

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ของต้นสามพันตา

Cytotoxicity of Crude Extracts and Pure Compounds of *Cleistanthus gracilis* Hook.J.



วาริ เนื่องจำนงค์

พรทิพา พินา

สุชานุช อ่อนดี

จรัญญา งามขำ

4 พ.ย. 2552

26 12 24

026/20887

การวิจัยได้รับทุนอุดหนุนประเภทเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปี 2547

เริ่มบริการ

20 พ.ย. 2552

บทคัดย่อ

กานสกัดสมุนไพรสามพันตาจากส่วนราก ลำต้น และใบ ใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 9 ส่วนสกัด นำส่วนสกัดทั้งหมดไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลิวคีเมีย (P388) พบว่า ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากราก ส่วนสกัดเฮกเซนจากใบ ส่วนสกัดเอทานอลจากราก และส่วนสกัดเอทานอลจากใบ สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้น่าสนใจ ($ED_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$) จึงนำส่วนสกัดทั้ง 4 นี้ไปแยกสารบริสุทธิ์ ได้สารบริสุทธิ์ 2 ตัว คือ Lupeol และ Stigmasterol นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ตัวนี้ไปศึกษาทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งอีกครั้ง พบว่า สาร Lupenol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่ ED_{50} ประมาณ $25 \mu\text{g/ml}$ แต่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของ Stigmasterol ซึ่งละลายไม่ดีในตัวทำละลายที่ใช้ทดสอบ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	2
2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช	6
2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี	6
2.4 การตกผลึก	9
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3 วิธีการทดลอง	
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	16
3.2 การเก็บและเตรียมสารตัวอย่าง	16
3.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว	18
3.4 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่ active	20
4 ผลการทดลอง	35
5 สรุป อภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	56
5.2 ข้อเสนอแนะ	57
บรรณานุกรม	58

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 น้ำหนักส่วนสัดต่าง ๆ ของดินสามพันตา	35
4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) ของสารสกัดจากดินสามพันตา	36
4.3 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-RT-CH	37
4.4 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2	38
4.5 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.1	38
4.6 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.5	39
4.7 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3	39
4.8 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.4	40
4.9 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.5	40
4.10 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.7	40
4.11 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 8	41
4.12 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-LE-HX	42
4.13 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 1	42
4.14 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2	43
4.15 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.1	43
4.16 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-RT-Et	44
4.17 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 1	44
4.18 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2	45
4.19 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3	45
4.20 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 4	45
4.21 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 5	45
4.22 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 6	46

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.23 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 7	46
4.24 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-LE-Et	47
4.25 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2	47
4.26 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3	48
4.27 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 4	48
4.28 ข้อมูลจาก IR- spectra ของ CG-1	49
4.29 ข้อมูลจาก ^1H -NMR spectra ของ CG-1	50
4.30 ข้อมูลจาก ^{13}C -NMR spectra ของ CG-1	51
4.31 ข้อมูลจาก IR- spectra ของ CG-2	52
4.32 ข้อมูลจาก ^1H -NMR spectra ของ CG-2	53
4.33 ข้อมูลจาก ^1H -NMR spectra ของ CG-2	54
4.34 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) ของสารสกัด บริสุทธิ์จากต้นสามพันดา	55

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
3.1 ส่วนสกัดต่างๆ ของต้นสามพันตา	17
3.2 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH	23
3.3 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 2	24
3.4 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 3	25
3.5 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 8	26
3.6 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-HX	27
3.7 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-HX Fraction ที่ 2.1	28
3.8 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et	29
3.9 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 1	30
3.10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 2	30
3.11 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 3	31
3.12 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 4	31
3.13 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 5	32
3.14 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 6	32
3.15 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 7	33
3.16 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-Et	34

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ความหลากหลายทางวัฒนธรรม และภูมิปัญญาพื้นบ้าน โดยเฉพาะการใช้สมุนไพรบำบัดโรคภัย การใช้เข็ม ความรู้จำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายเหล่านี้กำลังจะสูญหายไป พืชสมุนไพรจำนวนมากกำลังจะสูญพันธุ์ ผู้รู้จำนวนมากได้จากไปโดยไม่มีการถ่ายทอด และปราศจากการศึกษาอย่างต่อเนื่องเป็นระบบและเป็นวิทยาศาสตร์ความรู้เหล่านี้ที่ต่างชาติได้เห็นความสำคัญ และได้เข้ามาศึกษาหาความรู้และเก็บตัวอย่างไปศึกษาต่อ ซึ่งที่ประสบความสำเร็จก็มีตัวอย่างให้เห็น และที่กำลังดำเนินการศึกษาวิจัยอยู่ก็มีจำนวนมาก เส้นทางสู่ประเทศไทยของนักวิจัยต่างชาติยังคงดำเนินอยู่ในรูปแบบที่พลิกแพลงมากขึ้น จึงควรส่งเสริมการศึกษาและวิจัยองค์ความรู้ด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพร เนื่องจากมีราคาถูกลงและมีผลข้างเคียงน้อยกว่ายาแผนปัจจุบัน อีกทั้งในปัจจุบันสมุนไพรกำลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ ซึ่งตลาดต่างประเทศมีความต้องการสูงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และประเทศต่างๆ ในทวีปยุโรป ที่สมุนไพรส่วนมากไม่สามารถทำการผลิตได้ในประเทศเหล่านี้

ต้นสามพันดาหรือ *Cleistanthus gracilis* ก็เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอยู่ในสกุล Euphorbiaceae ที่เคยมีผู้ทำการศึกษาวิจัยพบว่า มีสารบางชนิดที่มีคุณสมบัติต้านมะเร็งได้ เช่น ในต้น *Cleistanthus collinus*⁽³⁾ พบสาร Cleistanthin A ซึ่งมีคุณสมบัติทำลายเนื้องอกได้โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายหรือ Cleistanthin B ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งซึ่งได้ทำการทดลองในหนูแฮมสเตอร์ ดังนั้นเราจึงนำต้นสามพันดาซึ่งอยู่ในสกุลดังกล่าว มาทำการศึกษาเพื่อหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในต้นสามพันดา เพื่อเป็นประโยชน์และพัฒนาการแพทย์แผนปัจจุบัน

1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของต้นสามพันดาด้วยทำละลายอินทรีย์
2. เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของส่วนสกัด
3. เพื่อทำการแยกหาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่บริสุทธิ์
4. เพื่อหาสูตร โครงสร้างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์โดยวิธีสเปกโตรสโกปี
5. เพื่อนำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง
6. เพื่อนำข้อมูลเบื้องต้นที่ได้ทั้งหมดไปบูรณาการให้เกิดการวิจัยและพัฒนาหาสารต้านมะเร็ง

จากสมุนไพรสามพันดา

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. จะได้สารบริสุทธิ์ใหม่ที่ยังไม่เคยค้นพบมาก่อน
2. จะได้สารออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งตัวใหม่
3. จะนำไปสู่การค้นพบยาต้านเซลล์มะเร็งชนิดใหม่
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์การออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดเดิมกับสารบริสุทธิ์ที่ได้
5. จะนำไปสู่การอนุรักษ์พืชสมุนไพรที่มีคุณค่าของไทยและการนำไปใช้ประโยชน์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสกัดจากจากส่วนราก ลำต้น และใบของต้นสามพันดาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล
2. นำส่วนสกัดทั้งหมดรวม 9 ส่วนไปทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง
3. นำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งสูงสุดไปทำให้บริสุทธิ์
4. หาสูตร โครงสร้างและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์โดยวิธีสเปกโตรสโกปี
5. นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็ง
6. ศึกษาการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์จะใช้เซลล์มะเร็งลิวกีเมีย ;P388 (Mouse Lymphocytic Leukemia)

บทที่ 2

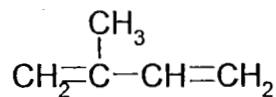
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ⁽²⁾

คำว่า “ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ” นั้น หมายถึงสารที่เกิดในธรรมชาติ เช่น กรดนิวคลีอิก ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่มีสูตรโครงสร้างเชิงซ้อนและมีหมู่ฟังก์ชันนัลหลายหมู่อยู่ในโมเลกุล ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจำนวนมากแสดงกัมมันตภาพทางชีวภาพ และทางสรีระวิทยา การจำแนกประเภทของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติไปเป็นสารประกอบกลุ่มใดเฉพาะนั้นเป็นสิ่งลำบาก ทั้งนี้เพราะโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีโครงสร้างเชิงซ้อนหลายหมู่ฟังก์ชันนัล อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ที่จะแบ่งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติให้เข้าไปอยู่ในกลุ่มต่างๆ โดยอิงโครงสร้างหลักของโครงสร้างโมเลกุลเป็นบรรทัดฐาน โดยเกณฑ์ดังกล่าวผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจึงแบ่งเป็นสองหมู่ใหญ่ หมู่แรกเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่โมเลกุลมีโครงสร้างหลักที่มีเฉพาะคาร์บอนอะตอมอยู่ในรูปแบบเป็นโซ่หรือเป็นวงแหวน เช่น เทอร์พีน (terpenes) และสเตอรอยด์ (steroids) ส่วนอีกกลุ่มเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีวงแหวนเฮกซะโรไซคลิกหรือวงแหวนที่มีออกซิเจน ไนโตรเจน หรือซัลเฟอร์อะตอมอยู่ด้วย

2.1.1 เทอร์พีน

เทอร์พีนเป็นหมู่ใหญ่ของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ในโมเลกุลจะมีหน่วยไอโซพรีน (isoprene) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของยางธรรมชาติรวมกันอยู่ เทอร์พีนทั้งหมดจะมีหน่วยของไอโซพรีนหนึ่งหน่วยหรือมากกว่านั้นขึ้นไป เป็นโครงสร้างคาร์บอน



isoprene

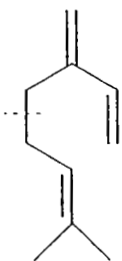
ไอโซพรีนไม่พบเป็นอิสระในธรรมชาติและไม่เป็นตัวนำไปสู่การเกิดเทอร์พีนโดยชีวภาพ แม้ว่าไอโซพรีนจะเป็นส่วนหนึ่งของหน่วยโครงสร้างโมเลกุลก็ตาม

เทอร์พีนเป็นส่วนประกอบที่ทำให้เกิดมีกลิ่นหอมในพืช น้ำมันหลายชนิดที่เราคุ้นเคยนั้นเป็นเทอร์พีน บางชนิดเป็นน้ำหอม เป็นยา เป็นตัวทำลายล้าง คำว่าเทอร์พีนมาจาก trepentin ซึ่งเป็นคำเก่ามาจาก turpentine

2.1.2 มอนเทอร์พีน

เทอร์พีนเชิงเดี่ยวหรือมอนเทอร์พีน เป็นไดเมอร์ของไอโซพรีน เป็นสารประกอบไม่อิ่มตัว มีสูตรโมเลกุลพื้นฐานเป็น $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีนห้าคาร์บอนสองหน่วยซึ่งตามปกติจะเชื่อมโยงกันเข้าที่คาร์บอนหนึ่งและสี่

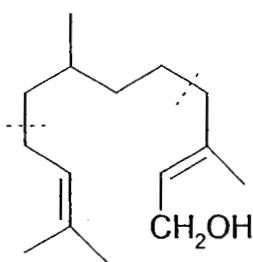
โมโนเทอร์พีนส่วนใหญ่เป็นสารประกอบระเหยและเป็นส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ในพืชน้ำมันเหล่านี้ให้กลิ่นหรือรสชาติของพืช เช่น ไมร์ซีน (myrcene) ได้จาก bayberry wax หรือ bay oil หน่วยไอโซพรีนแต่ละหน่วยในโมเลกุลจะแสดงให้เห็นเป็นเส้นประ ทั้งนี้เพื่อให้เห็นหน่วยของไอโซพรีนต่อกันเข้าเป็นพันธะ



myrcene

2.1.3 เซสควิเทอร์พีน

เซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) ประกอบด้วยหน่วยไอโซพรีนสามหน่วยเป็นสารประกอบ C_{15} มีโครงสร้างแปรผันได้มาก ตัวอย่างเช่น ฟาร์เนซอล (farnesol) เป็นแอลกอฮอล์อะไซคลิกแยกได้จากน้ำมัน citronella มีกลิ่นคล้ายดอกลิลลี่ตามหุบเขา เป็นอินเทอร์มีเดียตที่สำคัญในการสังเคราะห์ไตรเทอร์พีน และสเตอรอยด์



farnesol

2.1.4 ไดเทอร์พีนและไตรเทอร์พีน

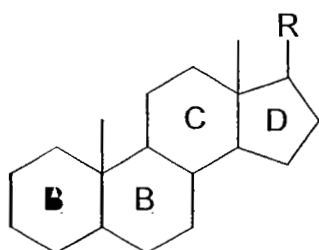
ไดเทอร์พีน (diterpene) เป็นสารประกอบที่มีไอโซพรีนสี่หน่วย มีคาร์บอนอะตอม 20 อะตอม ส่วนไตรเทอร์พีน (triterpene) เป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนอะตอม 30 อะตอม หรือประกอบด้วยไอโซพรีนหกหน่วย

ตัวอย่างของไดเทอร์พีน ได้แก่ วิตามินเอ กรดอะบีติก (abietic acid) หรือยางสน (pine resin) ซึ่งได้จากส่วนที่เหลือของน้ำมันสน

ไตรเทอร์พีนที่สำคัญได้แก่ ซควาลีน (squalene) และลาโนสเตอรอล (lanosterol) ซควาลีนได้แก่น้ำมันตับฉลาม ส่วนลาโนสเตอรอลได้จากไขมันขนแกะ สารทั้งสองมีความสำคัญในการนำไปสู่การสังเคราะห์สเตอรอยด์โดยกระบวนการชีวะ

2.1.5 สเตอรอยด์

สเตอรอยด์เป็นหมู่ของลิปิดซึ่งไม่ถูกซาฟอนนิไฟด์โดยเบสไปเป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอลสเตอรอยด์เป็นส่วนประกอบของไขมันสัตว์และพืช ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปแบบของแอลกอฮอล์แข็งที่เรียกว่า สเตอรอล (sterol) สเตอรอยด์เป็นจำนวนมากมีหมู่โมเลกุลที่มีฟังก์ชันทางชีวภาพและสรีรวิทยา โครงสร้างพื้นฐานของสเตอรอยด์เป็นระบบวงแหวน สามวงแหวนชนิดหก เมมเบอร์ริงและหนึ่งวงแหวนชนิดห้า เมมเบอร์ริงมาหลอมเป็นระบบวงแหวนสามวงแหวนชนิดหก เมมเบอร์ริงและหนึ่งวงแหวนชนิดห้า เมมเบอร์ริงมาหลอมเป็นวงแหวนเข้าด้วยกันในโครงสร้างจะมีคาร์บอนอะตอมทั้งหมดสิบเจ็ดคาร์บอนอะตอม ระบบวงแหวนสเตอรอยด์เทอร์ไฮโดรคาร์บอนนั้นนิวเคลียสเป็นเพอร์ไฮโดรไซโคลเพนแทนฟีแนนทรีน (perhydrocyclopentanophenanthrene nucleus)



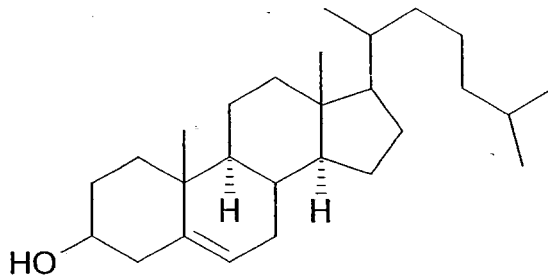
ระบบวงแหวนสเตอรอยด์

กำหนดวงแหวนเป็นตัวอักษร A, B, C และ D ตามลำดับ สเตอรอยด์ส่วนใหญ่มีหมู่เมทิลสองหมู่เกาะเรียกว่าหมู่เมทิลแองกูลาร์ (angular methyl group)

