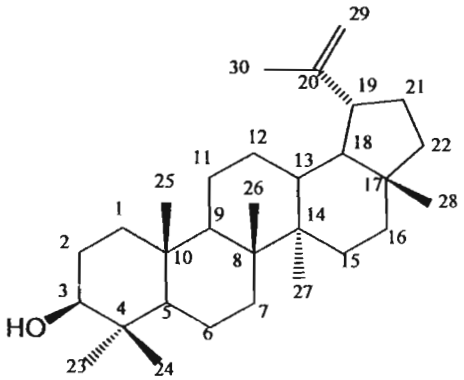
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE1 และ lupenone (in $CDCl_3$)



Position	ZE1	Lupenone
1	39.6	39.6
2	34.1	34.1
3	218.3	218.3
4	47.4	47.3
5	55.0	54.9
6	19.7	19.7
7	33.6	33.6
8	40.8	40.8
9	49.8	49.7
10	36.9	36.9
11	21.5	21.6
12	26.7	26.7
13	38.2	38.1
14	42.9	42.9
15	27.5	27.4
16	35.6	35.4
17	43.0	43.0
18	48.3	48.8
19	48.0	47.9
20	150.9	150.6
21	29.8	29.9
22	40.0	40.0
23	25.2	26.7
24	21.1	21.0
25	16.0	16.0
26	15.8	15.8
27	14.5	14.5
28	18.0	18.0
29	109.4	109.2
30	19.3	19.3

Fang *et al.*, 1984

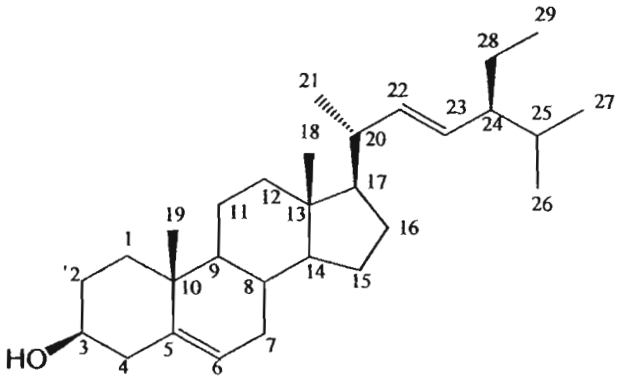
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE2 และlupeol (in $CDCl_3$)



Position	ZE2	Lupeol*
1	38.7	38.7
2	27.4	27.4
3	78.9	78.8
4	38.8	38.8
5	55.3	55.2
6	18.3	18.3
7	34.2	34.2
8	40.8	40.8
9	50.4	50.4
10	37.1	37.1
11	20.9	20.9
12	25.1	25.1
13	38.0	38.0
14	42.9	42.9
15	27.3	27.4
16	35.5	35.5
17	42.8	42.9
18	48.3	48.2
19	47.9	47.9
20	150.8	150.6
21	29.8	29.8
22	39.9	39.9
23	27.9	28.0
24	15.3	15.4
25	16.0	16.1
26	15.9	15.9
27	14.5	14.5
28	17.9	18.0
29	109.2	109.2
30	19.2	19.3

*Ahmad *et al.*, 1985

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZE3 และ stigmasterol (in $CDCl_3$)



Position	ZE3	Stigmasterol
1	37.2	37.2
2	31.6	31.6
3	71.8	71.8
4	42.3	42.3
5	140.7	140.7
6	121.6	121.7
7	31.8	31.9
8	31.9	31.9
9	50.1	50.1
10	36.5	36.5
11	21.1	21.1
12	39.6	39.7
13	42.2	42.3
14	56.8	56.9
15	24.3	24.3
16	28.8	28.9
17	55.9	55.9
18	12.0	12.0
19	19.3	19.4
20	40.4	40.5
21	21.0	21.1
22	138.2	138.3
23	129.3	129.3
24	51.2	51.2
25	31.9	31.9
26	21.0	21.2
27	18.9	19.0
28	25.3	25.4
29	12.1	12.2

De-Eknamkul and Potduang, 2003

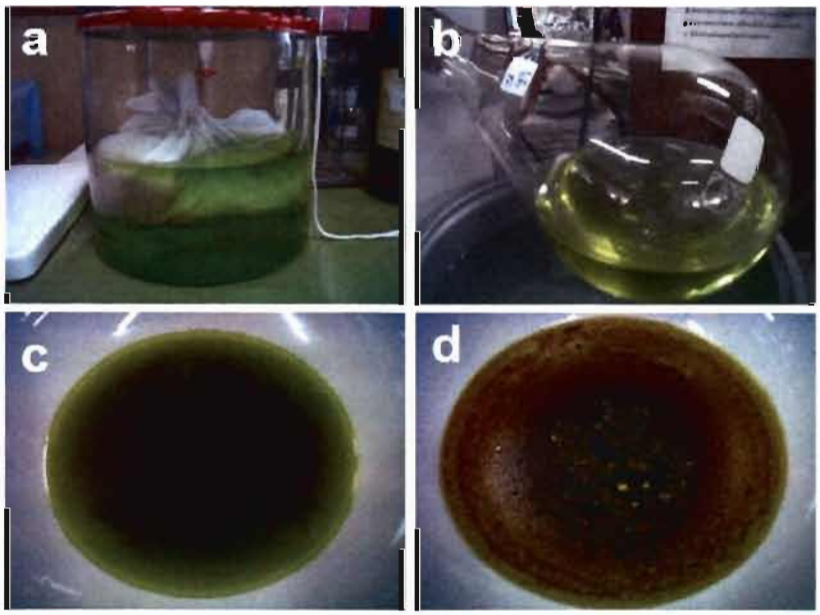
จากการเปรียบเทียบค่า chemical shift จาก ^{13}C-NMR spectra ของสาร ZE1, ZE2, ZE3 พบว่าตรงกับสาร lupenone, lupeol และ stigmasterol ที่เคยมีรายงานมาก่อนตามเอกสารอ้างอิง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ดังกล่าวที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ hexane เป็นสาร lupenone (20.9 mg), lupeol (171.1 mg) และ

