รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารกลุ่มควิโนนที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์จากใบของต้นทองพันชั่ง

/Isolation and Identification of Cytotoxic Quinoid from *Rhincanthus nasutus* (Linn.) Kurz Leaves

ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์

Pharkphoom Panichayupakaranant

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2543 - 2544

จุฬา
QK495.A1655 ภ162 2545
228386

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สารสกัดใบทองพันชั่งด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ได้แก่ High performance liquid chromatography (HPLC) และ Thin layer chromatography (TLC) พบว่าสารสกัดใบทองพันชั่งประกอบด้วยสาร naphthroquinone 4 ชนิดจากการพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบทั้งสี่ พบว่าเป็นสารประกอบ rhinacanthin-B, rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N สามารถแยกสาร rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N จากใบทองพันชั่ง โดยใช้ vacuum column chromatography (Siliga gel) ร่วมกับ gel filtration chromatography (LH-20) จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมสายพันธุ์ MCF-7 และมะเร็งปากมดลูกสายพันธุ์ Hela พบว่าสารประกอบ rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N ที่แยกได้จากใบของทองพันชั่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ MCF-7 ด้วยค่า ED_{50} เท่ากับ 1.02, 3.34, 2.78 μg/ml ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ Hela ด้วยค่า ED_{50} เท่ากับ 0.85 14.54 และ 1.59 μg/ml ตามลำดับ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่าสาร rhinacanthin-C, -D และ -N มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* โดย rhinacanthin-C มีค่า MIC เท่ากับค่า MFC ซึ่งเท่ากับ 512 μg/ml rhinacanthin-D มีค่า MIC เท่ากับค่า MFC ซึ่งเท่ากับ 64 μg/ml และ rhinacanthin-N มี MIC เท่ากับ 64 μg/ml และ มีค่า MFC เท่ากับ 128 μg/ml นอกจากนี้ยังพบว่า rhinacanthin-C, -D และ -N มีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวกชนิดกลม (*Staphylococcus aureus*) และชนิดแท่ง (*Bacillus subtilis*) แต่ไม่มีผลต่อเชื้อแกรมลบรูปแท่ง (*Escherichia coli*) ที่ใช้ในการทดสอบ สามารถวิเคราะห์ปริมาณสาร วิเคราะห์ rhinacanthin-C, -D และ -N โดยใช้เทคนิค HPLC โดยพบว่าในใบของทองพันชั่งมีสาร rhinacanthin-C (1.94 %w/w) เป็นสาร naphthoquinone หลัก ซึ่งมีมีมากกว่าสาร rhinacanthin –D (0.12 %w/w) และ –N (0.07 %w/w) ถึง 16 และ 27 เท่า ตามลำดับ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
สารบัญรูปภาพ	ง
สารบัญตาราง	จ
บทคัดย่อ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทองพันชั่ง	1
ประโยชน์ของทองพันชั่ง	2
สารเคมีที่พบในทองพันชั่ง	4
ฤทธิ์ทางชีวภาพของทองพันชั่ง	9
ความเป็นพิษของทองพันชั่ง	15
บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมี	16
บทที่ 3 การทดลอง	18
การเตรียมสารสกัดใบทองพันชั่งเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์	18
การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์	18
การสกัดและแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่ง	18
การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	19
การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัด	20
การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ	21
การวิเคราะห์หาปริมาณสาร rhinacanthin-C, -D และ N ในใบทองพันชั่ง	22
บทที่ 4 ผลการทดลองและสรุปผล	24
การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบทองพันชั่ง	24
การแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่ง	24
การพิสูจน์เอกลักษณ์สาร naphthoquinones	26
การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	37
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	38
การวิเคราะห์ปริมาณ rhinacanthins ในใบทองพันชั่ง	40
เอกสารอ้างอิง	44

ภาคผนวก 46

แบบเสนอโครงการวิจัย 46

บทคัดย่อการนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการ NRCT-JSPS ครั้งที่ 54

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*)	2
2	โครงสร้างของ rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P	4
3	โครงสร้างของ rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q	5
4	โครงสร้างของ rhinacanthone	6
5	โครงสร้างของ rhinacanthin-E และ -F	6
6	โครงสร้างของ 4-acetonyl-3,5-dimethoxy-*p*-quinol	7
7	TLC chromatogram ของสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate	25
8	^{1}H NMR Spectrum (500 MHz) ของสาร Rn1	26
9	^{13}C NMR Spectrum (125.65 MHz) ของสาร Rn1	27
10	สูตรโครงสร้างของ rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N	28
11	IR Spectrum ของสาร Rn2	29
12	^{1}H NMR Spectrum (500 MHz) ของสาร Rn2	30
13	^{13}C NMR Spectrum (125 MHz) ของสาร Rn2	31
14	IR Spectrum ของสาร Rn3	32
15	^{1}H NMR Spectrum (125 MHz) ของสาร Rn3	32
16	^{13}C NMR Spectrum (125 MHz) ของสาร Rn3	33
17	HPLC chromatogram ของสารสกัดจากใบทองพันชั่ง	34
18	HPLC chromatogram ของสารสกัดจากใบทองพันชั่ง เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS	35
19	Absorption spectrum และ Mass spectrum ของ peak ที่ RT 12.40 นาที เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS	36
20	Calibration curve ของ rhinacanthin-C	41
21	Calibration curve ของ rhinacanthin-D	42
22	Calibration curve ของ rhinacanthin-N	43

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติต่างๆ ของสารควิโนนที่พบในทองพันชั่ง	9
2	ผลของสารสกัดใบทองพันชั่งในการลดความดันโลหิตในหนูขาว	10
3	ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D	11
4	ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F	12
5	ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid	13
6	ผลของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid ที่พบในทองพันชั่ง ต่อการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด	14
7	ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate และสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี brine shimp lethality assay	24
8	ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ Hela ของสาร rhinacanthin-C, -D และ -N	37
9	ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ rhinacanthin-C, -D และ -N เปรียบเทียบกับ tetracycline	38
10	ผลของสาร rhinacanthin-C (Rn-C), -D (Rn-D), และ -N (Rn-N) ต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans*	39
11	ฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ของ rhinachanthin-C, -D and -N	39
12	ปริมาณสาร Rhinacanthin-C, -D และ -N ในผงใบทองพันชั่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC	40

บทที่ 1

บทนำ

1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของทองพันชั่ง

(โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530 ; นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz

ชื่อวงศ์ Acanthaceae

ชื่อพื้นเมืองอื่นๆ หญ้ามันไก่, ทองพันชั่ง (ชื่อไทย)

แปะเฮาะเล่งจือ (ชื่อจีน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เป็นพืชล้มลุกกึ่งไม้พุ่มเตี้ย สูงไม่เกิน 1.5 เมตร มักแตกหน่อและแผ่กิ่งก้านออกเป็นกอ ลำต้นและกิ่งก้านมีขนประปรายทั่วไป กิ่งอ่อนมักเป็นสันสี่เหลี่ยมตามยาว

ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปมน กว้าง 2-3 ซม. ยาว 4-6 ซม. โคนและปลายใบสอบเรียวออก เป็นคู่ๆ ตรงข้ามกัน และแต่ละคู่ออกสลับทิศทางกัน เนื้อใบบางและเกลี้ยง ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่นบ้างเล็กน้อย (รูปที่ 1)

ดอก สีขาวคล้ายนกกระยาง ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ดอกรวมกันเป็นหลอดรูปทรงสูง ปลายแยกเป็นสองกลีบ ปลายกลีบล่างห้อยย้อยลง และหยักเป็นสามลอน กลีบบนชี้ตั้งขึ้น ปลายแยกเป็นสามลอน โคนกลีบมีจุดประสีม่วงแดง เกสรตัวผู้สีน้ำตาลอ่อนมีสองอันยื่นพ้นปากหลอดออกมาเล็กน้อย รังไข่มี 1 อัน รูปยาวรี มีหลอดท่อรังไข่คล้ายเส้นด้าย ยาวเสมอปากหลอดดอก แต่ชาวสุรินทร์เห็นว่าดอกทองพันชั่งคล้ายข้าวเม่า คือ มีกลีบดอกสี่กลีบตกออกคล้ายข้าวเม่า จึงเรียกต้นทองพันชั่งว่า "ผกาอ็อมาเก" แปลว่า ต้นดอกข้าวเม่า (รูปที่ 1)

ผล เป็นฝักยาวมีขนสั้นๆ คลุม ภายในมี 4 เมล็ด

นิเวศวิทยาและการกระจายพันธุ์

ส่วนใหญ่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ และใช้เป็นยาพื้นบ้านตามบ้านเรือน ทองพันชั่งเป็นพืชที่ไม่ชอบร่มเงามากนัก ชอบที่ดินปนทราย การระบายน้ำดีไม่ขังแฉะ แต่ต้องคอยรดน้ำให้ดินชุ่มอยู่เสมอใบจึงจะงาม ถ้าดินขาดน้ำหรือถูกแดดมากไปใบจะมีจุดสีเหลือง

การขยายพันธุ์

ใช้เมล็ดเพาะ หรือเอากิ่งปักชำ

รูปที่ 1 ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*)

การเก็บมาใช้

ควรเก็บใบและรากจากต้นที่สมบูรณ์แข็งแรงได้รับปุ๋ย, แสงแดด และน้ำเพียงพอ กล่าวคือใบไม่มีจุดเหลือง มีสีเขียวสดเป็นมัน และควรเลือกเก็บจากต้นที่มีอายุเกิน 1 ปี หรือออกดอกแล้ว

2. ประโยชน์ของทองพันชั่ง

งานสาธารณสุขมูลฐาน

ใช้ทองพันชั่งในการรักษากลากเกลื้อน โดยใช้ใบ (สดหรือแห้ง) หรือราก (สดหรือแห้ง) ตำให้ละเอียด แช่เหล้าหรือแอลกอฮอล์พอท่วมตั้งไว้ 7 วัน นำน้ำยาที่ได้มาทาบริเวณที่เป็นบ่อยๆ หรือทาวันละ 3-4 ครั้ง จนกว่าจะหาย เมื่อหายแล้วให้ทาต่ออีก 7 วัน (มาโนช วามานนท์ และ เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2537)

เหตุที่ต้องแช่ไว้นาน 7 วัน เป็นเพราะน้ำยาที่ยังแช่ไม่ครบกำหนดจะมีฤทธิ์กัดผิวหนัง ถ้านำไปทาจะทำให้ผิวหนังแสบและคันมากขึ้น น้ำยาจากรากแห้งกัดผิวมากกว่าใบแห้ง ส่วนน้ำยาจากใบสดไม่กัดผิว

ข้อควรระวัง บางคนอาจแพ้ทองพันชั่งได้ คือ ทาแล้วมีเม็ดตุ่มขึ้น ต่อมาแตกมีน้ำเหลืองซึมออกมา ผิวหนังเปื่อยมากขึ้น ทำให้โรคกำเริบลุกลาม ควรหยุดทาทันที (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530)

ตำรายาแผนไทย (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

ในตำรายาแผนไทยได้บ่งสรรพคุณของทองพันชั่งในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ โดยแบ่งเป็นแต่ละส่วนของพืชต่อไปนี้ คือ

ราก รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน รักษาโรคมะเร็ง ดับพิษไข้ แก้พิษงู พยาธิวงแหวนตามผิวหนัง

ทั้งต้น รักษาโรคผิวหนัง กลากเกลื้อน แก้น้ำเหลืองเสีย ผื่นคัน รักษามะเร็ง ขับพยาธิตามผิวหนังหรือบาดแผล รักษาอาการไส้เลื่อน ปัสสาวะผิดปกติ

ต้น บำรุงร่างกาย รักษาอาการผมร่วง

ใบ ดับพิษไข้ รักษาโรคผิวหนัง ผื่นคัน กลากเกลื้อน โรคไขข้ออักเสบ โรคมะเร็ง โรคความดันโลหิตสูง โรคพยาธิวงแหวนตามผิวหนัง อาการผมร่วง ปวดฝี แก้พิษ ถอนพิษ แก้อักเสบ และบำรุงร่างกาย