2.1.6 คอเลสเตอรอล

สเตอรอยด์ที่รู้จักกันดีคือ คอเลสเตอรอล ความสนใจในเคมีสเตอรอยด์และการวิจัยในเรื่องนี้ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนับตั้งแต่ได้มีการชี้ให้เห็นโครงสร้างของคอเลสเตอรอลเมื่อ 40 ปีก่อน ส่วนใหญ่คอเลสเตอรอลพบในสมองและในไขสันหลังส่วนในเซลล์ที่มีชีวิตของสัตว์นั้นพบคอเลสเตอรอลปริมาณเล็กน้อย คอเลสเตอรอลดั้งเดิมนั้นสกัดจาก gall bladder คอเลสเตอรอล มีบทบาทเข้าไปเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ฮอร์โมนในร่างกาย และนอกจากนั้นยังทำให้ผนังของเส้นโลหิตแดงแข็ง

คอเลสเตอรอลมีโครงสร้างเหมือนกันกับโครงสร้างพื้นฐานสเตอรอยด์ ในโมเลกุลของคอเลสเตอรอลมีคาร์บอนอะตอมสมมาตรแปดอะตอม ดังนั้นจึงสามารถมีสเตอริโอไอโซเมอร์ได้ 256 ไอโซเมอร์ สูตรโครงสร้างของคอเลสเตอรอลเป็นดังนี้



cholesterol

2.2 การสกัดสารสำคัญจากพืช

2.2.1 Maceration เป็นการสกัดสารสำคัญจากพืช โดยเป็นการสกัดด้วยตัวทำละลายสำหรับแยกสาร และทำให้บริสุทธิ์ เช่น การแยกสารออกจากของผสมที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ โดยการแช่สมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยหมั่นเขย่าเพื่อให้ตัวทำละลายสกัดได้อย่างทั่วถึง แล้วกรองเอาตัวทำละลายออกจากกากไป โดยการสกัดจะได้ผลดีควรทำซ้ำหลายๆ ครั้ง

2.2.2 Solid liquid extraction เป็นวิธีการที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม สกัดสารที่เป็นของแข็ง นิยมใช้สกัดสารอินทรีย์จากธรรมชาติ ตัวทำละลายที่ใช้ส่วนใหญ่ เช่น ไดคลอโรมีเทน, เฮกเซน, อะซิโตน และแอลกอฮอล์ เครื่องมือที่ใช้สกัดสารอย่างต่อเนื่อง เช่น soxhlet extraction

2.3 ทฤษฎีโครมาโทกราฟี (Chromatography)⁽¹⁾

วิธีที่ง่ายและใช้มากในการแยกสารหนึ่งออกจากสิ่งเจือปน (ทำให้สารบริสุทธิ์) หรือในการแยกสารผสมออกจากกันมี 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย (extraction) และโครมาโทกราฟี ทั้งสองวิธีนี้ใช้หลักการเดียวกันคือ phase distribution ซึ่งมีหลักอยู่ว่า สารใดสารหนึ่งอาจจะกระจายตัวอยู่ในสมดุล (equilibrium) ระหว่างวัฏภาคสองวัฏภาค (phase) ที่ไม่รวมตัวกันซึ่งสัมผัสกันอยู่ อัตราส่วนการกระจายตัวของสารแต่ละตัวในวัฏภาคทั้งสองจะขึ้นอยู่กับอัตราความคงตัว (stability) ของสารในแต่ละวัฏภาค การแยกนี้อาจจะใช้แยกสารผสมที่เป็นก๊าซ ของเหลว หรือของแข็งได้

การกระจายตัวที่กล่าวนี้แบ่งได้เป็นสองชนิดคือ

1. Partition อาศัยคุณสมบัติที่ส่วนผสมนั้นละลายได้ในตัวทำละลายซึ่งส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ต่างกัน (selective dissolution) เช่น สารอินทรีย์ละลายได้ดีในอีเทอร์ แต่เกลือส่วนมากละลายได้ดีในน้ำ หลักการนี้ปกติใช้แยกสารด้วยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย
2. Adsorption อาศัยคุณสมบัติที่ส่วนผสมซึ่งเป็นของเหลวหรือสารละลายหรือก๊าซเกาะยึดอยู่กับผิวของวัฏภาคที่เป็นของแข็งได้ต่างกัน

การแยกสารด้วยวิธีสกัดเฉพาะ partition แต่โครมาโทกราฟีใช้ทั้ง partition และ adsorption โดยหลักการของ phase distribution ประกอบด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เคลื่อนผ่าน

วัฏภาคทั้งสองซึ่งอยู่กับที่ (stationary phase) ส่วนผสมที่มีสารต่างๆซึ่งมีอัตราการกระจายตัวในวัฏภาคทั้งสองนั้นไม่เท่ากัน เมื่อวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านไปมากขึ้นจะทำให้สารผสมแยกออกจากกันเป็นแถบอยู่บน stationary phase แถบเหล่านี้ยิ่งเคลื่อนที่ไปไกลเท่าใด สารต่างๆก็จะแยกจากกันได้ดีขึ้น

2.3.1 Column Chromatography

วิธีนี้ใช้คอลัมน์แก้วบรรจุตัวดูดซับ นำสารที่ต้องการแยกใส่ในคอลัมน์เดิมตัวทำละลายลงไป ตัวทำละลายจะค่อยๆพาสารที่ต้องการให้เคลื่อนที่ลงไปด้วยอัตราความเร็วที่ต่างกันจนในที่สุดจะได้แถบสีของแต่ละสารแยกออกจากกัน การที่สารในของผสมแยกออกจากกันได้ดีก็เนื่องจากว่าแต่ละสารถูกดูดซับในอัตราที่ไม่เท่ากัน สารที่ถูกดูดไว้มากกว่าย่อมเคลื่อนที่ลงมาช้ากว่า จากหลักการนี้เราสามารถแยกสารที่มี polarity ต่างกันออกจากกันได้ สารที่โพลาร์มากจะถูกดูดไว้แน่นกว่าสารที่โพลาร์น้อยกว่า

Adsorbent ที่นิยมใช้มากคือ อะลูมินา (alumina) และซิลิกาเจล (silica gel) ตัวทำละลายที่ใช้ได้มีมาก ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะให้อัตราเร็วในการแยกสารต่างๆออกจากตัวดูดซับ (eluting power) ไม่เท่ากัน ตัวทำละลายที่โพลาร์มากจะยิ่งพาสารต่างเคลื่อนที่ได้เร็วมาก ดังนั้นเราจึงเลือกตัวทำละลายที่นอนโพลาร์ (non polar) สำหรับแยกสารที่ถูกดูดซับน้อยออกมาก่อนแล้วเลือกตัวทำละลายที่โพลาร์มากขึ้นสำหรับแยกสารที่ถูกดูดซับดีขึ้นตามลำดับ ตัวทำละลายสามัญที่ใช้เรียงตามลำดับของ eluting power หรือ polarity จากน้อยไปหามาก

ถ้าต้องการตัวทำละลายที่มี eluting power พอเหมาะอาจต้องผสมตัวทำละลายสองชนิดหรือมากกว่านั้นเข้าด้วยกัน

ข้อควรระวัง เบนซีนและคาร์บอนเตตระคลอไรด์เป็นสารที่มีพิษ ถ้าจำเป็นต้องใช้ระวังอย่าให้ถูกผิวหนังหรือสูดดมโดยไม่จำเป็น

2.3.2 TLC (Thin-Layer Chromatography)

ใช้หลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี คือแบบ solid - liquid adsorption chromatography วิธีนี้ใช้ตัวดูดซับที่เป็นของแข็งเป็นชั้นหรือเป็นฟิล์มบางๆ หนา 0.25-1 มม. ติดอยู่บนแผ่นกระจก โดยมากมักจะใช้แผ่นกระจกไมโครสโคปสไลด์ เพราะสะดวกและรวดเร็วดี แล้วนำสารละลายของผสมที่จะแยกจำนวนเล็กน้อยไป spot บนตัวดูดซับที่ปลายกระจกข้างหนึ่งโดยใช้ capillary tube เมื่อตัวทำละลายระเหยไปแล้ว สารก็จะติดอยู่บนตัวดูดซับ นำแผ่นสไลด์นี้ไปใส่ภาชนะที่มีตัวทำละลายชนิดหนึ่ง (อาจเป็นตัวทำละลายผสมก็ได้) โดยให้ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร เมื่อปิดภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย ตัวทำละลายจะซึมขึ้นมาด้านบนตามแนวตั้งผ่านจุดที่สาร ของตัวทำละลายและตัวดูดซับแบบเดียวกับในวิธีคอลัมน์ ดังนั้นการที่สารแยกออกจากกันก็โดยอาศัยหลักที่ว่าสารต่างๆเคลื่อนที่หรือถูก elute ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน การที่

จะทราบว่าสารที่ไม่มีสีเคลื่อนที่มาอยู่ตรงไหน ทำให้หลายวิธีเช่นเดียวกับในวิธีคอลัมน์วิธีสะดวกมาก วิธีหนึ่งก็คือนำแผ่นสโลด์ที่มีสารนี้ไปใส่ในภาชนะปิดที่มีสารไอโอดีน สารอินทรีย์ส่วนมากจะเกิด reversible weak complex กับไอโอดีนให้จุดที่มีสีน้ำตาล เวลาใช้อาจเร็ว เช่น 5-10 นาที หรืออาจนานถึง 10-15 นาที แล้วแต่ว่าสารนั้น absorb ไอโอดีนเร็วหรือช้า

ตัวดูดที่ใช้อาจเป็นซิลิกาเจล หรืออะลูมินา เช่นเดียวกับในวิธีคอลัมน์ อำนวยในการดูดซับขึ้นอยู่กับการปริมาณของน้ำที่มีอยู่ด้วย ถ้ามีน้ำอยู่มากความสามารถในการดูดจะลดลง ในการเตรียมแผ่นสโลด์ของตัวดูดซับ ทำได้โดยคนตัวดูดซับกับตัวทำละลายจนเป็น slurry แล้วทำให้เคลือบบนแผ่นสโลด์ให้ทั่วถึงอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำแผ่นสโลด์นี้ไป activate โดยทำให้ร้อน เช่น อังหลอดไฟฟ้าหรือนำไปใส่เตาอบที่อุณหภูมิประมาณ 100-120 °C ประมาณ 10 นาที แต่ถ้าใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ก็ระเหยง่าย เช่น คลอโรฟอร์ม เมื่อเคลือบตัวดูดซับลงบนแผ่นสโลด์เรียบร้อยแล้วปล่อยให้คลอโรฟอร์มระเหยไปจนหมดก็นำแผ่นสโลด์นี้ไปใช้ได้ทันทีโดยไม่ต้องทำให้ร้อนก่อน

ตัวทำละลายที่ใช้ก็คล้ายคลึงกันหรืออาศัยหลักการเดียวกันกับวิธีคอลัมน์ และส่วนมากมักจะใช้ตัวทำละลายผสม

วิธีนี้ใช้แยกสารจำนวนน้อยออกจากกัน และสำหรับพิสูจน์ทราบสาร เพราะเหตุว่า ถ้าใช้ตัวดูดเดียวกันใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมือนกัน ที่อุณหภูมิและสถานะเดียวกัน สารหนึ่งๆจะมีค่า “rate of flow” หรือ “R value” คงที่

R_f value คือ อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่

$$R_f \text{ value} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2.3.3 PLC (Preparative Thin-Layer Chromatography)

เป็นการใช้แผ่นกระจกขนาดใหญ่เคลือบด้วยอนุภาคของแข็ง เช่น อะลูมินา ซิลิกาเจล เป็นต้นเป็นการแยกสารที่มีปริมาณน้อย มีลักษณะเหมือน TLC แตกต่างที่ขนาด โดย PLC จะมีขนาดใหญ่กว่าและเมื่อเคลือบเสร็จติดตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ก่อนนำไปเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 120 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง สารตัวอย่างจะใส่โดยการหยดลากลงไปบนแผ่น และการแยกสารจะเกิดขึ้นภายในไม่กี่ชั่วโมง จากนั้นจุดแถบที่แยกได้เติมตัวทำละลายลงไปเพื่อสกัดสารแล้วนำไประเหยตัวทำละลายให้แห้ง ซึ่งน้ำหนักสาร

2.3.4 PC (Paper Chromatography)

เปเปอร์โครมาโทกราฟี เป็น Partition chromatographyอาศัยคุณสมบัติที่สารผสมละลายในตัวทำละลายสองชนิดซึ่งไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน Stationary phase เป็นของเหลวที่มี polarity สูง ซึ่งถูกดูดซับอยู่กับ cellulose fiber ของกระดาษกรองได้แน่น mobile phase คือตัวทำละลายอินทรีย์ สารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ดีกว่าในน้ำก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า วิธีเปเปอร์โครมาโทกราฟีนี้มีประโยชน์ในการพิสูจน์ทราบสารและแยกสารที่มีปริมาณน้อยออกจากกันได้เร็วใช้แยกสารได้หลายชนิด เช่น amino acids, sugars, nucleotides, alkaloids และอื่น ๆ

เทคนิคในการทำคล้ายคลึงกับวิธี TLC มาก แต่ใช้หลักการต่างกัน ทำได้โดยเอากระดาษของสารผสมที่ต้องการจะแยกกับสารที่ต้องการเปรียบเทียบกับมา spot ด้วย capillary tube ให้แยกกันอยู่บนกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พอแห้งแล้วก็ให้เอากระดาษนี้ใส่ไปในภาชนะปิดที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ให้ส่วนปลายของกระดาษที่มีจุดของสารจุ่มอยู่ในตัวทำละลายโดยที่ระดับของตัวทำละลายอยู่ต่ำกว่าจุดของสาร ตัวทำละลายจะซึมผ่านจุดด้านบน ขณะซึมนั้นตัวทำละลายก็จะพาสารต่างๆในสารผสมให้เคลื่อนที่ไปด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากันโดยขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสาร และธรรมชาติของตัวทำละลาย ดังนั้นเมื่อทิ้งไว้ชั่วระยะเวลาหนึ่งสารต่างๆก็จะแยกออกจากสารตัวหนึ่งๆจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราคงที่ ถ้าหาใช้ระบบตัวทำละลายที่เหมือนกันที่อุณหภูมิและสภาวะเดียวกัน ค่า R_f (R_f value) ก็จะเป็นสมบัติประจำตัวของสารนั้น

$$R_f \text{ value} = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

การที่จะหาว่าสารต่างๆที่ไม่มีสีเคลื่อนที่ไปอยู่ที่ใดของกระดาษกรองนั้น เราใช้การพ่นด้วยสารเคมีบางชนิดบนโครมาโทแกรมที่แห้ง หรือฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต

2.4 การตกผลึก

สารเคมีซึ่งจะใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ นั้นจะต้องเป็นสารบริสุทธิ์แต่สารที่สังเคราะห์ขึ้นหรือที่แยกออกจากวัสดุในธรรมชาตินั้น ส่วนมากจะไม่บริสุทธิ์ คือมีสารอื่น (impurities) ปนอยู่ด้วยวิธีทำให้สารที่เป็นของแข็งให้บริสุทธิ์ที่ใช้มากอย่างหนึ่งคือการตกผลึกสารนั้นในตัวทำละลายที่เหมาะสม วิธีทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกนี้ใช้ได้เมื่อสารมีสิ่งเจือปนไม่มากนัก