1958562917

stigmasterol (145.2 mg) ซึ่งสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ทั้งนี้มีข้อสังเกตุจากการพิสูจน์เอกลักษณ์สารด้วยวิธี TLC สารตัวอย่าง ZE3 ที่แยกได้มีค่า R_f ตรงกันกับ สารมาตรฐาน β-sitosterol ในระบบตัวทำละลายเดียวกัน แต่เมื่อนำมาพิสูจน์สูตรโครงสร้างด้วย NMR จึงพบว่าสารดังกล่าวคือ stigmasterol ดังนั้นแสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของวิธีการตรวจด้วย TLC ว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสาร ทั้ง 2 ชนิด (stigmasterol และ β-sitosterol) ออกจากกันได้

การสกัดและแยกสารสำคัญจากเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2

เปลือกขี้หนอนส่วนที่เหลือจากการแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane ถูกนำมาแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 (3 รอบๆละ 3 ลิตร) สารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละครั้งถูกนำมารวมกันแล้วระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีดำอมเขียว น้ำหนักสารสกัดหยาบ 3.70 g คิดเป็น 0.37 % yield (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงการแช่สกัดเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2

a. เปลือกขี้หนอนบดแห้งบรรจุในห่อผ้าขาวแช่สกัดด้วย CH_2Cl_2
b. สารสกัดสมบูรณ์มีสีเขียวทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator
c. สารสกัดเข้มข้นมีสีเขียวเข้ม ระเหยแห้งบน water bath
d. สารสกัดหยาบมีลักษณะเป็นของแข็งสีดำอมเขียว

การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 ด้วยวิธี TLC

TLC conditions

Stationary phase: Silica gel GF254 (TLC plate 2.5 X 8 cm)

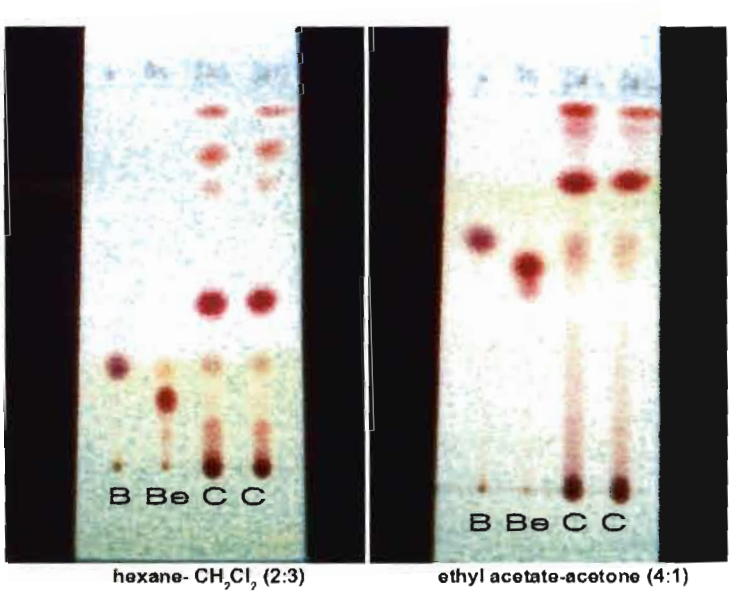
Mobile phase: a) Hexane- CH_2Cl_2 (2:3)

b) Ethyl acetate-Acetone (4:1)

Detection: Anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent ให้ความร้อน 110 °C (10 นาที)

การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 ด้วย TLC นอกจากจะตรวจสอบชนิดของสารสำคัญแล้วยังเป็นการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้แยกสารสำคัญผ่าน column chromatography อีกด้วย

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 มีองค์ประกอบเคมีคล้ายกับที่พบในสารสกัดหยาบ hexane โดยพบ spot ของสารสำคัญที่ตรงกันกับสารมาตรฐาน β-sitosterol และ spot ของสารสำคัญที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายขั้วต่ำ [Hexane- CH_2Cl_2 (2:3)] ซึ่งมีค่า R_f มากกว่าสารมาตรฐาน β-sitosterol ซึ่งคล้ายกับที่พบในสารสกัดหยาบ hexane แต่เมื่อเพิ่มความมีขั้วของระบบตัวทำละลายให้สูงขึ้น [Ethyl acetate-Acetone (4:1)] กลับไม่พบ spot ของสารสำคัญอื่นๆที่คาดว่าจะมีขั้วสูง ซึ่งจะมีค่า R_f น้อยกว่าสารมาตรฐาน betulin ที่ใช้เปรียบเทียบ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดง spots ของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (C) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol (B) และ betulin (Be)

การแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 ด้วย column chromatography และการพิสูจน์เอกลักษณ์

นำสารสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 หนัก 3.70 g แยกผ่าน column chromatography ตามระบบดังนี้

Packing material: Silica gel 60 (230-400 mesh) column (150 g, 4.5 X 23 cm)

Eluting solvents: Hexane: CH_2Cl_2 (2:3 → 0:1), CH_2Cl_2: MeOH (1:0 → gradient elution