การใช้ในประเทศไต้หวัน

ในประเทศไต้หวันใช้ทองพันชั่งเป็นยาพื้นบ้านในการบำบัดรักษาโรคเกาหวาน โรคผิวหนัง ความดันโลหิตสูง และตับอักเสบ (Wu, *et al.*, 1995)

3. สารเคมีที่พบในทองพันชั่ง

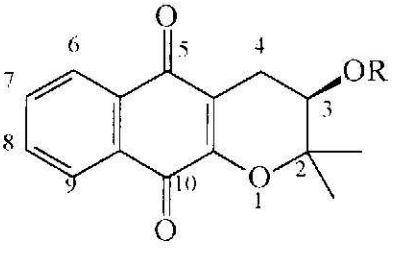
สารประกอบที่พบในส่วนต่างๆ ของทองพันชั่งมีด้วยกันหลายกลุ่มได้แก่

3.1 Naphthoquinones

ปัจจุบันพบสารในกลุ่มนี้ 17 ชนิด ได้แก่

rhinacanthin-A, -B, -C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N, -O, -P, -Q (Wu. *et al.*, 1988; Wu, *et al.*, 1998a, b; Sendl, *et al.*, 1996), rhinacanthone (3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,10-dione) (Kuwahara, *et al.*, 1995; Kodama, *et al.*, 1993)

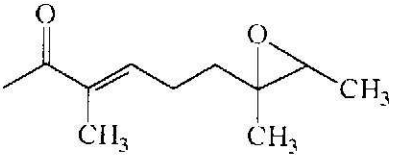
rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P มีโครงสร้างหลักเหมือนกัน ต่างกันที่หมู่แทนที่ (R) (รูปที่ 2)



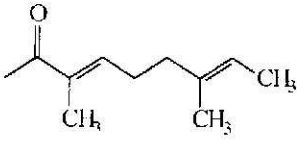
Rhinacanthin

A:R= H

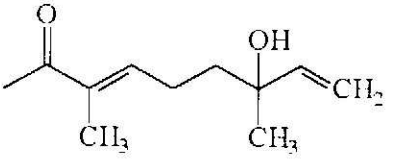
O : R=



B:R=

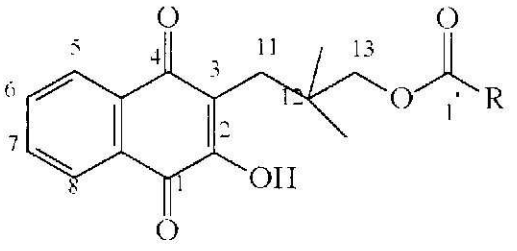


P : R=

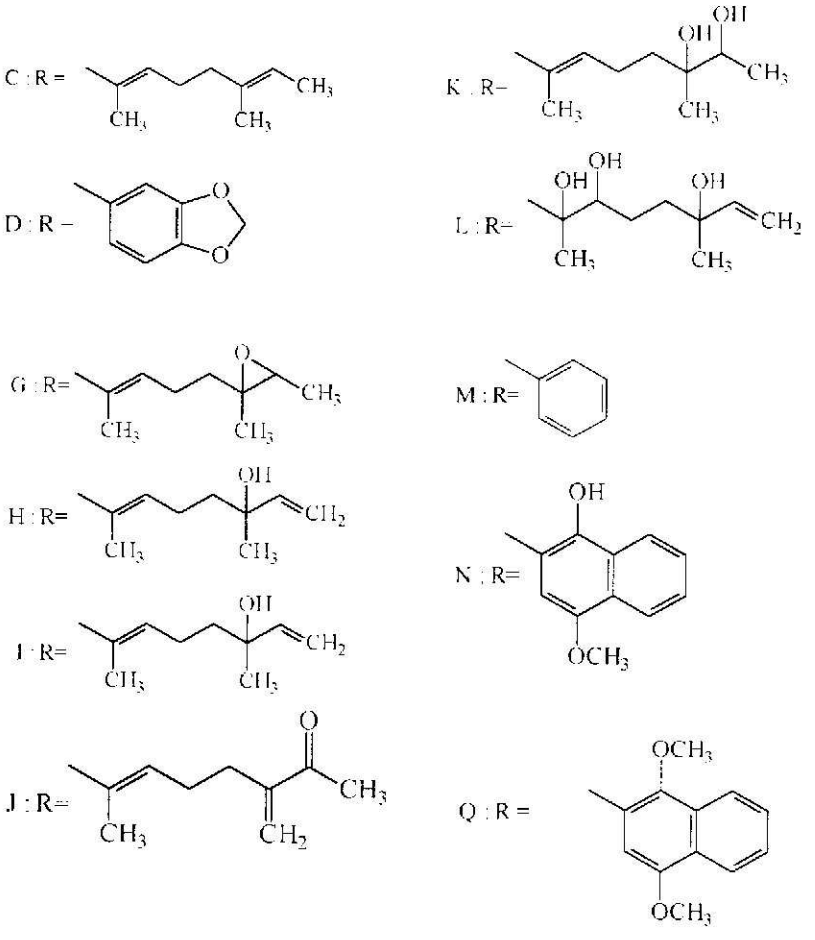


รูปที่ 2 โครงสร้างของ rhinacanthin-A, -B, -O, และ -P

rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q มีโครงสร้างหลักเหมือนกันต่างกันที่หมู่ R (รูปที่ 3)

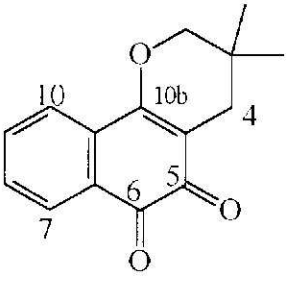


rhinacanthin



รูปที่ 3 โครงสร้างของ rhinacanthin-C, -D, -G, -H, -I, -J, -K, -L, -M, -N และ -Q

rhinacanthone (3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphtho-{2,3-B}pyran-5,6-dione) เป็น *O*-quinone analogous ของ β-lapachone (Kuwahara, *et al.*, 1995) (รูปที่ 4)

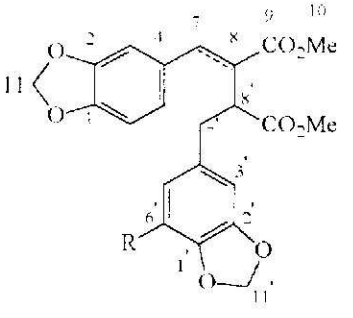


รูปที่ 4 โครงสร้างของ rhinacanthone

3.2 Lignan

พบสารในกลุ่มนี้ 2 ชนิด ได้แก่

rhinacanthin-E และ -F (Kernan, *et al.*, 1997) โดย rhinacanthin-F เป็น dihydro derivative ของ rhinacanthin-E (รูปที่ 5)

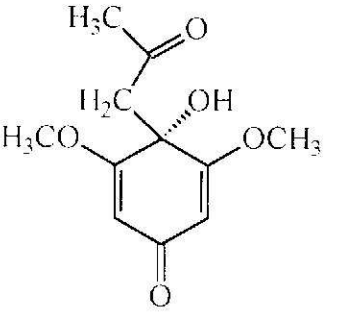


rhinacanthin-E : R = OCH_3 rhinacanthin-F : R = OCH_3

รูปที่ 5 โครงสร้างของ rhinacanthin-E และ -F

3.3 Quinol

ได้แก่ 4-acetonyl-3,5-dimethoxy-*p*-quinol (Wu. *et al*., 1995) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครงสร้างของ 4-acetonyl-3,5-dimethoxy-*p*-quinol

3.4 Anthraquinone

ได้แก่ 2-methylanthraquinone พบในใบและต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al*., 1995)

3.5 Benzenoid

พบสารกลุ่มนี้ 6 ชนิด ได้แก่

p-hydroxy-benzaldehyde	พบในราก
methyl-vanillate	พบในราก
syringaldehyde	พบในราก
2-methoxy-4-propionyl-phenol	พบในใบและลำต้น
สารผสมระหว่าง syringic acid กับ vanillic acid	พบในใบและลำต้น

(Wu, *et al*., 1995)

3.6 Triterpenoid

พบสารในกลุ่มนี้ 3 ชนิด ได้แก่

β-amyrin	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง
glutinol	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง
lupeol	พบในราก, ใบและลำต้นทองพันชั่ง

(Wu, *et al*., 1995)

3.7 Coumarin

พบสารในกลุ่มนี้ 2 ชนิด ได้แก่

(+)-praeruptorin	พบในรากทองพันชั่ง
umbelliferone	พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง

(Wu, *et al*., 1995)

3.8 Flavonoid

พบสารกลุ่มนี้ 2 ชนิด ในรากทองพันชั่ง ได้แก่

wogonin

oroxylin

(Wu, *et al.*, 1998a)

3.9 Steroid

พบสารกลุ่มนี้ 4 ชนิด ในใบและต้นทองพันชั่ง ได้แก่

สารผสมระหว่าง stigmasteral กับ sitosterol

สารผสมระหว่าง stigmast-4-en-3-one กับ stigmasta-4-22-dien-3-one

สารผสมระหว่าง stigmast-22-en-3-one กับ stigmastan-3-one

สารผสมระหว่าง 6-β-hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one กับ 6 β-hydroxystigmast-4-en-3-one

(Wu, *et al.*, 1995)

3.10 Glycoside

พบสารกลุ่มนี้ 4 ชนิด ในใบและลำต้นทองพันชั่ง ได้แก่

สารผสมระหว่าง stigmasterol-β-D-glucopyranoside กับ stigmasterol-β-D-glucopyranoside,

3,4-dimethoxyphenol-β-D-glucopyranoside,

3,4,5-trimethoxyphenol-β-D-glucopyranoside

(Wu, *et al.*, 1995)

3.11 Carbohydrate

ได้แก่ methyl-α-D-galactopyranoside พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

3.12 Amide

ได้แก่ allantoin พบในรากทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1998a)

3.13 Chlorophyll

ได้แก่ methyl pheophorbide-A พบในใบและลำต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

3.14 Rutin

ได้แก่ quercetin-3-rutinoside พบในดอกของทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1995)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติต่างๆ ของสารควิโนนที่พบในทองพันชั่ง

สาร	สูตรโมเลกุล	MW	ลักษณะสาร	mp (°C)	ส่วนที่พบ
Rhinacanthin-A	$C_{15}H_{14}O_4$	-	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	186.5-187	ราก
Rhinacanthin-B	$C_{25}H_{28}O_5$	408.1960	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง	78.8	ราก
Rhinacanthin-C	$C_{25}H_{30}O_5$	410.2903	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก, ทั้งต้น
Rhinacanthin-D	$C_{23}H_{20}O_7$	408.1209	ผงสีเหลือง	-	ราก, ทั้งต้น
Rhinacanthin-E	$C_{23}H_{22}O_{11}$	442.1264	ผง	-	ทั้งต้น
Rhinacanthin-F	$C_{23}H_{24}O_9$	444.1420	ผง	-	ทั้งต้น
Rhinacanthin-G	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-H	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	-	ราก
Rhinacanthin-I	$C_{25}H_{30}O_6$	426.2044	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	-	ราก
Rhinacanthin-J	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีส้ม	-	ราก
Rhinacanthin-K	$C_{32}H_{28}O_7$	444.2148	น้ำมันสีแดง	-	ราก
Rhinacanthin-L	$C_{25}H_{12}O_8$	-	น้ำมันสีแดง	-	ราก
Rhinacanthin-M	$C_{22}H_{20}O_5$	364.1311	น้ำมันสีส้ม	-	ราก
Rhinacanthin-N	$C_{37}H_{24}O_7$	460.1522	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	123-124	ราก
Rhinacanthin-O	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-P	$C_{25}H_{28}O_6$	424.1886	น้ำมันสีเหลือง	-	ราก
Rhinacanthin-Q	$C_{28}H_{26}O_7$	474.1684	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	116-117	ราก
Rhinacanthone	$C_{15}H_{14}O_3$	242.0942	ผลึกรูปเข็มสีส้ม	151.5-152	ราก
p-quinone	$C_{15}H_{14}O_3$	242.0942	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองสด	150.5-152	ราก
Quinol	$C_{11}H_{14}O_5$	226.0846	ผลึกรูปเข็ม	153-155	ใบ, ต้น

