รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย

Chemical constituents and bioactive compound from

Buchanania siamensis Miq.

โดย

ดร. อรพรรณ ยอดสะอึ และคณะ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 118/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย

Chemical constituents and bioactive compound from *Buchanania siamensis* Miq.

คณะผู้วิจัย	**สังกัด**
ดร. อรพรรณ ยอดสะอี	คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ดร. นิรามัย ฝางกระโทก	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
ดร. ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์	คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
ผศ. ดร. รุ่งนภา แซ่เอ็ง	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เดือนที่ได้รับทุน

เดือนตุลาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 118/2559 ขอขอบพระคุณ ดร. จักรพงษ์ รัตตะมณี คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สำหรับการอนุเคราะห์ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพืช ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์และคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือในการวิทยาศาสตร์

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 118/2559). We are very grateful to Dr. Chakkrapong Rattamanee for plant identification. We would like to express our appreciation to the Faculty of Science and Social Sciences, Faculty of Agricultural Technology and Faculty of Science, Burapha University and Center for Research and Development of Herbal Health Products (CRD-HHP), Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University for making this research possible.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาก่อน คือ Koaburside และจากการสกัดสารจากส่วนของใบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (**BS1**) และเมทานอล (**BS2**) และจากส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (**BS3**) และเมทานอล (**BS4**) ได้นำมาศึกษาลักษณะของโครมาโตกราฟีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อาทิ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านเชื้อรา ซึ่งสารสกัดจากเมธานอลมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทน โดยสารสกัด **BS4** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.1±0.1 μg/ml ซึ่งสูงกว่าสารสกัด **BS2, BS3** และ **BS1** ตามลำดับ สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์แมคโครเฟจ RAW264.7 ในสภาวะที่มี LPS ชักนำได้ โดยเฉพาะ **BS3** (IC_{50} เท่ากับ 94.47±23.50 μg/ml) สารสกัด **BS1** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT, HepG2, MCF-7 และ MDA-MB-231 มากกว่าสารสกัดชนิดอื่น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 119.41±4.80, 196.47±41.36, 264.76±8.50 และ 289.81±36.57 μg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่า **BS1** มีค่า selectivity index (SI) ต่ำกว่าสารสกัดชนิดอื่น และที่น่าสนใจไปกว่านั้นสารสกัดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับชนิด HepG2 ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 นอกจากนี้ สารสกัด **BS4** มีค่า SI ของเซลล์ HepG2 เท่ากับ 2.25 ซึ่งสูงกว่าสารสกัด **BS2**, **BS3** และ **BS1** (SI เท่ากับ 1.58, 0.88 และ 0.61, ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารสกัด BS1 และ BS3 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเหล่านี้ผ่านการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ ยังมีอีกหนึ่งสารสกัดคือ **BS3** ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, S. epidermidis* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ดีกว่าสารสกัด **BS1, BS2** และ **BS4** จากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัด **BS3** โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission electron microscopy (TEM) กับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. cereus* พบว่า สารสกัดสามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นสารสกัดจากต้นธนนไชยจึงอาจจะเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาต่อยอดทางด้านยาสมุนไพรและการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

Abstract

The chemical comstituent from the stems of *Buchanania siamensis* Miq., led to isolation of one known compound: Koaburside. Its leaves and stems were extracted by using dichloromethane and methanol and the extracts were called as **BS1**, **BS2**, **BS3** and **BS4**, respectively. Thin layer chromatography fingerprint, antioxidant activity, total phenolic content, anticancer, antibacterial and antifungal activities of the extracts were studied. The methanolic extracts contained higher total phenolic content than those of dichloromethane extracts but no significant difference between stems and leaves. **BS4** showed higher antioxidant activity (EC_{50} of 7.1±0.1 µg/ml) than **BS2**, **BS3** and **BS1**, respectively. All extracts inhibited nitric oxide production from LPS-induced RAW264.7 cells especially BS3 by IC_{50} of 94.47±23.50 µg/ml). **BS1** exhibited highest cytotoxicity against HaCaT, HepG2, MCF-7 and MDA-MB-231 cells by IC_{50} of 119.41±4.80, 196.47±41.36, 264.76±8.50 and 289.81±36.57 µg/ml, respectively. However, the **BS1** showed lower selectivity index (SI) against those cancerous cell lines. Interestingly, the extracts could significantly inhibit the proliferation of liver hepatocellular cells, HepG2, stronger than human breast cancer cells, MCF-7 and MDA-MB-231. In addition, SI of **BS4** against HepG2 cells was 2.25 which higher than **BS2**, **BS3** and **BS1** (SI of 1.58, 0.88 and 0.61, respectively). Moreover, BS1 and BS3 could inhibit the proliferation of those cancer cells via apoptotic induction. These results suggested that *B. siamensis* extracts have high antioxidant and anticancer activities, especially **BS4**. The **BS3** also exhibited stronger antibacterial activities against both Gram-positive bacteria: *B. subtilis, B. cereus, S. epidermidis* and *S. aureus* and Gram-negative bacteria: *E. coli* and *P. aeruginosa* than **BS1**, **BS2** and **BS4**. We further studied the possible mode of action of **BS3** against *B. subtilis* and *B. cereus* by observing the bacteria cell morphology through transmission electron microscopy (TEM). From the TEM results, it was clearly indicated that the cell walls of *B. subtilis* and *B. cereus* were completely deformed. This mechanism of BS3 was correlated to their strong antibacterial activity. Therefore, the results from this study suggested that **BS3** extract may interact with or damage the cell wall of *B. subtilis* and *B. cereus* as seen by the formation of pores on the cell wall of *B. subtilis and B. cereus*. Therefore, *B. siamensis* extracts can be a good candidate for further studies in herbal medicine and natural product developments.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ (ภาษาไทย)	ii
กิตติกรรมประกาศ (ภาษาอังกฤษ)	iii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	iv
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	v
สารบัญ	vi
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
สารบัญแผนภาพ	xi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xii
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	4
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	5
ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
วิธีดำเนินการวิจัย	
การสกัดและการแยกสารจากต้นธนนไชย	9
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	10

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย 15

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC 18

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิค 18

ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide 19

ผลการทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity 25

ผลการศึกษาการตายแบบ apoptosis 30

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดธนนไชย 34

วิจารณ์ผลการทดลอง 38

สรุปและเสนอแนะ 41

ผลผลิต 42

รายงานสรุปการเงิน 43

บรรณานุกรม 44

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด 48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล ^{1}H, ^{13}C NMR, DEPT และ HMBC (400 และ 100 MHz, DMSO-d_6) ของสาร **compound 1** (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz) 17

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิคของสารสกัดธนนไชย 19

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO 25

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} และ SI ของสารสกัดแต่ละชนิดที่มีต่อเซลล์ที่ทดสอบ 30

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 34

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 36

ตารางที่ 7 ผลของการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด **BS3** 37

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นธนนไชย 15

ภาพที่ 2 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **compound 1** 16

ภาพที่ 3 TLC fingerprint ของสารสกัดจากธรรมไชย 18

ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดจากใบธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ 20

ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดจากลำต้นธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ 21

ภาพที่ 6 ผลของสาร **compound 1** บริสุทธิ์จากธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ 21

ภาพที่ 7 ผลของสารสกัดจากใบธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS 22

ภาพที่ 8 ผลของสารสกัดจากลำต้นธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS 23

ภาพที่ 9 ผลของ **compound 1** จากธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS 24

ภาพที่ 10 ผลของสาร L-NAME ที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS 24

ภาพที่ 11 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HaCaT 26

ภาพที่ 12 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 27

ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 28

ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MDA-MB-231 29

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 15 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง HepG2 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml 31

ภาพที่ 16 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml 32

ภาพที่ 17 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml 33

ภาพที่ 18 ผลการทดสอบสารสกัดที่มีผลต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM 37

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่1 แสดงกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 7

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

s	=	*singlet*
d	=	*doublet*
m	=	*multiplet*
dt	=	*doublet of triplet*
br s	=	*broad singlet*
g	=	gram
nm	=	nanometer
mp	=	melting point
cm^{-1}	=	reciprocol centimeter (wave number)
δ	=	chemical shift relative to TMS
J	=	coupling constant
$[\alpha]_D$	=	specific rotation
λ_{max}	=	maximum wavelength
ν	=	absorption frequencies
ε	=	molar extinction coefficient
$^{\circ}C$	=	degree celcius
MHz	=	Megahertz
ppm	=	part per million
c	=	concentration
IR	=	Infrared

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

UV-VIS	=	Ultraviolet-Visible
MS	=	Mass Spectroscopy
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	=	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
DMSO-d_6	=	Deuterodimethylsulfoxide
NO	=	Nitric Oxide
LPS	=	Lipopolysaccharide
µM	=	micro molar
µg	=	micro gram
IC_{50}	=	the half maximal inhibitory concentration

บทนำ

ธนนไชย (*Buchanania siamensis* Miq) เป็นไม้ยืนต้นอยู่ในวงศ์ ANACARDIACEAE มีชื่อเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น ภาคกลางเรียก ธนนไชย นครราชสีมาเรียก ศรีธนนไชยอุบลราชธานีเรียกรวงไช รางไช รางไทย ปราจีนบุรีเรียก ลังไช ภาคใต้และราชบุรีเรียก พังพวยนก, พังพวยป่า, ลันไชย

ต้น ไม้ยืนต้นลำต้นเล็กถึงขนาดใหญ่ ปลายกิ่งลู่ลง กิ่งอ่อนมีขนขึ้นประปราย เมื่อแก่ขนจะหลุดออก ผิวเปลือกขรุขระแตกเป็นสะเก็ดสีเทาหรือสีเทาปนดำ

ใบ เป็นใบเดี่ยวออกเรียงสลับที่ปลายกิ่ง ทรงมนรี เนื้อใบเปราะหนา ผิวหลังใบเรียบเกลี้ยง ใต้ท้องใบจะมีขนและเส้นแขนงของใบเห็นได้ชัดมาก

ดอก ออกเป็นช่อยาวตามซอกใบ สีขาวอมเหลืองอ่อน

ผล เดี่ยว ค่อนข้างกลม ปลายผลหยักหรือเว้าเล็กน้อยผลมีขนเล็กน้อย เมื่อแก่สีม่วงหรือดำ

พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ธนนไชยพบทั่วไปตามป่าเต็งรังและป่าผลัดใบ ขยายพันธุ์ ด้วยเมล็ด ปักชำกิ่ง ชอบความชื้นมาก และแสงแดดเต็มวัน

ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักสด และสรรพคุณทางสมุนไพร ลำต้น ราก ต้มน้ำดื่มแก้ผิดสำแดงเปลือกต้มผสมเกลือ รักษารำมะนาดในปาก (เต็ม, 2544)

สกุล Buchanania พบในประเทศไทย 9 สกุล (สุเทพ) และมีผู้ศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีในพืชชนิดต่างๆ จากสกุลนี้น้อยมาก โดยเฉพาะในกรณีของพืชชนิดนี้ ยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับทั้งองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ

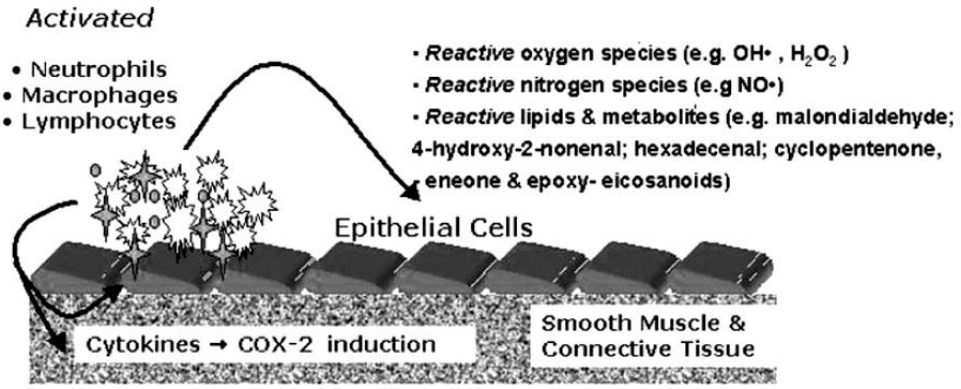
แต่จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพืชสกุลนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการเช่น จากต้นมะม่วงหัวแมงวัน (*Buchanania lanzan* Spreng.) แสดงฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายในหนูทดลอง (Puri *et al*., 2000) ต้านอนุมูลอิสระ (Kumari and Kakkar, 2008) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Pattnaik *et al*., 2013)

จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย กอร์ปกับการทดสอบเบื้องต้นของส่วนสกัดหยาบจากพืชชนิดนี้ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชชนิดนี้

มะเร็งเป็นสาเหตุต้นๆ ของการเสียชีวิตของประชากรจึงจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั้งในประเทศไทยและทุกประเทศทั่วโลก มะเร็งเป็นสภาวะที่ร่างกายไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติได้ ซึ่งมีเกิดจากการกลายพันธุ์ใน DNA โดยมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น

เกิดกระบวนการ carcinogenensis การได้รับสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (carcinogens, mutagens) การติดเชื้อไวรัสบางชนิด และการได้รับรังสีบางชนิด เป็นต้น หากการกลายพันธุ์ที่เกิดใน DNA นั้น มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ proto-oncogenes ไปเป็น oncogenes และการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างผิดปกติกลายเป็น malignant neoplastic cell และเมื่อเซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งเซลล์จะเกิดการสูญเสียคุณสมบัติ contact inhibition เกิดการต้านทานต่อการเกิด apoptosis และไม่ตอบสนองต่อ cell growth arrest signals จากนั้นจึงเกิดการสร้างเส้นเลือดเข้าไปหล่อเลี้ยง (angiogenesis) และเกิดการบุกรุกไปยังเนื้อเยื่อบริเวณอื่น (metastasis)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการในการสอบสนองของร่างกายเพื่อป้องกันและกำจัดการบุกรุกของเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอมโดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ เช่น neutrophils, macrophages, lymphocytes เป็นต้น และการสร้างสาร pro-inflammatory mediators ต่างๆ ของเซลล์ดังกล่าว เช่น cytokines, reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) เป็นต้น (รูปที่ 1) แล้วส่งผลให้เกิดการสร้าง inflammatory mediators เช่น histamine, bradykinin และ prostaglandins เป็นต้น แล้วจึงเกิดกระบวนการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตาม การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่มากจนเกินไป การอักเสบเรื้อรัง หรือการสูญเสียสมดุลย์ในการควบคุมกระบวนการอักเสบสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการ carcinogenesis และนำไปสู่การเกิดมะเร็งได้ เช่น ในการทำงานของ granulocytes และlymphocytes เซลล์เหล่านี้สามารถสร้างสารที่สามารถจัดเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่น hydrogen peroxide, oxy radicals, nitric oxide, malondialdehyde, 4-hydroxy-2-nonenal โดย oxy radicals ที่ได้จาก hydrogen peroxide สามารถจับทำลายที่ DNA ได้โดยตรง นำไปสู่การเกิดการกลายพันธุ์ใน oncogenes หรืออาจจะกระทบต่อการกระบวนการเกิด gene transcription และกด genomic repair pathway (Fitzpathick, 2001)



รูปที่ 1 โมเดลของการเกิดเซลล์มะเร็งที่เกิดจากการชักนำโดยกระบวนการอักเสบ

(ที่มา: Fitzpathick, 2001)

อนุมูลอิสระ (free radicals หรือ oxidants) เป็น oxidizing agent ซึ่งประกอบด้วย reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), reactive chloride species (RCS) และ sulfur แต่ ROS เป็น oxidant ที่เป็นสาเหตุหลักในการเกิด oxidative damage ต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆ โดยปกติร่างกายจะมีกระบวนการกำจัด ควบคุมอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เพื่อคงไว้ซึ่งสมดุลย์ของร่างกาย ได่แก่ catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น vitamin C, vitamin E, vitamin A, flavonoids, albumin, glutathione, polyphenols เป็นต้น (Nourazarian *et al.,* 2014) สำหรับสาร antioxidant ที่มาจากพืช (phytochemical antioxidants) เช่น vitamin C, vitamin E, vitamin K, pigments ต่างๆ เช่น carotenoids (β-carotene), xanthophylls, lycopene, anthocyanins และสาร phenolic และ polyphenols ต่างๆ สามารถออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งส่งผลให้ช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังได้ (Gupta *et al*., 2014)

การตายแบบ apoptosis หรือ programmed cell death เป็นการกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ เซลล์ที่ไม่ต้องการ หรือเซลล์ที่ไม่มีมีความจำเป็นแล้วโดยไม่ทำให้เกิดการอักเสบตามมา การตายแบบ apoptosis นี้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทั้งระดับโมเลกุลและรูปร่างเซลล์ โดยเซลล์ที่ถูกชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis นี้จะเกิดการหดตัวรวมกันแน่นของ chromatin และจะไปรวมกันอยู่ด้านในด้านหนึ่งของ nuclear membrane ทำให้มองเห็นนิวเคลียสมีลักษณะคล้ายจันทร์เสี้ยว เซลล์จะมีลักษณะกลมขึ้นและลดขนาดลง จากนั้น chromatin ที่อัดกันแน่นจะเกิดการแตกหัก (DNA fragmentation) จากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงของ plasma membrane เข้ามาห่อหุ้มส่วนของนิวเคลียสที่แตกหักและ organelles ต่างๆ หรือการเกิด membrane blebbing และเมื่อ cell membrane เสียสภาวะ membrane integrity แล้วจะทำให้เกิด apoptotic bodies ในระยะนี้เซลล์พวก phagocytes จะเข้ามาจับกิน apoptotic bodies เหล่านี้หรือเข้ามาจับในระยะก่อนเกิด apoptotic bodies เล็กน้อย (Wong, 2011) การตายแบบ apoptosis นี้ มีความสำคัญต่อการเกิด carcinogenesis การควบคุมการเกิดเซลล์มะเร็งและการรักษามะเร็ง โดยในการเกิด carcinogenesis จะมีการรบกวนสมดุลย์ระหว่าง pro-apoptotic และ anti-apoptotic proteins ลดการทำงานของ caspases และทำให้ death receptor signaling ถูกยับยั้งการทำงานลง จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ขึ้น และเมื่อการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เสียสมดุลย์ไปแล้วทำให้ไม่สามารถควบคุมหรือกำจัดเซลล์ที่ผิดปกตินั้นได้ จึงเกิดเป็นเซลล์มะเร็ง (Wong, 2011) หากมีวิธีการใดที่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งนั้นกลับมาเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ อาจจะทำให้สามารถรักษาโรคมะเร็งนั้นๆ ได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญในการศึกษาเพื่อค้นคว้าหายามารักษาโรคและใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบเคมีชนิดต่างๆ (partial synthesis) ดังนั้นการค้นหาองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบใหม่ๆในอนาคต ซึ่งปัจจุบันนี้ได้มีการนำพันธุ์ไม้หลายชนิดมาใช้เป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานในปริมาณมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอย่างเป็นระบบ เพื่อแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้นอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์ และนำไปใช้ประโยชน์อย่างถูกต้อง จึงจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด

ดังนั้นจึงมีการวิจัยเพื่อหาองค์ประกอบสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค หรือเพื่อสังเคราะห์สารคล้ายคลึง อย่างไรก็ตามการสกัดแยกสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นเพียงการเริ่มต้นในกระบวนการศึกษา เพื่อที่จะค้นพบสาระสำคัญใหม่ๆ เช่น การหาเอกลักษณ์หรือโครงสร้างของสารและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนั้นๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการสังเคราะห์ เภสัชเคมีและการแพทย์ต่อไป