จากนั้นตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC ตามระบบดังนี้

Stationary phase: Silica gel GF254 (TLC plate 2.5 X 8 cm)

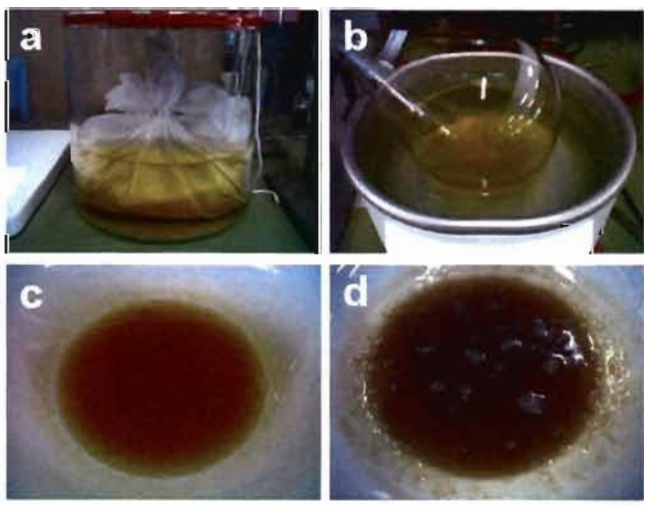
Mobile phase : Hexane- CH_2Cl_2 (1:4)

Detection: Anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent ให้ความร้อน 110 °C (10 นาที)

ผลการแยกสารพบว่าได้สารสำคัญซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 อยู่ 2 ชนิดคือ ZC1 และ ZC2 ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี TLC และพิสูจน์สูตรโครงสร้างเคมีด้วย NMR พบว่าสารสำคัญ ZC1 คือสาร lupeol (112.5 mg) และ สาร ZC2 คือ stigmasterol (19.4 mg) ซึ่งพบในสารสกัดหยาบ hexane ด้วย

การสกัดและแยกสารสำคัญจากเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย MeOH

เปลือกขี้หนอนส่วนที่เหลือจากการแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 ถูกนำมาแช่สกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH (3 รอบๆละ 3 ลิตร) สารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละครั้งถูกนำมารวมกันแล้วระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ MeOH มีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลว ข้นหนืดสีน้ำตาล มีน้ำหนัก 113.25 g คิดเป็น 11.33 % yield (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงการแช่สกัดเปลือกขี้หนอนด้วยตัวทำละลาย MeOH

a. เปลือกขี้หนอนบดแห้งบรรจุในห่อผ้าขาวแช่สกัดด้วย MeOH
b. สารสกัดสมบูรณ์มีสีเหลืองเข้มทำให้เข้มข้นด้วย rotary evaporator
c. สารสกัดเข้มข้นมีสีน้ำตาล ระเหยแห้งบน water bath
d. สารสกัดหยาบมีลักษณะข้นหนืดสีน้ำตาลเข้ม

การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ MeOH ด้วยวิธี TLC

<u>TLC conditions</u>

Stationary phase: Silica gel GF254 (TLC plate 2.0 X 8 cm)

Mobile phase: a) CH_2Cl_2- MeOH (4:1)

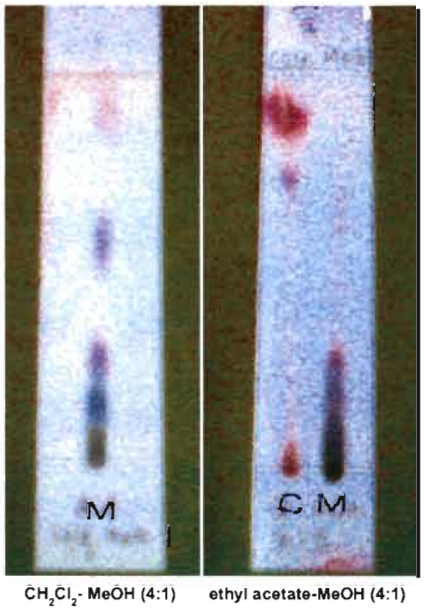
b) Ethyl acetate-MeOH (4:1)

Detection: Anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent ให้ความร้อน 110 °C (10 นาที)

การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ MeOH ด้วย TLC นอกจากจะตรวจสอบชนิดของสารสำคัญแล้วยังเป็นการศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะใช้แยกสารสำคัญผ่าน column chromatography ที่ใช้ silica gel เป็น stationary phase อีกด้วย

ผลการศึกษาพบ spots ของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบเคมีในสารสกัดหยาบ MeOH อย่างน้อย 4 ชนิด ซึ่งถูกแยกบน TLC plate และสามารถตรวจสอบได้ด้วย anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent อย่างไรก็ตามเมื่อเปลี่ยนระบบตัวทำละลายโดยใช้ ethyl acetate เป็นส่วนผสมผลพบว่าสารสกัดหยาบ MeOH ถูกแยกได้ไม่ดีเท่ากับระบบตัวทำละลายที่มี CH_2Cl_2 เป็นส่วนประกอบ และเมื่อนำสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 มา spot เปรียบเทียบในระบบตัวทำละลาย Ethyl acetate-MeOH (4:1) พบ spot ของสารที่มีขั้วต่ำอยู่บริเวณ solvent front บน TLC plate ซึ่งคาดว่าจะเป็นสาร lupeol และ stigmasterol ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ hexane และ CH_2Cl_2 ในขณะเดียวกันไม่พบ spot ของสารอื่นๆที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 ที่มีขั้วสูงกว่าสารสำคัญ 2 ชนิดข้างต้น