ขั้นตอนของการตกผลึกมีดังนี้ คือ

1. ละลายสารในตัวทำละลายที่เหมาะสมให้ได้สารละลายเกือบอิ่มตัวที่จุดเดือดของตัวทำละลาย
2. กรองขณะร้อนเพื่อขจัดสิ่งเจือปน ซึ่งไม่ละลายในตัวทำละลายขณะร้อนออก
3. ปลอຍสารละลายเย็นตัวลงเพื่อให้ของแข็งตกผลึกออกมา

4. กรองแยกผลึกออกจากสารละลายที่เหลือ (mother liquor)
5. ล้างผลึกด้วยตัวทำละลายที่เย็นจัดจำนวนเล็กน้อยเพื่อขจัดสิ่งเจือปนหรือ mother liquor ที่ติดอยู่ที่ผิวของผลึกออก
6. ทำให้ผลึกแห้ง เพื่อขจัดตัวทำละลายที่เหลือให้หมด

2.4.1 การเลือกตัวทำละลาย

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการตกผลึก นับว่าสำคัญมาก การเลือกตัวทำละลายสำหรับของแข็งที่รู้จักแล้ว อาจทำได้โดยตรวจสอบใน literatures ที่มีผู้ทดลองไว้ แต่สำหรับสารที่ไม่รู้จัก การเลือกตัวทำละลายทำได้ไม่ย้งนักเพราะเราไม่สามารถกำหนดเป็นกฎเกณฑ์แน่นอนได้ว่าสารชนิดหนึ่งละลายได้ในตัวทำละลายใด สารชนิดเดียวกันอาจจะละลายได้ในตัวทำละลายหลายอย่าง ดังนั้นการหาตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงได้มาจากการทดลอง แต่อาจอาศัยหลักกว้างๆได้ว่าสารจะละลายได้ในตัวทำละลายที่มีองค์ประกอบเคมีคล้ายคลึงกันเป็นต้นว่าเป็นสารชนิดเดียวกันหรือมี functional group คล้ายกัน หรืออาจสรุปได้ว่า “like dissolve like” เช่น naphthalene ละลายได้ใน benzene แต่ไม่ละลายน้ำ ในขณะที่ hydroxyl compounds ละลายได้ในน้ำเป็นต้น หรืออาจกล่าวได้ว่า non-polar compounds ละลายได้ใน non-polar solvents ส่วน polar compounds ละลายได้ใน polar solvents

คุณสมบัติของตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ

1. ควรจะละลายสารได้มากขณะร้อนและละลายได้น้อยมากขณะเย็น
2. ควรจะละลายสิ่งเจือปนได้ดีมาก หรือละลายได้น้อยมาก
3. ควรจุดเดือดค่อนข้างต่ำ เพื่อกำจัดออกจากผลึกได้ง่าย
4. ไม่ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารที่นำมาตกผลึก
5. ควรให้ผลึกของสารบริสุทธิ์ที่มีรูปร่างชัดเจน (ไม่ใช่ตะกอน)

ตัวทำละลายที่ใช้ได้ผลดีกับสารส่วนมากได้แก่ น้ำ, ethanol, methanol, Petroleum ether, hexane, benzene, toluene, acetone, ether, carbon tetrachloride เป็นต้น

2.4.2 การกรองผลึก

เพื่อแยกผลึกออกจากสารละลาย กรองโดยใช้ suction เครื่องมือที่ใช้ต้องต่อให้แน่น และแข็งแรงทุกแห่งไม่มีรอยร้าว เพราะการกรองผลึกจะได้ผลดีก็ต่อเมื่ออากาศถูกดูดออกผ่านทางกรวยกรองมากที่สุด ถ้ามีรอยร้าวอากาศจะถูกดูดผ่านกรวยกรองน้อยลงทำให้การกรองไม่ได้ผลดี water pump ที่น้ำไหลแรงอาจจะลดความดันภายในระบบได้ต่ำกว่า 20 มม.ปรอท ความดันของบรรยากาศภายนอกซึ่งสูงเกิน 760 มม.ปรอท หรือ 14.7 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่กดลงบนขวดนับว่ามาก ถ้าไม่ใช่ขวด suction ที่แข็งแรงและทนทานพอ อาจทำให้ขวดแตกหรือระเบิดได้

กระดวยกรองที่ใช้วาง Buchner Funnel ต้องมีขนาดเล็กกว่าขอบในของกรวยกรองเล็กน้อยก่อนจะกรองต้องทำให้กระดวยกรองเปียกด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึกนั้น และพยายามกดให้กระดวยแนบติดกรวยกรองให้สนิท ค่อยๆเปิด water pump ปิดสกรูก่อนเทสารละลายลงในกรวย ควรเขย่าเล็กน้อยเพื่อให้ผลึกออกมาพร้อมกับสารละลายขณะเทให้มากที่สุด ใช้แท่งแก้วหรือ spatula ที่ทำด้วยนิกเกิลหรือ stainless steel กวาดผลึกจากขอบลงในกรวยและผลึกที่เหลือในขวดอาจใช้ตัวทำละลายเย็นจัดจำนวนเล็กน้อยช่วยล้างผลึกออกมา

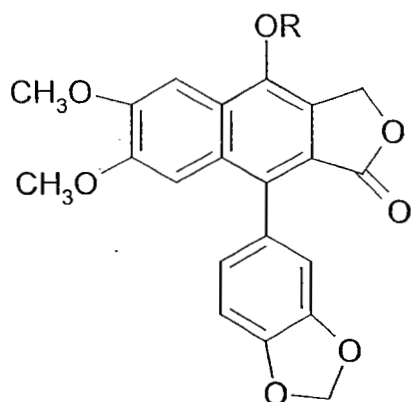
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปี 2000 Meenakshi, J. และ Shanmugam, G.⁽⁴⁾ พบว่า Cleistanthin A ซึ่งเป็น diphyllin glycoside ที่แยกได้จาก *Cleistanthus collinus* มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (cytotoxic) และทำให้ก้อนมะเร็งเล็กลง (tumor regression)

ปี 1999 Pradheepkumar, C.P. และ Shanmugam, G.⁽⁵⁾ พบว่า Cleistanthin A ที่ได้จาก *Cleistanthus collinus* มีศักยภาพในการต้านมะเร็ง (anticancer) และต้านเซลล์มะเร็ง (cytotoxic) ได้โดยมีค่า EC 50 เท่ากับ 10^{-7} - 10^{-9} M และเทียบกับยา anticancer มาตรฐาน 5 ชนิด พบว่า Cleistanthin A มีประสิทธิภาพมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง oral carcinoma cell line KB และ cervical carcinoma cell line SiHa ได้

ปี 1998 Kumar, C.P., Pradheep, P.G. และ Shanmugam, G.⁽⁶⁾ พบว่า Cleistanthin B ที่ได้จาก *Cleistanthus collinus* มีศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง ทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ (apoptosis) และ สารประกอบนี้ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ใน China hamster ovary (CHO) ได้ และทำลายเซลล์ cervical carcinoma (SiHa) ได้

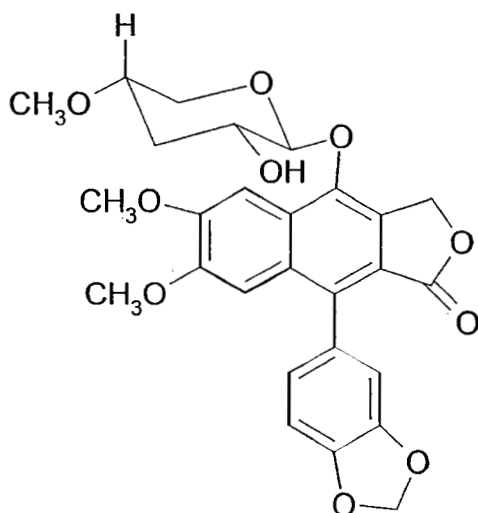
ปี 1996 Prabhakaran, C., Pradheep, P., Panneerselvam, N., Rajesh, และ S. Shanmugam, G.⁽⁷⁾ พบว่า Cleistanthin B ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นพิษที่แยกได้จาก *Cleistanthus collinus* สามารถออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) และออกฤทธิ์ genotoxic ต่อเซลล์ธรรมดาและเซลล์เนื้องอกได้



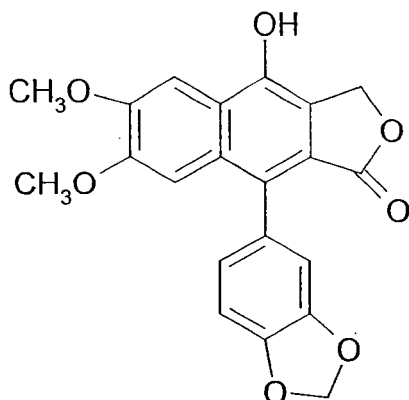
Cleistanthin A R = 3,4-di-o-methylxylosyl

Cleistanthin B R = β -D-glucosyl

ปี 1987 Sastry, K.V., Rao, E., Venkata, Buchanan, J.G., และ Steergeon, R.J.⁽⁸⁾, แยก Cleistanthoside B ซึ่งเป็น diphyllin glycoside (diphyllin-4-yl-4-O-methyl- β -D-xylopyranoside) ได้จากแก่นของ *Cleistanthus patulus* โดยพิสุจน์สูตรโครงสร้างได้จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี



Cleistanthoside B



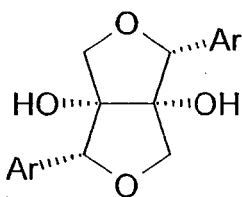
diphyllin-4-yl-4-O-methyl- β -D-xylopyranoside

ปี 1985 Latha, W., Modly: Rao, V.S. Sundara, Reddy, K.K. และ Sastry, K.N.N.⁽⁹⁾, แยกสารประกอบ phenolic จำนวน 10 ชนิดจากเปลือกของ *Cleistanthus collinus* และ 1 ชนิดจาก wood ของ *Cleistanthus collinus*

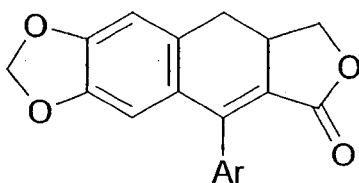
ปี 1984 Satyanarayana, P., Subrahmanyam, P., Rao, P. Koteswara.,⁽¹⁰⁾ พบว่ารากของ *Cleistanthus collinus* มี β -sitosterol, paulownin, diphyllin และ Cleistanthin D เป็นองค์ประกอบ

ปี 1983 Sastry, K.V., Rao, E. Venkata.,⁽¹¹⁾ พบ Cleistanthoside A, (+)-sesamin, taiwanin C, paulowin, Cleistanthin A diphyllin และ β -sitosterol จากแก่นของ *Cleistanthus patulus*

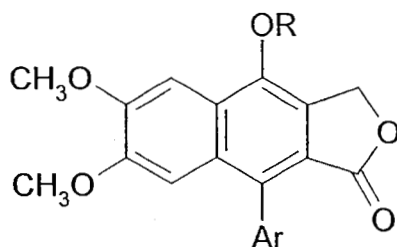
ปี 1981 Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Archuta., Row, L.Ramachandra, Venkatiswarlu, R., Pelter, A., และ Ward, R.S.,⁽¹²⁾ แยกลิคเนน 9 ตัวได้จากแก่นของ *Cleistanthus collinus* เป็นลิคเนนค้นพบใหม่ 5 ตัวได้แก่ wodeshiol, 3,4-dihydrotaiwanin C, Cleistanthin D, และ glycoside ของ Cleistanthin D



wodeshiol



3,4-dihydrotaiwanin C



R = 2,3,5-tri-o-methyl-D-xylose

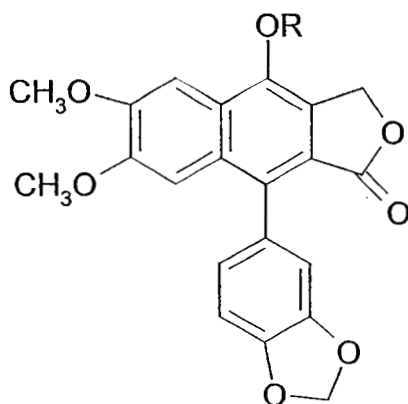
Cleistanthin D

ปี 1977 Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Atchuta, Row, L. และ L. Ramachandra⁽¹³⁾ แยก Cleistanthin C ซึ่งเป็น diphyllin glycoside ตัวใหม่ได้จากแก่นของ *Cleistanthus collinus* Roxb.

ปี 1975 Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Atchuta, Row, L. Ramachandra⁽¹⁴⁾ ค้นพบ (4-O- β -2,3-di-O-methylxylopyranosyl- β -D-glucopyranoside) diphyllin glycoside ตัวใหม่จากแก่นของ *Cleistanthus collinus*

ปี 1971 Pegel, K.H., Candy, H.A. และ Pakshong, Jran M.⁽¹⁵⁾ แยก pimarane diterpens 3 ตัวได้จากแก่นของ *Cleistanthus schlechteri* ซึ่ง diterpens 3 ตัวนี้เป็น aromatic diterpenes cleistanthol

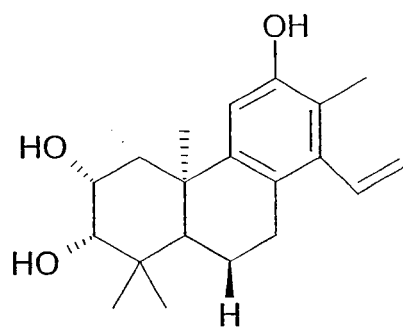
ปี 1970 Lakshmi, Mrs.T.G., Srimannaryana, G. และ Rao, N.V. Subba⁽¹⁶⁾ แยก Cleistanthin C ซึ่งเป็น glycoside ชนิด diphyllin O-glycoside ตัวใหม่จากเปลือกของ *Cleistanthus collinus*



R = 2,3-di-o-methylxylosyl

(1-4) glucosyl

Cleistanthin C



Cleistanthol

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การแยกหองค์ประกอบทางเคมีของลำต้นสามพันดาใช้อุปกรณ์และสารเคมีดังต่อไปนี้

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

- 3.1.1 เฮกเซน
- 3.1.2 เอทิลอะซิเตต
- 3.1.3 ไดคลอโรมีเทน
- 3.1.4 เมทานอล
- 3.1.5 เอทานอล
- 3.1.6 อะซิโตน
- 3.1.7 แมกนีเซียมซัลเฟต
- 3.1.8 ไอโอดีน
- 3.1.9 โพแทสเซียมโบรไมด์
- 3.1.10 ซิลิกาเจล 60 ขนาด 0.04-0.063 มิลลิเมตรของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- 3.1.11 ซิลิกาเจล 60 PF₂₅₄ ของบริษัท E.Merck, Dramstadt, Germany
- 3.1.12 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร
- 3.1.13 คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ยาว 40 เซนติเมตร
- 3.1.14 หลอดกำเนิดแสงยูวี (UV lamp) ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร
- 3.1.15 เครื่องระเหยแบบหมุน(Rotary Evaporator) Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 3.1.16 เครื่อง IR บริษัท Perkin Elmer รุ่น System 2000 FTIR
- 3.1.17 เครื่อง NMR บริษัท Buker 400 MHz Ultrashield 400