4. ฤทธิ์ทางชีวภาพของทองพันชั่ง

4.1 ฤทธิ์ลดความดันโลหิต (Hypotensive activity)

จากรายงานการศึกษาโดยใช้สารสกัดใบทองพันชั่งด้วยน้ำ ทำการทดสอบในหนูขาวไม่จำกัดเพศ น้ำหนักตัวประมาณ 200-250 g โดยให้สารสกัดใบทองพันชั่งทาง external jugular vein ในขนาดต่างๆ กัน คือ 25, 50, 100, 200 และ 400 mg/kg พบว่าฤทธิ์ลดความดันโลหิตจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดของสารสกัด ซึ่งจะลดความดันโลหิตมากที่สุดเมื่อใช้สารสกัดในขนาด 400 mg/kg และใช้เวลานานกว่า 60 นาที จึงจะทำให้ความดันโลหิตกลับคืนสู่ระดับปกติก่อนให้สารสกัด (ตารางที่ 2) (วรรณดี แต้โสตถิกุล, 2528)

ตารางที่ 2 ผลของสารสกัดใบทองพันชั่งในการลดความดันโลหิตในหนูขาว

ขนาด (มก./กก. น้ำหนักตัว)	จำนวนหนูขาว (ตัว)	ความดันโลหิต* (MABP)			ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ (นาที)
		ระยะ control (มม. ปรอท)	หลังจากให้สารสกัด (มม. ปรอท)	% ความดันโลหิตลด	
25	4	145.00 ± 3.33	101.50 ± 8.13	30.04 ±4.05***	~5
50	4	142.50 ±0.84	84.33 ± 5.18	40.84 ± 3.39***	~20
100	4	137.50 ± 4.12	75.00 ± 2.36	45.30 ± 2.50**	~25
200	4	131.67 ± 3.63	64.67 ± 4.62	51.50 ± 2.24**	~35
400	4	152.22 ±8.18	21.11 ± 1.74	86.07 ± 2.26**	>60

* ค่าที่แสดงเป็นค่า mean±S.E.M MABP = mean arterial blood presure **P < 0.001 ***P < 0.005

4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity)

มีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของทองพันชั่ง ต่อเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* (สาเหตุของโรคกลาก), *Epidermophyton floccosum*, *Candida albicans* (สาเหตุของการตกขาว), *Cryptococcus neoformans* และ *Saccharomyces* sp. ด้วยวิธี paper disc และวัดความกว้างของ clear zone เทียบกับ standard คือ griseofulvin และ nystatin โดยใช้สารสกัดจากกิ่งและใบทองพันชั่งซึ่งสกัดด้วยน้ำ แอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์น้อยมาก ส่วนสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดีพอสมควร (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530)

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของ rhinacanthone (*O*-quinone) ในการยับยั้ง spore germination ของ *Pyricularia oryzae* (เป็นตัวก่อให้เกิดโรคในข้าว) พบว่า rhinacanthone 10 ppm สามารถยับยั้งได้ 100 % ในขณะที่ *p*-quinone ไม่แสดงผลแม้จะใช้ในขนาด 1,000 ppm ก็ตาม (Kuwaharam, *et al.*, 1995)

มีรายงานว่าสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate และสาร rhinacanthin-C มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Trichophyton rubrum*, *T. mentagophyte* และ *Microsporum gypseum* โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Trichophyton* เท่ากับ 125 และ 82.8 μg/ml และต่อเชื้อ *Microsporum* 250 และ 165.6 μg/ml ตามลำดับ (Kongchai and Panichayupakaranant, 2002)

4.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Antiviral activity)

ปี 1996 Sendl และคณะ ได้ทำการศึกษาการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin -D (*in vitro*) ทำการทดสอบต่อเชื้อ cytomegalovirus ทั้งของหนู (mCMV) และมนุษย์ (hCMV), influenza virus type A (Flu-A), herpes simplex virus type 2

(HSV-2) และ respiratory syncytial virus (RSV) เทียบกับยาแผนปัจจุบัน คือ gancyclovir, amantadine, acyclovir, และ ribavirin พบว่า rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D แสดงฤทธิ์ในการต้าน mCMV และ hCMV ได้ดีเมื่อเทียบกับยาแผนปัจจุบัน แต่ไม่แสดงผลในการต้านเชื้อ Flu-A, HSV-2, และ RSV (ตารางที่ 3) (Sendl, *et al.*, 1996)

ตารางที่ 3 ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D

Compound	virus	Assay	EC_{50}(μg/mL)[a]	IC_{50}(μg/mL)[b]	SI[c]	n
Rhinacanthin-C	mCMV[d]	CPE[e]	1.1 ±0.2	8.0 ± 3.0	7.3	4
	mCMV	Plaque[f]	0.57	2.6	4.6	1
	mCMV[g]	Plaque	0.02	0.56	28	1
	Flu-A[h]	HAI[i]	none	0.2 ± 0.2	NOSI	2
	HSV-2[j]	CPE	none	0.03	NOSI	1
	RSV[k]	CPE	none	0.3	NOSI	1
Rhinacanthin-D	mCMV	CPE	9.5 ± 1.6	49 ±4.8	5.2	4
	mCMV	Plaque	9.5	35	4	1
	hCMV	Plaque	0.22	0.75	3	1
	FluA	HAI	none	0.78	NOSI	2
	HSV-2	CPE	none	< 0.8	NOSI	1
Gancyclovir	mCMV	CPE	5.0 ±0.4	> 100	>20	20
	mCMV	Plaque	13.8 ±5.2	> 100	>7.2	2
	hCMV	plaque	3.4 ±1.1	> 1000	>290	4
Amantadine	Flu-A	HAI	0.054 ± 0.004	56 ±10	1040	12
Acyclovir	HSV-2	CPE	2.3 ± 0.3	> 10	> 4.3	14
Ribavirin	RSV	CPE	1.8 ±0.2	35 ± 4.6	19	23

[a] Antiviral activity. [b] Cytotoxicity. [c] Selective Index = IC/EC. [d] Murine CMV. [e] Cytopathic effect.
[f] Plaque- neutralization. [g] Human CMV . [h] Influenza virus type A. [i] Hemadsorption inhibition.
[j] Herpes simplex virus type 2. [k] Respiratory syncytial virus.

และจากการศึกษาของ Kernan และคณะในปี 1997 ถึงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F โดยทำการทดสอบแบบ *in vitro* กับเชื้อ Flu-A, และ HSV-2 พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ Flu-A แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ HSV-2 (ตารางที่ 4) (Kernan, *et al.*, 1997)

จากการศึกษานี้เองทำให้ทราบว่า rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F มีผลยับยั้งกระบวนการ influenza biosynthetic จึงมีฤทธิ์ต้านเฉพาะ Flu-A ซึ่งต่างจาก lignan ตัว

อื่นๆ และ podophyllotoxin ที่มีผลยับยั้ง microtubule formation หรือ nucleic acid metabolism จึงป้องกันการ replication ของไวรัสได้ ทำให้สารดังกล่าวต้านเชื้อไวรัสได้หลายชนิด

ตารางที่ 4 ผลการต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin-E และ rhinacanthin-F

Compound	virus	EC_{50}[a]	IC_{50}[b]	SI[c]	N[d]
Rhinacanthin-E	Flu-A[e]	1.7	44	26	1
	Flu-A[f]	7.4 ±2.0	102 ± 64	15	2
	HSV-2[g]	none	17		1
Rhinacanthin-F	Flu_A[e]	< 0.94	17	>18	1
	Flu-A[f]	3.1	21	6.8	1
	HSV-2[g]	none	4.4		1
Amantadine[h]	Flu-A[e]	0.054 ± 0.004	56 ±10	1000	12
Ribavirin[h]	Flu-A[f]	3.7 ±1.2	>200	>59	4
Acyclovir[h]	HSV-2[g]	1.5 ± 0.2	>100	>60	2

[a] Antiviral activity , μg/mL , 50% effective concentration. [b] Cytotoxicity. μg/mL. 50% inhibitory concentration. [c] Selective index = IC_{50} / EC_{50}. [d] Number of assays. [e] Influenza virus type A. hemadsorption inhibition assay . [f] Influenza virus type A, cytopathic effect assay. [g] Herpes simplex virus type 2. CPE assay. [h] Antiviral reference controls.

4.4 Cytotoxicity

มีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารประกอบที่พบในทองพันชั่ง พบว่าสารกลุ่ม naphthoquinone หลายชนิดแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์

ปี 1988 Wu และคณะ ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของ rhinacanthin-A และ B โดยใช้ KB tissue culture assay พบว่า rhinacanthin-B มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.0 μg/ml ในขณะที่ rhinacanthin-A ไม่มีฤทธิ์ (Wu, *et al.*, 1988)

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid (wogonin) โดยใช้เซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29 และ HL-60 พบว่าสาร naphthoquinone ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29, และ HL-60 (ตารางที่ 5) (Wu, *et al.*, 1998b)

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid

Compound	Cell lines ED_{50} (μg/ml)				
	KB	P-388	A-549	HT-29	HL-60
Rhinacanthin-A	6.75	0.72	3.06	2.17	1.16
Rhinacanthin-B	8.01	0.35	6.50	3.01	2.57
Rhinacanthin-C	6.26	0.26	0.35	0.68	0.68
Rhinacanthin-D	25.0	3.79	8.26	8.89	11.8
Rhinacanthin-G	4.45	0.14	0.75	0.57	1.14
Rhinacanthin-H	23.8	6.43	9.97	11.5	8.87
Rhinacanthin-I	13.2	4.88	7.18	6.30	5.12
Rhinacanthin-K	17.3	3.17	16.4	7.75	6.81
Rhinacanthin-M	19.2	3.95	8.90	10.1	19.9
Rhinacanthin-N	4.80	0.71	1.97	2.67	1.38
Rhinacanthin-Q	>50	0.61	3.61	7.60	8.90
Wogonin	4.46	1.70	4.14	3.35	4.66

4.5 ฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด (Antiplatelet aggregation)

จากการศึกษาของ Wu และคณะในปี 1998 ถึงฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือดของสารกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid ภายใน *in vitro* โดยใช้เลือดกระต่ายที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกร็ดเลือด ด้วยสาร 4 ชนิดคือ thrombin (Thr), arachidonic acid (AA), collagen (Col) และ platelet activation factor (PAF) พบว่า rhinacanthin-A, -B, -C และ wogonin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย Collagen (72-100 %) และพบว่ามีเพียง rhinacanthin-B ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย PAF แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดโดยการเหนี่ยวนำของ arachidonic acid ได้น้อยมาก ในขณะที่สารตัวอื่นมีฤทธิ์ค่อนข้างดี และจากการทดลองไม่มีสารตัวใดที่สารมารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดย thrombin ได้เลย (ตารางที่ 6) (Wu, *et al.*, 1998b)

ตารางที่ 6 ผลของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid ที่พบในทองพันชั่ง ต่อการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดที่ถูกเหนี่ยวนำโดยวิธีการต่างๆ

Compound (μg/ml)	Induced inhibition (%)			
	Thr (0.1 U/ml)	AA (100 μM)	Col (10 μg/ml)	PAF (2 μg/ml)
Rhinacanthin-A (100)	2.30 ± 2.2	100 ± 1.1	100 ± 0.5**	13.1 ± 3.3
(50)		12.5 ±2.9	100 ±0.5**	
(20)		2.80 ± 2.8	29.0 ±2.4**	
(10)			2.30 ±1.6	
Rhinacanthin-B (100)	0.88 ± 1.6	7.45 ± 5.6**	100 ±0.5**	63.1 ±8.5
(50)		22.7 ±4.7#	87.8 ±4.8**	
(20)		0.24 ± 1.9	0.92 ±1.4**	
Rhinacanthin-C (100)	1.75 ±1.2	100 ±1.1	75.2 ±7.3**	8.50 ±2.2*
Rhinacanthin-G (100)	0.22 ±1.4	42.6 ± 8.9*	13.8 ±2.6#	10.7 ±2.1#
Rhinacanthin-H (100)	0.11 ± 1.3	54.8 ±4.4**	31.0 ± 3.9**	11.4 ±2.1#
Rhinacanthin-I (100)	0.66 ±1.5	54.9 ±8.2#	10.8 ±1.8#	22.2±3.9#
Rhinacanthin-K (100)	0.44 ±1.7	36.8 ±8.9*	17.0 ±1.6#	12.0 ± 2.2#
Rhinacanthin-M (100)	0.55 ±2.4	100 ±1.1**	5.40 ±1.3*	9.40 ±2.7*
Rhinacanthin-Q (100)	0.02 ±2.3	54.6 ± 11*	20.4 ±3.7#	6.88 ± 2.3
Wogonin (100)	0.66 ±2.3	100 ±1.1	72.5 ± 3.9	8.60 ±4.0

Plateles were preincubated with compound or DMSO (0.5%, control) at 37 C for 3 min; the inducer was added.