ดังจะเห็นได้ว่าระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2- MeOH (4:1) สามารถแยกสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดหยาบ MeOH ได้ดี จึงใช้ระบบตัวทำละลายดังกล่าวในการแยกสารสำคัญผ่าน column chromatography (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดง spots ของสารสกัดหยาบ MeOH (M) ที่ถูกแยกบน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (C)

การแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ MeOH ด้วย column chromatography และการพิสูจน์เอกลักษณ์

นำสารสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH หนัก 30.0 g แยกผ่าน column chromatography ตามระบบดังนี้

Packing material: Silica gel 60 (230-400 mesh) column (400 g, 10 X 15 cm)

Eluting solvents: CH_2Cl_2: MeOH (4:1→3:2) gradient elution

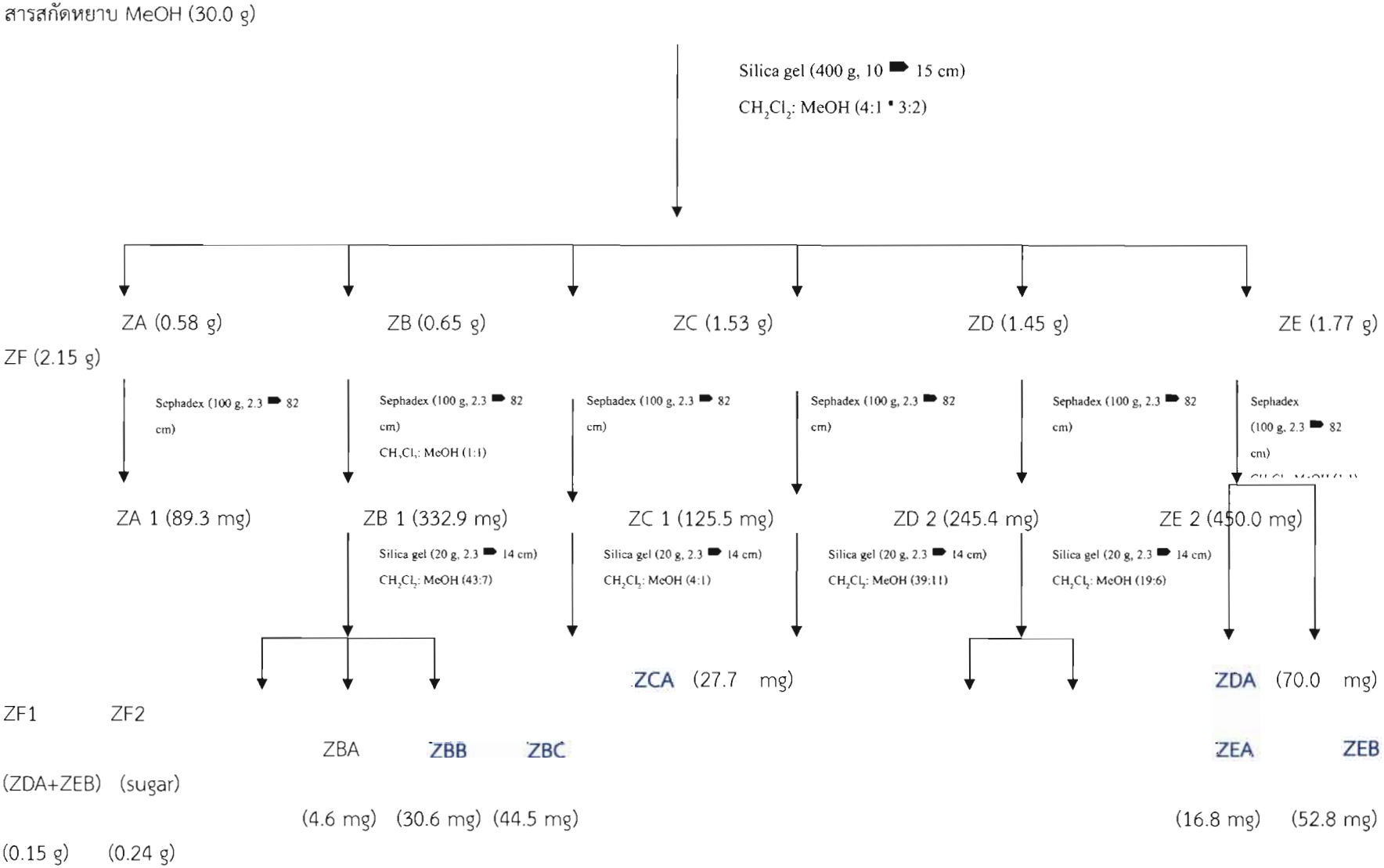
จากนั้นตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC ตามระบบดังนี้

Stationary phase: Silica gel GF254 (TLC plate 2.5 X 8 cm)

Mobile phase: CH_2Cl_2: MeOH (4:1)

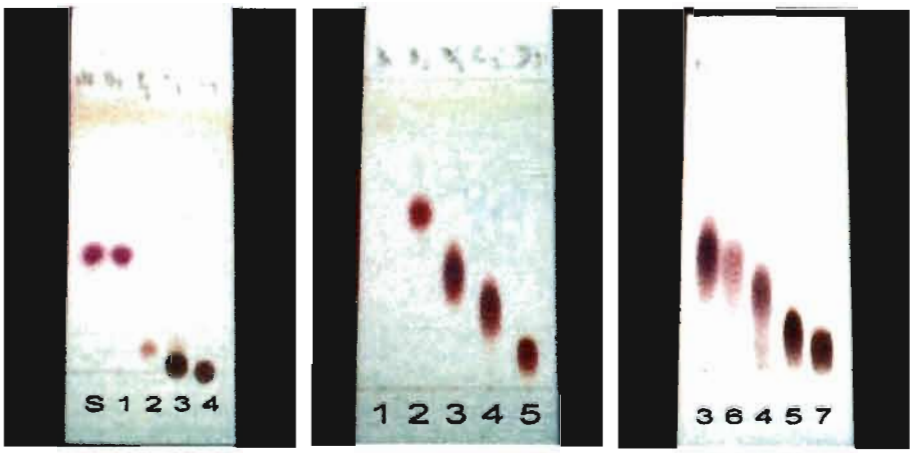
Detection: Anisaldehyde-sulfuric acid spray reagent ให้ความร้อน 110 °C (10 นาที)

ผลการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ MeOH ผ่าน column chromatography ตามระบบข้างต้น สามารถแบ่งกลุ่มของสารสำคัญตาม polarity เป็นกลุ่มย่อยๆได้ 6 subfractions (ZA-ZF) จากนั้นนำแต่ละ subfraction ไปแยกสารสำคัญจนได้สารชนิดเดี่ยวๆ วิธีการแยกสารสำคัญแสดงในภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงการแยกสารสำคัญจากสารสกัดหยาบ MeOH ด้วยวิธี column chromatography

จากการแยกองค์ประกอบเคมีที่พบในสารสกัดหยาบ MeOH จนได้สารสำคัญซึ่งเป็นสารชนิดเดี่ยวด้วยวิธี column chromatography นำสารสำคัญได้แก่ ZBA, ZBB, ZBC, ZCA, ZDA, ZEA และ ZEB มาตรวจสอบเอกลักษณ์เคมีเบื้องต้นด้วย TLC (ภาพที่ 14)

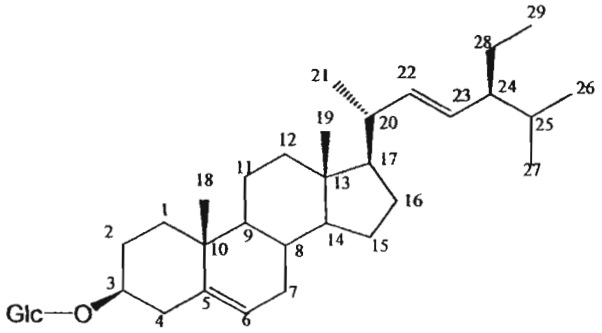


ภาพที่ 14 แสดง spots ของสารสำคัญ ZBA (1), ZBB (2), ZBC (3), ZCA (4), ZDA (5), ZEA (6) และ ZEB (7) บน TLC plate ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนที่ 2 ระบบ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน stigmasterol glucoside (S)

จากผลการตรวจสอบเอกลักษณ์เคมีของสารสำคัญทั้ง 7 ชนิดที่แยกได้ข้างต้นด้วยวิธี TLC พบว่าสาร ZBA (1) มี spot ของสารบน TLC plate ตรงกันกับสารมาตรฐาน stigmasterol glucoside (S) ซึ่งมีค่า R_f = 0.41 ในระบบตัวทำละลาย CH_2Cl_2- MeOH (9:1) เมื่อเพิ่มความมีขั้วของระบบตัวทำละลายให้สูงขึ้นเป็น CH_2Cl_2- MeOH (4:1) พบ spot ของสารสำคัญที่มีขั้วสูงกว่า ZBA (1) เคลื่อนที่บน TLC plate ได้เพิ่มมากขึ้นเรียงตามลำดับได้แก่ ZBB (2, R_f = 0.55), ZBC (3, R_f = 0.36), ZEA (6, R_f = 0.34), ZCA (4, R_f = 0.24), ZDA (5, R_f = 0.10) และ ZEB (7, R_f = 0.07) ทั้งนี้การพิสูจน์เอกลักษณ์เคมีเบื้องต้นด้วยวิธี TLC นอกจากจะทราบความบริสุทธิ์ของสารแล้ว spot ของสารบน TLC plate ที่ถูก spray ด้วย anisaldehyde-sulfuric acid reagent ยังสามารถบอกกลุ่มของสารสำคัญได้อย่างคร่าวๆ ซึ่ง spot ของสารทั้งหมดที่แยกได้ แสดงสีชมพูจนถึงม่วงเข้ม หมายถึงสารสำคัญนี้อาจจะเป็นสารในกลุ่ม steroid, terpenoids หรือ saponin อย่างไรก็ตามเพื่อทราบชนิดและสูตรโครงสร้างเคมีของสารจึงนำสารสำคัญทั้ง 7 ชนิดที่แยกได้ไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างเคมีด้วยวิธี NMR

ผลการศึกษาโครงสร้างเคมีของสารสำคัญจาก NMR spectra พบว่า สาร ZBA (1) ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วน้อยที่สุดที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ MeOH เป็นสาร stigmasterol glucoside ซึ่งสอดคล้องกับผล TLC อย่างไรก็ตามสาร stigmasterol glucoside ยังพบใน subfraction ZA1 อีกด้วย ข้อมูล ^{13}C-NMR ของสารสำคัญแสดงในตารางที่ 5 และ 6

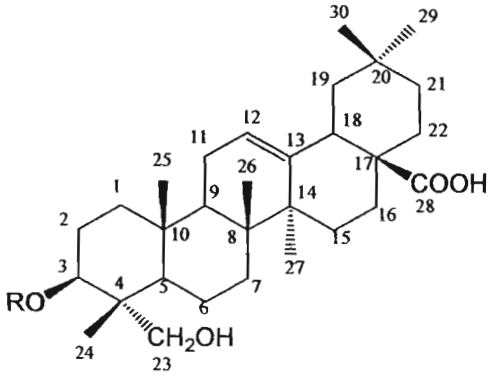
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZBA (1) และ stigmasterol glucoside (in C_5D_5N)