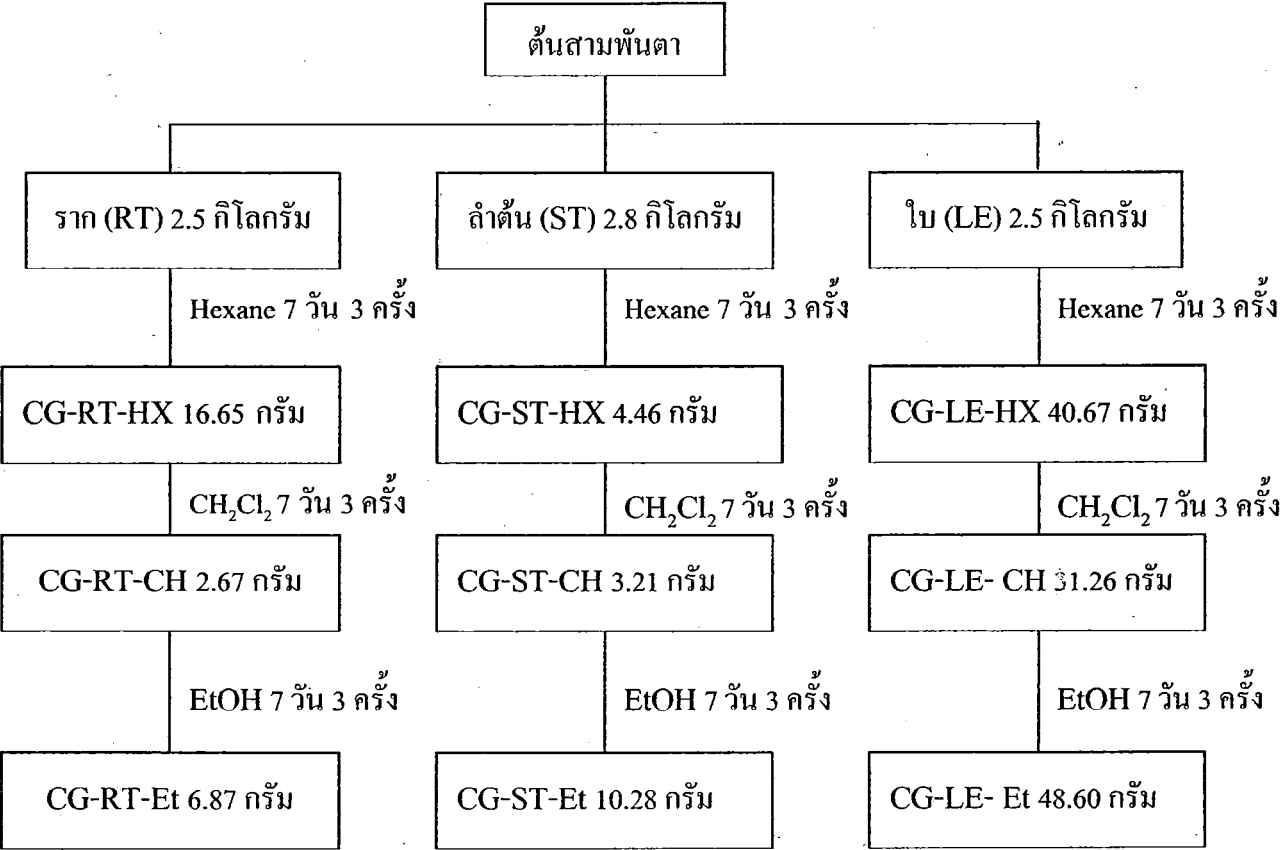
3.2 การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนลำต้นของสามพันดาที่หั่นและบดละเอียด บรรจุใส่ถุงผ้าที่สะอาด มัดปากถุงให้แน่นชั่งน้ำหนัก นำไปแช่ในตู้ทำละลายเฮกเซนเป็นระยะเวลา 7 วัน ไขตู้ทำละลายออกมาเพื่อสกัดเอาสารออกนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องแบบหมุนจนแห้ง ทำการสกัดทั้งหมดสามครั้ง นำ crude

extract ของเฮกเซนที่ได้ทั้งสามครั้งมารวมกันทำให้แห้งด้วย vacuum pump นำส่วนที่เหลือสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน และเอทานอลในทำนองเดียวกัน ตามลำดับ ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 9 ส่วน คือ

- 1) ส่วนสกัดเฮกเซนจากราก (CG-RT-HX)
- 2) ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากราก (CG-RT-CH)
- 3) ส่วนสกัดเอทานอลจากราก (CG-RT-Et)
- 4) ส่วนสกัดเฮกเซนจากลำต้น (CG-ST-HX)
- 5) ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากลำต้น (CG-ST-CH)
- 6) ส่วนสกัดเอทานอลจากลำต้น (CG-ST-Et)
- 7) ส่วนสกัดเฮกเซนจากใบ (CG-LE-HX)
- 8) ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบ (CG-LE- CH)
- 9) ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ (CG-LE- Et)

สรุปได้ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ส่วนสกัดต่างๆ ของต้นสามพันดา

3.3 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของส่วนสกัด (ทำที่งานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ)

นำส่วนสกัดทั้ง 9 ส่วนไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งโดยใช้เซลล์มะเร็งลิวคีเมีย;

P388 โดยวิธี Viable Cell Count: Dye Exclusion Method

3.3.1 การเตรียมเซลล์มะเร็งเพื่อใช้ในการทดลอง (stock cell suspension)

เตรียม cell suspension ให้ได้ประมาณ 5×10^4 cells/ml โดยการนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ซึ่งมีอายุประมาณ 3-4 วัน มาดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

- การย้อมสีเซลล์ (Dye exclusion)

เขย่าขวดเลี้ยงเซลล์เบาๆ เพื่อให้เซลล์กระจายไปทั่ว จากนั้นผสมเซลล์กับ 0.4% trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Pasteur pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที นำไปนับเซลล์ที่มีชีวิต คือ ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue

- การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Viable Cell Count)

นำเซลล์ที่ย้อมด้วย 0.4% trypan blue หยดลงบน Haemocytometer แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณค่า Dilution number เพื่อใช้เตรียม stock cell suspension ที่ความเข้มข้น 5×10^4 cells/ml ตามสมการดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ / ml} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{Dilution factor} \times 10^4}{\text{จำนวนช่องที่นับ}}$$

ซึ่ง Dilution factor : อัตราส่วนของ cell ต่อ 0.4% trypan blue มีค่าเท่ากับ 2

$$10^4 : \text{ปริมาตรของแต่ละช่องใน Haemacytometer} \\ (\text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{ลึก} = 0.1 \text{ cm} \times 0.1 \text{ cm} \times 0.01 \text{ cm})$$

$$\text{ดังนั้น Dilution Number} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ / ml}}{\text{ความเข้มข้นของ stock cell suspension ที่ต้องการเตรียม}}$$

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

เชื้อไวรัสละลายน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้ด้วย solvent control (2.5% DMSO in RPMI-1640) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการซึ่งจะมีปริมาณของสารและ solvent control รวมกันในขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 1 ml จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 3 ml และเซลล์มะเร็งที่เตรียมไว้จำนวน 1 ml ลงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่เชื้อไวรัสละลายน้ำมันหอมระเหย นำไปบ่มที่ภาวะ 37°C, 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 4 วัน โดยมีกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารละลายน้ำมันหอมระเหยแต่เติม solvent control แทน ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลอง

3.3.3 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

หลังจากบ่มเซลล์ครบ 4 วัน สามารถวัดผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยการย้อมเซลล์ที่ทำการทดลองและนับเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสีน้ำเงินของ trypan blue) จากเซลล์ตาย (ติดสีน้ำเงินของ trypan blue) เช่นเดียวการเตรียมเซลล์ก่อนการทดลอง จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการเจริญของเซลล์มะเร็งที่บ่มกับสารละลายน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่น้ำมันหอมระเหย สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการเจริญของเซลล์มะเร็ง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มทดลอง}}{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

ซึ่งหลักเกณฑ์ในการทดสอบ จะใช้หลักเกณฑ์ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ สหรัฐอเมริกา (61) กล่าวคือ ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่น่าสนใจที่มีค่า active test ควรมีค่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเซลล์ได้ครึ่งหนึ่ง (Median Effective Dose, ED₅₀) ไม่ควรเกิน 30 µg/ml ในการทดสอบขั้นต้น (Prescreening) จากนั้นนำสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาทำการทดสอบเพื่อยืนยันค่า ED₅₀ ที่ความเข้มข้นต่างๆอีกครั้ง

ในการคำนวณค่า ED₅₀ สามารถเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในแกน X และร้อยละของการเติบโตของเซลล์มะเร็งในวันที่ 4 ในแกน Y โดยค่า ED₅₀ จะเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่นำมาทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ครึ่งหนึ่ง และ ED₅₀ มีหน่วยเป็น µg/ml

จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของส่วนสกัดพบว่า ส่วนสกัดที่ active คือ CG-RT-CH, CG-RT-Et, CG-LE-HX และ CG-LE-Et จึงนำส่วนสกัดทั้ง 4 ส่วนนี้ไปแยกสารบริสุทธิ์สรุปได้ดังรูปที่ 3.2-3.16

3.4 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่ active

3.4.1 การแยกด้วยวิธี TLC (Thin-Layer Chromatography)

3.4.1.1 การเตรียมแผ่น TLC

นำซิลิกาเจลมาผสมน้ำให้เป็น slurry นำไปเคลือบบนแผ่น TLC หลังจากเคลือบแล้วนำไปทำให้แห้งก่อน จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100-120 °C ครึ่งชั่วโมง

3.4.1.2 การหาระบบตัวทำละลาย

แบ่ง crude extract มาเล็กน้อย เติมตัวทำละลายลงไป นำตัวทำละลายผสมกันในอัตราส่วนต่างๆระหว่างเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต นำไปใส่ใน chamber ทำการ spot สารลงบนแผ่น TLC ด้วยหลอดคาปิลลารี นำไปจุ่มใน chamber ที่ปิดฝาไว้รอจนตัวทำละลายเคลื่อนถึงระดับที่กำหนดนำไปส่องด้วยแสงยูวี ทำเครื่องหมายแต่ละจุดที่แยกเพื่อหาค่า R_f และจะเลือกระบบตัวทำละลายที่ทำให้สารแยกจากกันได้ดีที่สุด

3.4.2 การแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.4.2.1 การเตรียมคอลัมน์

นำคอลัมน์ยึดติดกับ clamp ให้แน่น เตรียมซิลิกาเจลบรรจุในคอลัมน์ประมาณ 3 ใน 4 ของคอลัมน์และนำมาผสมกับตัวทำละลายเฮกเซนจนให้สารละลายอิ่มตัวนำสำลีดูดไว้ที่ปลายด้านในของคอลัมน์เพื่อป้องกันไม่ให้ซิลิกาเจลถูกชะออกมาและใช้ทรายกลบทำให้ผิวหน้าเรียบ จากนั้นค่อย ๆ เทลงในคอลัมน์ทีละน้อยพร้อมเคาะคอลัมน์เพื่อให้ฟองอากาศหลังจากนั้นทิ้งคอลัมน์ทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมงเพื่อให้คอลัมน์อิ่มตัว

3.4.2.2 การบรรจุสารตัวอย่าง

นำ crude extract มาเติมตัวทำละลายเพื่อละลายจากนั้นเติมซิลิกาเจลชนิดเดียวกับคอลัมน์ลงไปเล็กน้อย นำไปประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจนแห้ง นำไปบรรจุลงในคอลัมน์ที่เตรียมตัวไว้ เกลี่ยผิวหน้าของสารให้เสมอกันทั้งคอลัมน์แล้วเติมเมกนีเซียมซัลเฟตลงไปพอประมาณ หลังจากนั้นชะด้วยตัวทำละลายที่เตรียมไว้

3.4.2.3 การแยกสารจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ทำ gradient elution โดยการค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของระบบตัวทำละลายที่ใช้หะสารในคอลัมน์ โดยใช้ เอทิลอะซิเตต : เฮกเซน ในอัตราส่วน 5, 10, 20, 30 ..จนกระทั่ง 100% เอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บ eluent โดยเก็บครั้งละ 100-150 มิลลิลิตร และนำไปประเหยตัวทำละลายออกจนเหลืออยู่พอประมาณ นำมา spot บน TLC โดย spot ครั้งละ 3 ขวดและตรวจสอบด้วยแสงยูวี เพื่อดูลักษณะและหาค่า R_f ทำการรวม fraction ถ้าเป็นสารตัวเดียวกัน นำไปประเหยให้แห้งและชั่งน้ำหนัก

3.4.3 การคัดแยกด้วยวิธี PLC (Preparative Thin-Layer Chromatography)

3.4.3.1 การหาระบบตัวทำละลาย

หาระบบตัวละลายที่เหมาะสมเหมือน 3.4.2

3.4.3.2 การเตรียมแผ่น PLC

เตรียมเหมือน TLC แต่ใช้กระจกขนาดใหญ่หลังจากนั้นทำให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100-120 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.4.3.3 การแยกสาร

หลังจากแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแล้ว นำสารที่ยังไม่บริสุทธิ์มาแยกด้วย PLC โดยนำมาเติมตัวทำละลายเล็กน้อยและสามารถละลายสารตัวอย่างได้หมด แล้วนำไปหยดบนแผ่น PLC ที่เตรียมไว้ ทิ้งให้แห้งแล้วนำไปจุ่มลงในแทงค์ที่บรรจุตัวทำละลายอยู่ ปิดฝาให้แห้งสนิททิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเมื่อถึงระดับจึงยกออกมาผึ่งให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยแสงยูวี ทำการขีด band ที่แยกได้ นำแต่ละ band ที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตและกรอง ซิลิกาเจลออก จากนั้นนำไปประเหยตัวทำละลายออกและชั่งน้ำหนักสาร

3.4.4 การตกผลึก

นำสารที่แยกจนบริสุทธิ์แล้วมาตกผลึกด้วยเมทานอล โดยใส่เมทานอลลงไปจากนั้นนำไปให้ความร้อนจนสารละลายหมด ถ้าสารละลายไม่หมดให้เพิ่มเมทานอลแล้วนำไปให้ความร้อน กรองขณะร้อนด้วยกระดาษกรองแบบพับจีบ นำไปให้ความร้อนใหม่เมื่อสารละลายหมดแล้วให้ปิดฝา ขณะร้อนและตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ทำการกรองผลึก นำผลึกที่ได้ไปใส่ใน vacuum pump เมื่อแห้งนำไปหาจุดหลอมเหลว

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์

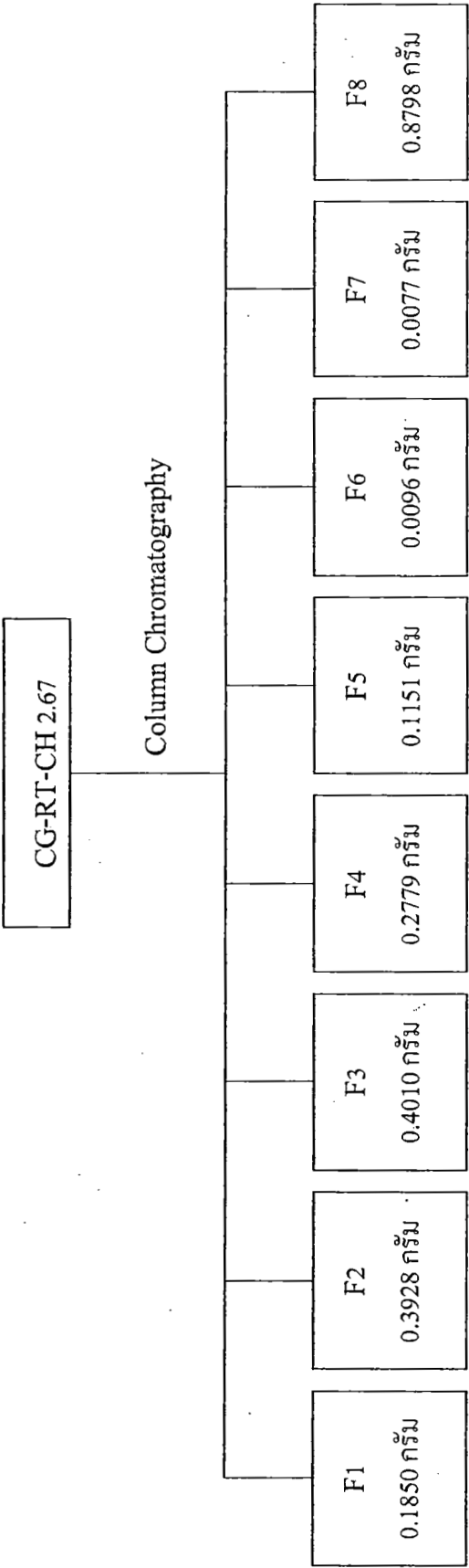
นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยวิธี spectroscopy