Values are mean ± s.e.m. (n = 3-4). *P < 0.05 P <0.01 **P < 0.001 were compared with the respective control.

4.6 ฤทธิ์ในการดึงดูดแมลง (Insect sex attractant and signalling)

มีการศึกษาฤทธิ์ในการดึงดูดแมลงของสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยอีเทอร์ พบว่าให้ผลต่อแมลง Mediterranean fruit fly ตัวผู้ แต่ให้ผลไม่แน่นอนใน *Aspiculurus tetraptera* melon fly ทั้งสองเพศ และให้ผลไม่แน่นอนในแมลงวันผลไม้ Oriantal fruit fly (*Dacusc dorsalis*) ทั้งสองเพศเช่นกัน

4.7 ฤทธิ์ในการเป็น juvenile hormone

มีการศึกษาฤทธิ์ในการเป็น juvenile hormone (ฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อน) ของสารสกัดรากทองพันชั่งด้วยอีเทอร์ ในขนาด 500.00 μg/สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ทำให้ตัวอ่อนของตัวมวน (*Oncopeltus fasciatus*) ไม่เจริญเติบโต แต่เมื่อใช้ในขนาด 250.0 μg/สัตว์ทดลอง จะไม่ได้ผล

(นันทวัน บุณยะประภัศร. 2530)

5. ความเป็นพิษของทองพันชั่ง

มีการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ของทองพันชั่ง โดยป้อนสารสกัดทองพันชั่ง (50% EtOH) ให้หนูถีบจักร และการฉีดสารสกัดเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 10 g/kg (เทียบเป็น 3333 เท่าของขนาดที่ใช้ในตำรายา) พบว่าไม่แสดงอาการเป็นพิษในหนูถีบจักร (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530; 2541)

ในเวียดนามทำการศึกษาโดยให้หนูกินใบทองพันชั่งในขนาด 0.5-1 g/kg น้ำหนักตัว (เทียบในมนุษย์จะเท่ากับการได้รับทองพันชั่ง 25 - 50 g หรือ 1 กำมือ) ไม่พบความเป็นพิษแต่อย่างใด (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530)

บทที่ 2
อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างพืช

ต้นทองพันชั่ง เก็บจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในช่วงเดือนตุลาคม เลือกเฉพาะส่วนของใบมาใช้ในการศึกษา

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดสาร

- vacuum chromatography
- Sephadex LH-20 column chromatography
- Erlenmeyer flask ขนาด 50 และ 125 ml
- rotary evaporator
- TLC Plate (Aluminium sheet silica gel GF_{254})
- TLC tank
- ชุดอุปกรณ์ในการฉีดพ่น 20% NaOH in methanol
- ชุดอุปกรณ์การ reflux

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

- volumetric flask
- pipette
- micropipette
- HPLC with diode array detection (TOSOH corporation, PD8020)
- LC-MS (LCQ MS)

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

- microwell plate
- กล้องจุลทรรศน์
- haemocytometer
- CO_2 incubator
- UV-Vis spectophotometer
- Incubator
- loop
- Shaker

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีในการสกัดและตรวจวิเคราะห์สาร naphthoquinone

- ethyl acetate
- chloroform
- methanol
- silica gel no. 9385
- Sephadex LH-20
- acetic acid

3.2 สารเคมีในการทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

- dimethyl sulfoxide
- artificial sea water (น้ำทะเลเทียม)
- formalin
- อาหารเพาะเลี้ยงชนิด EMEM (with glutamine)
- heat-inactivated newborn calf serum
- penicillin G sodium
- streptomycin sulfate
- amphotericin B (Fungizone®)
- phosphate buffered saline (pH 7.4)
- 0.1% trypsin-DETA
- trichloroacetic acid
- slphorhodamine B
- อาหารเลี้ยงเชื้อ : Tryptic soy agar
  Saboraud dextrose agar (SDA)
  Saboraud dextrose broth (SDB)
  Mueller Hinton agar
- tetracycline hydrochloride

บทที่ 3

การทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดใบทองพันชั่งเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์

1. อบใบทองพันชั่งที่อุณหภูมิ 50 - 60 °C เป็นเวลา 48 ชม.

2. บดใบทองพันชั่งที่อบแห้งแล้วจนละเอียด

3. เติม ethyl acetate พอท่วม ทำการสกัดโดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชม.

4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้เป็นสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate

5. นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วย ethyl acetate มาสกัดต่อด้วย methanol โดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัดในข้อ 4 จะได้เป็นสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol

2. การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ใช้วิธีการ brine shrimp lethality assay (Solis, *et al*., 1993) โดยมีวิธีการดังนี้

1. เพราะไข่ไรน้ำเค็มในน้ำทะเลเทียม โดยใช้ไรน้ำเค็ม 0.3 g ในน้ำทะเลเทียม 200 ml ไรน้ำที่ใช้ทดสอบควรมีอายุประมาณ 48 ชั่วโมง
2. เตรียมตัวอย่างสารละลายของสารสกัดที่ใช้ทดสอบให้ละลายอยู่ในน้ำทะเลเทียมที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน อย่างน้อย 3 ความเข้มข้น โดยอาจใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ช่วยในการละลายสารสกัด ความเข้มข้นของ DMSO ไม่ควรเกิน 5 %
3. การทดสอบทำใน microwell plate โดยนับจำนวนไรน้ำเค็มลงใน microwell plate ประมาณ 10 - 15 ตัว/น้ำทะเลเทียม 0.1 ml/หลุม
4. เติมสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 0.1 ml ลงในหลุม (ความเข้มข้นละ 3 หลุม)
5. เลี้ยงไว้ภายใต้แสงโคมไฟ 24 ชั่วโมง
6. นับจำนวนไรน้ำเค็มที่ตายในแต่ละหลุม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ช่วยในการตรวจนับ หลังจากนั้นให้ฆ่าไรน้ำเค็มด้วยสารละลาย 10% formalin ประมาณ 3 – 4 หยด และนับจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด เพื่อคำนวณหา % การตายของไรน้ำเค็ม

3. การสกัดและแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่ง

1. อบใบทองพันชั่งที่อุณหภูมิ 50 - 60 °C เป็นเวลา 48 ชม.

2. บดใบทองพันชั่งที่อบแห้งแล้วจนละเอียด

3. เติม ethyl acetate พอท่วม ทำการสกัดโดยการ reflux เป็นเวลา 1 ชม.

4. กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจนหมด

5. นำสารสกัดมาแยกโดย vacuum chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และ ใช้ chloroform เป็น mobile phase เก็บ fraction ละ 75 ml

5.1. นำสารสกัดที่แยกได้ใน fractions 9 - 12 มาแยกต่อโดย gel filtration chromatography 2 ครั้ง โดยใช้ Sephadex LH-20 เป็น stationary phase และใช้ methanol เป็น mobile phase จะได้สารบริสุทธิ์เป็นของเหลวสีเหลือง (**Rn1**) และผลึกสีแดง (**Rn2**)

5.2 นำสารสกัดที่แยกได้ใน fraction 16 - 19 มาแยกต่อโดย gel filtration chromatography 2 ครั้ง โดยใช้ Sephadex LH-20 เป็น stationary phase และใช้ methanol เป็น mobile phase จะได้สารบริสุทธิ์เป็นผลึกสีเหลือง (**Rn3**)

4. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (human tumour cells)

เซลล์มะเร็งเต้านม สายพันธุ์ MCF-7 และมะเร็งปากมดลูก สายพันธุ์ Hela ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับมาจากสถาบันมะเร็ง กรุงเทพมหานคร นำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงชนิด EMEM (with glutamine) ที่ supplement ด้วย 10% heat-inactivated newborn calf serum, 100 IU/ml penicillin G sodium, 100 IU/ml streptomycin sulfate และ 25 μg/ml amphotericin B (Fungizone®) นำมาเลี้ยงใน CO_2 incubator ที่ 37°C, 5% CO_2 และมีความชื้นประมาณ 95%

1. หาอัตราการเจริญเติบโต (determination of growth profile) ของ MCF-7 เพื่อกำหนดจำนวนเซลล์มะเร็งที่จะใส่ต่อหลุมเพื่อให้เซลล์อยู่ในช่วง exponential growth ตลอดการทดลอง (culture period คือ 7 วัน พบว่าจำนวนที่เหมาะสม (optimal plating density) คือ 2000 cells/well
2. เตรียม cell suspension ของ MCF-7 โดยล้าง cell monolayer ด้วย phosphate buffered saline (pH 7.4) แล้วย่อย monolayer ออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงด้วย 0.1% trypsin-DETA ให้ได้ single cells แขวนลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง คำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการนับ viable cells ด้วย haemocytometer (trypan blue exclusion) ทำ dilution ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ความเข้มข้น $2x10^4$ cells/ml แล้วถ่ายเซลล์ลงเลี้ยงใน 96-well microtiter plate หลุมละ 100 μl (จะได้ 2000 cells/well) เลี้ยงใน CO_2 incubator นาน 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะผิวก้นหลุมเป็น monolayer
3. นำ plate ออกมาเติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบซึ่งเตรียมใน culture medium ให้มีความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น (two-fold serial concentrations) โดยเติมหลุมละ 100 μl ได้ final concentrations เป็น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 μg/ml (ในกรณีที่ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเบื้องต้น เมื่อทำการเจือจางด้วย culture medium แล้วจะมีความเข้มข้นของ

Central Library
Prince of Songkla University

DMSO สูงสุดไม่เกิน 0.5% ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์) ทำซ้ำความเข้มข้นละ 6 หลุม (6 replicates) เลี้ยงใน CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ ดูด culture medium ออก แล้วล้างเซลล์ (monolayer) ด้วย 200 µl แล้วนำไปเลี้ยงใน CO_2 incubator ต่ออีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (รวม culture period เป็นเวลา 7 วัน)

4. นำมาวิเคราะห์หาอัตราการรอด (percent survival) ของเซลล์มะเร็ง (เทียบกับ non-treated control) โดยวิธี Sulphorhodamine B assay (SRB assay) ซึ่งทำได้โดยยึดเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ในแต่ละหลุมด้วยการเติม 40% trichloroacetic acid หลุมละ 100 µl เก็บ plate ไว้ที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมง นำ plate มาล้างด้วยน้ำ 5 ครั้ง แล้วเติม 0.4% Sulphorhodamine B (เตรียมใน 1% acetic acid) ลงไปหลุมละ 50 µl ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำมาล้างด้วย 1% acetic acid 5 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ plate แห้ง
5. เติม 10 mM tris base ลงไปหลุมละ 100 µl และเขย่าบน gyratory shaker ประมาณ 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Visible ด้วย plate reader (Power Wave X : Bio-TEK Instruments, Inc.) ที่ความยาวคลื่น 492 nm ค่า OD ที่วัดได้จะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่ถูก fix ไว้ในแต่ละหลุม โดยกำหนดให้ค่า OD ของ non-treated control มีค่าเป็น 100% survival
6. นำค่า % survival ที่ได้มาคำนวณทางสถิติหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (ED_{50}) จาก dose response curve ซึ่งจะเป็นดัชนีบ่งถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity)