Position	ZBA	Stigmasterol glucoside*
1	37.4	37.4
2	29.2	28.5
3	78.1	78.1
4	39.3	39.2
5	140.9	140.8
6	121.8	121.9
7	32.1	32.1
8	32.0	32.0
9	50.3	50.3
10	36.9	36.9
11	21.2	21.2
12	39.8	39.9
13	42.3	42.5
14	56.9	56.8
15	24.5	24.5
16	29.5	29.4
17	56.0	56.2
18	12.1	12.0
19	19.4	19.4
20	36.3	36.4
21	19.1	19.0
22	138.7	137.3
23	129.4	128.3
24	51.4	51.0
25	25.6	26.3
26	21.4	20.0
27	19.2	19.2
28	30.2	29.9
29	12.4	12.2

*El-Askary, 2005

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า ^{13}C (75 MHz) NMR chemical shift (in ppm) ของสาร ZBB (2), ZBC (3), ZCA (4), ZDA (5) , ZEA (6) และ ZEB (7) และ hederagenin (in CD_3OD)



Position	Hederagenin*	2	3	4	5	6	7
1	39.5	39.7	39.7	39.7	39.7	39.7	39.7
2	27.4	28.9	28.9	28.9	28.8	28.9	28.9
3	73.9	82.3	82.3	82.6	82.3	82.4	82.4
4	43.3	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0
5	47.8	48.2	48.2	48.2	48.2	48.2	48.2
6	19.1	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8	18.8
7	33.5	33.5	33.4	33.4	33.4	33.4	33.4
8	40.5	40.6	40.5	40.5	40.5	40.5	40.5
9	48.4	49.0	49.0	49.0	49.0	49.0	49.0
10	37.9	37.7	37.7	37.6	37.6	37.6	37.6
11	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5
12	123.6	123.6	123.6	123.6	123.5	123.6	123.6
13	145.3	145.3	145.3	145.3	145.2	145.3	145.3
14	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0	43.0
15	28.8	28.9	28.9	28.9	28.8	28.9	28.9
16	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1	24.1
17	47.6	47.7	47.7	47.7	47.6	47.7	47.7
18	42.7	42.8	42.8	42.8	42.7	42.8	42.8
19	47.2	47.3	47.3	47.3	47.2	47.3	47.3
20	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6	31.6
21	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9	34.9
22	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8	33.8
23	67.3	64.6	64.7	64.6	64.6	64.7	64.6
24	12.7	13.7	13.8	13.8	13.8	13.8	13.8
25	16.3	16.4	16.4	16.4	16.4	16.4	16.4
26	17.6	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8
27	26.4	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5	26.5
28	181.9	182.0	181.9	182.0	181.9	182.0	181.9
29	33.6	33.6	33.6	33.6	33.6	33.6	33.6
30	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0

* Jayasinghe *et al.*, 1995

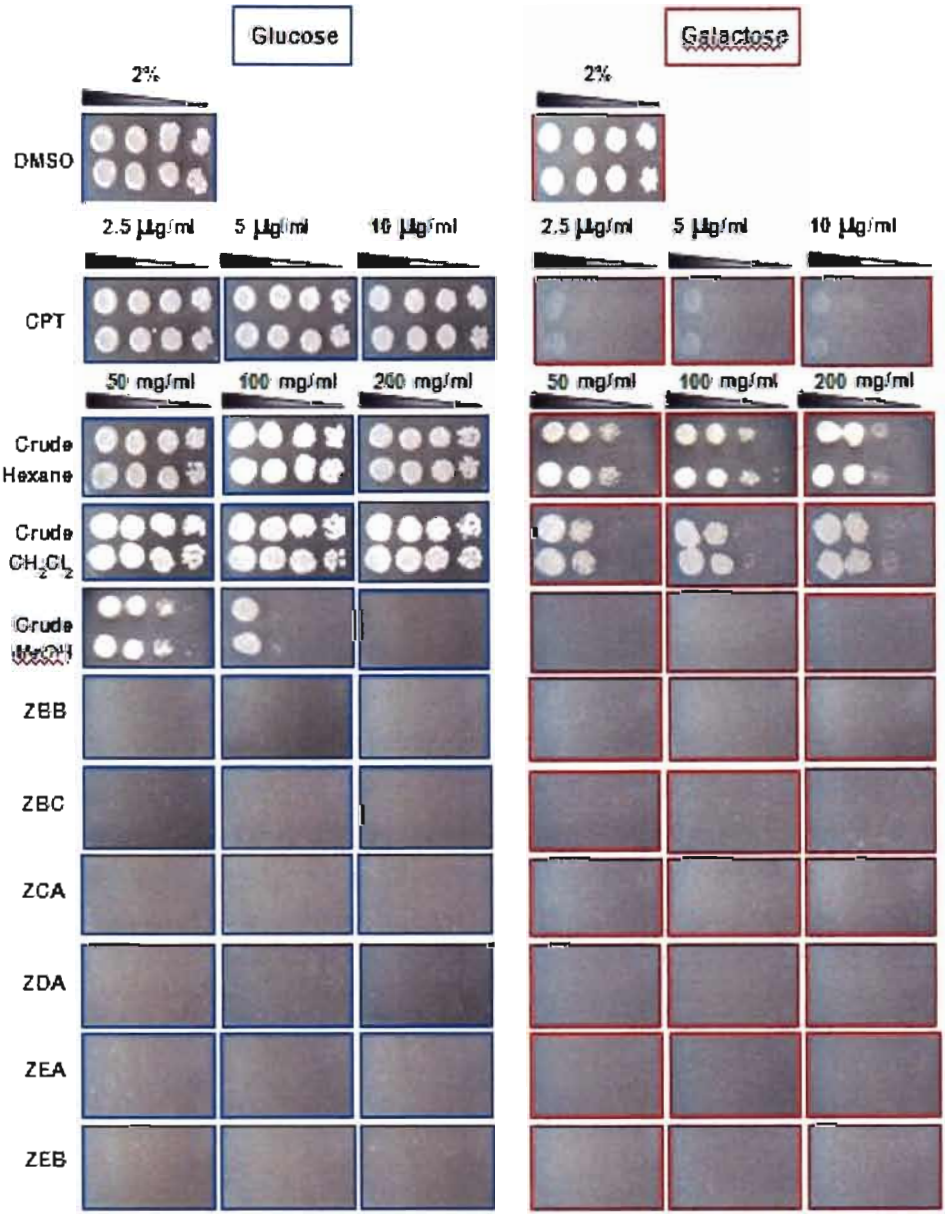
การศึกษาโครงสร้างเคมีของสารสำคัญ ZBB (2), ZBC (3), ZCA (4), ZDA (5) , ZEA (6) และ ZEB (7) ด้วยวิธี NMR พบว่าสารสำคัญดังกล่าวทั้งหมดเป็นสารกลุ่ม saponin ที่มีส่วน aglycone เป็นชนิด hederagenin โดยเปรียบเทียบค่า ^{13}C-NMR chemical shift ของสารดังกล่าวทั้งหมดกับสาร hederagenin