ขั้นตอนการแยกส่วนสกัด CG-RT-CH, CG-RT-Et, CG-LE-HX และ CG-LE-Et รูปที่

3.2-3.9

3.6 การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์

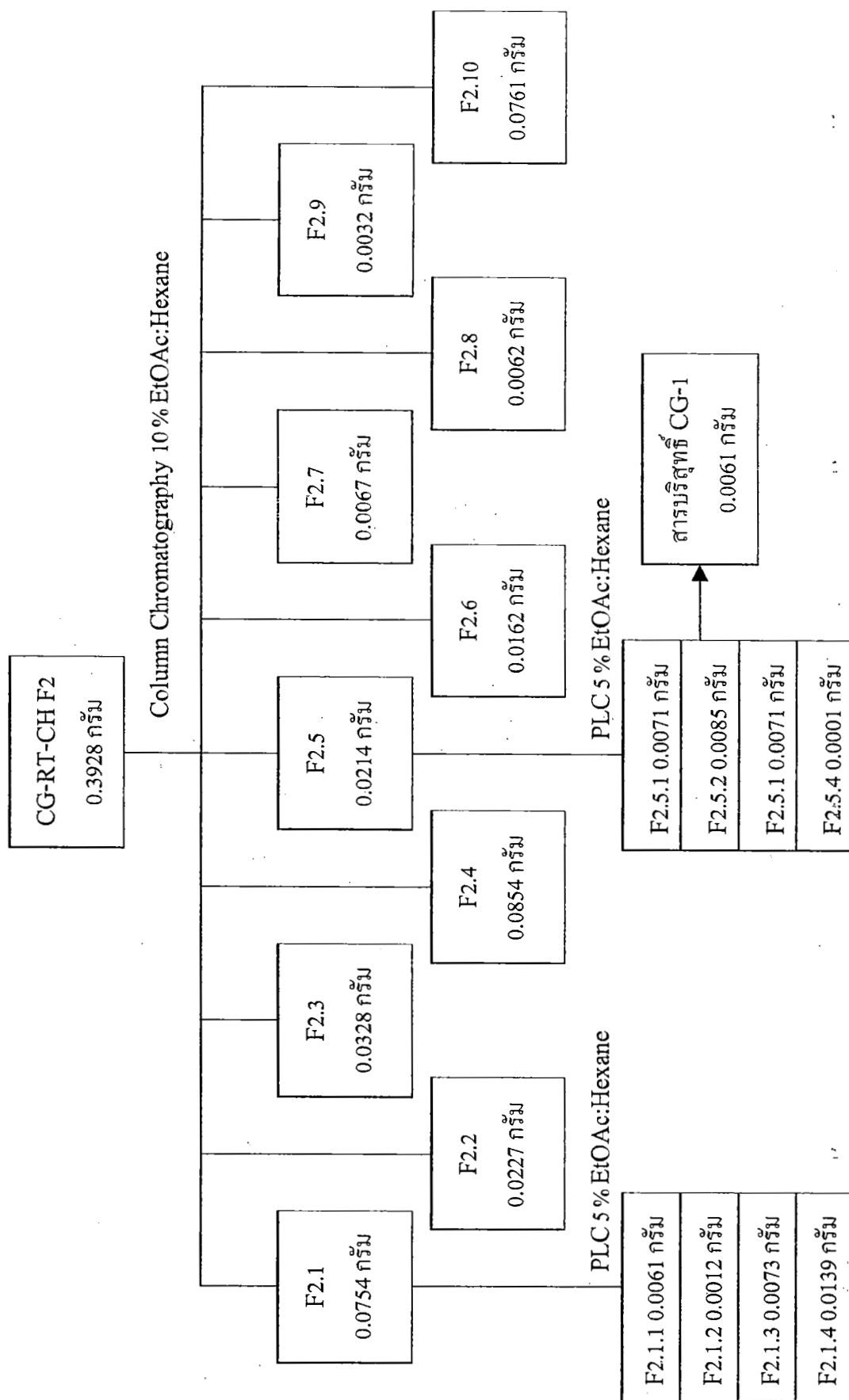
โดยวิธี Viable Cell Count: Dye Exclusion Method ดูรายละเอียดในข้อ 3.3



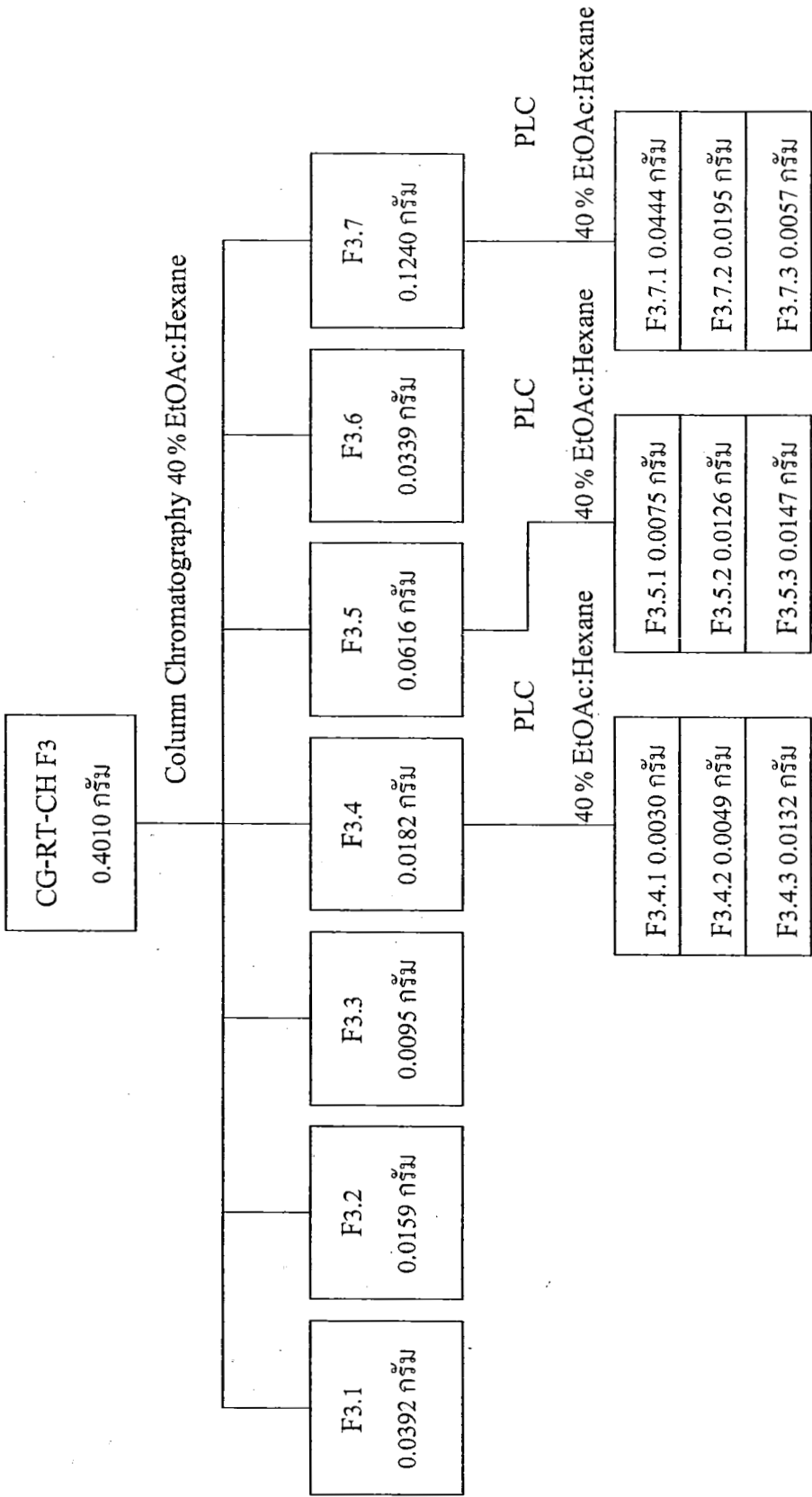
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH

๒๕๖๓
๒๕๖๓
๒๕๖๓

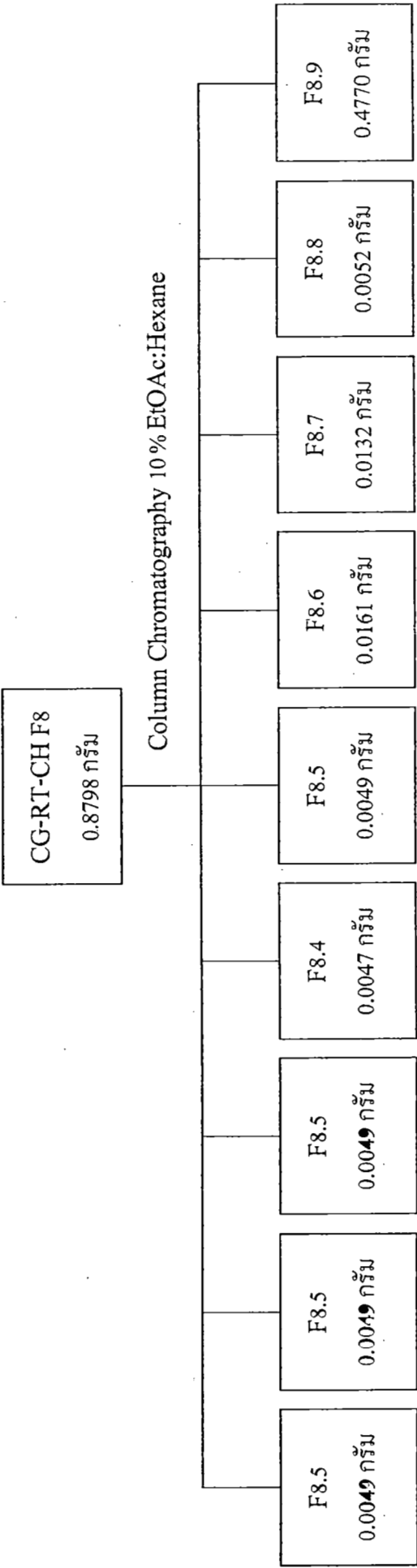
26 1224



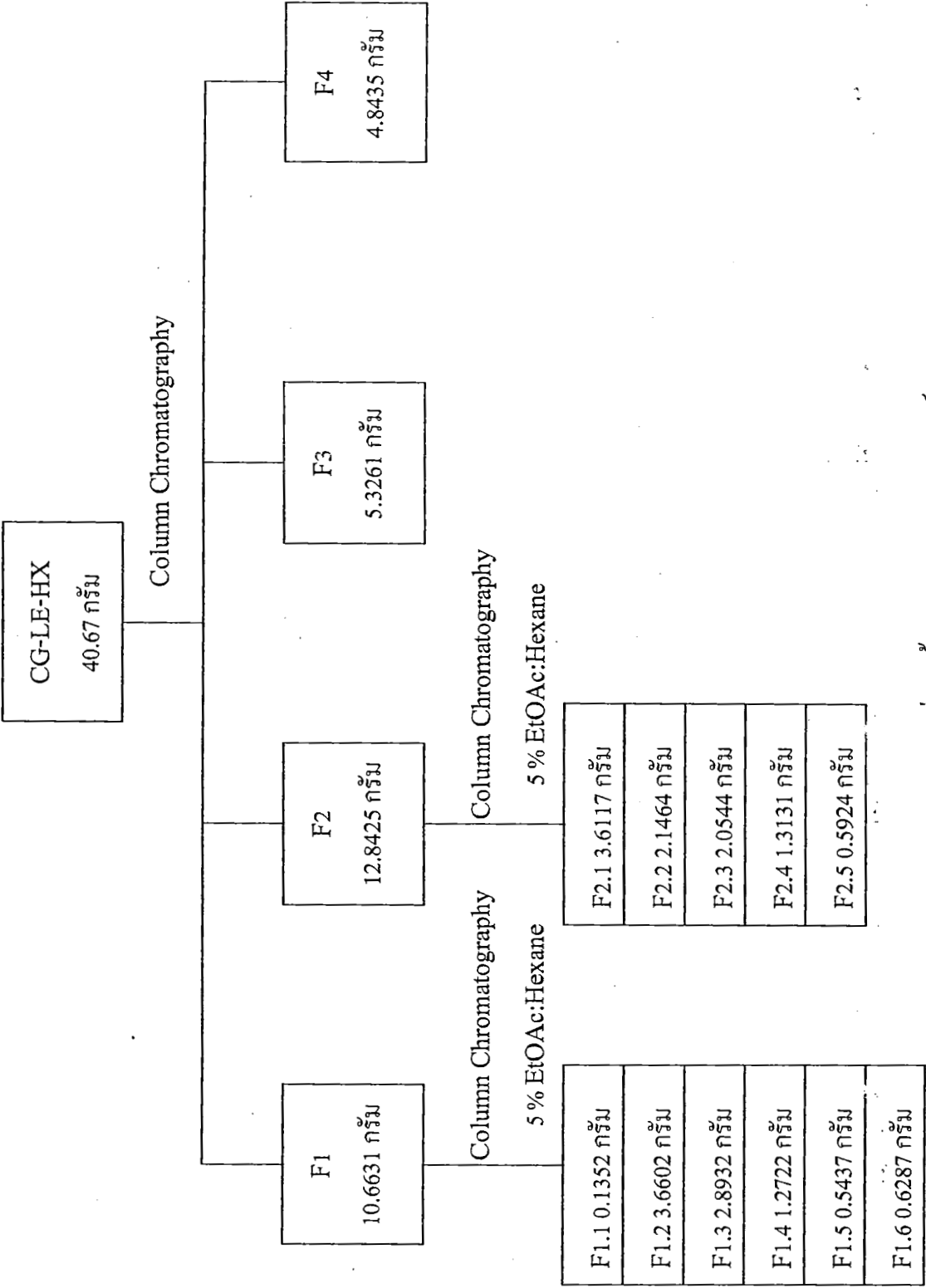
รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 2