ในปัจจุบันผู้คนส่วนใหญ่ต้องเผชิญกับสภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการทำลายระบบอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นที่เป็นสาเหตุของโรคภัยต่างๆ เช่น โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน โรคเบาหวาน และ โรคมะเร็ง ซึ่งโรคมะเร็งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอันดับต้นๆ ของประเทศไทย จากรายงานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2554 ได้ระบุว่ามะเร็งที่พบมาก 3 อันดับแรกในชายไทย คือ มะเร็งลำไส้ (16.2%), มะเร็งปอดและหลอดลม (15.5%) และมะเร็งตับและถุงน้ำดี (15.3%) ในขณะที่มะเร็งที่พบมากในหญิงไทย คือ มะเร็งเต้านม (37.5%), มะเร็งปากมดลูก (14.4%) และมะเร็งลำไส้ (9.6%) (Attasara and Buasom, 2011) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ แม้ว่ามะเร็งหลายชนิดจะสามารถรักษาได้หากตรวจพบตั้งแต่ระยะเริ่มต้นด้วยการผ่าตัดร่วมกับการให้เคมีบำบัดและฉายรังสี แต่ผลข้างเคียงจากการรักษาด้วยเคมีบำบัดจะส่งผลกระทบต่อสภาพร่างกายและจิตใจของผู้ป่วยเป็นอย่างมาก ผู้ป่วยจำนวนมากทุกข์ทรมานจากผลข้างเคียงดังกล่าว นำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลว ปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษา เพื่อลดผลข้างเคียงและเพื่อเสริมการรักษาร่วมกับยาแผนปัจจุบัน

นอกจากนี้ สารสกัดจากสมุนไพรมีหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ เช่น แผลติดเชื้อที่บริเวณผิวหนัง แล้วแผลไม่ได้รับการดูแลรักษา จึงเกิดการติดเชื้อมีสาเหตุมาจากภาวะต่างๆได้ เช่น โรคเบาหวาน แผลกดทับ แผลติดเชื้อเรื้อรัง แผลไฟไหม้ เป็นต้น บาดแผลเรื้อรังเป็นบาดแผลที่ต้องใช้เวลาของกระบวนการซ่อมแซมรักษานานกว่าแผลทั่วไป อาจเกิดจาก

ภาวะแทรกซ้อนได้ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย อาการที่มีภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว อาจรุนแรงถึงขั้นสูญเสียอวัยวะหรือตาย

การติดเชื้อจากแบคทีเรียอาจพบเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Escherichia coli* ได้ ในการรักษาแผลเรื้อรังที่มีการติดเชื้อโดยใช้ยาปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เป็นเวลานานมักจะส่งผลให้เชื้อดื้อยา และยากต่อการรักษา ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ประโยชน์จึงนับว่าเป็นเรื่องที่สำคัญยิ่ง เนื่องจากผลที่ตามมาเป็นประโยชน์อย่างมาก และการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุต่อการติดเชื้อ

การวิจัยหาสารสำคัญจากสารสกัดธรรมชาติหรือจากสมุนไพรที่สามารถยับยั้งหรือต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการในการเกิดต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง เป็นหนทางหนึ่งในการค้นคว้าหาสารสำคัญที่สามารถรักษาและป้องกันไม่ให้เกิดโรคต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยไม่เกิดอาการข้างเคียง หรือเกิดอาการข้างเคียงน้อยที่สุด คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพจากต้นนี้ อีกทั้งจากการศึกษาวิจัยในระดับนำร่องเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากพืชสมุนไพรไทย ผู้วิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากลำต้นและใบธนนไชยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก และเนื่องจากนี้ยังไม่พบรายงานการวิจัยทั้งทางด้านการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของธนนไชย คณะผู้วิจัยยังสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ด้วย เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide ฤทธิ์ cytotoxicity และ วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการสังเคราะห์ เภสัชเคมีและการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย เพื่อเกิดองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนาเป็นยาในอนาคต
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของธนนไชย
3. เพื่อผลิตผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
4. เพื่อส่งเสริมการเชื่อมโยงและความร่วมมือระหว่างนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้อง
5. สร้างนักวิจัยใหม่เพื่อเข้าสู่วงการวิจัย

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1 เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร ธนนไชยจาก มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

2. สกัดสารด้วย เมทิลีนคลอไรด์และเมทานอล ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้อง แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน

3. แยกสารจากส่วนสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟีได้แก่ Quick column chromatography, Column chromatography, Thin Layer Chromatography และการตกผลึก

4. พิสูจน์โครงสร้างสารด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ เช่น Ultraviolet (UV), Infrared (IR), Nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectroscopy (MS) เป็นต้น

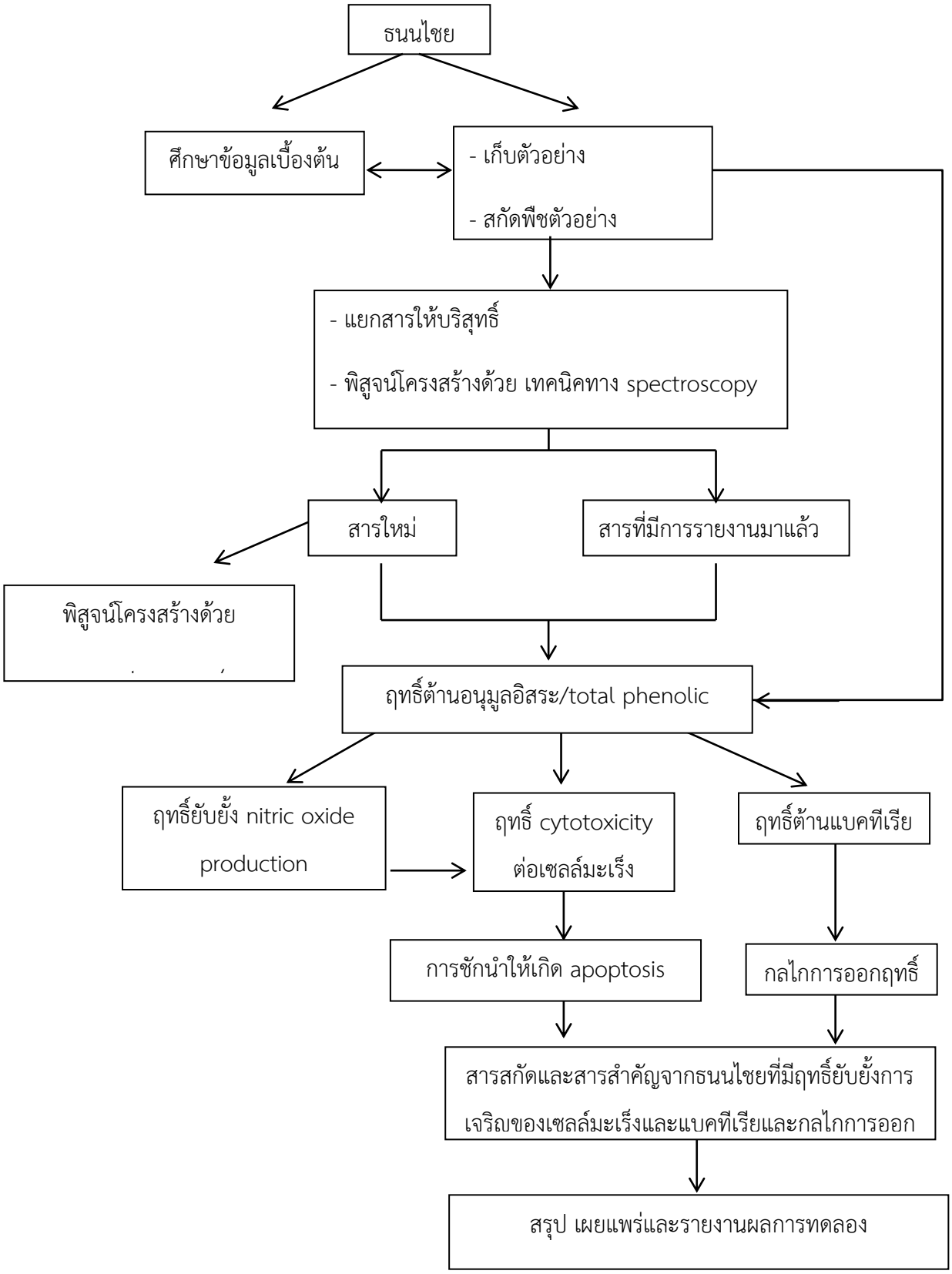
5 ถ้าสารที่ได้เป็นผลึก นำไปหาโครงสร้างโดยวิธีการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์บนผลึกเดี่ยว หาจำนวนอะตอม ความยาวพันธะ มุมพันธะและระนาบต่างๆ ของโมเลกุล เป็นต้น

6. นำส่วนสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอาทิ

- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- วิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content
- ฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide
- ฤทธิ์ cytotoxicity
- วิเคราะห์การตายแบบ apoptosis
- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

7. ถ้าสารบริสุทธิ์มีปริมาณมากพอ สังเคราะห์และดัดแปลงโครงสร้างของสารเพื่อหาสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



แผนภาพที่1 แสดงกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสารสำคัญและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ

2. ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์และสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อนำไปพัฒนายาจากสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ

3. ตีพิมพ์ผลงาน เผยแพร่ในวารสารวิชาการและประชุมวิชาการทั้งในหรือต่างประเทศ

4. สามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการส่งเสริมให้สมุนไพรไทยได้รับความน่าเชื่อถือจากผู้บริโภคและเผยแพร่สู่สากล

5. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการวิเคราะห์ต่างๆ สนับสนุนและพัฒนานักศึกษาระดับปริญญาตรีให้เป็นนักวิจัย

6. ส่งเสริมการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชสมุนไพรในท้องถิ่น เช่น สร้างสวนป่าสมุนไพรในมหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตสระแก้ว

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดและการแยกสารจากต้นธนนไชย

การสกัดสารจากส่วนของใบ

นำใบของต้นธนนไชยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้งรวม 316.7 กรัม แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (**BS1**, 10.60 g) จากนั้นทำการสกัดซ้ำแต่ใช้ MeOH แทน CH_2Cl_2 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ MeOH (**BS2**, 18.37 g)

การสกัดสารจากส่วนของลำต้น

นำลำต้นของต้นธนนไชยมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปตากลมให้แห้ง ได้น้ำหนักแห้งรวม 2.3 กิโลกรัม แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย CH_2Cl_2 2 ครั้งๆละ 5 วัน เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ CH_2Cl_2 (**BS3**, 6.09 g) จากนั้นทำการสกัดซ้ำแต่ใช้ MeOH แทน CH_2Cl_2 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออกได้ส่วนสกัดหยาบ MeOH (**BS4**, 97.80 g)

นำส่วนสกัดหยาบ MeOH (**BS4**, 97.80 g) จากส่วนของลำต้น มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography; QCC) และชะด้วย CH_2Cl_2 แล้วเพิ่มขั้วด้วย MeOH ตามลำดับ ได้ 11 fractions (B1-B11)

Fraction B8 (4.50 g) นำมาแยกต่อด้วย QCC และชะด้วย 60% acetone-hexane ได้ 9 subfractions (B8a-B8i) subfraction B8e (820.0 mg) นำมาแยกต่อด้วย column chromatography ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ และชะด้วย 15% MeOH- CH_2Cl_2 ได้สาร **compound 1** (40.6 mg)

Compound 1: ของแข็งสีขาว; mp 200-202 °C; $[\alpha]_D^{27}$ –41.4° (*c* 0.76, CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} (log ε) 206 (4.50), 225 (3.87), 270 (3.00) nm; IR (neat) υ_{max} 3429 (O-H), 2930 (C-H) cm^{-1}; ^1H NMR (*DMSO-d_6*, 400 MHz) และ ^{13}C NMR (*DMSO-d_6*, 100 MHz), ดูได้จากตารางที่ 1 เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การเตรียมตัวอย่างทดสอบ

สารสกัดจากใบและลำต้นของต้นธนนไชยที่สกัดด้วย CH_2Cl_2 และ MeOH รวมทั้งสิ้น 4 ตัวอย่างทดสอบ คือ **BS1**, **BS2**, **BS3** และ **BS4** ทำการละลายสารสกัดด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml แล้วกรองด้วย 0.45 um syringe filter จะได้ตัวอย่างสำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และ Tamoxifen ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่เป็นยาต้านมะเร็ง ถูกละลายด้วย DMSO ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml แล้วกรองเช่นเดียวกัน

2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC)

2.1. ละลายสารสกัดด้วยเมทานอล 1 mg/ml แล้ว spot บน TLC Silica gel 60 F254 plates (Merck KGaA, Germany) โดยเลน 1-11 คือ epigallocatechin (EGC), vanillic acid, gallic acid, คือ **BS1**, **BS2**, **BS3, BS4**, catechin, quercetin, caffeic acid และ tannic acid ตามลำดับ

2.2. mobile phase ที่เลือกใช้คือ EtoAC : Hexane : Acetic acid ในอัตราส่วน 60 : 3.93 : 0.07 ตามลำดับ

2.3. ตรวจสอบสารที่สามารถดูดกลืนแสงที่ปรากฏภายใต้ Ultra-Violet light (UV light) ที่ 254 nm และ 360 nm

2.4. ตรวจสอบสารสเปรย์ รีเอเจนต์ โดยการสเปรย์แผ่น TLC จากข้อ 2.3. ด้วย 30% sulfuric acid, anisuldehyde-sulfuric และ DPPH solution แล้วนำมาตรวจสอบการดูดกลืนแสงภายใต้ Ultra-Violet light (UV light) ที่ 254 nm และ 360 nm อีกครั้ง

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ใช้วิธีการ DPPH radical scavenging assay (Aruoma et al., 1997)

3.1. ทำการเตรียมสารละลาย 1 mM DPPH (2,2-diphenyl-picryl hydrazine) โดยละลายในเมทานอล

3.2. นำสารสกัดมาละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเมทานอล ส่วนการทำกราฟมาตรฐาน ใช้วิตามินซี (Ascorbic acid) และวิตามินอี (Tocopherol) เป็นสารมาตรฐานโดยทำการเจือจางด้วยเมทานอลเช่นกัน

3.3. ปิเปตสารละลาย DPPH ปริมาตร 200 µl ลงในหลอดทดลองแล้วเติมด้วยสารละลายสารสกัดที่เจือจางแล้วปริมาตร 2800 µl ผสมให้เข้ากัน

3.4. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm

3.5. ทำการคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้ง แล้วแสดงค่าเป็น 50% effective concentration (EC_{50})

4. การศึกษาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิค

ใช้วิธี Folin-Ciocalteu method (Makkar et al., 1993)

4.1. ทำการละลายสาร tannic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ด้วยเมทานอลปริมาตร 0.5 ml และทำการละลายสารสกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหลอดทดลอง

4.2. เติมสารละลาย Folin reagent ปริมาตร 0.25 ml แล้วเติมด้วย 20% sodium carbonate solution ปริมาตร 0.25 ml

4.3. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 725 nm

4.4. ทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Tannic acid กับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าที่วัดได้จากสารสกัดมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วแสดงผลเป็นค่า tannic acid equivalent (mg TAE/g)

5. ศึกษาฤทธิ์ต้าน nitric oxide production

5.1. ทำการเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 cells ใน 96-well plate ด้วยอาหาร DMEM + 10% FBS + 1% Antibiotic-Antimycotic solution โดยให้มีจำนวนเซลล์หลุมละ 100,000 cells/well แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2. เจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีและไม่มี 10 µg/ml LPS แล้วปิเปตลงในเซลล์จากข้อ 5.1. แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3. นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณ nitric oxide production โดยใช้ Griess reagent แล้วคำนวณค่า Inhibitory concentration รายงานเป็นค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50})

5.4. นำเซลล์ที่เหลือจากการข้อ 5.3. มาวิเคราะห์ % viability โดยใช้ Alamar blue (Page et al., 1993) แล้ววัดการการเรืองแสง แล้วทำการคำนวณ % inhibition รายงานเป็นค่า IC_{50}

6. ศึกษาฤทธิ์ cytotoxic activity

6.1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง (HaCaT), เซลล์มะเร็งตับ (HepG2), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่มี ER receptor (MCF-7), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิดที่ไม่มี ER receptor (MDA-MB-231) ใน 96-well plate หลุมละประมาณ 10,000 cells/well ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และ 1% Antibiotic-Antimycotic solution แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.2. ทำการเจือจางสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วปิเปตลงในเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในข้อ 6.1 แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.3. เมื่อครบเวลา ทำการวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตด้วย Alamar blue3 แล้ววัดการการเรืองแสง แล้วทำการคำนวณ % inhibition แล้วรายงานเป็นค่า IC_{50}

6.4. ทำการคำนวณ Selectivity index (SI) ด้วยสมการ

$SI = IC_{50}$ เซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง / IC_{50} เซลล์มะเร็ง

7. ศึกษาการตายแบบ apoptosis

7.1. ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งในหลุม 12 well plate จำนวน 50,000 cells/well ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่ผสม 10% FBS และ 1% Antibiotic-Antimycotic solution แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.2. เจือจางสารสกัดที่ความเข้มข้น 0, 200 และ 300 µg/ml แล้วเติมลงในเซลล์จากข้อ 7.1. แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3. ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วเติมด้วย cold methanol เพื่อไล่น้ำและ fix เซลล์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

7.4. ปิเปตเมทานอลออกแล้วเติมด้วย 1 µg/ml DAPI solution แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

7.5. ทำการส่องและถ่ายรูปเซลล์ด้วยกล้องฟลูออร์เรสเซนต์ Ex = 358, Em = 461

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การแสดงผลการศึกษาเป็นค่า mean ± S.D. และใช้การวิคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA และ multiple comparison (LSD) โดยใช้ SPSS version 16.0

9 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด

9.1.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด ด้วยวิธี Disc Diffusion ตามวิธีของ Cristina and Rehder, 2007

9.1.1.1. ทำการเพาะเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ลงบนอาหารเหลวสูตร Mueller Hinlon Broth (MHB) แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปรับความขุ่นที่ 0.5 McFarland standard ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

9.1.1.2. นำไม้พันสำลีปลอดเชื้อ จุ่มลงในหลอดเชื้อที่ปรับค่าความขุ่นแล้วมาป้ายลงบนอาหารแข็งสูตร Mueller Hinlon Agar (MHA)

9.1.1.3. นำสารสกัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน หยดลงบนแผ่น disc และวางลงบนผิวหน้าอาหารเปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ คือ Tetracycline นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง และเก็บผลการทดลอง

9.1.2 วิธีการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

9.1.2.1. เตรียมเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อ คือ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ลงในอาหารเหลวสูตร Mueller Hinlon Broth (MHB) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18–24 ชั่วโมง

9.1.2.2. ปรับความขุ่นของเชื้อ เท่ากับ 0.5 McFarland

9.1.2.3. เตรียมสารสกัดที่ต้องการทดสอบ โดยนำสารกัดมาทำการละลายด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ทำการกรอง จากนั้นนำสารสกัดใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อดูว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

9.1.2.4. เมื่อบ่มครบเวลา ตรวจดูผลการยับยั้งของสารสกัด และเลือกความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยสังเกตจากการวัดด้วยเครื่อง spectrometer โดยหลอดที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญ หรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดจะไม่ขุ่น เมื่อเทียบกับหลอดยาปฏิชีวนะและหลอดของสารสกัดที่ไม่มีเชื้อ อ่านค่าปริมาณความเข้มข้นของสารในหลอดนี้เป็นค่าของ MIC

10 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัด

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อราของสารสกัด ด้วยวิธี agar well diffusion ตามวิธีของ Lee et al., 2013

10.1 ใช้ cork borer มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหาร PDA