5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารสกัด

เชื้อจุลินทรีย์ใช้ทดสอบ

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*

ใช้วิธี disc diffusion (Lorian, 1986)

1. นำสารสกัด rhinacanthin-C, -D และ -N ที่แยกได้จากใบทองพันชั่งมาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) นำสารละลายที่เตรียมได้หยดลงไปบน blank paper disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm) โดยหยดลงไป disc ละ25 µl วางให้ตัวทำละลายระเหยไป จะได้ปริมาณของสารต่อ disc คือ rhinacanthin-C 170 µg, rhinacanthin-D 60 µg และ rhinacanthin-N 255 µg
2. เตรียมเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, และ *Escherichia coli* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้

normal saline ชะล้างเชื้อจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วปรับความขุ่นด้วย normal saline ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard (จะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^8 ตัว/ml) และทำการเตรียมเชื้อ *Candida albicans* ในทำนองเดียวกัน แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Saboraud dextrose agar (SDA) แทนและบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาปรับความขุ่นด้วย Saboraud dextrose broth (SDB)

3. ใช้สำลีพันปลายไม้ (cotton swab) จุ่มลงในหลอดของเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้แล้ว บิดกับข้างหลอดให้หมาดๆ แล้วป้ายลงบนผิวหน้าของอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) โดยป้ายเป็นแนวให้ทั่วผิวหน้า จากนั้นให้ป้ายซ้ำเหมือนเดิมอีก 2 ครั้ง โดยให้แนวที่ป้ายใหม่ทำมุมกับรอยป้ายเดิม 60 องศา สำหรับ *C. albicans* ใช้ SDA แทน MHA
4. ใช้ปากคีบจับแผ่น disc ของสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 1 วางแนบลงไปบนผิวหน้าของ MHA และ SDA ที่ป้ายเชื้อไว้แล้วโดยวาง disc ให้ห่างเท่าๆ กันจากละ 4-6 disc โดยใช้ disc ของ tetracycline hydrochloride 30 μg/disc เป็น positive control และ ใช้ disc ที่ใส่ DMSO และวางให้ระเหยจนแห้งแล้วเป็น negative control นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ยกเว้น SDA ที่มี *C. albicans* บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่น disc

6. การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ค่าเชื้อ

ใช้วิธี broth dilution (Lorian, 1986)

1. นำสารสกัด rhinacanthin-C, -D และ -N ที่แยกได้จากใบทองพันชั่ง มาละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้ได้ความเข้มข้น 1,024 μg/ml จากนั้นนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับด้วยวิธี 2-fold serial dilution ในหลอดขนาด 13x10 mm โดยใช้ double strength Sabouraud dextrose broth (SDB) ให้มีความเข้มข้น 16384, 8192,....., 2, 1 μg/ml ตามลำดับ และมีปริมาตรหลอดละ 0.5 ml พร้อมกับนำ DMSO มาเจือจางด้วยวิธีเดียวกันเพื่อใช้เปรียบเทียบ
2. เตรียมเชื้อ *Candida albicans* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ SDB ชะล้างเชื้อจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อนำมาวัดค่า transmittance ที่ 530 nm ปรับความขุ่นด้วย SDB ให้ได้ 90%T และเจือจางต่ออีก 1:10 จะได้เชื้อประมาณ 10^5 ตัว/ml นำเชื้อที่เตรียมได้ใส่ลงในหลอดต่างๆ ในข้อ 1 หลอดละ 0.5 ml นำหลอดทั้งหมดกับหลอดที่มีเฉพาะอาหารกับเชื้อ 1 หลอด และหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว 1 หลอด ไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหลอดที่มีเฉพาะอาหารกับเชื้อ 1 หลอด และหลอดที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียว 1 หลอด ไป

เก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความขุ่น หลังจากบ่มเพาะเชื้อตามเวลาที่กำหนด แล้วอ่านค่า MIC จากหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีความขุ่น

3. หาค่า MFC โดยใช้ลูป (loop) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เห็นความขุ่นมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูการเจริญเติบโตของเชื้อ หลอดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อจะเป็นค่า MFC

7. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร rhinacanthin-C, -D และ –N ในใบทองพันชั่ง

1. การทำ calibration curve ของสารมาตรฐาน rhinacanthin-C, -D และ –N
   - ชั่งสารมาตรฐาน rhinacanthin-C, -D และ -N อย่างถูกต้องแม่นยำ อย่างละประมาณ 5 mg ละลายใน methanol ปรับ ปริมาตรจนครบ 10.0 ml
   - ทำ half dilution 4 ครั้ง จะได้สารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น นำไปวิเคราะห์โดย HPLC
2. การเตรียมตัวอย่างสารสกัดผงใบทองพันชั่ง
   - ชั่งผงใบทองพันชั่งอย่างถูกต้องแม่นยำ ประมาณ 100 mg
   - สกัดโดยการ reflux (75°C) ด้วย chloroform 20 ml เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
   - กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง และนำสารสกัดมาระเหยให้แห้ง (*in vacuo*) ปรับปริมาตร จนครบ 10.0 ml ด้วย methanol นำไปวิเคราะห์โดย HPLC
3. สภาวะของ HPLC

Column	: TOSOH. ODS-80Ts (4.6 mm ID x 150 mm)
Mobile Phase	: Methanol : 5 % Aq. Acetic acid (85 : 15), Isocratic
Flow rate	: 1.0 ml/min
Column temperature	: 40°C
Injection volume	: 20 µl
Detection	: 254 nm
Wavelength range	: 250 – 600 nm

4. สภาวะของ LC-MS

Column	: TOSOH. ODS-80Ts (4.6 mm ID x 150 mm)
Mobile Phase	: Methanol : 5 % Aq. Acetic acid (80 : 20). Isocratic
Flow rate	: 1.0 ml/min
Column temperature	: 40°C
Injection volume	: 20 µl

Detection : 254 nm

Wavelength range : 250 – 600 nm

LCQ Finnigan Mat

Tune Mode	: ESI 1 ml flow
Duration (min)	: 30.00
Capillary Temp	: 280.00 °C
APCI Vapourizer Temp	: 450.00 °C
AGC Off Ion Time (ms)	: 5.00
Sheath Gas Flow	: 100.00
Aux Gas Flow	: 20
Source Type	: ESI

Positive polarity

Source Voltage (kV)	: 5.00
Source Current (μA)	: 80.00
Capillary Voltage (V)	: 10.00

Negative polarity

Source Voltage (kV)	: 5.00
Source Current (μA)	: 80.00
Capillary Voltage (V)	: - 10.00

บทที่ 4

ผลการทดลองและสรุปผล

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบทองพันชั่ง

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol และ ethyl acetate โดยวิธี brine shrimp lethality assay พบว่าสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate และสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol มีค่า LD_{50} 15.23 และ 84.93 μg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงว่าสารสกัดสารใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ดีกว่าสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol และน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาสารที่ออกฤทธิ์ดังกล่าว โดยสารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์น่าจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติความมีขั้วน้อย (non-polar compound) เนื่องจากถูกสกัดได้ดีด้วย ethyl acetate

ตารางที่ 7 ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate และสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol เมื่อทดสอบด้วยวิธี brine shrimp lethality assay

สารสกัด	ความเข้มข้น (μg/ml)	จำนวนที่ตาย (ตัว)			จำนวนทั้งหมด (ตัว)			% ที่ตาย (เฉลี่ย)	LD_{50}
		A	B	C	A	B	C		
Ethyl acetate	50	10	10	11	10	10	11	100	15.23*
	25	9	7	8	9	10	10	82.8	
	12.5	4	2	6	10	13	11	35.3	
Methanol	200	15	11	12	16	12	13	90.2	84.93**
	100	4	3	4	12	12	11	31.0	
	25	3	3	3	13	13	13	23.1	
	12.5	2	3	1	15	9	14	17.4	

* G = 0.1642; uper confidence limit = 18.08 μg/ml; lower confidence limit = 12.17 μg/ml

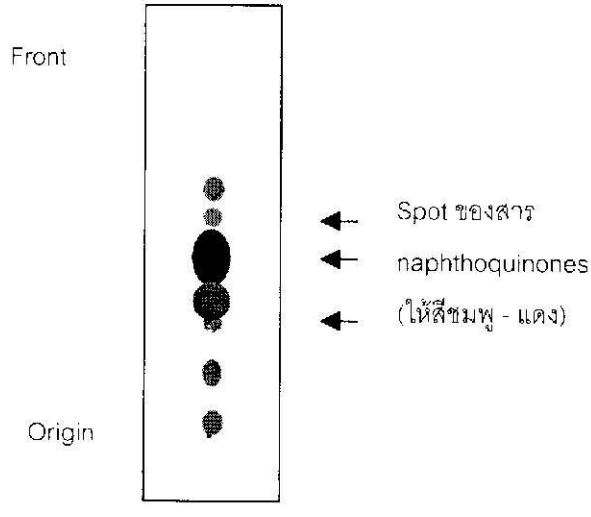
** G = 0.1146; uper confidence limit = 112.09 μg/ml; lower confidence limit = 62.98 μg/ml

2. การแยกสาร naphthoquinone จากใบทองพันชั่ง

จากการสกัดใบทองพันชั่งด้วยตัวทำละลายสองชนิดซึ่งใช้เป็นตัวแทนของตัวทำละลายชนิดมีความเป็นขั้วมากคือ methanol และชนิดมีความเป็นขั้วน้อย คือ ethyl acetate พบว่าเมื่อนำสารสกัดที่ได้จากการสกัดผงใบทองพันชั่งด้วยตัวทำละลายทั้งสองชนิดมาทดสอบด้วยเทคนิค TLC (Thin layer

chromatography) พบว่าสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย methanol มีองค์ประกอบที่เป็นสารประกอบ naphthoquinone เหมือนกับในสารสกัดใบทองพันชั่งด้วยethyl acetate และยังพบว่ามีปริมาณสารประกอบ naphthoquinone น้อยกว่าสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารประกอบ naphthoquinone ที่มีรายงานพบในทองพันชั่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ naphthoquinone ester ซึ่งเป็นสารประกอบที่ค่อนข้างมีขั้วน้อย จึงถูกสกัดด้วย ethyl acetate ได้ดีกว่า methanol และจากข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดทั้งสองดังกล่าวข้างต้น ทำให้ผู้วิจัยสนใจในการแยกสาร quinone เฉพาะในสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate

เมื่อนำสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate มาทดสอบด้วย TLC โดยใช้ Silica gel F254 plate และ chloroform/ethyl acetate (19.5 : 0.5) เป็น mobile phase และใช้ 20% KOH in ethanol เป็น spraying reagent ในการตรวจสอบสาร naphthoquinone (ผล positive จะให้ spot สารมีสีชมพูจนถึงสีแดง) พบว่าสารสกัดใบทองพันชั่งมี spot สาร naphthoquinone 3 spots มีค่า Rf เท่ากับ 0.34, 0.45 และ 0.50 ตามลำดับ โดยมีสารที่มีค่า Rf 0.45 เป็นสารประกอบหลัก (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 TLC chromatogram ของสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate หลังจากฉีดพ่นด้วย 20% KOH in ethanol

เมื่อนำสารสกัดใบทองพันชั่งด้วย ethyl acetate มาแยกด้วย silica gel column chromatography โดยใช้ chloroform เป็นตัวชะสาร (eluent) และนำ fractions ที่ตรวจพบสาร naphthoquinones มาแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 gelfiltration chromatography โดยใช้ methanol เป็นตัวชะสาร สามารถแยกสาร naphthoquinone ได้ 3 ชนิด คือ Rn1, Rn2 และ Rn3