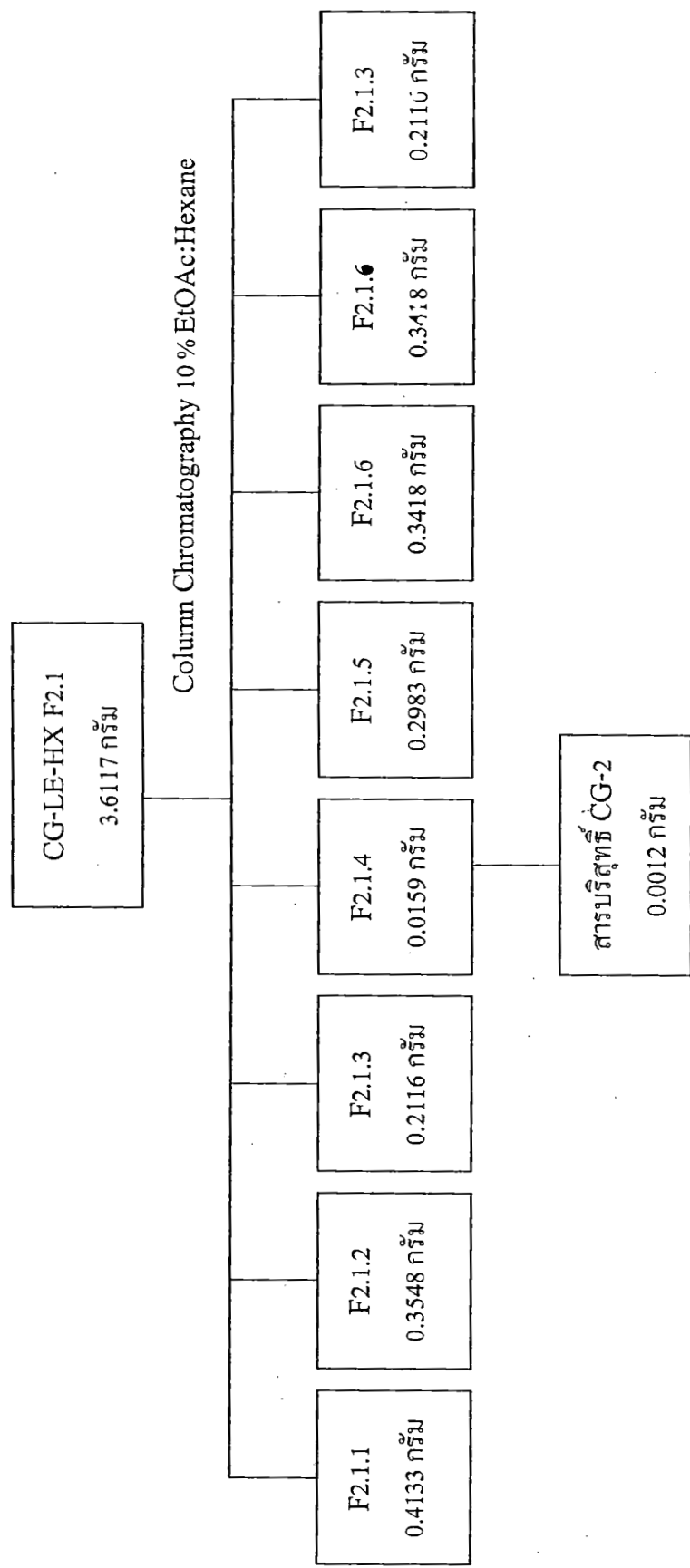
รูปที่ 3.4 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 3



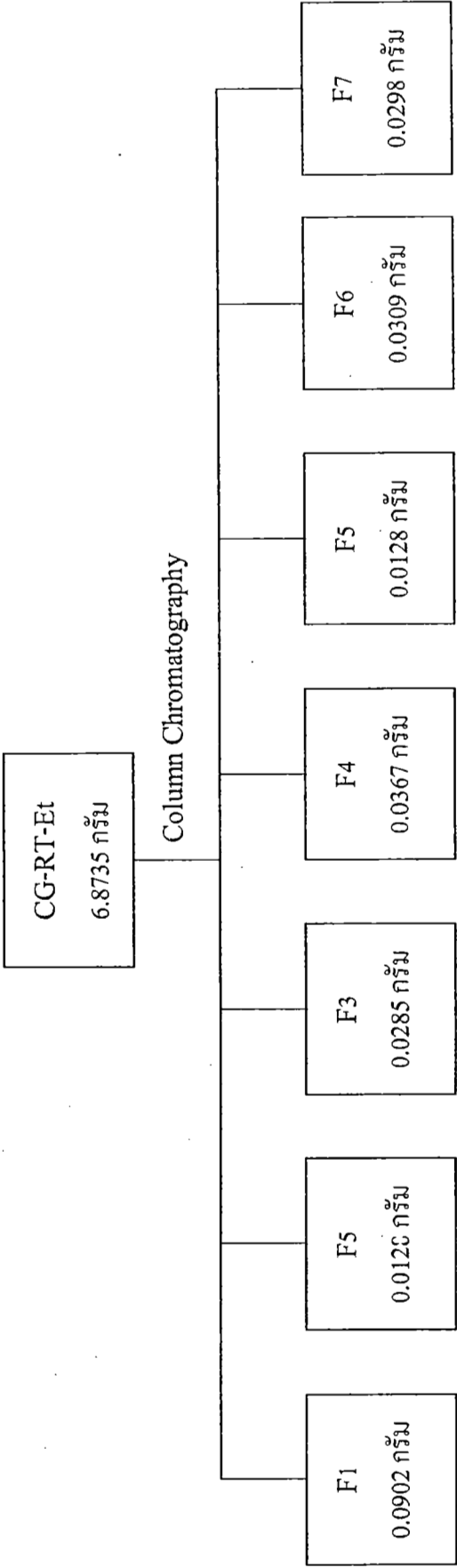
รูปที่ 3.5 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-CH Fraction ที่ 8



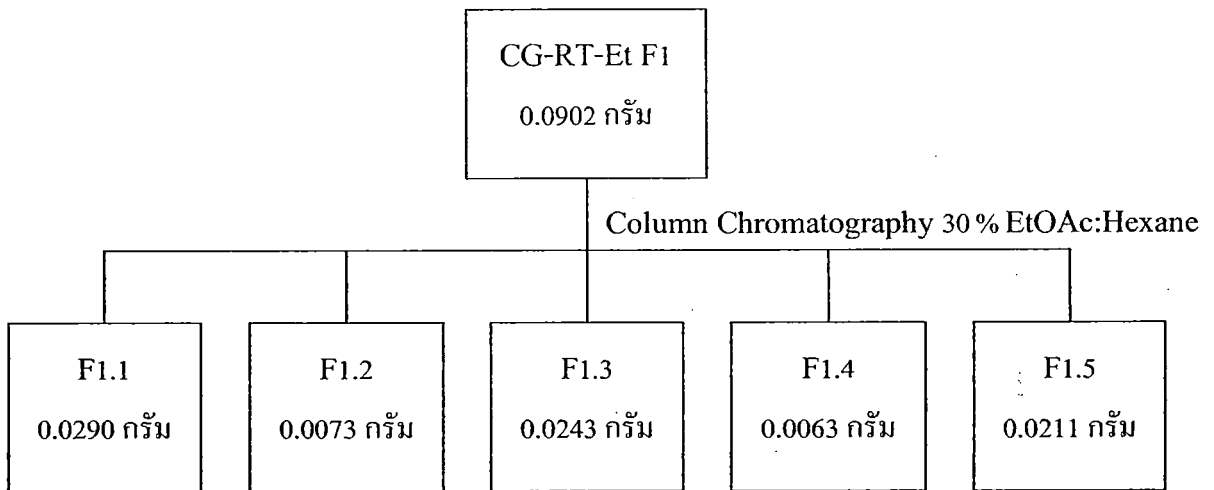
รูปที่ 3.6 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-HX



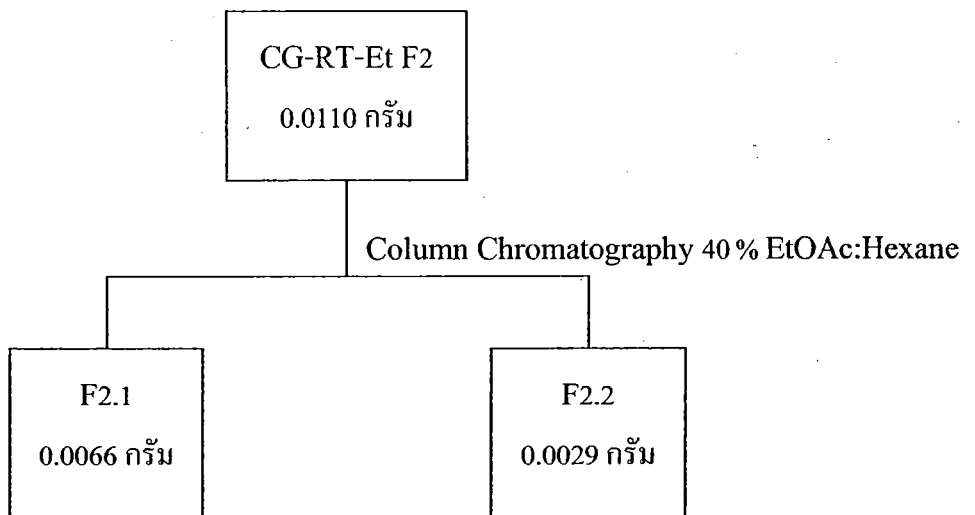
รูปที่ 3.7 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-HX Fraction ที่ 2.1



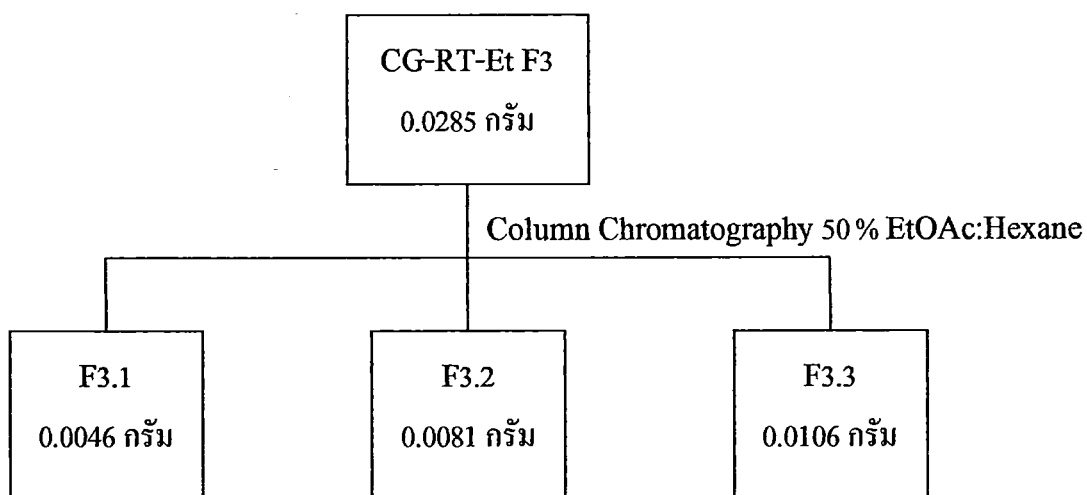
รูปที่ 3.8 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et



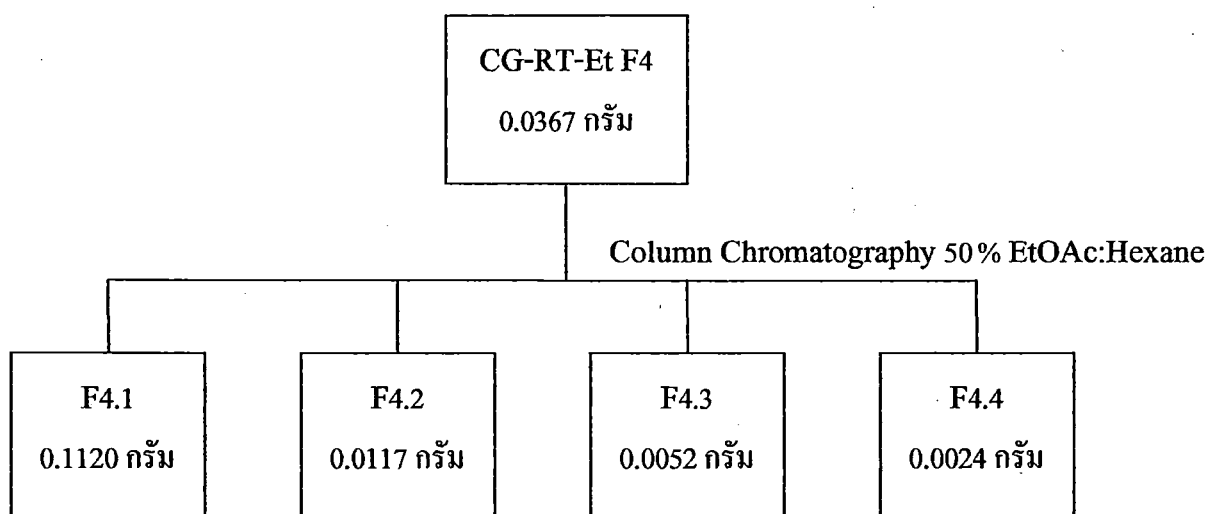
รูปที่ 3.9 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 1



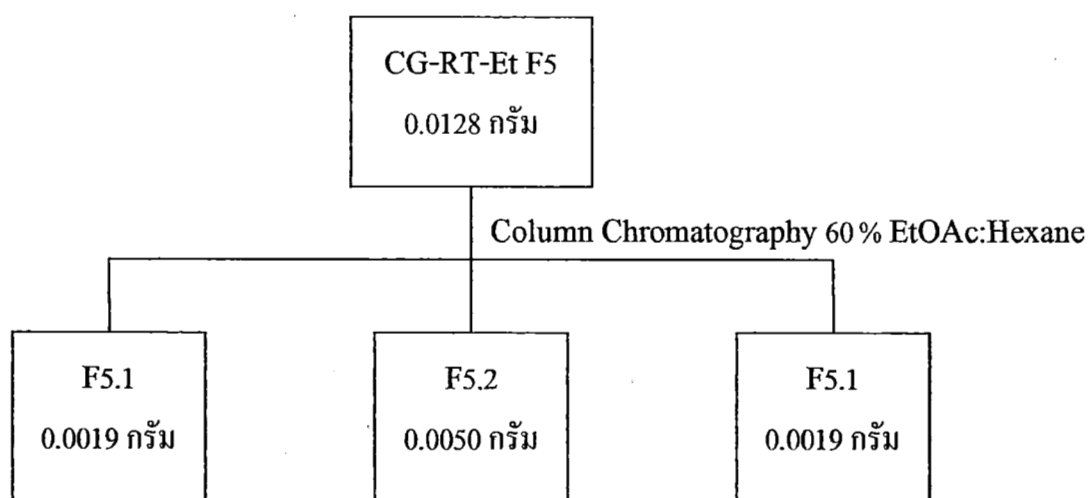
รูปที่ 3.10 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 2



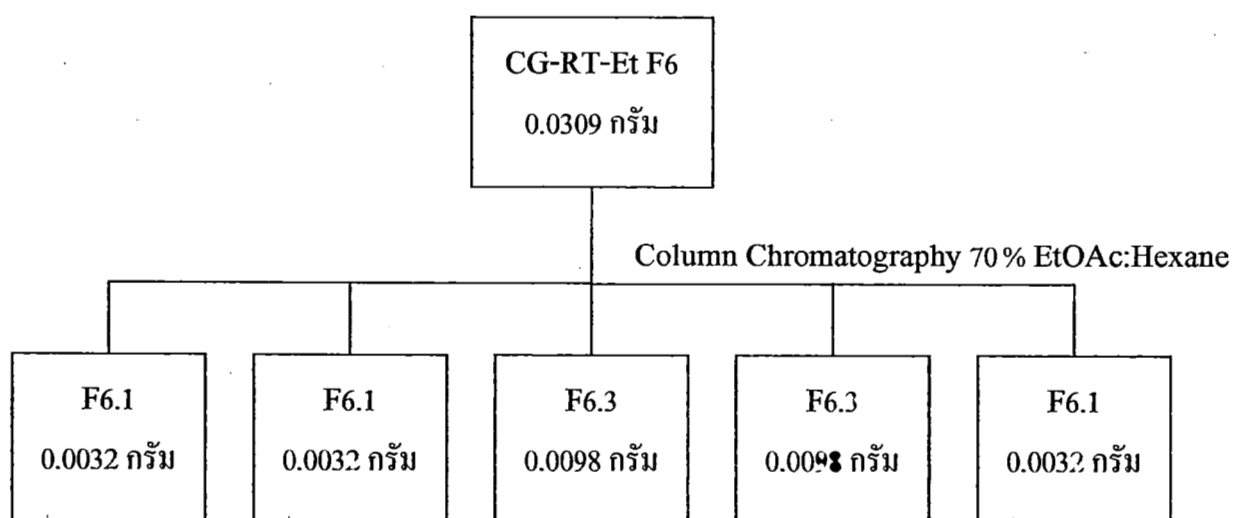
รูปที่ 3.11 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 3