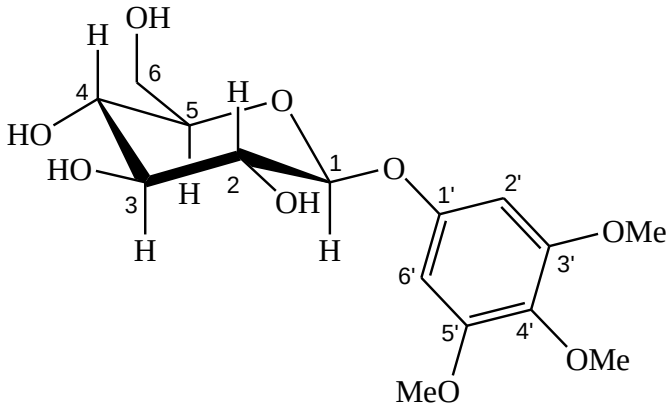
10.2 นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ และตัดเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีเส้นใยและใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นวุ้นไปวางตรงกลางของอาหาร PDA

10.3 นำสารสกัดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน หยดลงบนหลุมที่เจาะ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}$C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และเก็บผลการทดลอง

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาคือ Koaburside



ภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากต้นธนนไชย

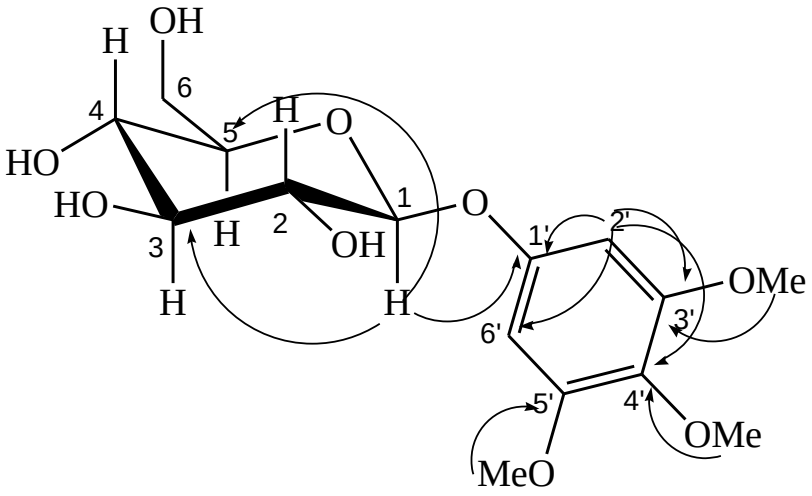
Compound 1: ของแข็งสีขาว; mp 200-202 °C; $[\alpha]_D^{27}$ –41.4° (*c* 0.76, CH_3OH); UV (CH_3OH) λ_{max} (log ε) 206 (4.50), 225 (3.87), 270 (3.00) nm; IR (neat) υ_{max} 3429 (O-H), 2930 (C-H) cm^{-1}; ^1H NMR (*DMSO-d_6*, 400 MHz) และ ^{13}C NMR (*DMSO-d_6*, 100 MHz), ดูได้จากตารางที่ 1 เป็นสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว

สาร **compound 1**; Koaburside

เป็นของแข็งสีขาว สูตรโมเลกุล $C_{15}H_{22}O_9$ ข้อมูลอินฟราเรดแสดงแถบดูดกลืนของหมู่ไฮดรอกซิล (3429 cm-1) ข้อมูล UV แสดงแถบดูดกลืนสูงสุดที่ 206, 225 และ 270 nm ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR (ตารางที่ 1) ปรากฏสัญญาณของ aromatic โปรตอน 2 โปรตอนที่ δ_H 6.38 (brs, H-2’ และ H-6’) ซึ่งเป็นลักษณะสัญญาณของ 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene และพบสัญญาณของ OMe 3 หมู่ ที่ δ_H 3.59 (OMe-4’) และ 3.74 (OMe-3’ และ 5’)

นอกจากนี้ยังปรากฏลักษณะเฉพาะโครงสร้างของ glucopyranoside สัญญาณที่ δ_H 3.10 (td, J = 8, 4 Hz, H-4), 3.22 (td, J = 8, 4 Hz, H-2), 3.27 (td, J = 8, 4 Hz, H-3), 3.34 (m, H-5), 3.41 (m, H-6), 3.71 (m, H-6) และ 4.78 (d, J = 8 Hz, H-1) และสัญญาณที่ δ_C 61.4 (C-6), 70.6

(C-4), 73.7 (C-2), 77.3 (C-5), 77.7 (C-3) และ 101.6 (C-1) จากข้อมูลของ COSY spectrum แสดงให้เห็นการเชื่อมต่อของพันธะระหว่าง H-1 กับ H-2 ของพันธะระหว่าง H-2 กับ H-1 และ H-3 ของพันธะระหว่าง H-3 กับ H-2 และ H-4, ของพันธะระหว่าง H-4 กับ H-3 และ H-5, และ ของพันธะระหว่าง H-5 กับ H-4 และ H-6 จากข้อมูลดังกล่าวระบุได้ว่ามีน้ำตาลชนิด glucopyranoside จำนวน 1 หมู่ ซึ่ง anomeric โปรตอนที่ δ_H 4.78 (d, J = 8 Hz, H-1) ยังแสดง HMBC correlation กับคาร์บอนที่ δ_C 77.3 (C-5), 77.7 (C-3) และ 154.4 (C-1') ข้อมูลนี้ระบุตำแหน่งการเชื่อมต่อของ 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene กับ glucopyranoside ที่ C-1 และ C-1' เมื่อได้เปรียบเทียบกับข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีกับข้อมูลของสาร **compund 1** กับ Koaburside (Achenbach และ Benirschke., 1995) พบว่าสาร **compound 1** เป็น Koaburside (Achenbach และ Benirschke., 1995)



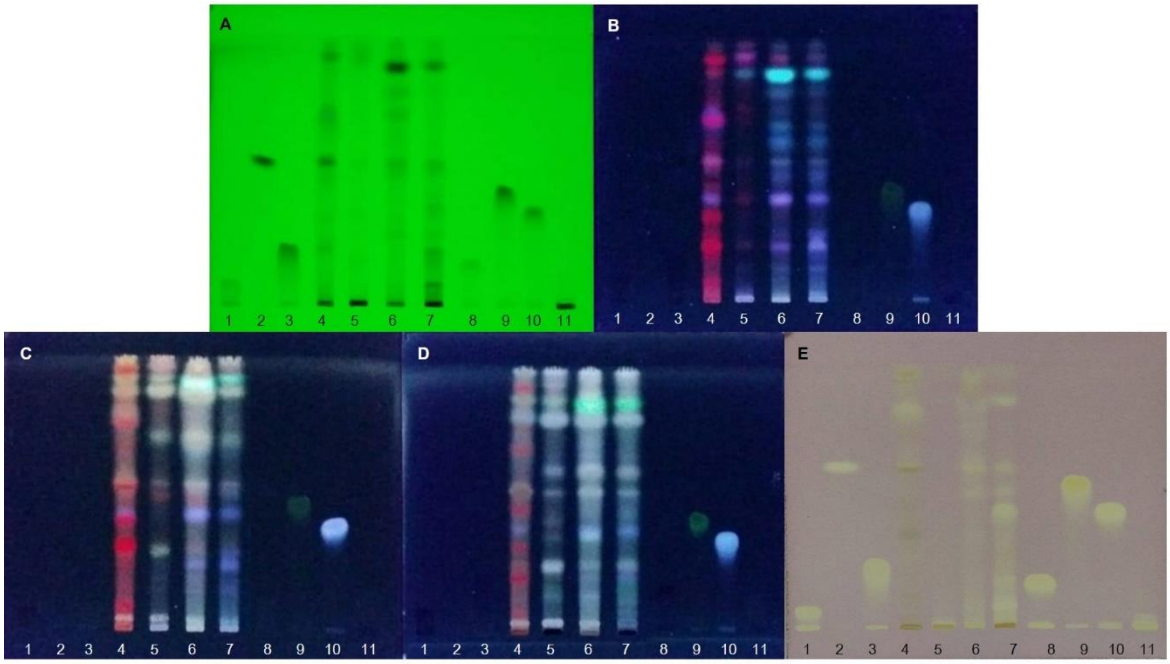
ภาพที่ 2 แสดงข้อมูล HMBC บางส่วนของสาร **compound 1**

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล ^{1}H, ^{13}C NMR, DEPT และ HMBC (400 และ 100 MHz, DMSO-d_6) ของสาร **compound 1** (δ in ppm, multiplicities, *J* in Hz)

ตำแหน่ง	δ_H	δ_C	DEPT	HMBC
1	4.78 d (8)	101.6	CH	1', 3, 5
2	3.22 td (8, 4)	73.7	CH	1, 4
3	3.27 td (8, 4)	77.7	CH	1, 5
4	3.10 td (8, 4)	70.6	CH	2, 3, 5, 6
5	3.34 m	77.3	CH	3, 6
6	3.41 m 3.71 m	61.4	CH_2	4, 5
1'	-	154.4	C	
2'	6.38 brs	59.1	CH	1', 3', 4', 5', 6'
3'	-	153.6	C	
4'	-	133.1	C	
5'	-	153.6	C	
6'	6.38 brs	95.1	CH	1', 2', 3', 4', 5'
2-OH	5.28 d (4)	-	-	
3-OH	5.11 d (4)	-	-	
4-OH	5.05 d (4)	-	-	
6-OH	4.66 t (8)	-	-	
3'-OMe	3.74 s	56.3	CH_3	3'
4'-OMe	3.59 s	60.1	CH_3	4'
5'-OMe	3.74 s	56.3	CH_3	5'

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี TLC

จากการสกรีนองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้การแยกด้วย TLC พบว่า สารสกัด **BS1** มีแถบที่ตรงกับ vanillic acid และ gallic acid ในขณะที่สารสกัด **BS2** มีแถบที่ตรงกับ caffeic acid และ tannic acid ส่วนสารสกัด **BS3** มีแถบที่ตรงกับ vanillic acid และ quercetin ในขณะที่สารสกัด **BS4** มีแถบที่ตรงกับ EGC, vanillic acid, catechin, quercetin และ caffeic acid นอกจากนี้ เมื่อสเปรย์ด้วย DPPH solution ซึ่งสามารถช่วยสกรีนสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ พบว่า สารสกัดธนนไชยมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 TLC fingerprint ของสารสกัดจากธรรมไชย โดย A) 254 nm, B) 360 nm, C) Anisuldehyde-sulfuric under 360 nm, D) 30% sulfuric under 360 nm และ E) DPPH spray reagent และ Lane 1: EGC, 2: vanillic acid, 3: gallic acid, 4: **BS**, 5: **BS2**, 6: **BS3**, 7: **BS4**, 8: catechin, 9: quecetin, 10: caffeic acid และ 11: tannic acid

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิค

จากตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิคของสารสกัดธนนไชยแต่ละชนิด โดยสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลจะมีสารที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลลิคมากกว่าสารที่สกัดด้วย dichloromethane แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนสารสกัด **BS4** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.1±0.1 µg/ml รองลงมาคือ สารสกัด **BS2**, **BS3** และสารสกัด **BS1** ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟี

นอลลิค ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ดังกล่าวอาจมาจากการมีสารกลุ่มฟีนอลลิคนี้ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิคของสารสกัดธนนไชย

Extracts/Standard	Antioxidant activity EC_{50}	Total phenolic content
BS1	750.1 ± 52.4^{a}	6.2 ± 0.4^{A}
BS2	10.0 ± 0.2^{b}	206.7 ± 12.8^{B}
BS3	13.5 ± 1.1^{c}	6.4 ± 0.5^{A}
BS4	7.1 ± 0.1^{d}	192.3 ± 8.7^{B}
Ascorbic acid	3.5 ± 0.1^{e}	ND
Tocopherol	6.7 ± 0.1^{f}	ND

หมายเหตุ: ND คือ no determination

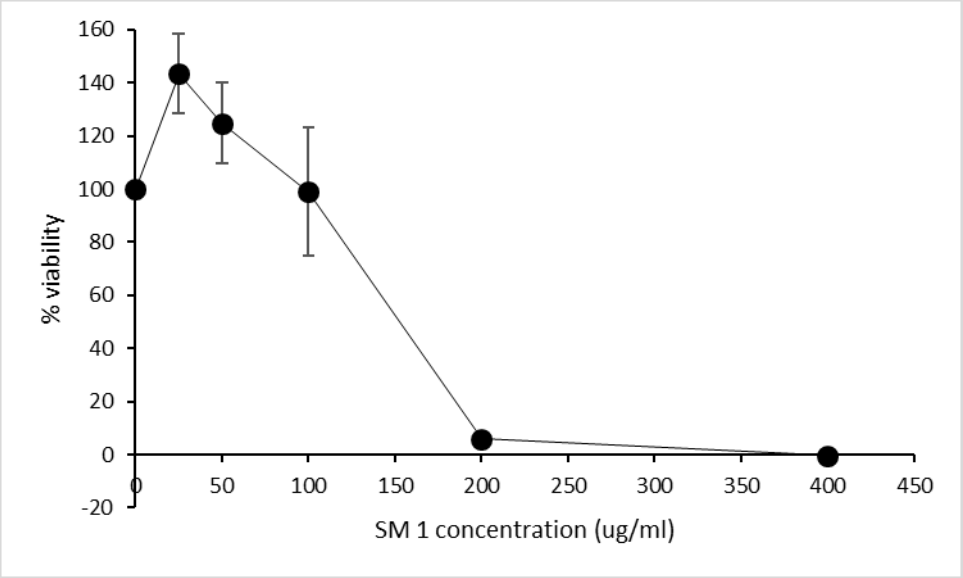
ผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide

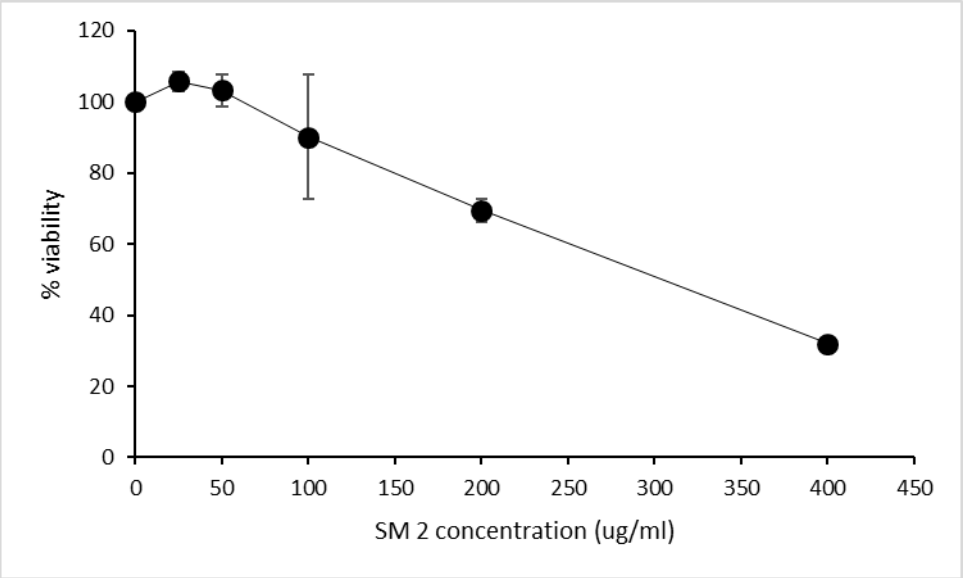
ในการศึกษาการฤทธิ์ต้านการสร้าง nitric oxide ต้องทำการศึกษาความเป็นพิษขอสารสกัดก่อนเพื่อใช้ในการเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมโดยไม่ทำให้มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบซึ่งอาจจะส่งผลต่อการสร้าง nitric oxide ด้วย

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด พบว่า สารสกัด **BS1** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ที่ทดสอบสูงกว่าสารสกัดชนิดอื่น รองลงมา คือ สารสกัด **BS2** ส่วนสารสกัดจากลำต้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบมากที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ คือ 400 µg/ml ดังนั้น ในการศึกษาต่อไป ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้สูงสุดไม่เกิน 200 µg/ml ยกเว้น สารสกัด **BS1** ที่ใช้ความเข้มข้นไม่เกิน 100 µg/ml (ภาพที่ 4) ส่วนสารบริสุทธิ์จากธนนไชย พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 40 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก ดังนั้น จึงใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 40 µg/ml ต่อไป (ภาพที่ 6)

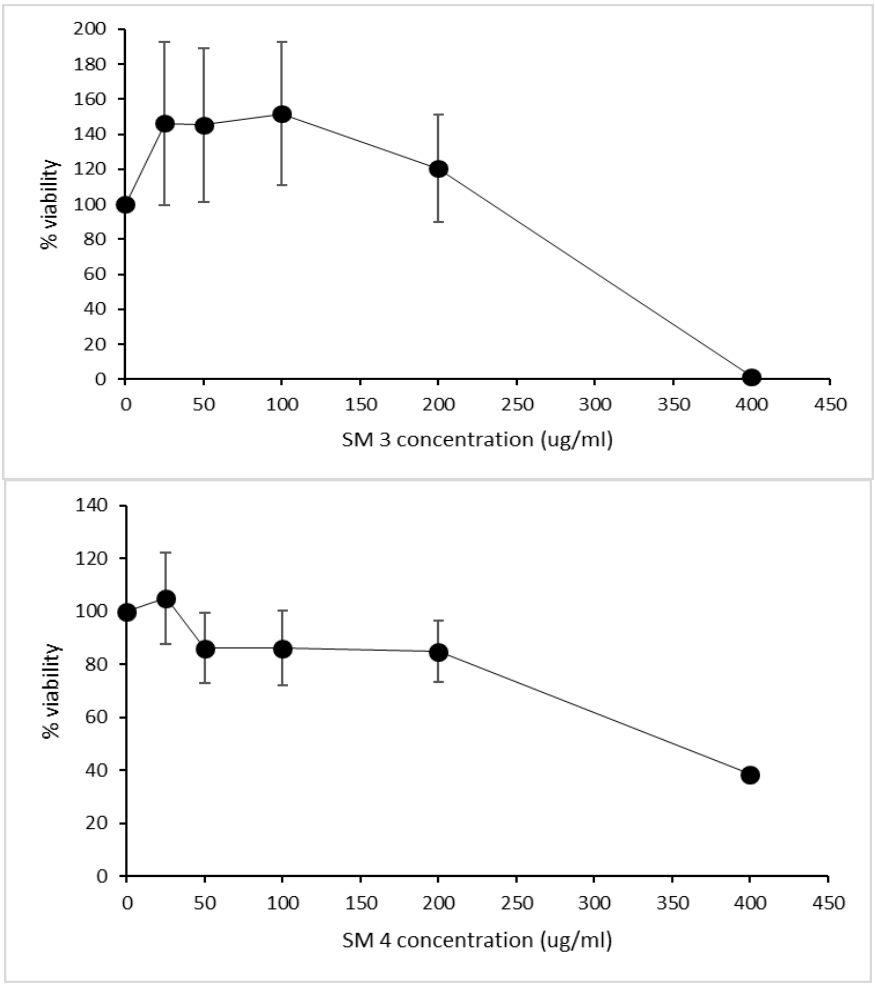
ในการศึกษาผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการสร้าง nitric oxide พบว่า ในสภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ สารทุกชนิดที่ทดสอบไม่ชักนำให้เกิดการสร้าง nitric oxide ได้ด้วยตนเอง แต่เมื่อทำการชักนำด้วย 10 µg/ml LPS พบว่า สารสกัดจากใบธนนไชยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้ปานกลาง โดยลดการสร้างลงเพียงประมาณ 50% (ภาพที่ 7, 8 และ 9) ส่วนสารสกัด **BS3** สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 94.47 ± 23.50 µg/ml (ภาพที่ 8, ตารางที่ 3) แต่ยังน้อยกว่าผลในการยับยั้งของสารมาตรฐาน L-NAME (ภาพที่ 10 ตารางที่ 3) ในขณะที่สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (ภาพที่ 8)