ที่เคยมีรายงานมาก่อน ดังแสดงในตารางที่ 5 อย่างไรก็ตามสาร 2-7 มีค่า chemical shift แตกต่างกับ hederagenin ตรงตำแหน่ง C-3 และ C-23 ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของหมู่แทนที่ (R) บริเวณตำแหน่ง C-3 ของโครงสร้าง aglycone ซึ่งมีหมู่น้ำตาลมาเชื่อมต่อด้วยพันธะแบบ *O*-glycoside ดังนั้นสารสำคัญดังกล่าวจึงเป็น hederagenin glycosides

แม้ว่าสาร 2-7 ที่แยกได้จะเป็นสารกลุ่ม saponin ชนิด hederagenin glycosides เหมือนกันแต่ก็เป็นสารคนละชนิดกัน เนื่องจากผลการศึกษาด้วยวิธี TLC ในระบบตัวทำละลายเดียวกัน พบว่าสารสำคัญทั้งหมดมีค่า R_f ต่างกันซึ่งแสดงถึงความมีขั้วของสารที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของหมู่น้ำตาลบนโครงสร้างสารซึ่งอาจเป็นน้ำตาลคนละชนิดรวมถึงจำนวนหมู่น้ำตาลที่แทนที่บนโครงสร้างเคมีของสาร ซึ่งจะต้องทำการวิเคราะห์ต่อไป

การสกัดแยกสารสำคัญจากเปลือกต้นขี้หนอนโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นตัวนำ

นำ fraction ต่างๆ ที่ได้จากการแยกสารมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I โดยใช้เชลล์ยีสต์ ได้ผลดังภาพที่ 15 ซึ่งพบว่าสารสกัด methanol แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ดีกว่าสารสกัด hexane และสารสกัดจาก dichloromethane เมื่อทำการทดสอบสารในกลุ่ม saponin glycosides ทั้ง 6 ชนิดที่แยกได้จากส่วน methanol พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ทั้งหมด



ภาพที่ 15 การเจริญเติบโตของยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอนเมื่อเติมสารสกัดจากขี้หนอนที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหยดยีสต์ 5 ไมโครลิตร ที่เจือจางความเข้มข้นของยีสต์ให้ลดลงทีละ 10 เท่าตามลำดับจากซ้ายไปขวา; (ภาพกรอบสีน้ำเงิน) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน; (ภาพกรอบสีแดง) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I ของสิ่งสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี โดยการใช้เซลล์ยีสต์ พบว่าสิ่งสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรจำนวน 40 ชนิด 45 ตัวอย่าง มีจำนวน 4 ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอโซเมอเรส I ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกขี้หนอน *(Zollingeria dongnaiensis)*, ใบเข็มขาว (*Ixora ebarbata*), ใบเปล้าใหญ่ (*Croton cf.kerrii*) และใบสำเภา (*Chaetocarpus castanocarpus)*

งานวิจัยนี้ได้เลือกสารสกัดจากเปลือกขี้หนอนมาทำการศึกษาต่อ ซึ่งเป็นพืชที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน เริ่มทำการแยกสารสำคัญออกจากสารสกัดหยาบเปลือกขี้หนอน โดยแยกเป็นสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย hexane สารสกัดหยาบในตัวทำละลาย dichloromethane และสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย methanol พบสารสำคัญหลายชนิด ดังนี้ พบสารในกลุ่ม triterpenoids 2 ชนิด ได้แก่ lupenone และ lupeol และสารในกลุ่ม steroid 1 ชนิด ได้แก่ stigmasterol ในสารสกัดหยาบ hexane และ dichloromethane ส่วนในตัวทำละลาย methanol นั้นพบสารสำคัญในกลุ่ม saponin ได้แก่ stigmasterol glucoside และ glycosides 6 ชนิดที่มี hederagenin เป็นส่วน aglycone