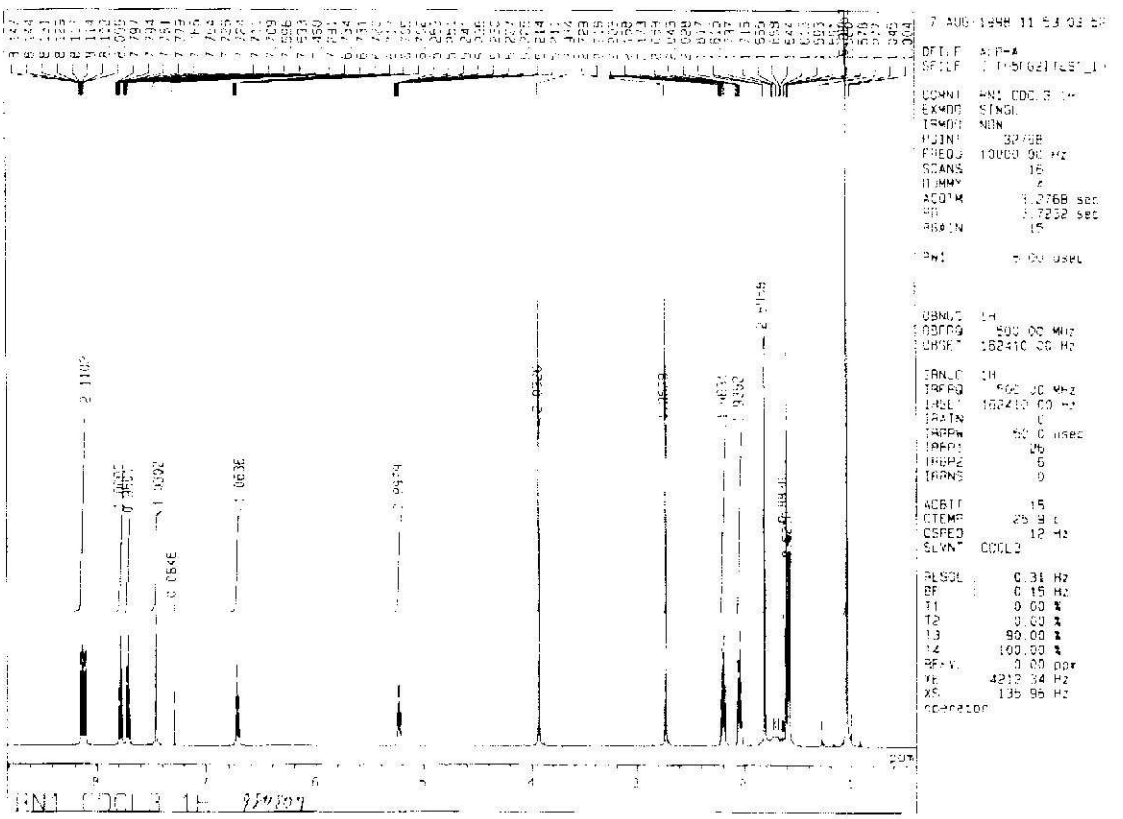
3. การพิสูจน์เอกลักษณ์สาร naphthoquinones

Rn1 : นำสาร Rn1 มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิค NMR ได้ข้อมูลดังนี้

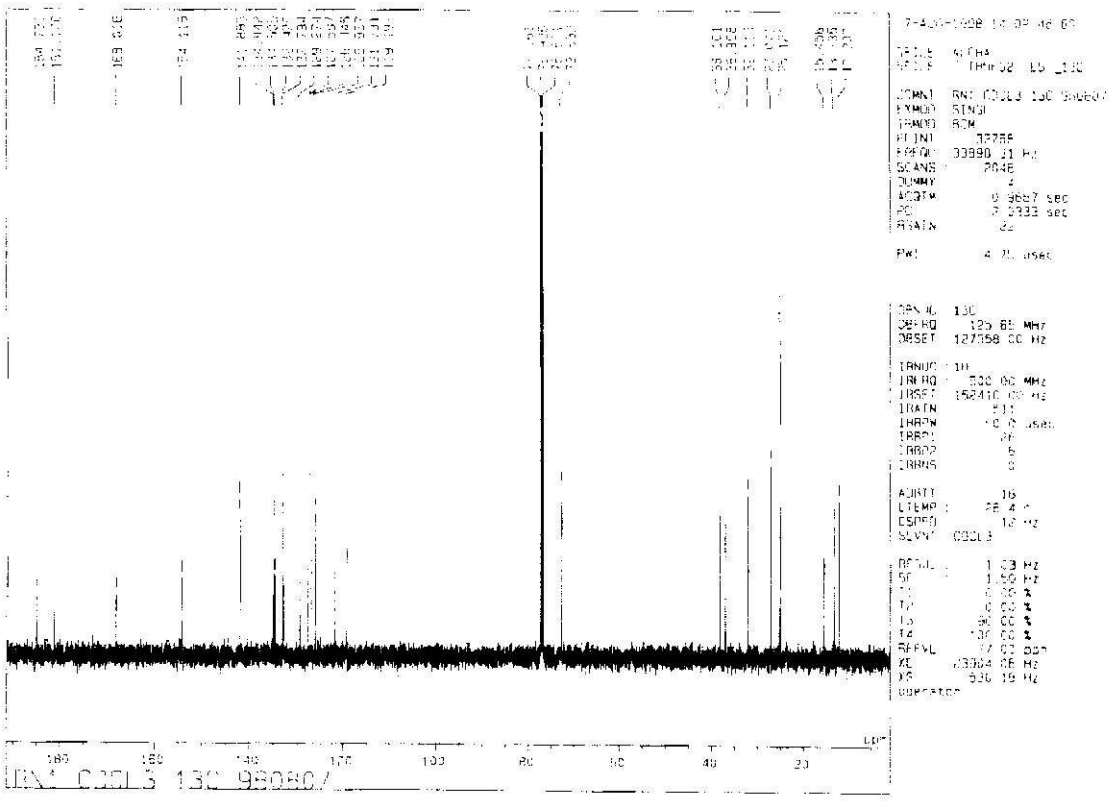
^{1}H NMR : 1.06 (6H), 1.56 (3H), 1.59 (3H), 1.80 (3H), 2.02 (2H), 2.17 (2H), 2.71 (2H), 3.90 (2H), 5.20 (H), 6.70 (H), 7.70 (H), 7.77 (H), 8.09 (H), 8.12 (H) ppm (รูปที่ 8)

^{13}C NMR : 72.9, 37.0, 32.2, 121.8, 184.0, 133.1, 126.1, 134.9, 132.9, 127.1, 129.2, 181.0, 154.3, 25.2 (x 2), 168.5, 127.7, 142.3, 27.2, 38.2, 134.5, 119.3, 13.3, 12.2, 15.5 ppm (รูปที่ 9)

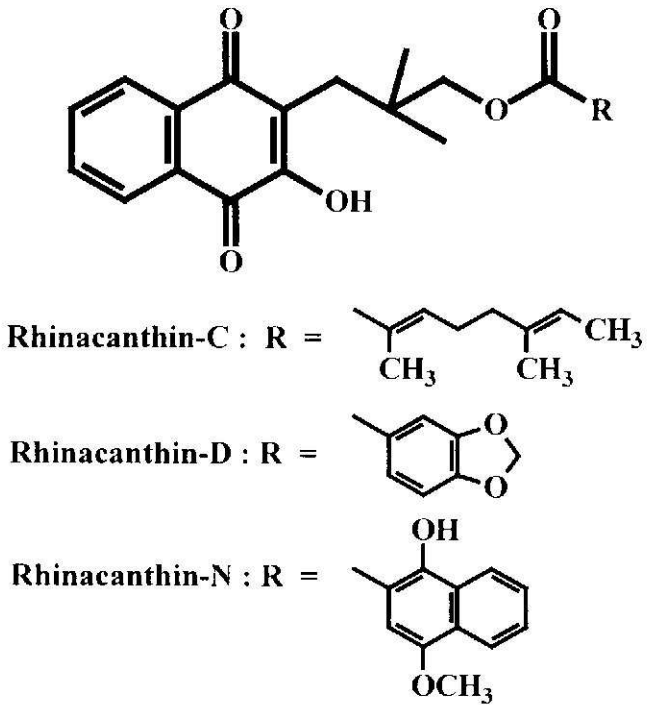
สาร Rn1 ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองเข้ม เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าเป็นสาร rhinacanthin-C (รูปที่ 10) ซึ่งมีรายงานว่าแยกได้จากส่วนของทั้งต้น (whole plant) ของทองพันชั่ง (Sendl, *et al.*, 1996)



รูปที่ 8 ^{1}H NMR Spectrum (500 MHz) ของสาร Rn1



รูปที่ 9 ^{13}C NMR Spectrum (125.65 MIIz) ของสาร Rn1



รูปที่ 10 สูตรโครงสร้างของ rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N

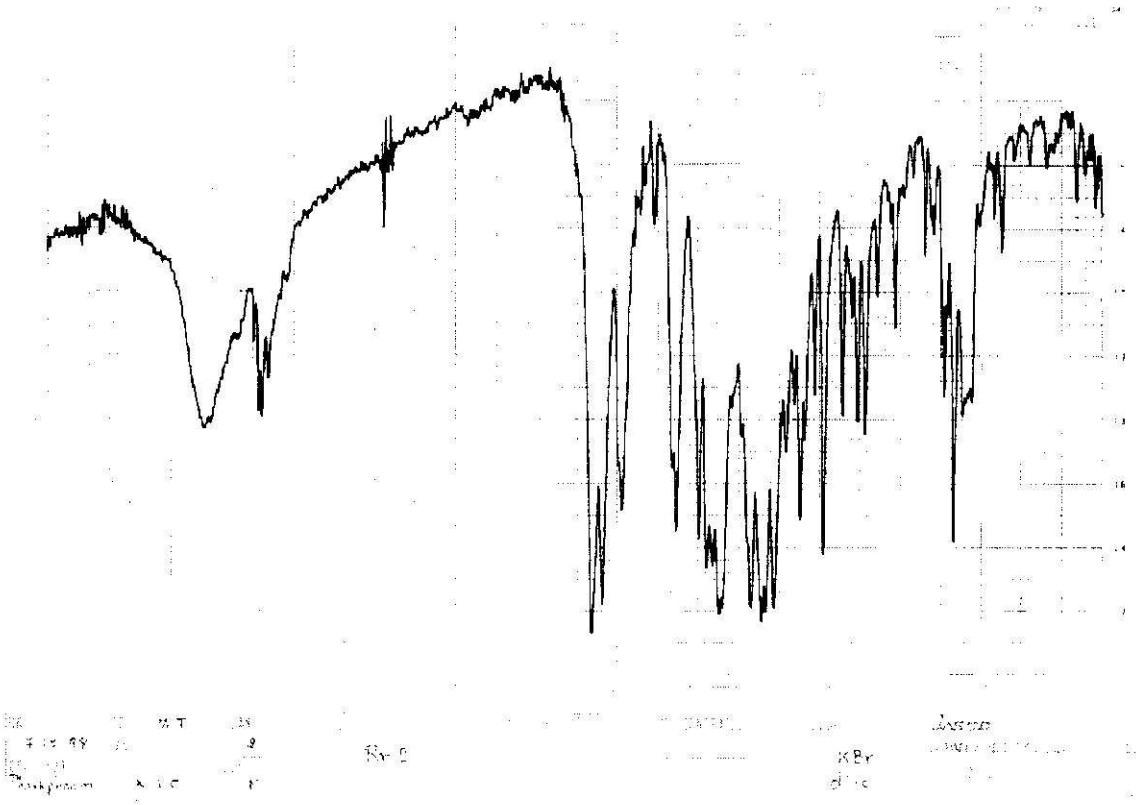
Rn2 : นำสาร Rn2 มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิค IR และ NMR ได้ข้อมูลดังนี้

IR (KBr) cm^{-1}: 3215, 1665, 1635, 1590, 1350, 1240 (รูปที่ 11)