สำหรับสาร **compound 1** ไม่มีฤทธิ์ในการยั้งยั้งการสร้าง nitric oxide แต่มีฤทธิ์ในทางเพิ่มการสร้าง nitric oxide ได้เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 9

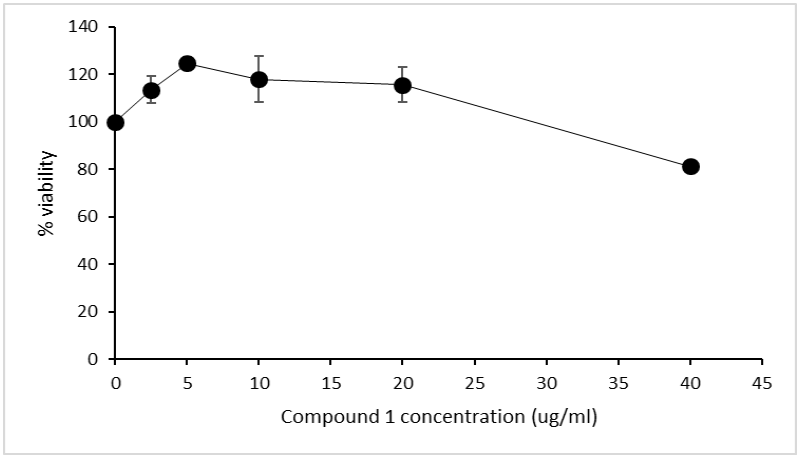




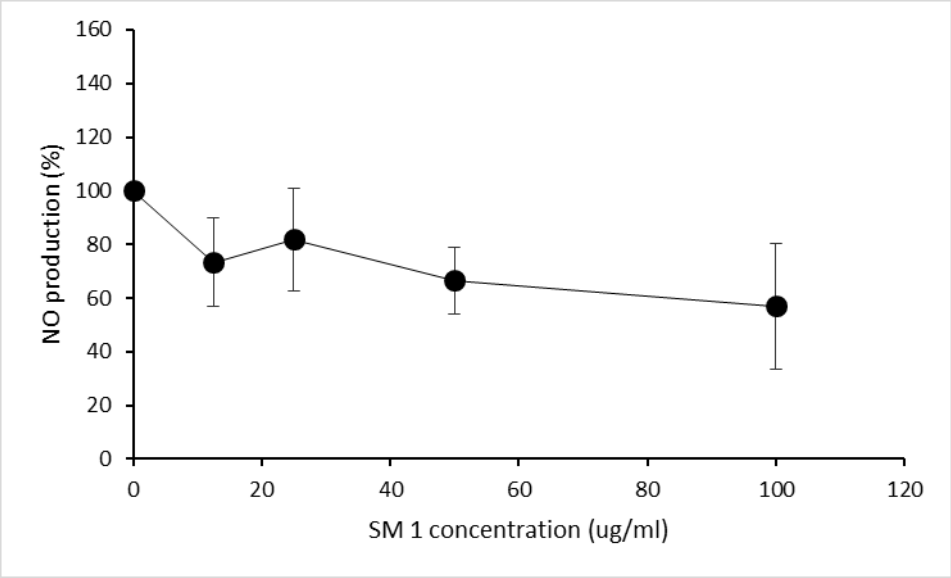
ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดจากใบธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ

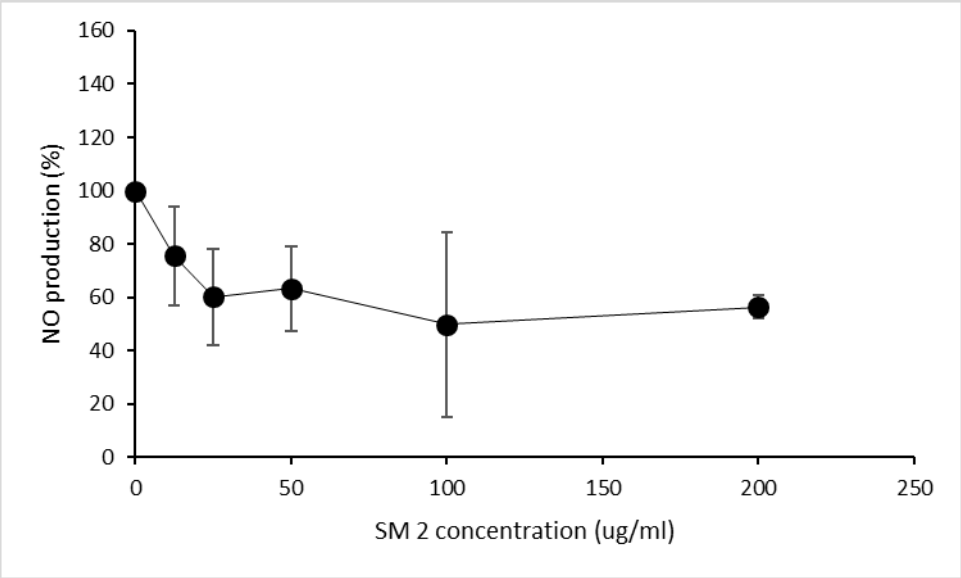


ภาพที่ 5 ผลของสารสกัดจากลำต้นธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ

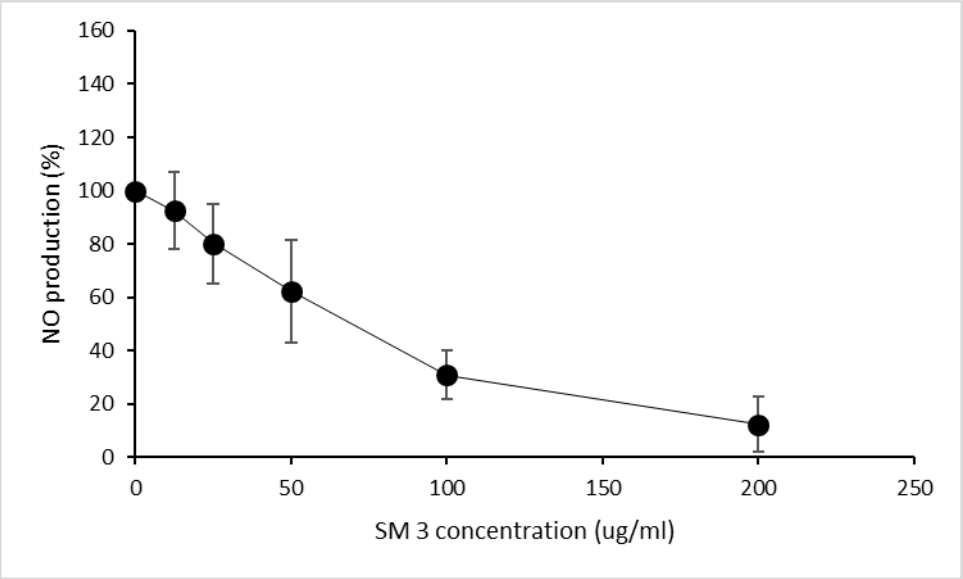


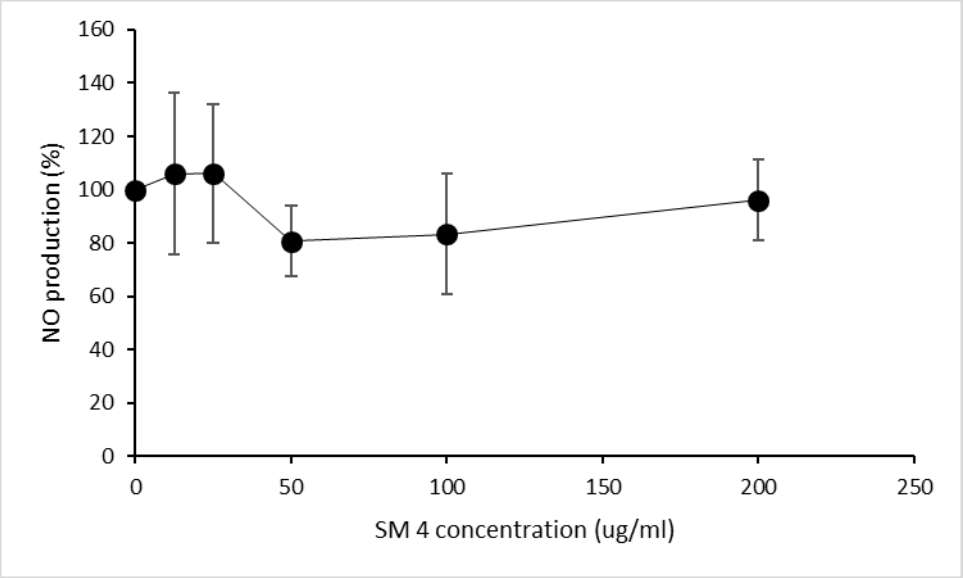
ภาพที่ 6 ผลของสาร **compound 1** บริสุทธิ์จากธนนไชยที่มีต่อ cell viability ของ RAW264.7 ในภาวะที่ไม่มี LPS ชักนำ



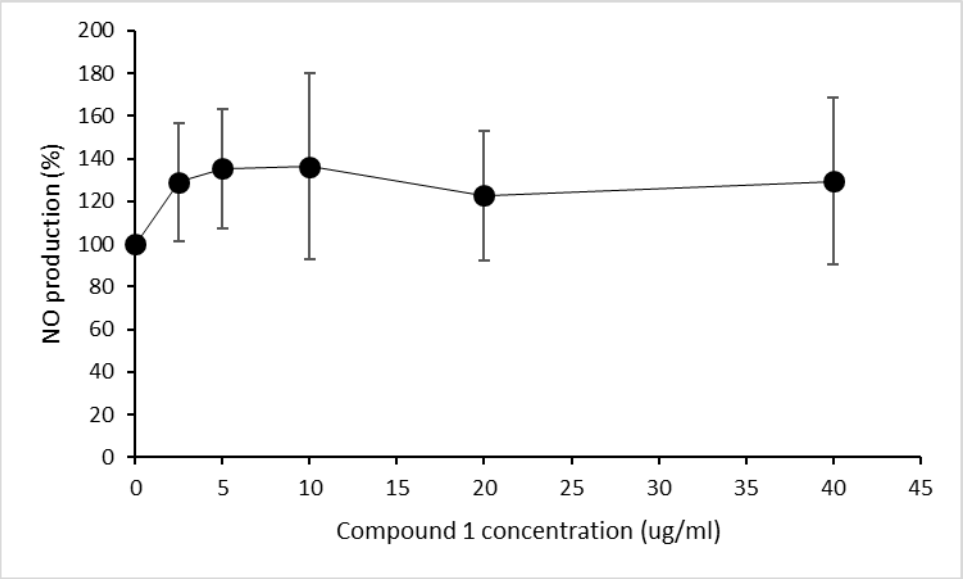


ภาพที่ 7 ผลของสารสกัดจากใบธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS

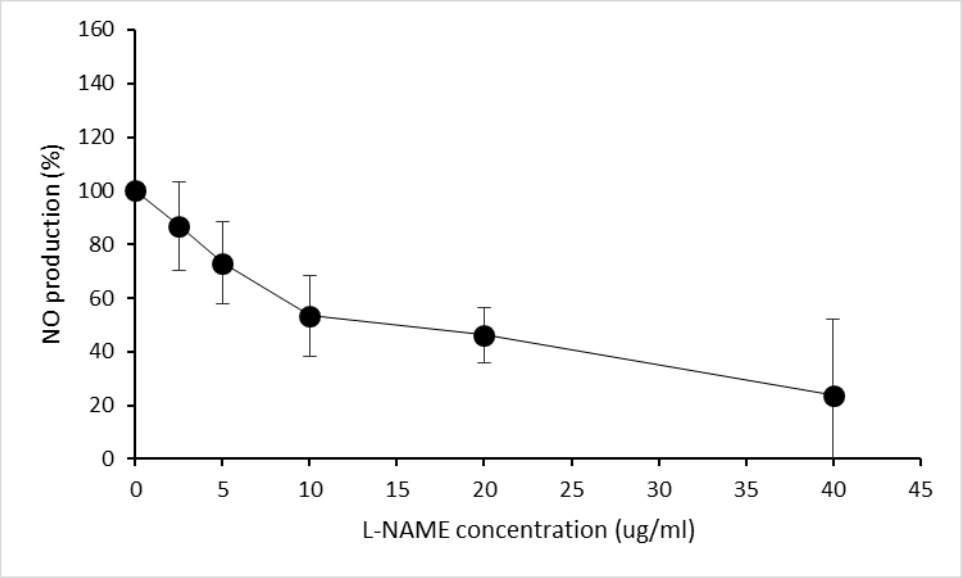




ภาพที่ 8 ผลของสารสกัดจากลำต้นธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS



ภาพที่ 9 ผลของ **compound 1** จากธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS



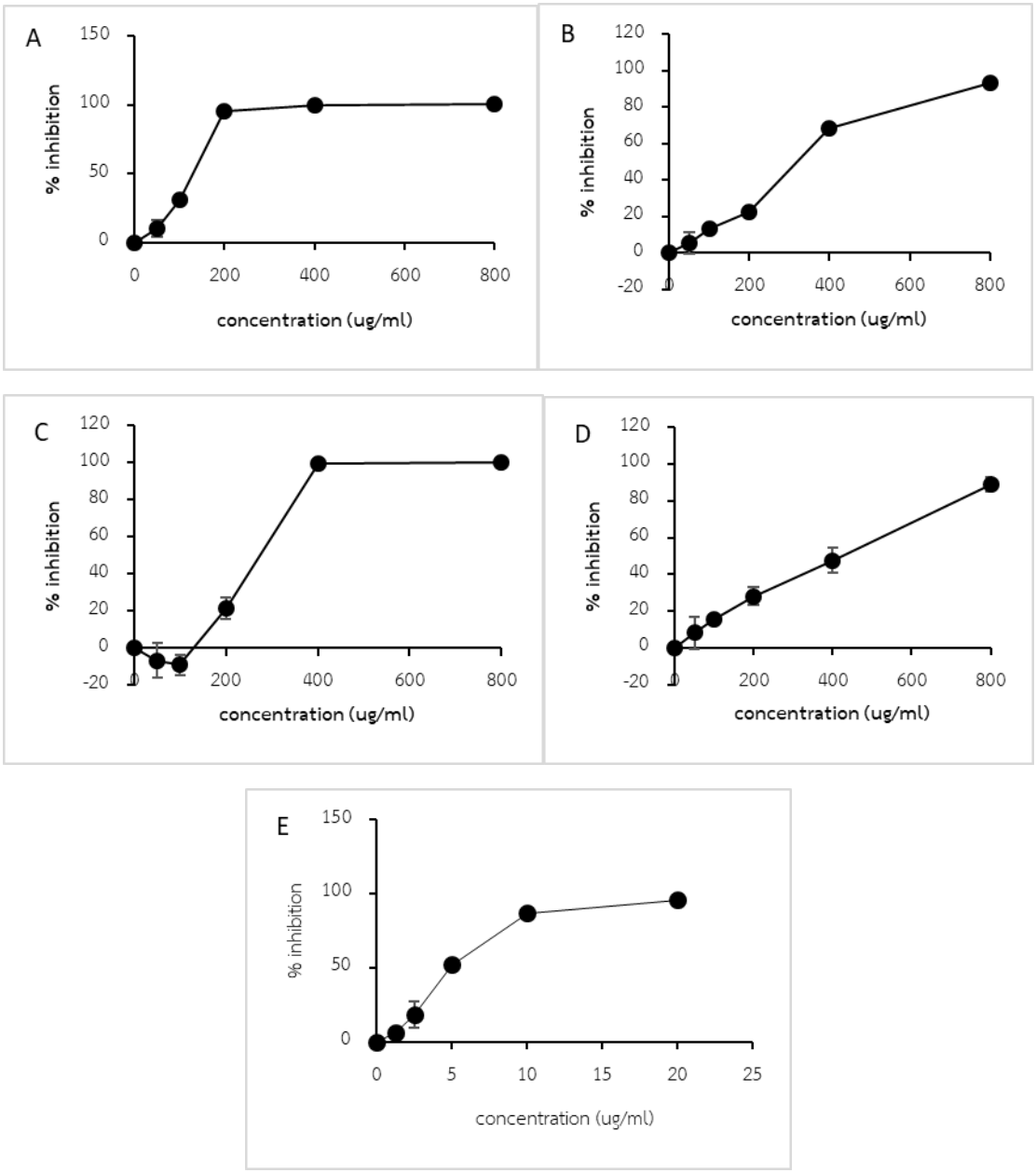
ภาพที่ 10 ผลของสาร L-NAME ที่มีต่อการสร้าง NO ของเซลล์ RAW264.7 ที่ถูกชักนำโดย LPS

ตารางที่ 3 ค่า IC_{50} ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากธนนไชยที่มีต่อการสร้าง NO

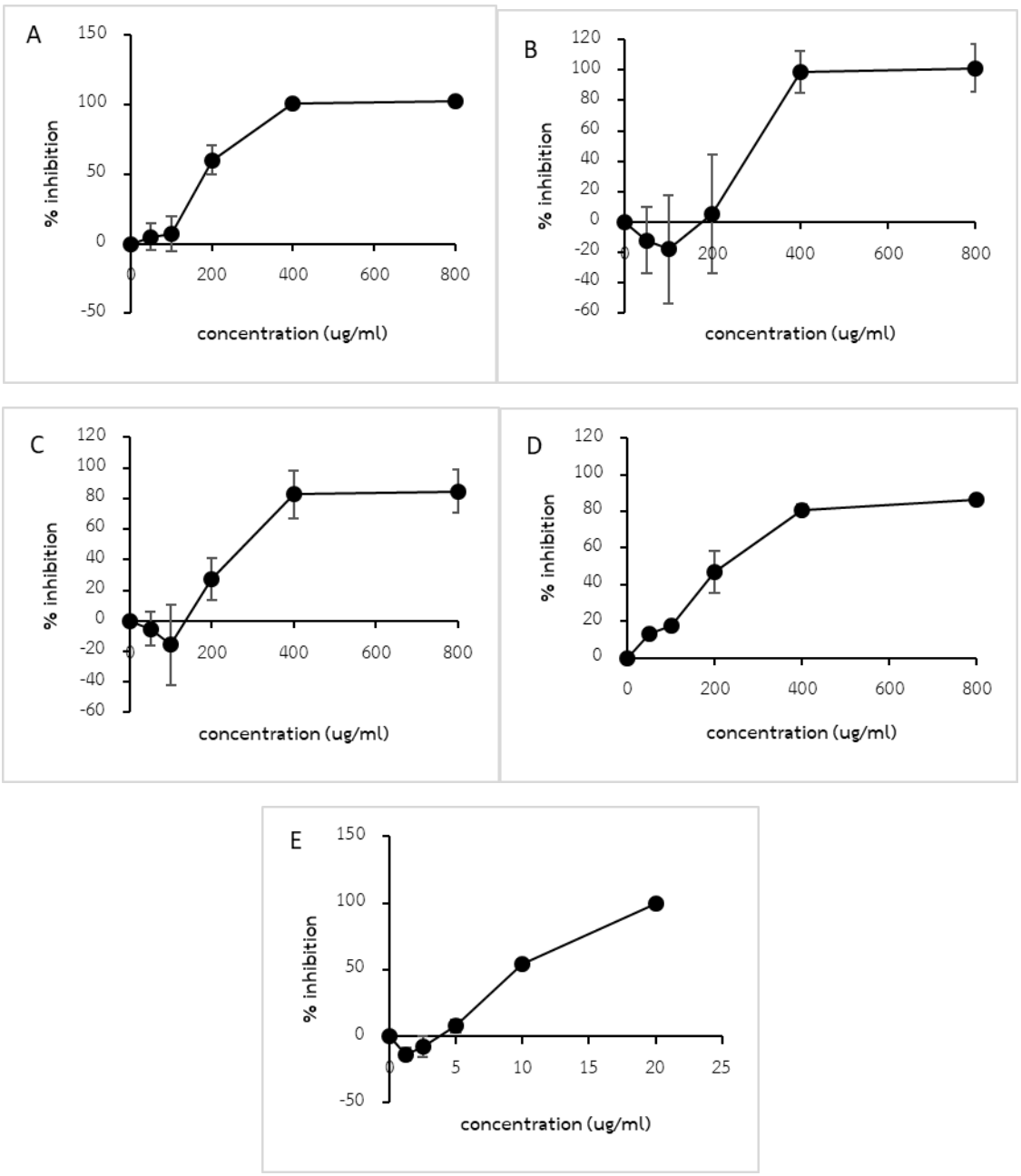
สารสกัด/สารบริสุทธิ์	IC_{50} (µg/ml)
BS1	151.44 ± 96.55
BS2	164.19 ± 29.91
BS3	94.47 ± 23.50
BS4	No IC_{50}
Compound 1	No IC_{50}
L-NAME	23.83 ± 9.53

ผลการทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity

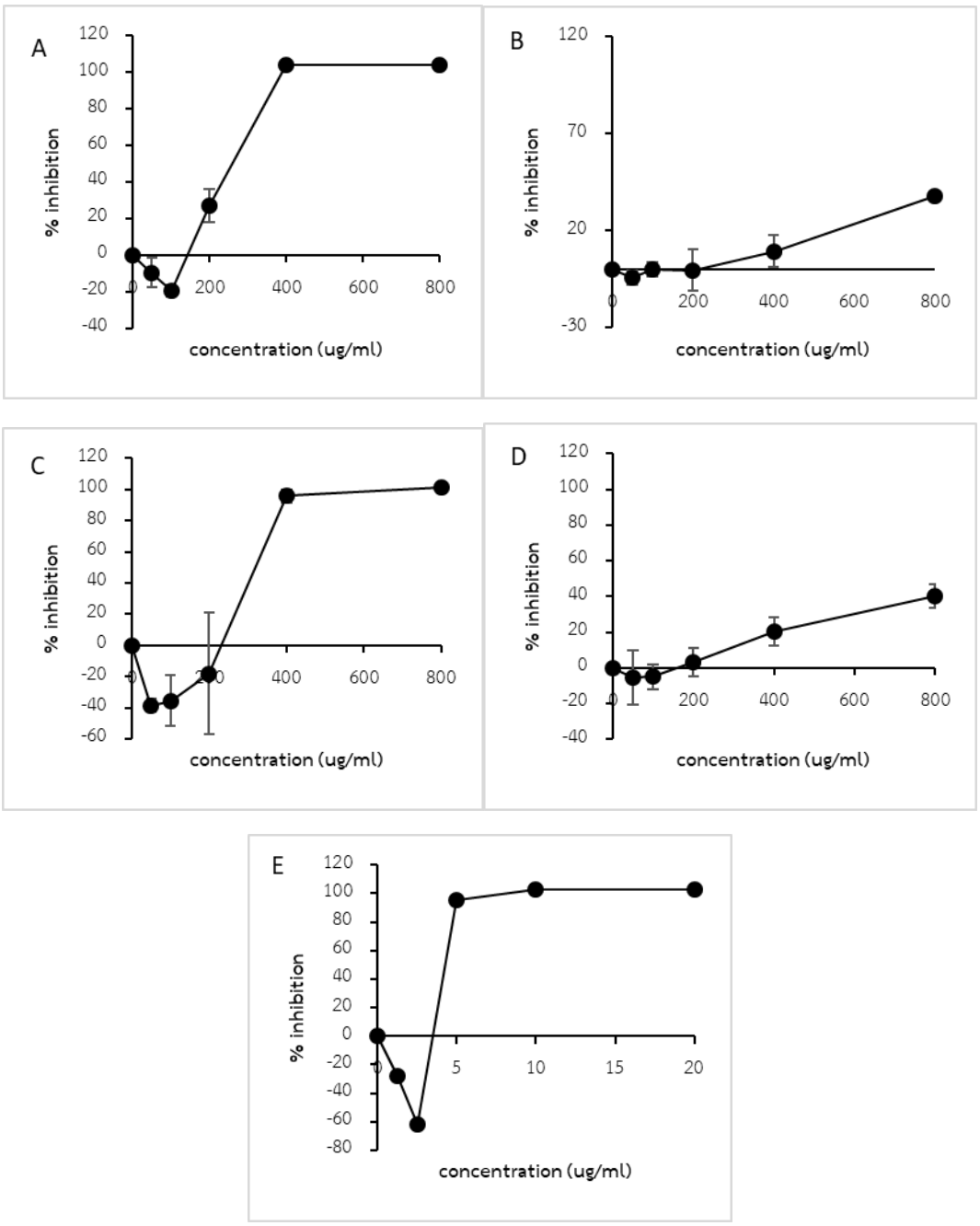
จากการศึกษาพบว่า สารสกัดธนนไชยทุกส่วนสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ดังแสดงในภาพที่ 11-14 และตารางที่ 4 โดยสารสกัด **BS1** สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ **BS3**, **BS4** และ **BS2** ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็ง (HaCaT) ด้วยเช่นกัน จึงทำให้ค่า SI ของสารสกัดแต่ละชนิดน้อยว่า 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีความเป็นพิษแบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง แต่ที่น่าสนใจคือ สารสกัด **BS4** และ **BS2** มีค่า SI ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มากกว่า 1 ซึ่งแม้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับน้อยกว่า **BS1** และ **BS3** แต่มีความจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งตับมากกว่า หากคำนึงถึงความปลอดภัยแล้วสารสกัด **BS2** และ **BS4** มีความปลอดภัยมากกว่าโดยที่ยังคงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ด้วย



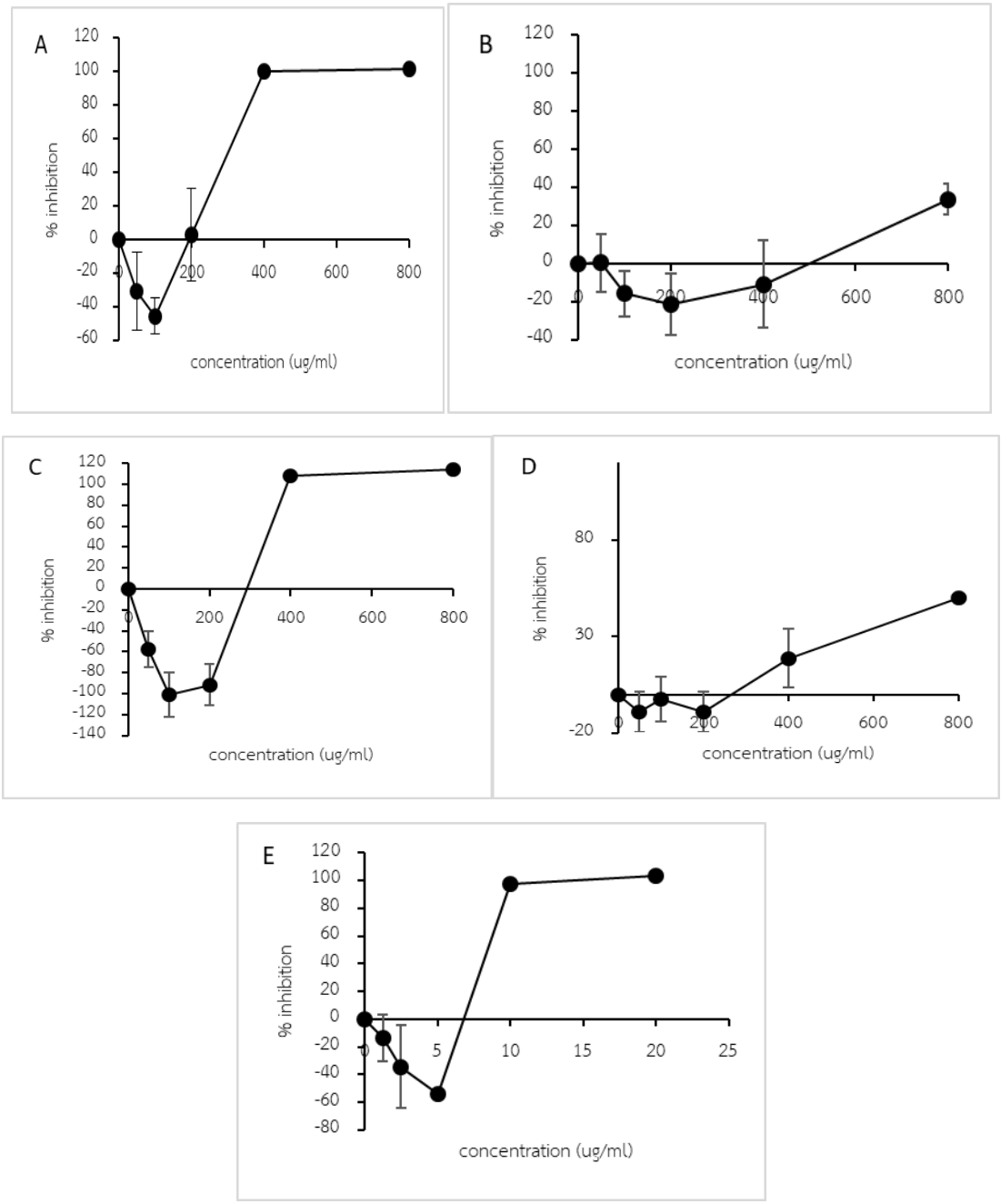
ภาพที่ 11 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HaCaT โดย A คือ สารสกัด **BS1**, B คือ **BS2**, C คือ **BS3**, D คือ **BS4** และ E คือ ยามาตรฐาน Tamoxifen



ภาพที่ 12 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ HepG2 โดย A คือ สารสกัด **BS1**, B คือ **BS2**, C คือ **BS3**, D คือ **BS4** และ E คือ ยามาตรฐาน Tamoxifen



ภาพที่ 13 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MCF-7 โดย A คือ สารสกัด **BS1**, B คือ **BS2**, C คือ **BS3**, D คือ **BS4** และ E คือ ยามาตรฐาน Tamoxifen



ภาพที่ 14 ผลของสารสกัดธนนไชยในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ MDA-MB-231 โดย A คือ สารสกัด **BS1**, B คือ **BS2**, C คือ **BS3**, D คือ **BS4** และ E คือ ยามาตรฐาน Tamoxifen

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} และ SI ของสารสกัดแต่ละชนิดที่มีต่อเซลล์ที่ทดสอบ

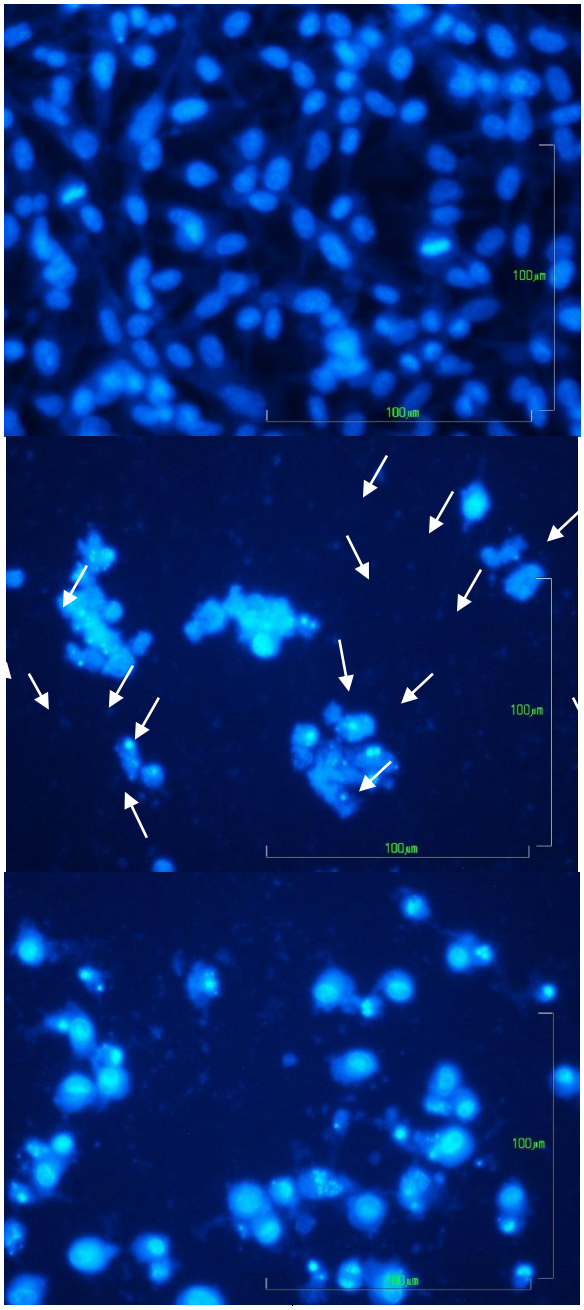
Ext. /Cpd	Inhibitory effect						
	HaCaT	HepG2		MCF-7		MDA-MB-231	
	IC_{50} (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)	SI	IC_{50} (µg/ml)	SI	IC_{50} (µg/ml)	SI
BS1	$119.41\pm4.80^{a,A}$	$196.47\pm41.36^{a,B}$	0.61	$264.76\pm8.50^{a,C}$	0.45	$289.81\pm36.57^{a,C}$	0.41
BS2	$434.12\pm16.56^{b,A}$	$275.27\pm37.47^{b,c,B}$	1.58	$>800^{b,C}$	0.54	$>800^{b,C}$	0.54
BS3	$256.34\pm6.63^{c,A}$	$291.25\pm13.75^{c,B}$	0.88	$312.97\pm32.74^{c,B,C}$	0.82	$341.43\pm5.50^{c,C}$	0.75
BS4	$490.24\pm16.10^{d,A}$	$218.34\pm38.75^{a,b,B}$	2.25	$>800^{b,C}$	0.61	$778.48\pm15.09^{b,C}$	0.63
Tam.	$5.62\pm0.05^{e,A}$	$11.03\pm0.47^{d,B}$	0.51	$4.18\pm0.14^{d,C}$	1.34	$8.42\pm0.05^{d,D}$	0.67

Note: a-e แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ IC_{50} ระหว่างสารสกัดชนิดต่างๆ ที่มีต่อเซลล์ชนิดเดียวกัน (column)

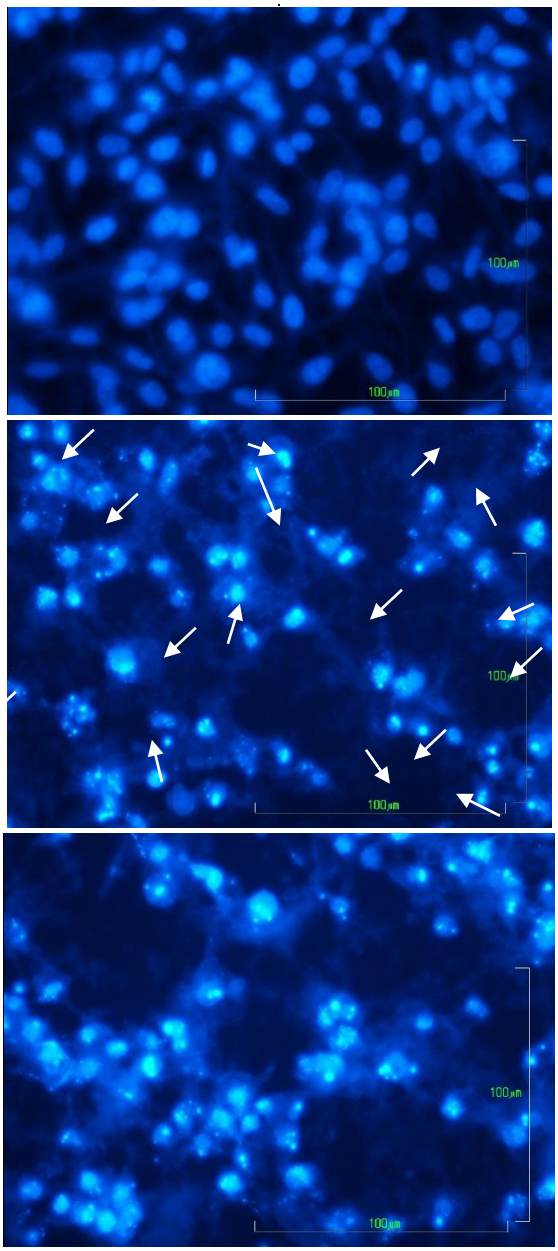
A-D แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ IC_{50} ระหว่างเซลล์ชนิดต่างๆ เมื่อทดสอบกับสารสกัดชนิดเดียวกัน (row)

ผลการศึกษาการตายแบบ apoptosis

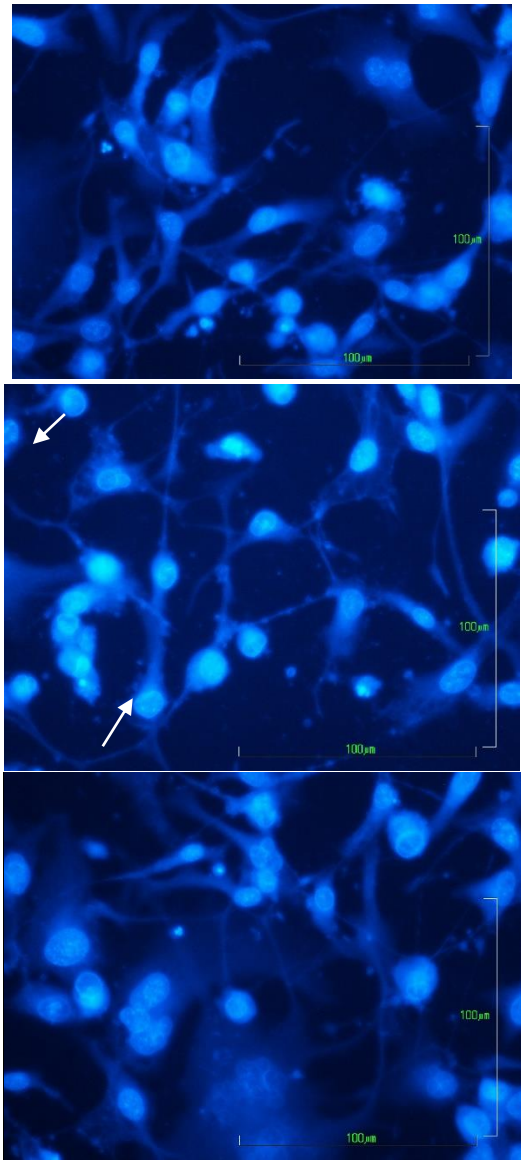
ทำการเลือกเพียงสารสกัด **BS1** และ **BS3** มาทำการศึกษาลักษณะการตายของเซลล์ จากการศึกษาพบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ดีทั้งในเซลล์ HepG2 และ MCF-7 ยกเว้น MDA-MB-231 ซึ่งเห็นการตายไม่ชัดนัก (ภาพที่ 15-17) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาการตายแบบ apoptosis ต้องศึกษาด้วยวิธีการหลายแบบเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารนั้นสามารถชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ได้จริง จึงสมควรมีการศึกษาเพิ่มเติม



ภาพที่ 15 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง HepG2 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml (บน) สารสกัด **BS1** (ล่างซ้าย) และ **BS3** (ล่างขวา) ที่ความเข้มข้น 400 µg/ml