เมื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ของสารสกัดหยาบจากเปลือกขี้หนอน ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ด้วยวิธี bioassay-guided fractionation พบว่าสารสกัดหยาบ methanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส I ได้ดีที่สุดซึ่งสารออกฤทธิ์น่าจะอยู่ในสารสกัดส่วนนี้ ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม saponin glycosides จำนวน 6 ชนิดที่มี hederagenin เป็นส่วน aglycone ถึงแม้ว่าสารที่ 2-7 ที่แยกได้จะเป็นสารกลุ่ม saponin ชนิด hederagenin glycosides เหมือนกันแต่ก็เป็นสารคนละชนิดกัน เนื่องจากผลการศึกษาด้วยวิธี TLC ในระบบตัวทำละลายเดียวกัน พบว่าสารสำคัญทั้งหมดมีค่า R_f ต่างกันซึ่งแสดงถึงความมีขั้วของสารที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของหมู่น้ำตาลบนโครงสร้างสารซึ่งอาจเป็นน้ำตาลคนละชนิด รวมถึงจำนวนหมู่น้ำตาลที่แทนที่บนโครงสร้างเคมีของสาร ซึ่งจะต้องทำการวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดและจำนวนของน้ำตาลต่อไป

งานวิจัยนี้ได้สร้างองค์ความรู้พื้นฐานถึงศักยภาพของสารสำคัญในกลุ่ม saponin glycosides ชนิดที่มี hederagenin เป็น aglycone ที่มีในเปลือกขี้หนอนที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ซึ่งเป็นเป้าหมายหนึ่งของการใช้เป็นยาต้านมะเร็ง

เอกสารอ้างอิง

1. จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. (2550). **ระบบพันธุกรรมของจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 64-65.**
2. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2548). **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 27.**
3. Ahmad VU, Bano S, Mohammed FV. (1985). Nepehinol-a new triterpene from *Nepeta hindostana*. Planta Medica. 521-523.
4. Bjornsti MA. (1991). DNA topoisomerases. Current Opinion in Stuctural Biology. 1: 99-103.
5. De-Eknamkul W, Potduang B. 2003. Biosynthesis of β-sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. Phytochemistry. 62: 389-398.
6. El-Askary H. (2005). Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. Molecules. 10: 971-977.
7. Fang S, Berry, DE Lynn, DG Hecht SM, Campbell J, Lynn WS (1984). The chemistry of toxic principles from *Maytenus nemerosa*. Phytochemistry. 23: 631-633.
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. Jayasinghe L, Shimada H, Hara N, Fujimoto Y. (1995). Hederagenin glycosides from *Pometia eximia*. Phytochemistry. 40: 891-897.
10. Osheroff N, Bjornsti MA. (2001). DNA topoisomerase protocols enzymology and drugs. United States of America: Humana Press Inc. pp. 303-313.
11. Reid RJD, Benedetti P, Bjornsti MA. (1998). Review yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. Biochemica et Biophysica Acta. 1400: 289-300.
12. Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K, (2008). Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer camptothecin in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. United States of America. 105(18): 6782-6786.
13. Webb MR, Ebeler SE. (2003). A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation. Analytical Biochemistry. 321: 22-30.

ประวัตินักผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Police Captain Suchada Sukrong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1206 00099 48 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail

   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8364 081-8196742, โทรสาร : 02-218-8357
   Email : suchada.su@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2533
ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Ph.D.	PlantPhysiology/ Biochemistry/ Molecular Biology	University of Kentucky, U.S.A.	2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Bioactivity of natural products, Plant tissue culture

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*

   7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

   1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556
   2. การศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่สร้างอัลคาลอยด์ต้านมะเร็ง: แคมโททีซิน, ทุนวิจัยทุนวิจัยเซเรบอส Cerebos Award (Thailand) 2008, ปี 2551
   3. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2551
   4. การชักนำให้เกิดรากขนของผักหลอดดอกขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการย้ายปลูก, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบสมุนไพรโดยใช้ลักษณะทางมหทรรศน์และจุลทรรศน์ โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551
6. การศึกษาความเสถียรของสีธรรมชาติเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง , โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2550
7. การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นในข้าว, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2549-2551

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)*

1. Ya-ut P, Chareonsap P, Sukrong S. **2011**. Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. Biotech Letters (accepted).
2. 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.
3. Thitikornpong W, Phadungcharoen T, Sukrong S. **2011.** Pharmacognostic evaluations of *Lagerstroemia speciosa* leaves. J of Med Plant Res. 5(8):1330-1337.
4. 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.
5. 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.
6. 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. Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, Sukrong S. **2008**. Sequencing analysis of the medicinal plant *Stemona tuberosa* and five related species existing in Thailand based on *trn*H-*psb*A chloroplast DNA. Planta Med; 74(14):1764-1766.
8. Nuchuchua O, Chaipompokin W, Maktrirat R, Phummiratch D, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus* by

molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Acta Horticulturae 786: 107-114.

9. Picheansoonthon C, Chaiyoot A, Sukrong S. **2008**. Jirawongsea, a new genus of the family Zingiberacea. Folia malaysiana. 91(1): 1-16.
10. Nuchuchua O, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants 107-111.
11. Sukrong S, Zhu S, Ruangrungsi N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. **2007**. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species *Mitragyna speciosa*. Biol Pharm Bull 30(7): 1284-1288.
12. Picheansoonthon C, Lim CK, Sukrong S, Chaiyoot A. **2007**. A new species of Caulokaempferia (Zingiberaceae) from Southern Thailand. Folia Malaysiana 8(2): 53-61.