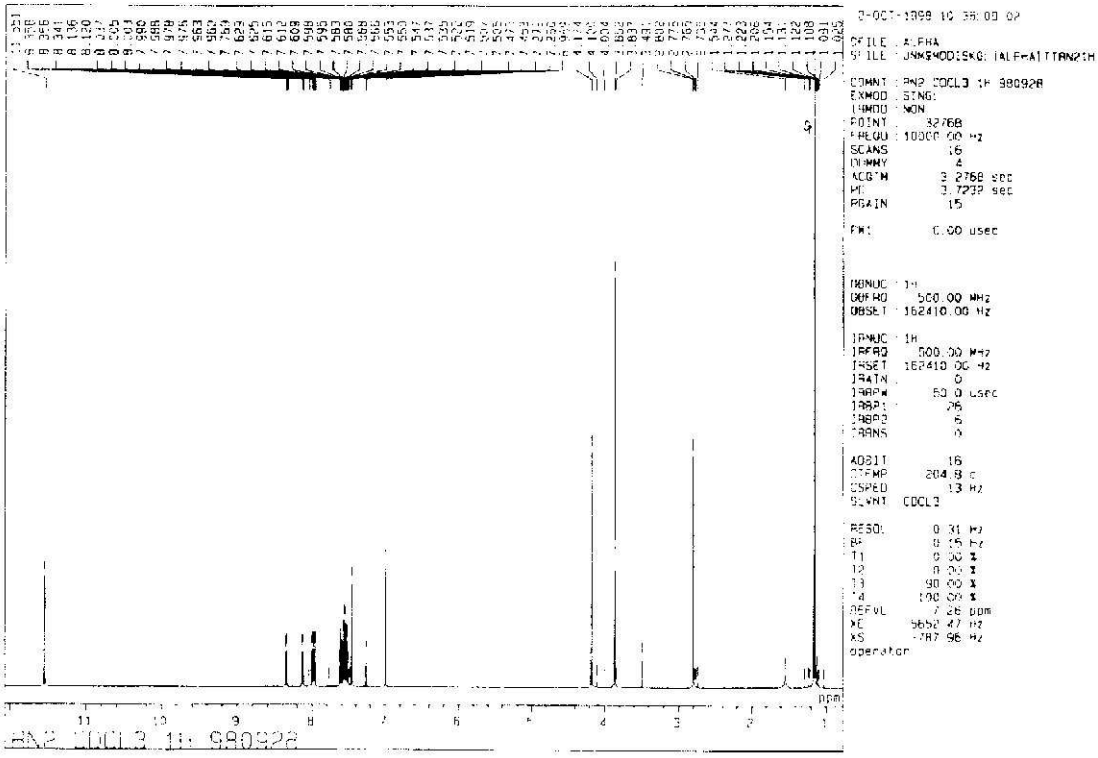
^{1}H NMR : 1.08 (3H), 2.76 (2H), 4.05 (2H), 6.00 (2H), 6.73 (H), 7.41 (OH), 7.41 (H), 7.58 (H),7.66 (H), 7.71 (H), 8.06 (H), 8.05 (H) ppm (รูปที่ 12)

^{13}C NMR : 25.3, 32.2, 37.1, 73.1, 101.7, 107.9, 109.4, 121.7, 124.4, 125.2, 126.0, 127.0, 129.3, 132.8, 133.0, 134.9, 147.6, 151.4, 154.2, 165.8, 181.2, 184.9 ppm (รูปที่ 13)

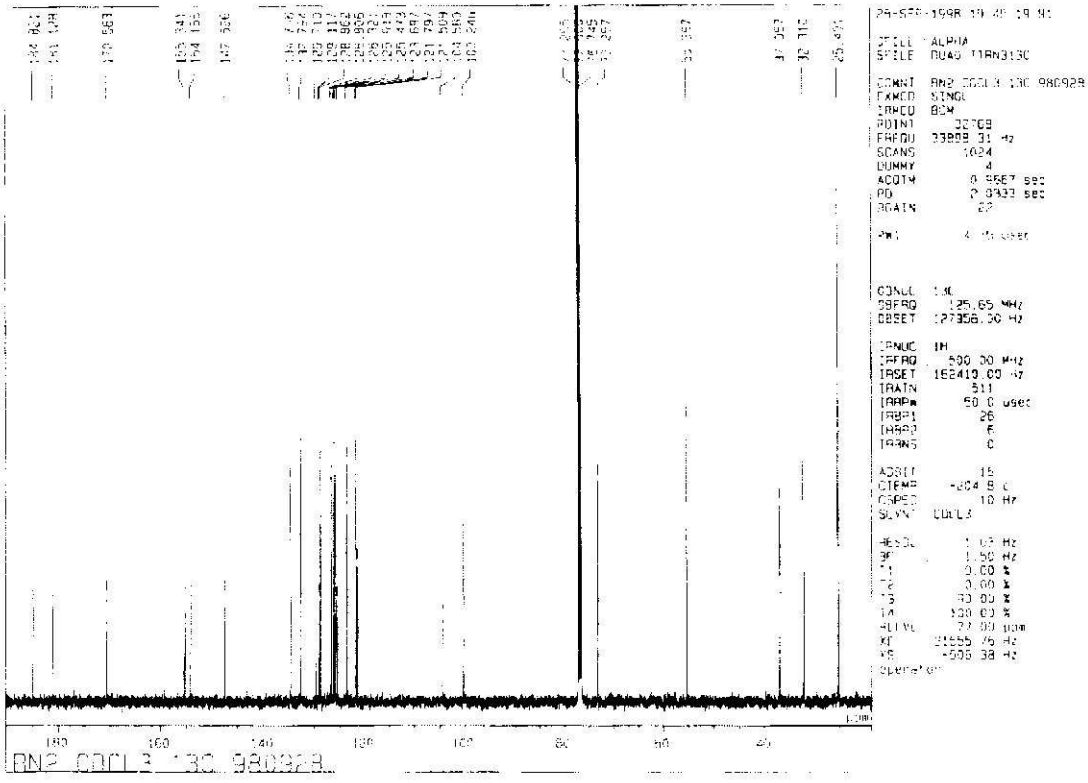
สาร Rn2 ที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีแดง มีค่า melting point เท่ากับ 114 – 115°C เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย IR, ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าเป็นสาร rhinacanthin-N (รูปที่ 10) ซึ่งเคยมีรายงานว่าแยกได้จากส่วนรากของทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1998a)



รูปที่ 11 IR Spectrum ของสาร Rn2



รูปที่ 12 ^{1}H NMR Spectrum (500 MHz) ของสาร Rn2



รูปที่ 13 ^{13}C NMR Spectrum (125.65 MHz) ของสาร Rn2

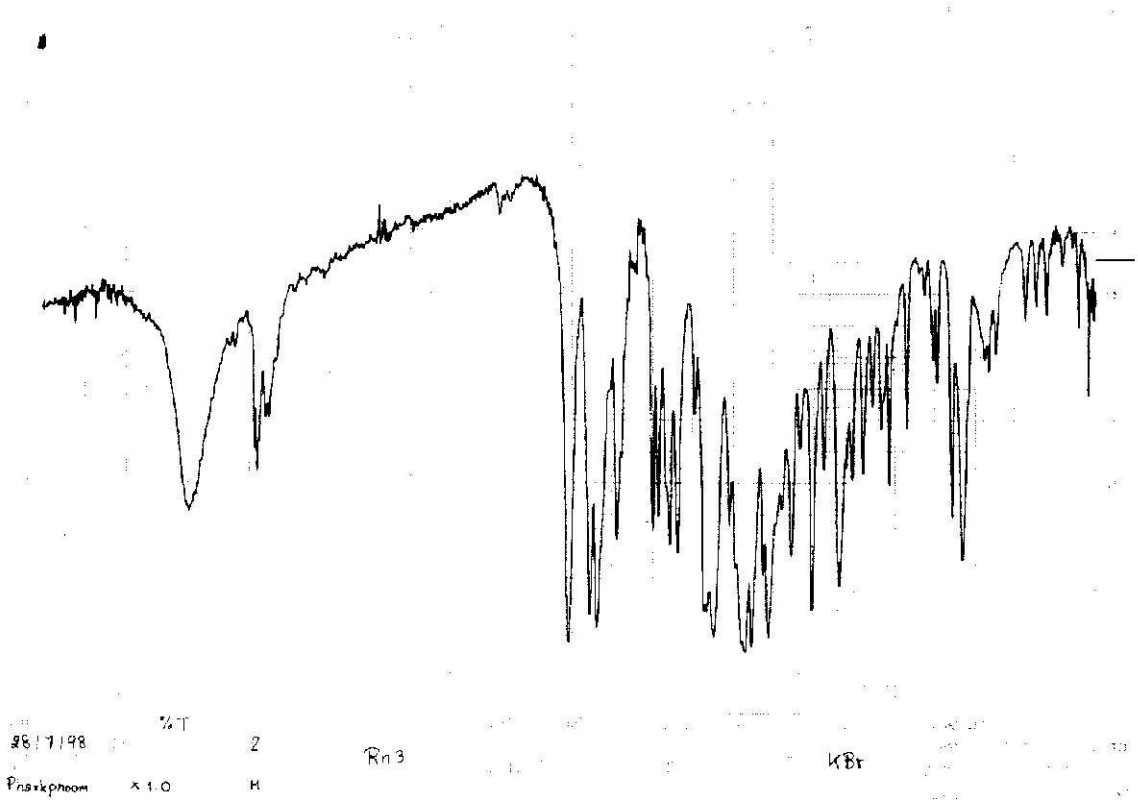
สาร Rn2 ที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีแดง มีค่า melting point เท่ากับ 114 – 115°C เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย IR, ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าเป็นสาร rhinacanthin-N (รูปที่ 10) ซึ่งเคยมีรายงานว่าแยกได้จากส่วนรากของทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1998a)

Rn3 : นำสาร Rn3 มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิค IR และ NMR ได้ข้อมูลดังนี้

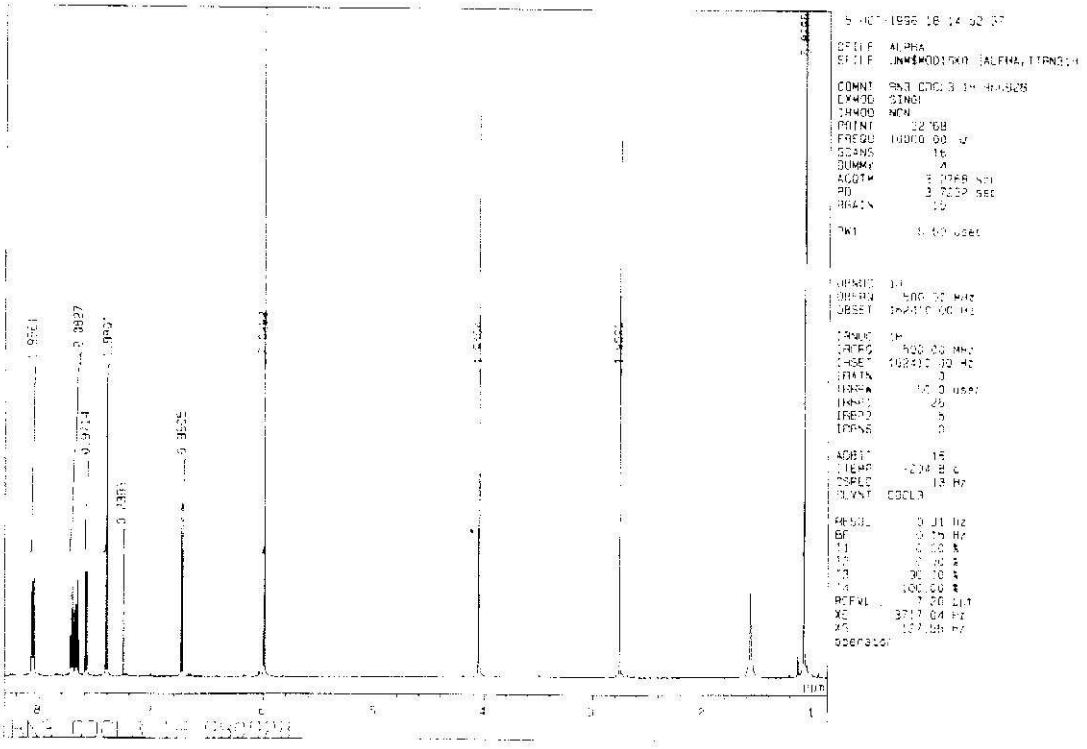
IR (KBr) cm^{-1} : 3300, 1710, 1660, 1640, 1590, 1500, 1460, 1440, 1350 (รูปที่ 14)