ภาพที่ 16 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง MCF-7 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml (บน) สารสกัด **BS1** (ล่างซ้าย) และ **BS3** (ล่างขวา) ที่ความเข้มข้น 400 µg/ml



ภาพที่ 17 ลักษณะการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง MDA-MB-231 จากการย้อมด้วยสี DAPI ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 0 µg/ml (บน) สารสกัด **BS1** (ล่างซ้าย) และ **BS3** (ล่างขวา) ที่ความเข้มข้น 400 µg/ml

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดธนนไชย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดธนนไชยจากส่วนใบและลำต้น ที่มีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ คือ *B. subtilis, B. cereus, S. epidermidis, S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ด้วยวิธี disc diffusion โดยใช้วิธีการวัดขนาดโซนใสที่เกิดขึ้น ดังตารางที่ 5 ผลการทดสอบของสารสกัด **BS1**, **BS2**, **BS3** และ **BS4** พบว่า สารสกัด **BS3** มีผลยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด **BS1**, **BS2** และ **BS4** เมื่อใช้สารสกัดความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 2, 4 และ 6 มิลลิกรัม โดยสารสกัดที่ความเข้มข้นที่ 2 มิลลิกรัม ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis , B. cereus, S. epidermidis, S. aureus*, *E. coli* และไม่มีผลต่อการยับยั้งของเชื้อ *P. aeruginosa* สารสกัดที่ความเข้มข้นที่ 4 และ 6 มิลลิกรัม มีผลยับยั้งต่อเชื้อ *B. subtilis, B. cereus, S. epidermidis, S. aureus*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* โดยเปรียบเทียบกับ tetracycline เป็นยามาตรฐานที่ใช้ทดสอบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ จากการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียพบว่า ยามาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับสารสกัดมีขนาดของโซนใสมากกว่าสารสกัด เนื่องจากว่าสารสกัดอาจมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพน้อยกว่ายามาตรฐาน (Chew et al., 2012)

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

สารสกัด	เชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสาร (mg)			Tetracycline
		2	4	6	30 µg
BS1	**แกรมบวก**				
	B. subtilis	-	-	-	
	B. cereus	9.50±0.70	10.50±0.70	11.50±0.70	
	S. epidermidis	-	7.00±0.0	10.50±0.70	
	S. aureus	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	
	แกรมลบ				
	E. coli	-	-	-	
	P. aeruginosa	-	-	-	
BS2	**แกรมบวก**				
	B. subtilis	-	-	-	
	B. cereus	7.50±0.58	8.75±0.95	10.50±0.60	
	S. epidermidis	-	-	-	
	S. aureus	-	-	-	

สารสกัด	เชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสาร (mg)			Tetracycline
		2	4	6	30 µg
	แกรมลบ				
	E. coli	-	-	-	
	P. aeruginosa	-	-	-	
BS3	**แกรมบวก**				
	B. subtilis	7.25±0.50	9.00±0.81	10.50±2.38	
	B. cereus	8.25±0.50	10.00±0.81	11.50±1.30	
	S. epidermidis	8.25±1.50	9.25±1.26	12.50±2.40	
	S. aureus	8.50±1.30	13.25±5.73	12.75±3.30	
	แกรมลบ				
	E. coli	7.00±0.00		9.25±1.26	
	P. aeruginosa	-	7.00±0.00	10.00±0.00	
BS4	**แกรมบวก**				
	B. subtilis	-	-	-	
	B. cereus	-	-	-	
	S. epidermidis	-	-	-	
	S. aureus	-	-	-	
	แกรมลบ				
	E. coli	-	-	-	
	P. aeruginosa	-	-	-	
Tetracycline	**แกรมบวก**				
	B. subtilis				24.75±0.43
	B. cereus				29.25±0.95
	S. epidermidis				21.50±1.73
	S. aureus				18.50±0.57
	แกรมลบ				
	E. coli				25.25±0.50
	P. aeruginosa				18.00±1.22

หมายเหตุ: - ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดธนนไชยจากส่วนใบและลำต้น โดยใช้สารสกัด **BS1, BS2, BS3** และ **BS4** เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ คือ *C. albicans, A. niger* และ *A. flavus* ด้วยวิธี agar well diffusion ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 2, 4 และ 6 มิลลิกรัม โดยใช้วิธีการวัดขนาด1 โซนใสที่เกิดขึ้น ผลการทดสอบของสารสกัด **BS1, BS2, BS3** และ **BS4** พบว่า สารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. niger* และ *A. flavus* ได้ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

สารสกัด	เชื้อรา	ความเข้มข้นของสาร(mg)		
		2	4	6
BS1	*C. albicans*	-	-	-
	A. niger	-	-	-
	A. flavus	-	-	-
BS2	*C. albicans*	-	-	-
	A. niger	-	-	-
	A. flavus	-	-	-
BS3	*C. albicans*	-	-	-
	A. niger	-	-	-
	A. flavus	-	-	-
BS4	*C. albicans*	-	-	-
	A. niger	-	-	-
	A. flavus	-	-	-

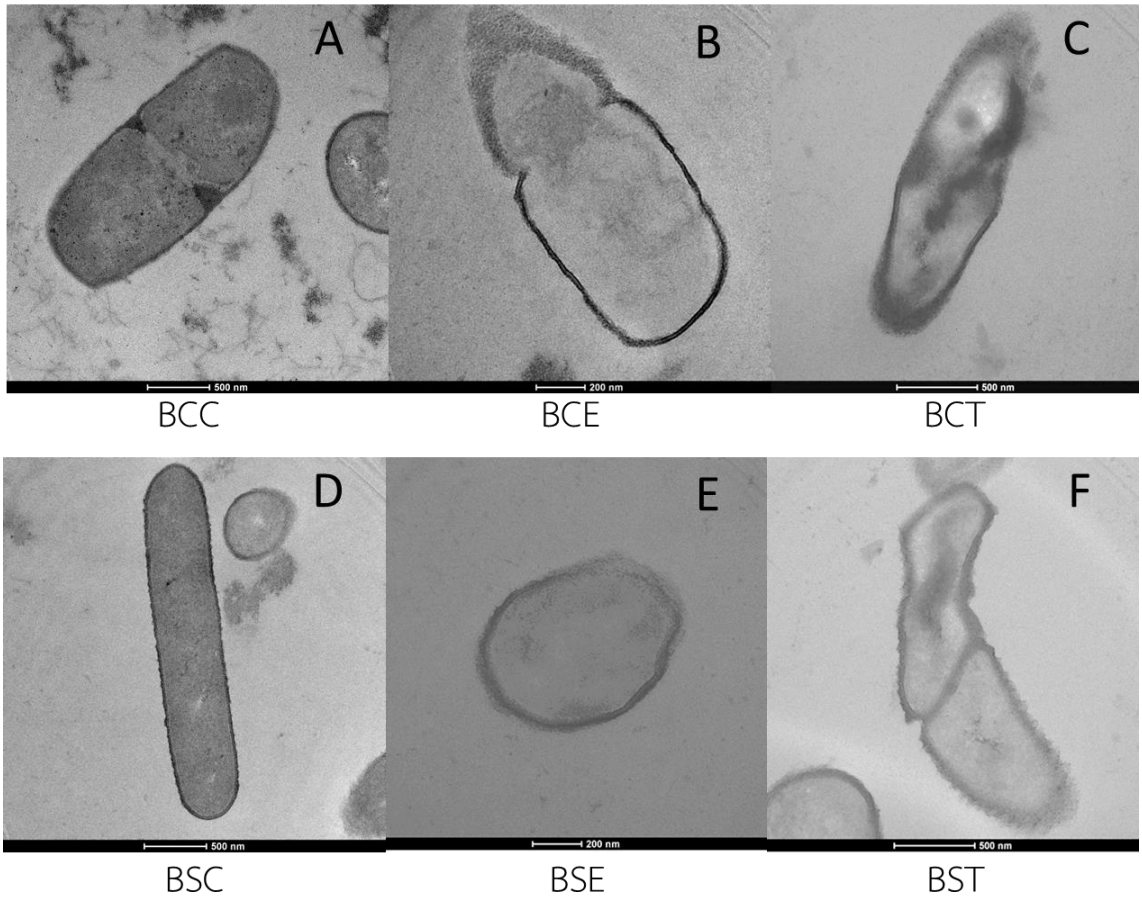
หมายเหตุ: - ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยราได้

การศึกษาหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ โดยนำผลทดสอบเบื้องต้นจากการทำ disc diffusion มาศึกษาต่อพบว่า ค่า MIC ของสารสกัด **BS3** มีความสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. cereus* ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. cereus* ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 7 ผลของการยับยั้งและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารสกัด **BS3**

ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย	ความเข้มข้นของสารสกัด (mg/ml)	
	MIC	MBC
B. subtilis	4	6
B. cereus	4	6

การศึกษาผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission electron microscopy (TEM) ดังรูปที่ 18 พบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลายโดยสารสกัด และทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้



รูปที่ 18 ผลการทดสอบสารสกัดที่มีผลต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน TEM โดย *B. subtilis* (BS), *B. cereus* (BC), *B.s cereus* เป็น control (A), *B. cereus* เป็นตัวอย่างที่ให้สารสกัด (B), *B. cereus* เป็นตัวอย่างที่ให้ Tetracycline (B), *B. subtilis* เป็น control (D), *B. subtilis* เป็นตัวอย่างที่ให้สารสกัด (E), *B. subtilis* เป็นตัวอย่างที่ Tetracycline (F)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสกรีนองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้การแยกด้วย TLC พบว่า สารสกัด **BS1** มีแถบที่ตรงกับ vanillic acid และ gallic acid ในขณะที่สารสกัด **BS2** มีแถบที่ตรงกับ caffeic acid และ tannic acid ส่วนสารสกัด **BS3** มีแถบที่ตรงกับ vanillic acid และ quercetin ในขณะที่สารสกัด **BS4** มีแถบที่ตรงกับ EGC, vanillic acid, catechin, quercetin และ caffeic acid นอกจากนี้ สารสกัดธนนไชยมีสารที่เป็นองค์ประกอบหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ จากการศึกษาสารสกัดจากใบของมะม่วงหัวแมงวัน หรือ *B. lanzan* ที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่า มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักๆ ซึ่งเป็น secondary metabolites คือ Glycosides และ Phenolic compounds ด้วยเทคนิค TLC และ HPTLC (Mehta et al., 2010) นอกจากนี้ ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชยครั้งนี้ สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาก่อน คือ Koaburside จากรายงานของ Mehta และคณะ (2011) ได้รายงานการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดใบของ *B. lanzan* ที่สกัดด้วยเมทานอลได้ 3 ชนิด คือ pinitol, vomicine and celidoniol (Mehta et al., 2011)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิคของสารสกัดธนนไชยแต่ละชนิด พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลจะมีสารที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลลิคมากกว่าสารที่สกัดด้วย dichloromethane ส่วนสารสกัด **BS4** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัด **BS2**, **BS3** และสารสกัด **BS1** ตามลำดับ ซึงจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟีนอลลิค ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ดังกล่าวอาจมาจากการมีสารกลุ่มฟีนอลลิคนี้ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ สารสกัดจากเปลือกลำต้นต้นมะม่วงหัวแมงวัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Jain and Jain, 2011; Mehta et al., 2009; Patra et al., 2011) โดยยังพบอีกว่าสารสกัดจากเปลือกนี้มีแทนนิน quercetin, gallic acid, glycosides, flavonoids (Khare, 2007; Kumara and Kakkar, 2008; Vyavaharkar and Mangaonkar, 2016) มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงหัวแมงวันสามารถลด oxidative stress ในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำด้วย cyclophosphamide โดยลด chromosome damage, lipid peroxidation ได้ (Jain and Jain, 2012) สารสกัดจากใบ *B. lanzan* ที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ในการ anti-diabetic, anti-hyperlipidemic และ anti-oxidant activities ในหนูทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 โดยสามารถลด blood glucose level, serum lipid profile และเพิ่ม antioxidant activity โดยเพิ่ม super oxide dismutase (SOD), catalase, glutathione (GSH), แต่ลด activity ของ lipid peroxidation (LPO) (Sushma et al., 2013) ซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการมีฤทธิ์ต้านอนูลอีสระสูงและมีสารเคมีองค์ประกอบที่ส่งเสริมการต้านอนุมูลอิสระได้

การสร้าง nitric oxide มีความสำคัญต่อกระบวนการทำงานของร่างกายหลายอย่างและมีความซับซ้อน และเป็นส่วนหนึ่งที่สำคัญในประบวนการเกิดการอักเสบ (inflammation) และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์พวก phagocytes ในการศึกษาผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่มีต่อการสร้าง nitric oxide พบว่า สารสกัด **BS3** สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide ได้มากที่สุด ในขณะที่สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอลไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง สำหรับสาร **compound 1** ไม่มีฤทธิ์ในการยั้งยั้งการสร้าง nitric oxide แต่มีฤทธิ์ในทางเพิ่มการสร้าง nitric oxide ได้เล็กน้อย ในส่วนของ **compound 1** ที่มีผลให้เพิ่มการสร้าง nitric oxide ได้ อาจมีประโยชน์ในทางการส่งเสริมการทำงานของ phagocytes หรือการขยายหลอดเลือด ส่วนสารสกัด **BS3** สามารถนำไปศึกษาต่อในด้านฤทธิ์ต้านการอักเสบซึ่งฤทธิ์ในการต้านการสร้าง nitric oxide และฤทธิ์ต้านการอักเสบนี้มักเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีสารกลุ่มฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งสัมพันธ์กับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดธนนไชยในการศึกษาครั้งนี้ จากการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดมะม่วงหัวแมงวัน พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงและมีสารกลุ่มฟีนอลิคมาก นอกจากนี้ การศึกษาสารสกัดจากมะม่วงหัวแมงวันในหนูทดลอง พบว่า สารสกัดจากเมล็ด *B. Lanzan* พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาปวดและลดไข้ได้ (Mehmood et al., 2016)

จากการศึกษาครั้งนี้ สารสกัดธนนไชยทุกส่วนสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ โดยสารสกัด **BS1** สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือ **BS3**, **BS4** และ **BS2** ตามลำดับ แต่ค่อนข้างมีความไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง ยกเว้น สารสกัด **BS4** และ **BS2** ที่มีค่า SI ต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) มากกว่า 1 ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติแต่ยังคงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งนี้ เกิดจากการชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ดีทั้งในเซลล์ HepG2 และ MCF-7 ยกเว้น MDA-MB-231 ที่เห็นการตายไม่ชัดนัก จากการศึกษาสารสกัดจากเปลือกของต้น B. lanzan พบว่า สารสกัดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (HL-60) แต่ในการศึกษาดังกล่าวทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำ คือ ไม่เกิน 100 µg/ml (Jain and Jain, 2011) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบต่ำเกินไป ซึ่งค่า IC_{50} ในการศึกษาครั้งนี้มีค่าสูงกว่าการศึกษาดังกล่าว

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดธนนไชย พบว่า สารสกัด **BS3** มีผลยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด **BS1**, **BS2** และ **BS4** โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis , B. cereus, S. epidermidis, S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ ซึ่งจากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัด **BS3** โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

Transmission electron microscopy (TEM) พบว่า สารสกัดสามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Kamomwannasit และคณะ (2013) และ Dong และคณะ (2015) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดธนนไชย พบว่า สารสกัดไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งคล้ายกันกับการศึกษาในอดีตของสารสกัดจากต้นมะม่วงหัวแมงวัน หรือ *B. lanzan* โดยจากการศึกษาสารสกัดจากเมล็ด *B. lanzan* พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อ *Salmonella flexneri* และ *B. cereus* ได้ แต่ไม่ยับยั้ง *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, เชื้อรา *Geotrichum candidum*, *A. niger* และ *Rhizopus stolonifera* (Khatoon et al., 2015) ส่วนการศึกษาในสารสกัดจากใบ *B. lanzan* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* นอกจากนี้ ยังลดการสร้าง biofilm ของเชื้อ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้อีกด้วย (Pattnaik et al., 2013)

สรุปและเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์กลุ่ม glycoside 1 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาก่อน คือ Koaburside และจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ให้ผลดังนี้ สารสกัดที่สกัดด้วยเมธานอลจากส่วนของลำต้น (**BS4**) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ EC_{50} = 7.1±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟีนอลลิคที่ค่าเท่ากับ 192.3±8.7 ส่วนสารสกัดจากส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (**BS3**) สามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide และยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis , B. cereus, S. epidermidis, S. aureus, E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ดีสุด สำหรับสารบริสุทธิ์ **compound 1** แม้จะไม่มีฤทธิ์ในการยั้งยั้งการสร้าง nitric oxide แต่มีฤทธิ์ในทางเพิ่มการสร้าง nitric oxide ได้เล็กน้อย ซึ่งอาจมีประโยชน์ในทางการส่งเสริมการทำงานของ phagocytes หรือการขยายหลอดเลือด ส่วนสารสกัด **BS3** สามารถนำไปศึกษาต่อในด้านฤทธิ์ต้านการอักเสบซึ่งฤทธิ์ในการต้านการสร้าง nitric oxide และฤทธิ์ต้านการอักเสบนี้มักเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีสารกลุ่มฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ซึ่งสัมพันธ์กับผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดธนนไชยในการศึกษาครั้งนี้

จากงานวิจัยนี้ยังเป็นแรงกระตุ้นให้นักวิจัยทางด้านพฤษศาสตร์หันมาให้ความสนใจที่อนุรักษ์และขยายพันธุ์ไม้ของไทยเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อสืบค้นข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับต้นธนนไชยในทุกๆด้านยังมีไม่มากนัก งานวิจัยจึงอาจจะงานวิจัยอีกชิ้นที่ทำให้นักวิจัยทั้งด้านเคมี เภสัชศาสตร์รวมถึงด้านพืชศาสตร์หันมาศึกษาพืชชนิดนี้อย่างจริงจังมากขึ้น

ผลผลิต

1. Yodsaoue, O., Kamonwannasit, S., Fangkrathok, N. Antioxidant and anticancer activities of *Buchanania siamensis* Miq. stem and leaf extracts. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University*. 2017 (In press)

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2559A1082006 สัญญาเลขที่ 118/2559

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. อรพรรณ ยอดสะอื

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 30 เดือนกันยานย พ.ศ. 2560

ระยะเวลาดำเนินการ....2.....ปี .....0..... เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 30 เดือนกันยานย พ.ศ. 2560

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	220,000 บาท	เมื่อวันที่ 27 เดือนเมษายน พ.ศ. 2559
งวดที่ 2 (40%)	176,000 บาท	เมื่อวันที่ 31 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2560
งวดที่ 3 (10%)	44,000 บาท	
รวม		

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	39,600	39,600	0
2. ค่าจ้าง	26,600	26,600	0
3. ค่าวัสดุ	253,000	259,800	0
4. ค่าใช้สอย	75,000	70,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ค่าสาธารณูปโภค	45,800	44,000	0
รวม	440,000	440,000	0

(.....)

นางสาวอรพรรณ ยอดสะอื

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

บรรณานุกรม

สุเทพ จันทร์เขียว รายชื่อพรรณ(ป่า)ไม้ในประเทศไทย (tree in Thailand), เครือข่ายการวิจัยนิเวศวิทยาป่าไม้ (ประเทศไทย) (ออนไลน์) เข้าถึงได้จาก : http://t-fern.forest.ku.ac.th/Forest/?action=family&action2=family_detail&fam=ANACARDIACEAE

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544). กรมป่าไม้. กรุงเทพ.

Attasara, P.; Buasom, R. 2011. Hospital-based cancer registry. *National Cancer Institue.* Union Ultraviolet Co. Ltd. 55p.