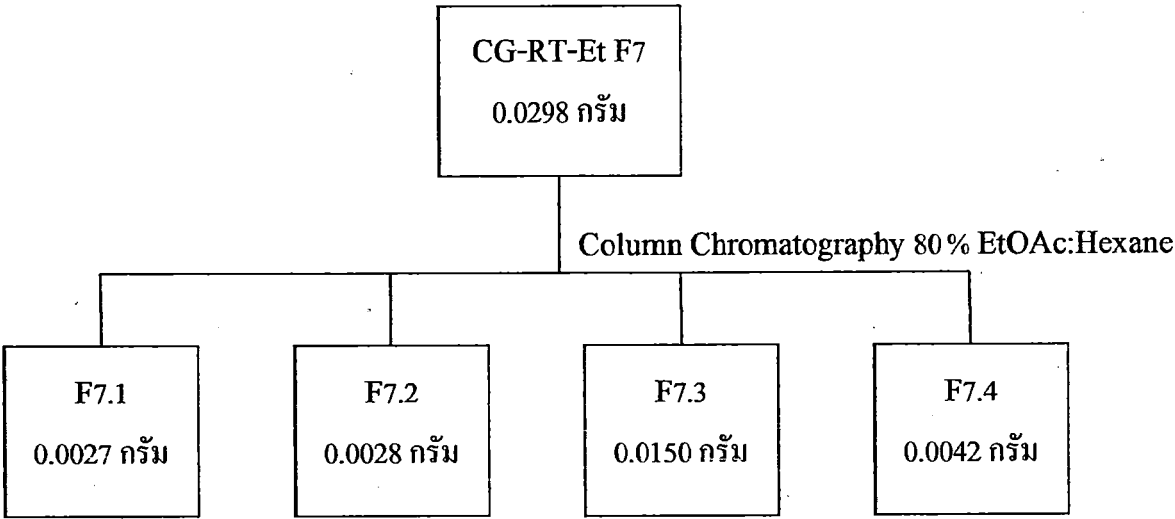
รูปที่ 3.12 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 4



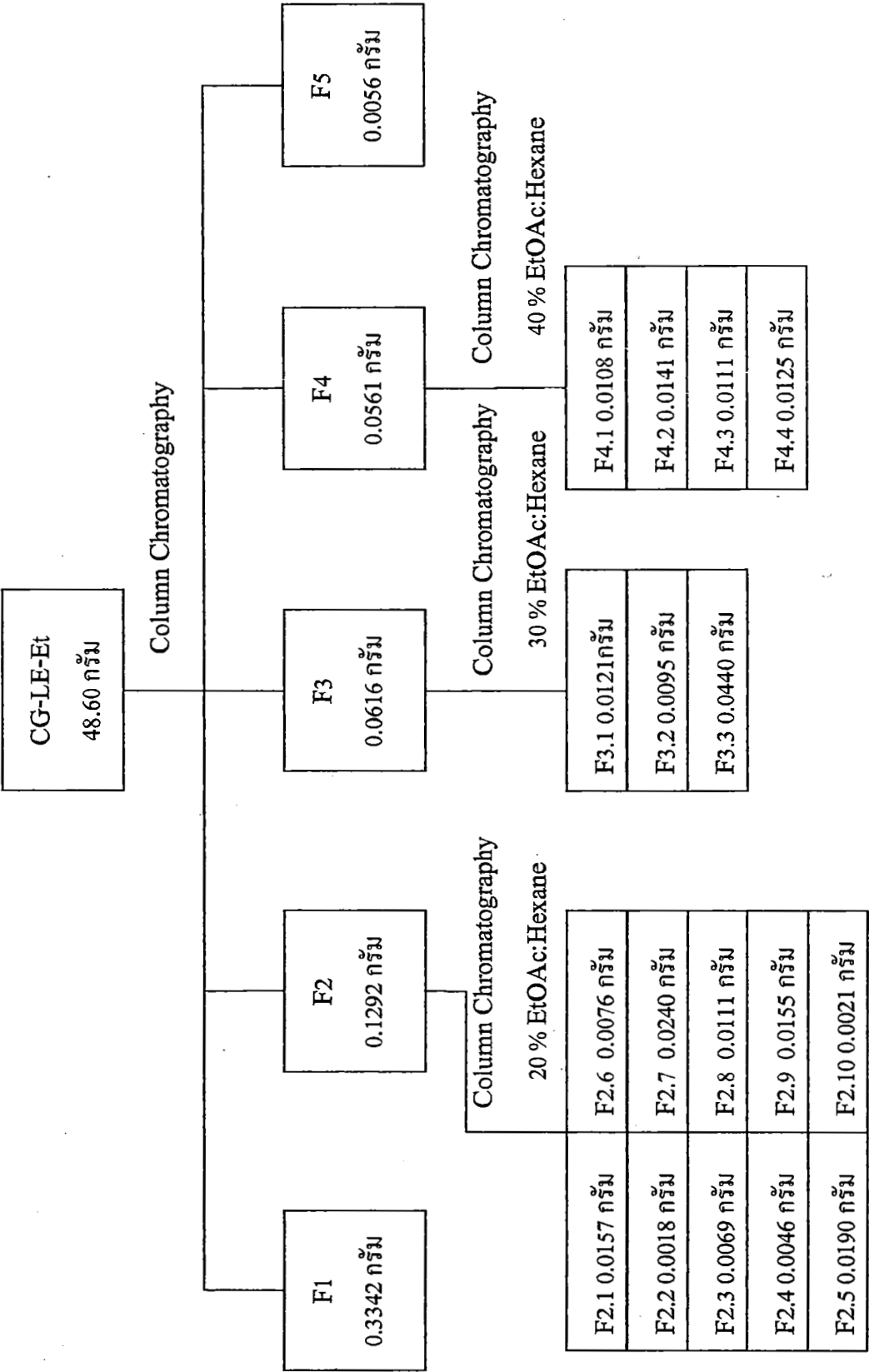
รูปที่ 3.13 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 5



รูปที่ 3.14 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 6



รูปที่ 3.15 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-RT-Et Fraction ที่ 7



รูปที่ 3.16 ขั้นตอนการแยกสารบริสุทธิ์ของ CG-LE-Et

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่ active

จากการนำราก ลำต้น และใบที่แห้งและบดละเอียดมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทานอล ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 9 ส่วน ดังนี้

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักส่วนสกัดต่าง ๆ ของต้นสามพันดา

ส่วนสกัด	รหัส	น้ำหนัก (กรัม)
ราก 2.5 กิโลกรัม		
ส่วนสกัดเฮกเซนจากราก	CG-RT-HX	16.65
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากราก	CG-RT-CH	2.67
ส่วนสกัดเอทานอลจากราก	CG-RT-Et	6.87
ลำต้น 2.8 กิโลกรัม		
ส่วนสกัดเฮกเซนจากลำต้น	CG-ST-HX	4.46
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากลำต้น	CG-ST-CH	3.21
ส่วนสกัดเอทานอลจากลำต้น	CG-ST-Et	10.28
ใบ 2.5 กิโลกรัม		
ส่วนสกัดเฮกเซนจากใบ	CG-LE-HX	40.67
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบ	CG-LE-CH	31.26
ส่วนสกัดเอทานอลจากใบ	CG-LE-Et	48.60

นำส่วนสกัดทั้ง 9 ส่วนสกัดไปทดสอบการออกฤทธิ์ด้านเซลล์มะเร็งได้ผลดังนี้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) ของสารสกัดจาก
ต้นสามพันดา

Sample Conc. (µg/ml)	% Cell Growth										ED ₅₀ (µg/ml)
	Exp.1	Exp.2			Exp.4			Exp.4			
	30	5	10	20	10	30	30	10	30	30	
1.1 RT-HX	91.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>30
1.2 RT-CH	2.18	-	-	-	73.39	24.40	3.56	74.75	53.60	23.77	~17
1.3 RT-ET	0	96.35	95.13	0	91.02	51.86	0	81.64	75.74	24.75	~23
2.1 ST-HX	0	86.98	81.77	81.42	96.27	98.64	77.46	-	-	-	>30
2.2 ST-CH	99.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>30
2.3 ST-ET	87.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>30
3.1 LE-HX	44.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~30
3.2 LE-CH	84.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	>30
3.3 LE-ET	0	81.42	85.94	0	91.86	1.02	0	88.19	0	0	~13

นำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากราก (CG-RT-CH) 16.65 กรัม ส่วนสกัดเอทานอลจากราก (CG-RT-Et) 6.87 กรัม ส่วนสกัดเฮกเซนจากใบ (CG-LE-HX) 40.76 กรัม และส่วนสกัดเอทานอลจากใบ (CG-LE-Et) 48.6 กรัม มาแยกสารบริสุทธิ์ได้ผลการทดลองดังนี้

นำส่วนสกัดทั้ง 4 ส่วนสกัดมาแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีโดยเริ่มชะด้วยเฮกเซนแล้วค่อย ๆ เพิ่มขั้วของตัวทำละลายโดยเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอทิลอะซีเตตต่อเฮกเซนจาก 5% เอทิลอะซีเตตต่อเฮกเซนจนถึง 100% เอทิลอะซีเตตและ 100% ตามลำดับ แล้วเก็บสารละลายเป็น fraction นำแต่ละ fraction มา spot และรวมสารที่มี spot เหมือนกันไว้ด้วยกันได้ fraction ต่าง ๆ ดังรูปที่ 3.2 - 3.16 และตารางที่ 4.3 - 4.27

CG-RT-CH

ตารางที่ 4.3 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-RT-CH

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1	0.185	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 1	0.3928	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 1	0.185	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 4	0.2779	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 1	0.1151	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 1	0.0096	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 1	0.0096	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 4	0.8798	ของเหลวสีเขียวอ่อน

นำ fraction ที่ 2 3 และ 8 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ส่วน fraction อื่นมีปริมาณน้อยและไม่น่าสนใจจึงไม่นำมาแยกต่อ

Fraction ที่ 2 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลาย 10% EtOAc:Hexane ได้ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1	0.0754	ของเหลวใส
F 2.2	0.0227	ของเหลวสีส้ม
F 2.1	0.0728	ของเหลวสีส้ม
F 2.4	0.0854	ของเหลวสีส้ม
F 2.1	0.0754	ของเหลวสีเขียว
F 2.6	0.0162	ของเหลวสีเขียว
F 2.7	0.0067	ของเหลวสีเขียว
F 2.7	0.0067	ของเหลวสีเขียว
F 2.7	0.0032	ของเหลวสีเขียว
F 2.10	0.0754	ของเหลวสีเขียว

นำ fraction ที่ 2.1 และ 2.5 มาแยกต่อด้วย PLC ส่วน fraction อื่นๆไม่น่าสนใจจึงไม่นำมาแยกต่อ

Fraction ที่ 2.1 และ 2.5 นำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลาย 40%

EtOAc:Hexane ได้ผลดังตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.5 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.1

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1.1	0.0067	ของเหลวใส
F 2.1.2	0.0012	ของเหลวใส
F 2.1.3	0.0032	ของเหลวใส
F 2.1.1	0.0754	ของเหลวใส

ตารางที่ 4.6 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.5

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.5.1	0.0071	ของเหลวใส
F 2.5.2	0.0085	ของแข็งสีขาว
F 2.5.1	0.0071	ของเหลวใส
F 2.5.4	0.0071	ของเหลวใส

จากตารางที่ 4.5 F 2.5.2 เป็นของแข็งสีขาวนำมาตกผลึกด้วยเมทานอล ทำให้แห้งด้วย vacuum pump ได้ผลึกสีขาว น้ำหนัก 0.0061 กรัม จุดหลอมเหลว 177-179°C

ตารางที่ 4.7 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.1	0.0392	ของเหลวใส
F 3.2	0.0159	ของเหลวสีเหลือง
F 3.3	0.0071	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.3	0.0392	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.3	0.0616	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.6	0.0339	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.2	0.1240	ของเหลวสีเขียวอ่อน

จากตารางที่ 4.7 นำ fraction ที่ 3.4 3.5 และ 3.7 มาแยกด้วย PLC ด้วยระบบตัวทำละลาย 40% EtOAc:Hexane ได้ผลดังตารางที่ 4.7-4.9 ส่วน fraction อื่นๆมีปริมาณน้อยไม่น่าสนใจจึงไม่นำมาแยกต่อ

ตารางที่ 4.8 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.4

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.4.1	0.003	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.4.1	0.0049	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3.4.1	0.0132	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.9 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.5

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.5.1	0.0075	ของเหลวสีเขียวเหลือง
F 3.5.2	0.0126	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3.5.1	0.0132	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.10 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3.7

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.5.1	0.0444	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.5.2	0.0049	ของเหลวสีเขียวอ่อน
F 3.7.3	0.0075	ของเหลวสีเขียวอ่อน

Fraction ที่ 8 นำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลาย 10% EtOAc:Hexane ได้ผลดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 8

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 8.1	0.0054	ของเหลวสีเหลืองใส
F 8.2	0.0065	ของเหลวสีเหลืองใส
F 8.1	0.0065	ของเหลวสีเหลืองใส
F 8.2	0.0065	ของเหลวสีเหลืองใส
F 8.2	0.0054	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 8.1	0.0065	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 8.1	0.0132	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 8.1	0.0132	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 8.1	0.4770	ของเหลวสีเขียวเข้ม

จากสารทั้งหมดในตารางที่ 4.11 พบว่าได้สารปริมาณน้อยมากและไม่น่าสนใจจึงไม่นำมาแยกต่อ

CG-LE-HX

ตารางที่ 4.12 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-LE-HX

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1	0.0054	สีเขียวเหลือง
F 2	0.0065	สีเขียวเข้ม
F 2	0.0065	สีเขียวเข้ม
F 4	0.0047	สีเขียวเข้ม

จากตารางที่ 4.12 นำ fraction ที่ 1 และ 2 มาแยกต่อซึ่งได้ผลดังตารางที่ 4.13 และ 4.14 ส่วน fraction ที่ 3 และ 4 มีคลอโรฟิลล์จำนวนมากจึงไม่ทำการแยกต่อ

ตารางที่ 4.13 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 1

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1.1	0.1352	ของเหลวหนืดสีขาว
F 1.1	0.6602	ของเหลวหนืดสีเหลือง
F 1.1	2.8932	ของเหลวสีน้ำตาล
F 1.1	1.2722	ของเหลวสีเขียว
F 1.1	0.5437	ของเหลวสีเขียว
F 1.6	0.6287	ของเหลวสีเขียว

ตารางที่ 4.14 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1	3.6117	ของเหลวหนืดสีเหลือง
F 2.1	2.1464	ของเหลวหนืดสีเขียว
F 2.1	2.0544	ของเหลวหนืดสีเขียว
F 2.4	1.3131	ของเหลวหนืดสีเขียว
F 2.5	0.5924	ของเหลวหนืดสีเขียว

นำ fraction ทั้งหมดจากตารางที่ 4.13 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดย NMR fraction 2.1 น่าสนใจจึงนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลาย 10% EtOAc:Hexane ได้ผลดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2.1

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1.1	0.4133	ของเหลวหนืดสีขาว
F 2.1.2	0.3548	ของเหลวหนืดสีขาว
F 2.1.3	0.2116	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
F 2.1.1	0.0159	ของแข็งสีขาว
F 2.1.2	0.2983	ของเหลวหนืดสีขาว
F 2.1.1	0.3418	ของเหลวหนืดสีขาว
F 2.1.2	0.3548	ของเหลวหนืดสีขาว
F 2.1.8	0.4110	ของเหลวหนืดสีขาว