Aruoma, O. I.; Halliwell, B.; Williamson, G. 1997. In vitro methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of nonnutritive substances in plant foods. In: O.L. Aruoma and S.L. Cuppet (eds) *Antioxidant methodology*. USA, AOCS Press. pp173-204.

Chew, A. L.; Jessica, J. J. A.; Sasidharan, S. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of different part of *Leucas aspera*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2(3), 176-180.

Cristina, I. V. P.; Rehder, A. 2007. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. *Journal of Microbiological Methods*. 71, 186-190.

Dong, J. W.; Cai, L.; Xiong, J.; Chen, X. H.; Wang, W. Y.; Shen, N.; Liu, B. L.; Ding, Z. T. 2005. Improving the antioxidant and antibacterial activities of fermented *Bletilla striata* with *Fusarium avenaceum* and *Fusarium oxysporum*, *Process Biochem*. 50, 8–13.

Fitzpatrick, F. A. 2001. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int. Immunopharmacol.*, 1, 1651–1667.

Gupta, R. K.; Patel, A. K.; Shah, N.; Choudhary, A. K.; Jha, U. K.; Yadav, U. D.; Gupta, P. K.; Pakuwal, U. 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.,* 15, 4405-4409.

Jain, R.; Jain, S. K. 2011. Total phenolic contents and antioxidant activities of some selected anticancer medicinal plants from Chhattisgarh state, *India. Pharmacology online*. 2, 755-762.

Jain, R.; Jain, S. K. 2011. Screening of *in vitro* cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S147-S150.

Jain, R.; Jain, S. K. 2012. Effect of *Buchanania lanzan* Spreng. bark extract on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 187-191.

Kamonwannasit, S.; Nantapong, N.; Kumkrai, P.; Luecha, P.; Kupittayanant, S.; Chudapongse, N. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of *Aquilaria crassna* extracts. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 12, 20.

Khare, C. P. 2007. Indian medicinal plants: an illustrated dictionary. Berlin: Sringer-verlag. p. 600-601.

Khatoon, N.; Gupta, R. K.; Tyagi, Y. K. 2015. Nutraceutical potential and phytochemical screening of *Buchanania lanzan*, an underutilized exotic Indian nut and its use as a source of functional food. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 4(1), 87-94.

Kumari, A.; Kakkar, P. 2008. Screening of antioxidant potential of selected barks of Indian medicinal plants by multiple in vitro assays. *Biomed. Environ. Sci.,* 21, 24-9.

Lee, C. J.; Chen, L. W.; Chen, L. G.; Chang, T. L.; Huang, C. W.; Huang, M. C.; Wanga, C.C. 2013. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *J Food Drug Anal*. 21, 169-76.

Lin, J. Y.; Tang, C. Y. 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.

Makkar, H. P. S.; Bluemmel, M.; Borowy, N. K.; Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein perception methods. *Journal of Sciences and Food Agriculture*. 61, 161-165.

Mehta, S. K.; Jaiprakash, B.; Nayeem, N. 2011. Isolation & phytochemical investigation on leaves of *Buchanania Lanzan* (Chironji). *Annals of Biological Research.* 2(3), 469-473.

Mehta, S. K.; Mukherjee, S.; Jaiprakash, B. 2010. Preliminary phytochemical investigation on leaves of *Buchanania lanzan* (Chironji) . *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(2), 55-59.

Mehta, S. K.; Mukherjee, S.; Jaiprakash, B. 2009. Comparative anti-oxidant activity studies of *Buchanania lanzan* methanolic extract. *Biomed Pharmacol J.* 2, 441-444.

MehMood, A.; Hamid, I.; Sharif, A.; Akhtar, M. F.; Akhtar, B.; Saleem, A.; Iqbal, J.; Shabbir, M.; Ali, S. 2016. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of aqueous and ethanolic extracts of seeds of *Buchanania lanzan* Spreng. in animal models. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 73(6), 1601-1608.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survivals: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55–63

Nourazarian, A. R.; Kangari, P.; Salmaninejad, A. 2014. Roles of oxidative stress in the development and progression of breast cancer. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.*, 15, 4745-4751.

Oh, H. T.; Kim, S. H.; Choi, H. J.; Chung, M. J.; Ham, S. S.; 2008. Antioxidative and antimutagenic activities of 70 % ethanol extract from masou salmon (*Oncorhychus masou*). *Toxicology*, 22, 1484-1488.

Page, B.; Page, M.; Noel, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*. 3, 473-476.

Patra, K. C.; Pareta, S. K.; Harwansh, R. K.; Kumar, K. J. 2011. Antioxidant activity of *Buchanania lanzan* Spreg. F. *Anacardiaceae. Pharmacology online*. 1, 733-739.

Pattnaik, A.; Sarkar, R.; Sharma, A.; Yadav, K. K.; Kumar, A.; Roy, P.; Mazumder, A.; Karmakar, S.; Sen, T. 2013. Pharmacological studies on *Buchanania lanzan* Spreng.- a focus on wound healing with particular reference to anti-biofilm properties. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.*, 3, 967-74.

Puri, A.; Sahai, R.; Singh, K. L.; Saxena, R. P.; Tandon, J. S.; Saxena, K. C. 2000. Immunostimulant activity of dry fruits and plant materials used in indian traditional medical system for mothers after child birth and invalids. *J Ethnopharmacol.* 71, 89-92.

Sun, J.; Zhang, X.; Broderick, M.; Fein, H. 2003. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 3, 276–284.

Sushma, N.; Smitha, P. V.; Gopal, Y. V.; Vinay, R.; Reddy, N. S.; Mohan, C. M.; Raju, A. B. 2013. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of *Buchanania lanzan* Spreng. methanol leaf extract in Streptozotocin-induced types I and II diabetic rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 12(2), 221-226.

Vyavaharkar, R. V.; Mangaonkar, S. S. 2016. Extraction of flavonoids from *Buchanania lanzan* Spreng. seeds by supercritical fluid extraction and determination of their antioxidant activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 8(1), 353-358.

Wong, R. S. Y. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.*, 30. doi: 10.1186/1756-9966-30-87

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

ประวัติคณะผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการวิจัย</u>

1.ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวอรพรรณ ยอดสะอึ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Orapun Yodsaoue

2.เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1400500012410

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ต. วัฒนานคร อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว 27160

โทรศัพท์/โทรสาร 0-3810-2222 ต่อ 4053

โทรศัพท์มือถือ 086-746-5117

e-mail: orapun@buu.ac.th

1. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	สถานศึกษา
วท.บ. (เคมี)	2549	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วท.ม (เคมีอินทรีย์)	2551	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปร.ด. (เคมีอินทรีย์)	2556	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

เคมี เคมีอินทรีย์ เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ purification, elucidation, spectroscopy

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

หัวหน้าโครงการวิจัย : Chemical constituents from stems of *Artocarpus lakoocha* Roxb งบอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

ผลงานวิจัย:

Cheenpracha, S., **Yodsaoue, O**., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., Tewtrakul, S. and Kanjana-Opas, A. Potential anti-allergic ent-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. Phytochemistry, 2006, 67, 2630–2634.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Fun, H.-K. and Kanjana-Opas, A. Phanginin A-K, diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. Phytochemistry, 2008, 69, 1242–1249.

Yodsaoue, O., Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimanont, C., and Tewtrakul, S. Anti-allergic activity of principles from the roots and heartwood of *Caesalpinia sappan* on antigen-induced β-hexosaminidase release. Phytother. Res., 2009, 23, 1028–1031.

Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Phytochemistry, 2010, 71, 1756–1764.

Fun, H.-K., **Yodsaoue, O.,** Karalai, C. and Chantrapromma, S. Absolute configuration of isovouacapenol C. Acta Cryst., 2010, E66, o2059–o2060.

Fun, H.-K., **Yodsaoue, O.,** Chantrapromma, S. and Karalai, C. Absolute configuration of vouacapen-5-**β**-ol. Acta Cryst., 2010, E66, o2166–o2167.

Fun, H.-K., Chantrapromma, S., **Yodsaoue, O**. and Karalai, C. Absolute configuration of odorine. Acta Cryst., 2010, E66, o2437–o2438

Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S., Cheenpracha, S., **Yodsaoue, O.,** Karalai, C. and Ponglimanont, C. Anti-inflammatory principles of *Suregada multiflora* against nitric oxide and prostaglandin E2 releases. J. Ethnopharmacol., 2011, 133, 63─66.

Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Pulcherrins D–R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. Tetrahedron, 2011, 67, 6838–6846.

Yodsaoue, O., Sonprasit, J., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakul, S. and Chantrapromma, S. Diterpenoids and triterpenoids with potential anti-inflammatory activity from the leaves of *Aglaia odorata*. Phytochemistry, 2012, 76, 83–91.

Yodsaoue, O., Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical constituents from the heartwood and roots of *Caesalpinia sappan*.: PERCH-CIC Congress V. Jomtein Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. 6-9 May 2007. (Poster)

Yodsaoue, O., Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*.: The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand, Walailak University, Nakhon si thammarat, Thailand. 18-20 October 2007. (Poster).

Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C. and Tewtrakulb, S. Anti-Inflammatory Constituents from the Roots of *Caesalpinia mimosoides*.: PERCH-CIC Congress VI. Jomtein Palm Beach, Pattaya, Chonburi, Thailand. 3-6 May 2008. (Poster)

Yodsaoue, O., Karalai, C. and Ponglimanont, C. Chemical Constituents from the Seeds of *Caesalpinia sappan* Linn.: The 6th regional IMT-GT UNINET conference 2008. The Gurney resort hotel, Penang, Malaysia. 28-30 August 2008. (Oral)

Yodsaoue, O., Karalai, C., Ponglimanont, C., Tewtrakulb, S. and Chantrapromma, S. Anti-inflammatory constituents from the roots of *Caesalpinia mimosoides*.: Commission on Higher Education Congress III: University Staff Development Consortium CHE-USDC Congress III. A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Chonburi, Thailand. 9-11 August 2010. (Poster)

1.1 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางนิรามัย ฝางกระโทก

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Niramai Fangkrathok

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3320200007019

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ต. วัฒนานคร

อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว 27160

โทรศัพท์/โทรสาร 037-261559-60

โทรศัพท์มือถือ 083-1477567, 088-0243168

e-mail: niramai@buu.ac.th

5. **ประวัติการศึกษา**

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	สถานศึกษา
วท.บ. (จุลชีววิทยา)	2542	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
วท.ม (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)	2546	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปร.ด. (วิจัยและพัฒนาเภสัชภัณฑ์)	2555	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ**

   จุลชีววิทยา, เทคโนโลยีชีวภาพ, เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

7. **หมายเลขนักวิจัยแห่งชาติ**: 03-67647

8. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

   หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนังจากสารสกัดใบสาบเสือ ปีงบประมาณ 2557 จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้จากจุลสาหร่ายในแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย (สนองพระราชดาริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดาริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี). 2558. จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

3. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพิกัดเกสร ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

4. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารสำคัญจากเห็ดขลำหมา ประจำปีงบประมาณ 2560 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญของพืชสมุนไพรในพื้นที่โคกภูตากา (โครงการภายใต้ชุดแผนงานวิจัยการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่โคกภูตากา อ.ภูเวียง จ.ขอนแก่น งบอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ 2549 มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

2. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2551 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

3. โครงการการศึกษามาตรฐานและสารสำคัญจากพืชสมุนไพรในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

4. โครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพและเวชสำอางเพื่อเพิ่มมูลค่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีสีโดยการปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ ปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

5. โครงการการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมของสมุนไพรวงศ์อะคาร์เดียซีในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ประจำปีงบประมาณ 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

6. การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ปกป้องเนื้อเยื่อประสาท และการพัฒนามาตรฐานของสารสกัดโปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีสี ประจำปีงบประมาณ 2556 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

7. องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย ประจำปีงบประมาณ 2559 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

8. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาตำรับที่รักษาภาวะเบาหวานต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูไมซ์ ประจำปีงบประมาณ 2560 จากกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

9. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาตำรับปถวี อาโป วาโย ต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูไมซ์ที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน ประจำปีงบประมาณ 2560 จากกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

10. การศึกษาคุณค่าทางโภชนาการ ฤทธิ์ทางชีวภาพและการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง ประจำปีงบประมาณ 2560 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลงานวิจัย:

Niramai Fangkrathok, Suwanee Deeharing, Waraporn Petshri, Jantana Yahauyai, Jannarin Nontakham, Pongpun Siripong, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidant and Antityrosinase Activities of *Cochlospermum regium* Twig, Petal and Leaf Extracts. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.** 2017; 41(5th IPNaCS Conference Issue): 13-16.

Jintana Junlatat, Pokpong Prayong, Pitchanan Thiantongin, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidative and anti-inflamatory activity effects of Datura metel leave extract. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences.** 2017; 41(5th IPNaCS Conference Issue): 33-36.

Niramai Fangkrathok, Orapun Yodsaoue, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai, Sunan Jaisamut. Inhibitory effect of D-mannitol isolated from mushroom *Mycoamaranthus cambodgensis* on LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells. **Science and Technology, Ubon Ratchathani University (supplement).** 2017. (*In press*).

Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. *In vitro* bioactivity evaluation of ethanolic extract of *Cladogynos orientalis* leaves: Antioxidation, antimelanogenesis and antiinflammation. **Science and Technology, Ubon Ratchathani University (supplement)**. 2017. (*In press*).

Orapun Yodsaoue, Sirilak Kamonwannasit, Niramai Fangkrathok. Antioxidant and anticancer activities of *Buchanania siamensis* stem and leaf extracts. **Science and Technology, Ubon Ratchathani University (supplement)**. 2017. (*In press*).

Chokchai Chuangchot, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai, Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok. Antibacterial and antioxidant activity of *Rafflesia kerrii* extract against multidrug-resistant bacteria. **Songklanakarin Journal of Science and Technology.** 2017: 39(2); 163-170.

Catheleeya Mekjaruskul, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Acute toxicity investigation of polysaccharide extracts of *Lentinus polychrous* in rats. **Songklanakarin Journal of Science and Technology.** 2015: 34(4); 433-439.

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of extracts from *Phyllanthus emblica* branches. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 2014: 36(6); 669-674.

Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi, Bungorn Sripanidkulchai. Cytotoxic and immunomodulatory effects of polyhydroxyoctane isolated from *Lentinus polychrous* mycelia. **Journal of Natural Medicines**. 2014: 68(2); 302-309.

Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat, Bungorn Sripanidkulchai. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013: 147(3); 631-637.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi. Bioactive ergostanoids and a new polyhydroxyoctane from *Lentinus polychrous* mycelia and their inhibitory effects on E2-enhanced cell proliferation of T47D cells. **Natural Product Research**. 2013; 27(18): 1611-9

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkratok, Jintana Junlatat, Kittisak Sripanidkulchai. Antioxidative Activity and Antimutagenicity of Three Plants in Annonaceae in Plant Genetics Conservation at Khok Phutaka, Amphur Phuwiang, Khon Kaen. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2008: 4(2); 104-112.

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Praumjit Saralamp, Noppamas Soon thornchareonnon. Mutagenicity and Antimutagenicity tests of extracts from Thai traditional medicines. **J KKU Res**. 2007; 12(4): 492-8.

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Julatat, Kittisak Sripanidkulchai. Contamination of microbials and heavy metals in Thai herbal medicine produced in five ampores of Khon Kaen province. **J KKU Res**. 2007; 12(4): 499-507.

Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tatavasart, Jintana Junlatat, Niramai Jindakul, Wanna Sirisangtrakul. Antimutagenicity of extracts from dark and pale color rhizomes of *Kaempferia parviflora*. 10th World Congress on Clinical Nutrition (WCCN) 2004, Phuket, Thailand. p61.

Niramai Fangkrathok, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Cratoxylum formosum*. The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2008. China. p73-78.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tattawasart. Antiviral and immunomodulating effects of *Glochidion coccineum*. 1st Annual Northeast Pharmacy Research Conference 2009. Khon Kaen, Thailand. 9-10 Feb 2009. p61-64.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Biological activities of ethanolic extract from *Lentinus polychrous* mycelia. The 4th Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2010. Khon Kaen. Thailand. 11-13 July 2010. p120-125.

Niramai Fangkrathok, Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) activity of five selected plants from Khon Kaen Province, Thailand. The 5th Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2012. China. 17- 20 Sep 2012. p49-53. (Very good oral presentation award).

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Julatat, Kittisak Sripanidkulchai. Contamination of pathogenic microorganism and heavy metals in Thai traditional medicines produced in Khon Kaen province. 1st International Conference on Natural Product for Health and Beauty (NATPRO1) 2005, Mahasarakarm, Thailand. p168.

Bungorn Sripanidkulchai, Unchalee Tatavasart, Niwat Sanoamuang, Niramai Fangkrathok, Darunee Juntaviset. Immunomodulating activity of Thai edible

and medicinal mushroom mycelial extracts on Balb/cA mouse immunity in vitro. 1st Sino –Thai Conference on Traditional medicine and Natural Health Product 2006, China. p153-8.

Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Khaetthareeya Sutthanut. Anti-cancer and immunomodulatory effects of *Kaempferia parviflora* in mitogen-stimulated murine spleen cells. 5th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal transduction and drug effect (IRS2007) 2007, Japan. p107.

Fangkrathok N, Sripanidkulchai B, Rakngan W. Antioxidative and anticancer activities of Thai black glutinous and brown rice bran. The 2nd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Natural Products. Thailand. 2-6 December 2007. p 251-5.

Fangkrathok N., Sripanidkulchai B, Sanoamuang N. Effects of local mushroom extracts on nitric oxide production, iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells. Commission on Higher Education Congress I, University staff Development Consortium. Thailand. p 113.

Sripanidkulchai B, Rakngan W, Soahar C, Fangkrathok N, Khamkeaw P, Julatat J. Mutagenic, antimutagenic and antioxidative activity of *Glochidion coccineum*. The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products. 2008. China. P13-18.

Fangkrathok N., Sripanidkulchai B., Rakngan W., Soaha C., Khamkeaw P., Julatat J. Naresuan Phayoa Journal, Vol 1, Suppl 1, 2008 : Antioxidative and antimutagenic activities of *Dalbergia darlacensis*. The 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO2). 17-19 December 2008. Thailand. p227.

Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. Anti-cancer and anti-viral activities of *Lentinus polychrous* extracts. Commission on Higher Education Congress II, University staff Development Consortium. Thailand. 27-29 Aug 2009. p 217.

Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. and Sripanidkulchai K. Anticancer activity of *Kaempferia parviflora* extract and its constituents against breast cancer cells. The 3rd International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO3), Bangkok, Thailand, 16-18 March 2011. P124.

Fangkrathok N., Sripanidkulchai B. and Sripanidkulchai K. Mutagenicity and anti-mutagenicity of *Erythrophleum succirubrum* extract. The Physiological Society of Thailand International Conference, Khon Kaen, Thailand, 2-4 May 2011. P137.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi. Steroidal constituents from mycelia of Thai local edible mushroom, *Lentinus polychrous*. The 58th Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy (Tokyo, 2011). September 24-25, 2011. Tokyo, Japan. p276.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Immunorestoration of *Lentinus polychrous* mycelial extract on immunocompromised model in in vitro. 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. Chiang Mai, Thailand. 1-2 March 2012. pHS-255-HS259. (Excellent poster presentation award).

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Screening of mutagenic and anti-mutagenic activities of six selected plants from Chaiyapoom Province, Thailand. The 4th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO4). 28-30 Nov 2012. Chiang Mai, Thailand.

Unchalee Tattawasart, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok. Antimicrobial activities of *Catimbium speciosum* extract. Thai resources: Bring the best Thai things to the world. 21-23 Dec 2013. p95-96. Kanchanaburi, Thailand.

Kittisak Sripanidkulchai, Bungorn Sripanidkulchai, Niramai Fangkrathok, Jintana Junlatat. Study of anti-cancer activity against breast cancer of Anacardiaceae plants. Thai resources: Bring the best Thai things to the world. 21-23 Dec 2013. P34-35. Kanchanaburi, Thailand.

Panjapa Kolakul, Niramai Fangkrathok, Plearn Kammungkun, Ploykwan Kranjanasurat, Bungorn Sripanidkulchai. Antimicrobial effects of Thai Plants against Acne-induction bacteria. The 5th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2013 “Pharmacy Profession: Moving Forward to ASEAN Harmonization”. 16-17 Feb 2013. Mahasarakarm, Thailand. p34.

Niramai Fangkrathok, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi, Bungorn Sripanidkulchai. Immunosuppressive effect of five ergosterols isolated from *Lentinus polychrous* mycelial extract and theirs *in vitro* cytotoxicity. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2014. 13-16 April 2014. Melbourne, Australia.

Niramai Fangkrathok, Kittisak Sripanidkulchai, Bungorn Sripanidkulchai. Mutagenic and antimutagenic activities of two plant extracts from Euphobiaceae. 5th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO5). 6-8 May 2014. p167. Phuket, Thailand.

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. In vitro mutagenic and antimutagenic effects of *Diosyros castanea* brance and leaf extracts. 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21-23 Jan, 2016. p132-135. Khon Kaen, Thailand.

Catheleeya Mekjaruskul, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Antioxidative and anticancer activities of selected microalgae extracts isolated from East coast of Thailand. 6th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6). 21-23 Jan, 2016. p146-149. Khon Kaen, Thailand.

นิรามัย ฝางกระโทก, กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกลุชัย และบังอร ศรีพานิชกลุชัย. (๒๕๕๙). ฤทธิ์ปรับระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองของสารสกัดจากต้นเปลือยเลือดและแสนคำ. ใน *การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ "การประชุมวิชาการ ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ ๗"* (หน้า ๓๖๖-๓๗๐). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ("Thai Resources: Review Our Own Assets. 24-26 มีนาคม 2559)

Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Immunosuppressive effect of *Lentinus polychrous* mycelial extract on T helper 1 differentiation. The 3rd International Conference on Pharma-Food (ICPF 2016). November 17-18, 2016 Shizuoka, Japan. p148.

Jintana Junlatat, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. Anti-inflammatory and anti-oxidant activities of Pi-Kad-Ka-Sorn-5 herbal tea extracts. The 3rd International Conference on Pharma-Food (ICPF 2016). November 17-18, 2016 Shizuoka, Japan. p117.

Niramai Fangkrathok. Effects of *Chromolaena odorata* leaf extracts and its gel formulation on acne causative bacteria. 2rd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. 25-27 Jan 2017. Bangkok, Thailand. p218-223.

Kanyarat Peng-ngummuang, Jintana Junlatat, Gunnanut Thapsuriyanoon, RattanapornAinthanam, Suparat Rahotan, Angsana Meemoe, Niramai Fangkrathok, Bungorn Sripanidkulchai. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of Thai herbal teas. 2rd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017. 25-27 Jan 2017. Bangkok, Thailand. p357-364.

1.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Sirilak Kamonwannasit

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3251200073889

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ต. วัฒนานคร

อ. วัฒนานคร จ. สระแก้ว 27160

โทรศัพท์/โทรสาร 037-261559-60

โทรศัพท์มือถือ 081-5716252

E-mail: sirilak25@hotmail.com หรือ sirilakk@buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	สถานศึกษา
วท.บ. (วิทยาศาสตร์ โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์)	2548	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
วท.ม (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)	2550	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ปร.ด. (เภสัชวิทยา)	2556	สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- เทคนิคทางด้านจุลชีววิทยา
- เทคนิคทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร
- การสกัดหาปริมาณสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

- ELISA
- การใช้เครื่อง SEM และ TEM

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย :

1. โครงการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบกฤษณา บริษัท กฤษณา กรีน โกลด์ จำกัด งบวิจัยภายนอก ประจำปี 2553

ผลงานวิจัย:

Kamonwannasit S, Phrompittayarat W, Ingkaninan K, Tanaka H, Putalun W. Imprement of Pseudojujubogenin Glycosides Production from Regenerate *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and Enhaned Yield by Elicitors. Z Naturforsch C. 2008, 63(11-12):879-83.

Sirilak Kamonwannasit, Nawarat Nantapong, Pakarang Kumkrai, Prathan Luecha, Sajeera Kupittayanant and Nuannoi Chudapongse. Antioxidant and antibacterial activities of *Aquilaria crassna* extracts. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013, 12:20:1-7.

Pakarang Kumkrai, Sirilak Kamonwannasit, Nuannoi Chudapongse. Cytoprotective and anti-diabetic effects of *Derris reticulate* aqueous extract. J Physiol Biochem. 2014.

S Kamonwannasit, P Kumkrai, N Nantapong, S Kupittayanant, N Chudapongse. Antioxidant and antibacterial activities of the extract of *Aquilaria crassna* leaves. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 4–9 September 2011. Antalya, Turkey.

1.3 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นางสาวรุ่งนภา แซ่เอ็ง

   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Rungnapha Saeeng

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 4101700033133

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ต. แสนสุข ชลบุรี 20131

โทร 0-3810-3039 มือถือ 08-1656-7524 โทรสาร 0-3839-3494

E-mail rungnaph@buu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	ปี พ.ศ.ที่จบ	สถานศึกษา
ปริญญาตรี (เคมี)	2532	มหาวิทยาลัยมหิดล
ปริญญาโท (เคมีอินทรีย์)	2538	มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุนมูลนิธิ ศ.ดร. แถบ นีละนิธิ)
ปริญญาเอก (เคมีอินทรีย์)	2542	Nagoya University (ทุนรัฐบาลญี่ปุ่น Monbucho)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาที่ชำนาญ เคมีอินทรีย์สังเคราะห์ (Organic synthesis)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

1. ภายในประเทศ

2543-2544	แหล่งทุน	ทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	The Studies of Electronic Factors in the C-Glycosidation with Silylacetylene for Bryostatin 1 Synthesis
2544-2545	แหล่งทุน	ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สกว
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	The Synthetic Studies of 6,7-Membered Ether Ring from Sugar
2546-2547	แหล่งทุน	ทุนอุดหนุนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Thailand Toray Science Foundation
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	The Studies on Selective Propargylation of Sugar Leading to the Synthesis of Bioactive Compounds
2546-2547	แหล่งทุน	ทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	The Synthesis of Bioactive Compounds from Sugar Derivatives
2551	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การผลิต halogenated carbohydrate เพื่อใช้ในงานทางด้านเวชศาสตร์นิวเคลียร์
2551-2552	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การปรับเปลี่ยนสาร andrographolide เพื่อเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทยฟ้าทะลายโจร

2552-2553	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การสังเคราะห์โครงสร้างบางส่วนของสารเลียนแบบผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ
2553-2555	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การเตรียมสารอนุพันธ์ใหม่ของ andrographolide เพื่อใช้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง
2554-2555	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การเตรียมเอริลไกล์โคไซด์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านเบาหวาน
2556-2558	แหล่งทุน	ทุนงบประมาณแผ่นดินจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	การเตรียมสารสังเคราะห์ไตรเอโซลไกลโคไซด์เพื่อศึกษาสมบัติการต้านมะเร็งท่อน้ำดี

2. ภายนอกประเทศ

2547	แหล่งทุน	The MEXT Grant-in-Aid for Special Promotion of Science Grant
	สถานภาพ	ผู้ร่วมโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	C-Glycosidation of 1,4-Bis(trimethylsilyl)-2-butyne
2548	แหล่งทุน	JASSO fellow up research fellowship (MEXT)
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย
	หัวข้อโครงการวิจัย	The stereoselective glycosidation of glycal
2551	แหล่งทุน	JSPS Invitation Fellowship
	สถานภาพ	หัวหน้าโครงการวิจัย

หัวข้อโครงการวิจัย Synthesis of Mini-Ciguatoxin

ผลงานตีพิมพ์

1. Minoru Isobe, Seijiro Hosokawa, Kazunobu Kira, Tongzhu Liu, Bettina Kirschbaum, **Rungnapha Saeeng.** Synthetic strategy toward ciguatoxin. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*; **1997**; *39*, 103-108.
2. Vichai Reutrakul, **Rungnapha Saeeng** and Manat Pohmakotr. Synthetic Applications of Samarium(II) Iodide Mediated Regioselective Cleavage of Phenylsulfonyl Activated Cyclopropyl Ketones *Tetrahedron Letter*, **1999**, *40*, 1019-1020.
3. **Rungnapha Saeeng** and Minoru Isobe. Partial Synthesis of Ciguatoxin (*5R*)-ABC-Segment *Tetrahedron Letter*, **1999**, *40*, 1911-1914.
4. Minoru Isobe, **Rungnapha Saeeng**, Rena Nishisawa, Masato Konobe and Toshio Nishikawa. Electronic Factors in the C-Glycosidation with Silylacetylene *Cheistry. Lett*er, **1999**, 467-468.
5. **Rungnapha Saeeng** and Minoru Isobe. Synthesis of Ciguatoxin (*2S,5R*)-ABC-Segment *Heterocycles*, **2001**, *54*, 789-798.
6. **Rungnapha Saeeng**, Uthaiwan Sirion, Poolsak Sahakitpichan and Minoru Isobe Iodine Catalyzed *C*-Glycosidation of D-Glucal with Silylacetylene *Tetrahedron Letter*, **2003**, *44*, 6211-6215.
7. Minoru Isobe, Wanna Phoosaha, **Rungnapha Saeeng**, Kazunibu Kira and Chavi Yenjai Different C-Glycosidation Products of Glucal with Alkynyl or Propargyl Silanes under Acidic Condition *Organic letter*, **2003**, *5*, 4883-4885.
8. Shingo Tojo, **Rungnapha Saeeng**, Akinari Hamajima, Minoru Isobe Synthetic Studies on Solanoeclepin A *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu* **2005**, *85*, 1081.
9. **Rungnapha Saeeng** and Minoru Isobe. Synthesis of silylallene glycosides and diene-diglycosides from C-glycosidation of D-glucal with 1,4-bis(trimethylsilyl)-2-butyne *Organic letter*, **2005**, *7*, 1585-1588.
10. Krissana Peewasarn, Sittidate Purintawarrakun and **Rungnapha Saeeng**. Synthesis of New Derivatives of Unsaturated Enol Ether *Burapha Sci. J*. **2006**, *11*, 11-18.

11. **Rungnapha Saeeng** and Minoru Isobe. Stereoselective *C*-Alkynylation, Allenylation and Prop-2-ynylation Leading to Sugar Glycosides. *Chemistry letter*, **2006**, 552.
12. **Rungnapha Saeeng**, Akinari Hamajima and Minoru Isobe. Synthesis of Mini-Ciguatoxin *Proceeding in Annual Meeting of JSBBA* **2008**, *2A04*, 1.
13. Uthaiwan Sirion, Sittidate Purintawarrakun, Poolsak Sahakitpichan and **Rungnapha Saeeng**. An efficient method for the selective synthesis of 2-deoxy-2-iodo-glycosides by O-glycosidation of D-glucal using I_2–$Cu(OAc)_2$. *Carbohydrate Research*, **2010**, *345*, 2401–2407.
14. **Rungnapha Saeeng**, Uthaiwan Sirion, Yada Sirichan, Thanida Trakulsujaritchok, and Poolsak Sahakitpichan. Convertible Formation of Different Glycoside Using Molecular Iodine. *Heterocycles*, **2010**, *81*, 2596-2617.
15. Tanida Trakulsujaritchok, Nok Noiphom, Napa Tangtreamjitmun and **Rungnapha Saeeng**. Adsorptive features of poly (glycidyl methacrylate-co-hydroxyethyl methacrylate): effect of porogen formulation on heavy metal ion adsorption. *Journal of Materials Science*, **2011**, *46*, 5350-5362.
16. **Rungnapha Saeeng**; Uthaiwan Sirion; Sakkasem Kasemsook; Apichart Suksamrarn; Pawinee Piyachaturawat; Kanoknetr Suksen. Derivatives of andrographolide as anti-cancer drugs. *Thai Patent Application*, No. **1101000272**, 25 February 2011.
17. **Rungnapha Saeeng**, Wadchara Mangsang, Uthaiwan Sirion, "One-pot synthetic method of triazole glycoside derivatives" Thai patent application, No. **1101002712**, 19 October 2011.
18. **Rungnapha Saeeng**; Uthaiwan Sirion; Sakkasem Kasemsook; Apichart Suksamrarn; Pawinee Piyachaturawat; Kanoknetr Suksen. Synthetic-amino andrographolide as anti-cancer drugs. *Thai Patent Application*, No. **1101003842**, 26 December 2011.
19. Uthaiwan Sirion, Sakkasem Kasemsook , Kanoknetr Suksen, Pawinee Piyachaturawat, Apichart Suksamrarn, **Rungnapha Saeeng*** New substituted C-19-andrographolide analogues with potent cytotoxic activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2012**, *22*, 49-52.

20. Jintapat Nateewattana, **Rungnapha Saeeng** Sakkasem Kasemsook , Kanoknetr Suksen, Suman Dutta, Sarawat Jariyawat, Arthit Chairoungdua, Apichart Suksamrarn, Pawinee Piyachaturawat. Inhibition of topoisomeraseII a activity and induction of apoptosis in mammalian cells by semi-synthetic andrographolide analogues, *Invest New drugs* **2012**, published online; *17 August 2012.*
21. Narumol Bhummaphan, Jintapat Nateewattana, Kanoknetr Suksen, **Rungnapha Saeeng**, Arthit Chairoungdua. Induction of cholangiocarcinoma cells apoptosis by an andrographolide analog, *Scientific Research and Essays*, **2013**, *8*, 26-31.
22. Wadchara Mangsang, Uthaiwan Sirion, **Rungnapha Saeeng**[*] One-pot synthesis of O-glycosyl triazoles by O-glycosylation–click reaction, *Carbohydrate Research*, **2013**, *375*, 79–89.
23. Sakkasem Kasemsook, Uthaiwan Sirion, Kanoknetr Suksen, Pawinee Piyachaturawat, Apichart Suksamrarn, **Rungnapha Saeeng**[*] 12-Amino-andrographolide analogues: synthesis and cytotoxic activity, *Archives of Pharmacal Research***, 2013**, *36*, 1454-1464.
24. Jintapat Nateewattana, Suman Dutta, Somrudee Reabroi**, Rungnapha Saeeng** Sakkasem Kasemsook , Arthit Chairoungdua, Jittima Weerachayaphorn, Sopit Wongkham, Pawinee Piyachaturawat Induction of apoptosis in cholangiocarcinoma by an andrographolide analogue is mediated through topoisomerase II alpha inhibition, *European Journal of Pharmacology*, **2014**, *723*, 148-155.
25. Jaray Jaratjaroonphong, Surisa Tuengpanya, **Rungnapha Saeeng**, Sarinporn Udompong, Klaokwan Srisook Green synthesis and anti-inflammatory studies of a series of 1,1-bis(heteroaryl)alkane derivatives *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *83*, 561-568.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ผลงานตีพิมพ์ในข้อ 6-25

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 6 จากทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์ และทุนอุดหนุนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Thailand Toray Science Foundation

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 7-9 จาก The MEXT Grant-in-Aid และ JASSO fellow up research fellowship

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 10 จากทุนรายได้คณะวิทยาศาสตร์

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 11 -

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 12 จาก JSPS Invitation Fellowship

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 13 จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกว. 2547

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 14 จากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2551 และ PERCH-CIC

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 16 และ 18 จากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2552-2553 และ PERCH-CIC

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 19, 20 และ 23 จากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2553-2555 และ PERCH-CIC

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 17, 22 และ 24 จากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2554-2556 และ PERCH-CIC

-ผลงานตีพิมพ์ข้อ 25 บางส่วนจากทุนงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา ปี 2552-2553 และ PERCH-CIC

งานวิจัยที่กำลังทำ :

1. หัวข้อโครงการวิจัย “การเตรียมสารสังเคราะห์ไตรเอโซลไกลโคไซด์เพื่อศึกษาสมบัติการต้านมะเร็งท่อน้ำดี”

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพา

สถานภาพ หัวหน้าโครงการวิจัย

งานสำเร็จลุล่วง 80%

2. หัวข้อโครงการวิจัย “การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร Iridoid Glycoside ที่ได้จากสมุนไพรไทยเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ”

แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกว.

สถานภาพ หัวหน้าโครงการวิจัย

งานสำเร็จลุล่วง 30%

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ข้าพเจ้า ดร. อรพรรณ ยอดสะอี ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) องค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธนนไชย

(ภาษาอังกฤษ) Chemical constituents and bioactive compound from *Buchanania siamensis* Miq

รหัสโครงการ 2559A10802006 / สัญญาเลขที่ 118/2559

ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 440,000 บาท (สี่แสนสี่หมื่นบาทถ้วน)

ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึง 30 เดือนกันยายน พ.ศ. 2559)

บทคัดย่อ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากลำต้นของต้นธนนไชย สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์ 1 สาร ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานมาก่อน คือ Koaburside และจากการสกัดสารจากส่วนของใบที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (**BS1**) และเมทานอล (**BS2**) และจากส่วนของลำต้นที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (**BS3**) และเมทานอล (**BS4**) ได้นำมาศึกษาลักษณะของโครมาโตกราฟีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ อาทิ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกรวม ต้านมะเร็ง ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านเชื้อรา ซึ่งสารสกัดจากเมธานอลมีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากไดคลอโรมีเทน โดยสารสกัด **BS4** มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ มีค่า EC_{50} เท่ากับ 7.1±0.1 μg/ml ซึ่งสูงกว่าสารสกัด **BS2, BS3** และ **BS1** ตามลำดับ สารสกัดทุกชนิดสามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์แมคโครเฟจ RAW264.7 ในสภาวะที่มี LPS ชักนำได้ โดยเฉพาะ **BS3** (IC_{50} เท่ากับ 94.47±23.50 μg/ml) สารสกัด **BS1** มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT, HepG2, MCF-7 และ MDA-MB-231 มากกว่าสารสกัดชนิดอื่น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 119.41±4.80, 196.47±41.36, 264.76±8.50 และ 289.81±36.57 μg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่า **BS1** มีค่า selectivity index (SI) ต่ำกว่าสารสกัดชนิดอื่น และที่น่าสนใจไปกว่านั้นสารสกัดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ตับชนิด HepG2 ได้ดีกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และ MDA-MB-231 นอกจากนี้ สารสกัด **BS4** มีค่า SI ของเซลล์ HepG2 เท่ากับ 2.25 ซึ่งสูงกว่าสารสกัด **BS2**, **BS3** และ **BS1** (SI เท่ากับ 1.58, 0.88 และ 0.61, ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารสกัด BS1 และ BS3 สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเหล่านี้ผ่านการชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis นอกจากนี้ ยังมีอีกหนึ่งสารสกัดคือ **BS3** ที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, S. epidermidis* และ *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ดีกว่าสารสกัด **BS1, BS2** และ **BS4** จากการศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัด **BS3** โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Transmission electron microscopy (TEM) กับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ *B. cereus* พบว่า สารสกัดสามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้ ดังนั้นสารสกัดจากต้นธนนไชยจึงอาจจะเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาต่อยอดทางด้านยาสมุนไพรและการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ

Output

1. Yodsaoue, O., Kamonwannasit, S., Fangkrathok, N. Antioxidant and anticancer activities of *Buchanania siamensis* Miq. stem and leaf extracts. *Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University*. 2017 (In press)

ข้อเสนอแนะ

ไม่มี