จากตารางที่ 4.14 พบว่า F 2.1.4 เป็นของแข็งสีขาว จึงนำมาตกผลึกด้วยเมทานอลได้สารบริสุทธิ์ CG-2 0.0012 กรัม ผลึกรูปเข็ม จุดหลอมเหลว 137-139 °C

CG-RT-Et

ตารางที่ 4.16 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-RT-Et

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1	0.0902	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1	0.011	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3	0.0285	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4	0.0367	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3	0.0128	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6	0.0902	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3	0.0298	ของเหลวสีเขียวเข้ม

นำทุก fraction จากตารางที่ 4.16 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ผลดังตารางที่ 4.17-4.23

ตารางที่ 4.17 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 1

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1.1	0.0120	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1.2	0.0073	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1.1	0.0285	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1.4	0.0063	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1.1	0.0298	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.18 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1	0.0066	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0029	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.19 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1	0.0066	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0066	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 3.3	0.0066	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.20 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 4

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 4.1	0.1120	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4.1	0.0117	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4.1	0.0052	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4.1	0.1120	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.21 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 5

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 5.1	0.0052	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4.1	0.005	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 5.1	0.0039	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.22 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 6

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 6.1	0.0032	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6.2	0.0036	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6.2	0.0032	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6.4	0.0036	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6.5	0.0032	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.23 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 7

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 6.1	0.0027	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 7.2	0.0028	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 6.5	0.0150	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 7.4	0.0032	ของเหลวสีเขียวเข้ม

นำทุก fraction จากตารางที่ 4.16-4.22 มาทดสอบด้วย TLC พบว่าส่วนใหญ่เป็นคลอโรฟิลล์จึงนำทุก fraction ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดย NMR พบว่าไม่มี fraction ใดน่าสนใจจึงไม่ทำการแยกต่อ

CG-LE-Et

ตารางที่ 4.24 น้ำหนัก ลักษณะของแต่ละ fraction ของ CG-LE-Et

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 1	0.3342	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2	0.1292	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2	0.0616	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 4	0.0561	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 1	0.0056	ของเหลวสีเขียวเข้ม

นำ fraction ที่ 2 3 และ 4 ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยระบบตัวทำละลาย 20% 30% และ 40% EtOAc:Hexane ตามลำดับ ได้ผลดังตารางที่ 4.25-4.27

ตารางที่ 4.25 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 2

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 2.1	0.0157	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0056	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0069	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0069	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0190	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.6	0.0069	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.7	0.0240	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.6	0.0157	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.2	0.0155	ของเหลวสีเขียวเข้ม
F 2.10	0.0021	ของเหลวสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.26 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 3

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.1	0.0121	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
F 3.1	0.0095	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
F 3.1	0.0440	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม

ตารางที่ 4.27 น้ำหนัก ลักษณะของ fraction ที่ 4

Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะสารที่ได้
F 3.1	0.0418	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
F 4.2	0.0121	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
F 4.2	0.0121	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
F 4.4	0.0121	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม

นำทุก fraction จากตารางที่ 4.24-4.26 มาทดสอบด้วย TLC พบว่าส่วนใหญ่เป็นคลอโรฟิลล์ จึงนำทุก fraction ไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดย NMR พบว่าไม่มี fraction ใดน่าสนใจจึงไม่ทำการแยกต่อ

จากการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่ active ทั้งหมด พบว่าได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด ไดคลอโรมีเทนจากราก (CG-RT-CH) ให้สารบริสุทธิ์ CG-1 และส่วนสกัดเอทานอลจากใบ (CG-LE-HX) ให้สารบริสุทธิ์ CG-2 นำสารบริสุทธิ์ทั้งสองไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดย IR และ NMR ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.28-4.33

ตารางที่ 4.28 ข้อมูลจาก IR- spectra ของ CG-1

ความถี่ (cm ⁻¹)	หมู่ฟังก์ชัน
3439.1	O-H stretch
3030.1	C-H stretch
3439.1	C-H stretch CH ₂
2863.4	sp ³ C-H stretch
2863.4	C=C stretch
3439.1	CH ₂ bend
1380.6	CH ₂ bend
2063.4	C-O stretch
879.2	=C-H out-of-plane bending

ตารางที่ 4.29 ข้อมูลจาก $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ CG-1

ค่า chemical shift (ppm)	ชนิดของโปรตอน
0.78, s	C-CH_3
0.78, s	C-CH_3
0.85, s	C-CH_3
0.78, s	C-CH_3
0.85, s	C-CH_3
1.05, s	C-CH_3
1.27, s	C-CH_3
1.28, s	C-CH_3
1.28, s	C-CH_3
1.41, s	C-CH_3
0.78, s	C-CH_3
1.68, s	$\text{CH}_3\text{-CH=C}$
1.94, m	$\text{C-CH}_2\text{-C}$
1.94, m	$\text{CH}_3\text{-CH=C}$
3.20, m	CH-O
4.58, m	HC=CH_2
3.20, m	=CH-CH_2
1.60-0.70, m	$\text{CH-}, \text{CH}_2\text{-}$

ตารางที่ 4.30 ข้อมูลจาก ^{13}C -NMR spectra ของ CG-1

ค่า chemical shift (ppm)	ชนิดของคาร์บอน
14.56	R-CH_3
14.56	R-CH_3
18.33	R-CH_3
14.56	$\text{R-CH}_3, \text{R-CH}_2\text{-R}$
27.99	$\text{R-CH}_2\text{-R}$
14.56	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
14.56	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
40.86	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
27.99	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
27.99	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
14.56	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
14.56	$-\text{C-O}-$
109.32	$-\text{C}=\text{C}-$
109.32	$-\text{C}=\text{C}-$

ตารางที่ 4.31 ข้อมูลจาก IR- spectra ของ CG-2

ความถี่ (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชัน
3439.1	O-H stretch
3439.1	C-H stretch CH_2
2863.4	sp^3 C-H stretch
1738.2	C=C stretch
1738.2	C=C stretch
1738.2	CH_2 bend
3439.1	CH_2 bend
3439.1	C-O stretch

ตารางที่ 4.32 ข้อมูลจาก $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ CG-2

ค่า chemical shift (ppm)	ชนิดของโปรตอน
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.81, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.87, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
0.70, s	C-CH_3
1.60, m	$\text{C-CH}_2\text{-C}$
1.85, m	$\text{C-CH}_2\text{-C}$
1.35, m	$\text{CH}_2\text{-C=O}$
1.35, m	$\text{CH}_2\text{-C=O}$
1.60, m	CH-O
1.35, m	HC=CH_2
5.16, m	HC=CH_2
0.70, s	C-CH_3
1.40-0.70, m	HC=CH_2

ตารางที่ 4.33 ข้อมูลจาก ^{13}C -NMR spectra ของ CG-2

ค่า chemical shift (ppm)	ชนิดของคาร์บอน
18.78	R-CH_3
18.78	R-CH_3
21.21	$\text{R-CH}_3, \text{R-CH}_2\text{-R}$
18.78	$\text{R-CH}_3, \text{R-CH}_2\text{-R}$
18.78	$\text{R-CH}_3, \text{R-CH}_2\text{-R}$
18.78	$\text{R-CH}_3, \text{R-CH}_2\text{-R}$
31.92	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R-CH}_2\text{-R}, \text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
18.78	$\text{R}_3\text{CH}, \text{R}_4\text{C}$
71.81	-C-O-
18.78	$\text{-C-}\bullet\text{-}$
121.90	R-CH_3
121.90	$\text{-C-}\bullet\text{-}$
135.37	-C=C-
121.90	-C=C-

ตารางที่ 4.34 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (P388) ของสารสกัดบริสุทธิ์จาก
ต้นสามพันตา

Test material	Final Drug Conc. (µg/ml)	Cell Count									% Growth at Day 4
		Day 0			Day 1	Day 2	Day 3	Day 4			
		Cells /						Cells /			
		5 sq	Flask	Mean				5 sq	Flask	Mean	
-	Control	-	5x10 ⁴	-	-	-	-	235	4.70x10 ⁶	4.23x10 ⁶	100
GC-1	30	-	5x10 ⁴	-	-	-	-	188	3.76x10 ⁶		39.01
		-	5x10 ⁴	-	-	-	-	76	1.52x10 ⁶	1.65x10 ⁶	
		-	5x10 ⁴	-	-	-	-	89	1.78x10 ⁶		
GC-2	30	-	5x10 ⁴	-	-	-	-	277	5.54x10 ⁶	4.82x10 ⁶	113.95
		-	5x10 ⁴	-	-	-	-	205	4.10x10 ⁶		

หมายเหตุ สารสกัดหมายเลข GC-2 ของต้นสามพันตา เมื่อละลายในตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ DMSO, Chloroform และ media (DMSO: chloroform = 2:1) จะมีลักษณะเป็นคอลลอยด์

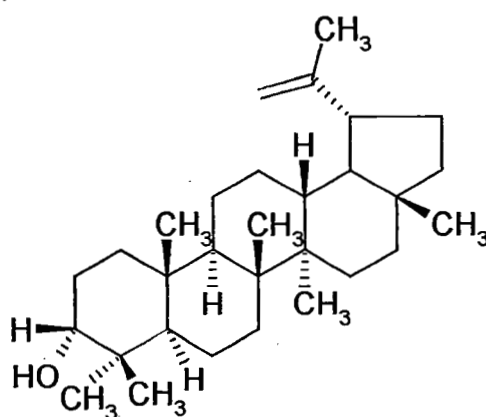
บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

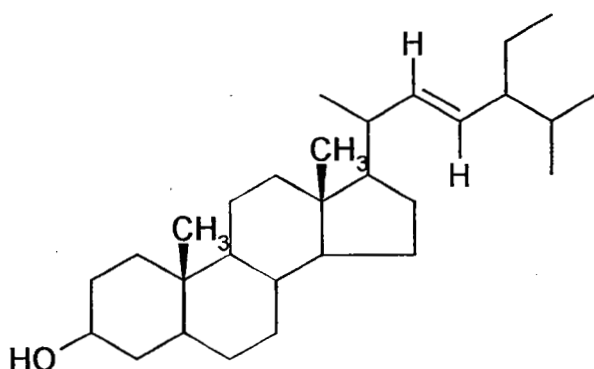
จากการหาสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดที่ active ให้สารบริสุทธิ์ 2 ตัว คือ CG-1 มีจุดหลอมเหลว 177-179 °C 0.0061 กรัม และ CG-2 มีจุดหลอมเหลว 137-139 °C 0.0012 กรัม

CG-1 จากข้อมูล IR $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (ตารางที่ 4.27-4.29) ของ CG-1 มีค่าใกล้เคียงกับ Lupeol จึงสรุปได้ว่า CG-1 คือ Lupeol



Lupeol

CG-2 จากข้อมูล IR $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (ตารางที่ 4.30-4.32) ของ CG-2 มีค่าใกล้เคียงกับ Stigmasterol จึงสรุปได้ว่า CG-2 คือ Stigmasterol



Stigmasterol

นำสารบริสุทธิ์ 2 ตัวนี้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งรังลิคิเมีย โดยการละลายใน DMSO แต่พบว่าสารทั้งสองชนิดละลายใน DMSO น้อยมากจึงปรับวิธีการละลายใหม่ ด้วยใช้ DMSO : Chloroform ในอัตราส่วน 2:1 พบว่า สาร Lupeol ละลายค่อนข้างดี ในขณะที่ Stigmasterol มีลักษณะ

เป็นสารแขวนลอย (Colloid) และยังพบว่าคุณสมบัติในการละลายมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือ Lupenol ที่ความเข้มข้น $30 \mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้มากกว่า 50% ส่วน Stigmasterol ซึ่งละลายได้น้อย ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) ควรหาเทคนิคอื่นๆที่ใช้แยกสารที่ไม่สามารถมองเห็นได้ในแสงยูวี
- 2) ควรนำต้นไม้มันชนิดอื่นที่อยู่ในตระกูลเดียวกันมาทำการสกัดและตรวจสอบสารที่ได้ว่าเป็นสารประเภทเดียวกันหรือไม่
- 3) ในกรณีสาร Stigmasterol ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก Crude extract (RT-HX) ที่ค่อนข้าง Active ($\text{ED}_{50} \sim 30 \mu\text{g/ml}$) แต่เมื่อทดสอบกับสาร Stigmasterol พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยไม่ละลายในตัวทำละลายตัวเดียวกับ Lupenol ซึ่งสมควรศึกษาการละลายที่ดีกว่า อาจจะพบฤทธิ์ที่ดีขึ้นด้วย
- 4) ควรนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่นอกเหนือจากการออกฤทธิ์ที่นอกเหนือจากการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

บรรณานุกรม

1. เพลด็จ สิริสุนทรและคณะ.คู่มือปฏิบัติการเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543
2. สมพงษ์ จันทรโพธิ์ศรี. เคมีอินทรีย์ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมวิชาการ
3. Meenakshi and other. Journal written in English Cancer Biology Unit. India, 2003
4. Meenakshi, J. and Shanmugam, G., Cleistanthin A, a diphyllin glycoside from *Cleistanthus collinus* is cytotoxic to PHA-stimulated (proliferating) human lymphocytes, Drug Development Research 51, 3, 187, (2000)
5. Pradheephuman, C.P. and Shanmugam, G., Anticancer potential of cleistanthin A isotated from the tropical plant *Cleistanthus collinus* Oncology Research 11, 5, 225, (1999)
6. Kumar, C.P., Pradheep, P.G. and Shunmugam G., Cleistanthin B cause G1 arrest and induces apoptosis in mammalian cells Apoptosis 3, 6, 413, (1998)
7. Prabhakarn, C., Pradheep, P., Panneerselvan, N., Rajesh, So and S. Shanmugam, G. Cytotoxic and genotoxic effects of Cleistanthin B in normal and tumor cells Mutagenesis, 11, 6, 553, (1996)
8. Sastry, K.V. , Rao, E., Venkata, Buchanaw, J.G. and Sturgeon, R.J., Cleistanthoside B, a diphyllin glycoside from *Cleistanthus patulus* heartwood Phytochemistry 26, 4, 1153, (1987)
9. Latha W., Madhy; Rao, V.S. Sundara, Reddy K.K., and Sastry, K.N.N., Phenolic constituents of karada (*Cleistanthus collinus*) Leather Science (Madras) 32, 3, 65, (1985)
10. Satyanarayana, P., Subrahmanyam, P., Rao, P. and Koteswara., Chemical constituents of *Cleistanthus collinus* roots Indian Journal of Pharmaceutical Science, 46, 2, 95, (1984)
11. Sastry, K.V., Rao, E. Venkata, Isotation and structure of cleistanthoside A Planta Medica, 47, 4, 227, (1983)

12. Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Archuta, Row, L. Ramachandra, Venkateswarlu, R., Pelter, A. and ward, R.S., New lignans from the hartwood of *Cleistanthus collinus* Tetrahedron, 37, 21, 3641, (1981)
13. Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Atchuta, Row, L. and L. Ramachandra., Indian Journal of Chemistry, Section B : Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry 15, 1, 10, (1977)
14. Anjaneyulu, A.S.R., Ramaiah, P., Atchuta, and Row, L. Ramachandra, New diphyllin glycoside from *Cleistanthus collinus* Phytochemistry, 14, 8, 1875, (1975)
15. Pegel, K.H., Candy, H.A. and Pakshong, Joan M., Pimarane diterpenes from *Cleistanthus schlechteri* Journal of Chemical Society (section C) : Organic 18, 2536, (1970)
16. Lakshmi, Mrs.T.G., Srimannaryana, G. and Rao, N.V. Subber., Current Science, 39,17,395, (1970)