^{1}H NMR : 1.15 (6H), 2.80 (2H), 3.86 (3H), 4.19 (2H), 6.99 (H), 7.45 (OH), 7.52 (H), 7.55 (H), 7.57 (H), 7.60 (H), 7.97 (H), 8.00 (H), 8.13 (H), 8.35 (H), 11.55 (OH) ppm (รูปที่ 15)

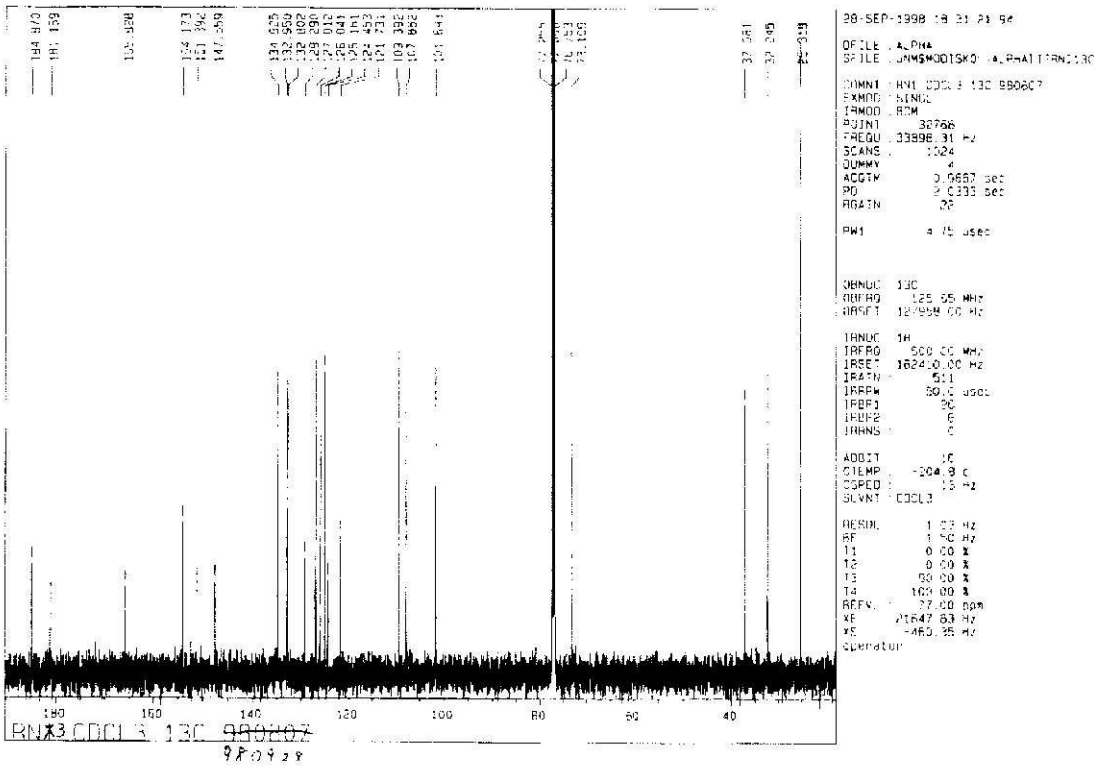
^{13}C NMR : 25.4, 32.3, 37.1, 55.4, 73.3, 100.2, 104.6, 121.5, 121.8, 123.7, 125.5, 125.9, 126.3, 126.8, 128.9, 129.1, 129.7, 132.8, 134.8, 147.5, 154.2, 155.3, 170.6, 181.1, 184.8 ppm (รูปที่ 16)



รูปที่ 14 IR Spectrum ของสาร Rn3



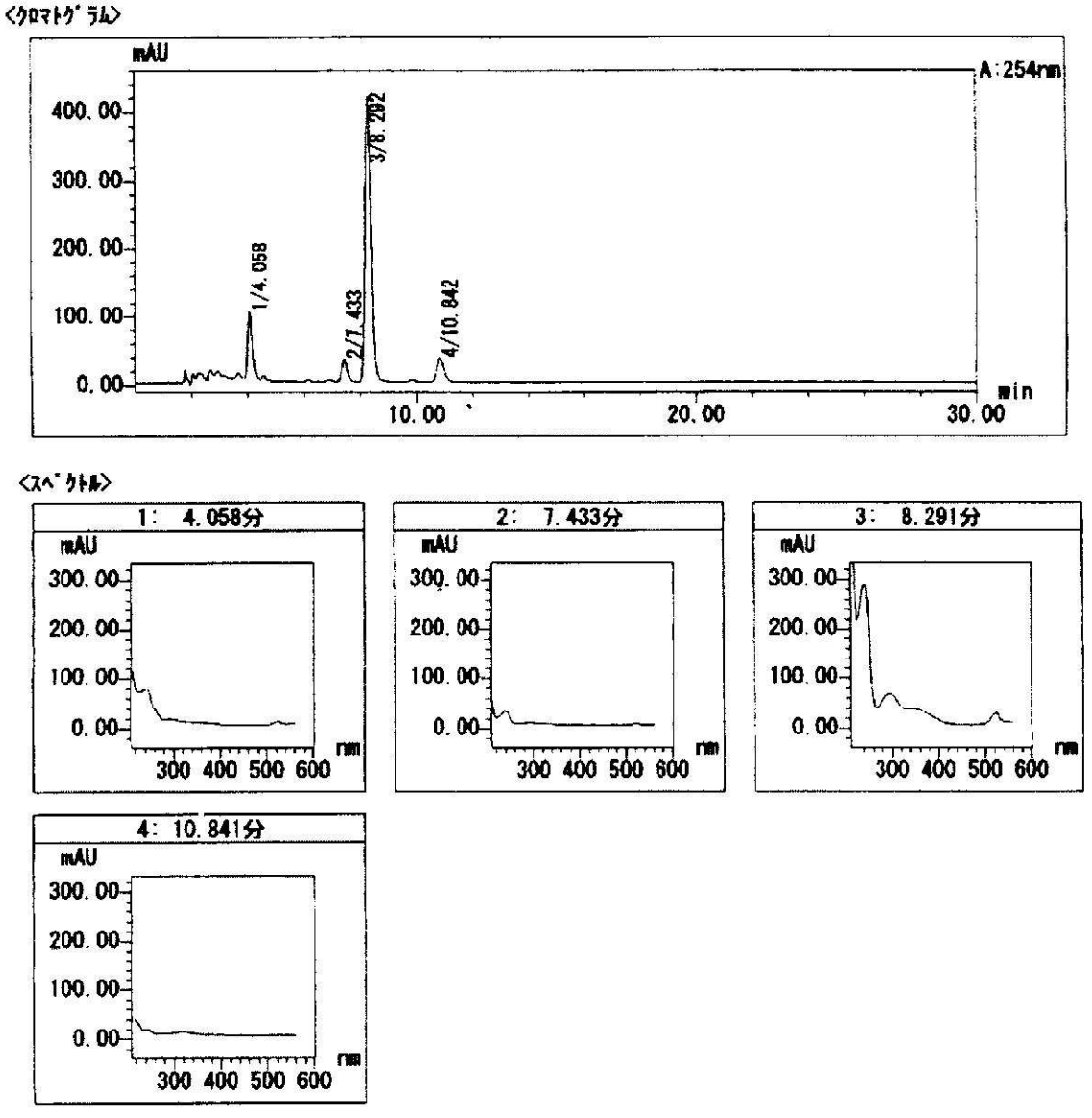
รูปที่ 15 ^{1}H NMR Spectrum (500 MHz) ของสาร Rn3



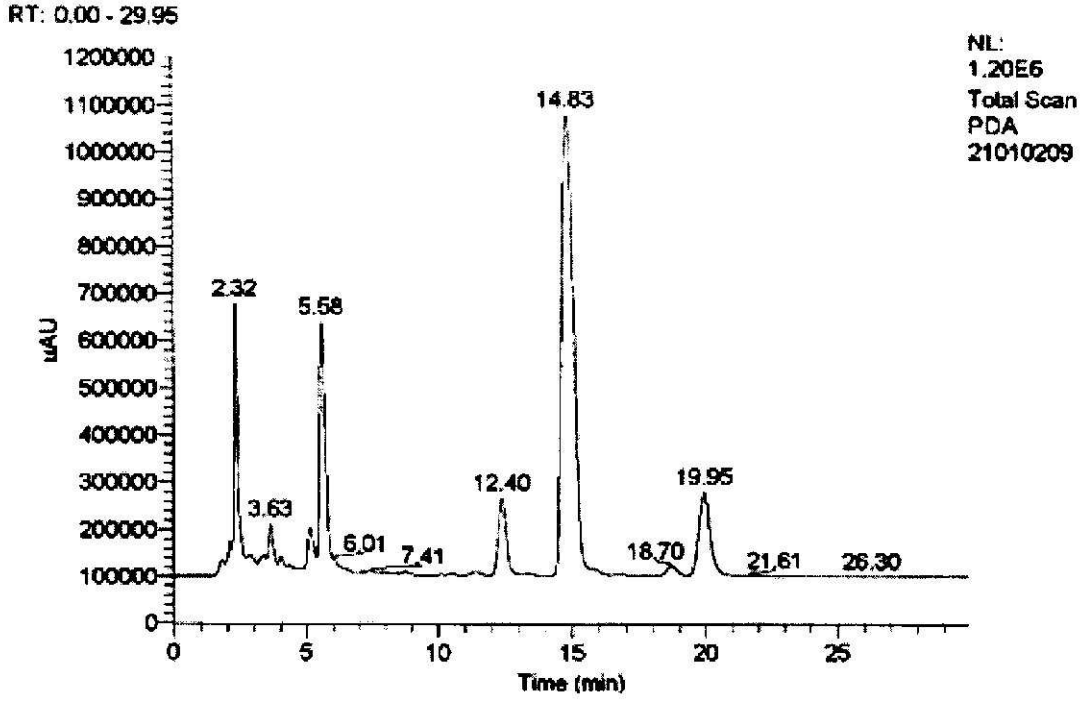
รูปที่ 16 ^{13}C NMR Spectrum (125 MHz) ของสาร Rn3

สาร Rn3 ที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองเข้ม มีค่า melting point เท่ากับ 134 – 135 °C เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย IR, ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR พบว่าเป็นสาร rhinacanthin-D (รูปที่ 8) ซึ่งเคยมีรายงานว่าแยกได้จากส่วนทั้งต้น (whole plant) ทองพันชั่ง (Sendl, *et al.*, 199)

เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร rhinacanthin ทั้งสามชนิดด้วย HPLC โดยใช้ ODS-80Ts column และใช้ methanol : 5 % Aq. Acetic acid (85 : 15) เป็นตัวชะ พบว่าเมื่อตรวจวัดด้วย UV detector ที่ 254 nm พบ peak ของสารประกอบหลัก 4 ชนิด ที่ retention time (RT) เท่ากับ 4.06, 7.43, 8.29 และ 10.84 นาที โดยเมื่อตรวจสอบกับสารมาตรฐาน rhinacanthin ที่แยกได้จากใบทองพันชั่งแล้ว พบว่า peak ที่มี RT เท่ากับ กับ 4.06, 8.29 และ 10.84 คือ rhinacanthin-D, rhinacanthin-C และ rhinacanthin-N ตามลำดับ (รูปที่ 17) และเพื่อพิสูจน์ เอกลักษณ์ peak ของสารประกอบที่มี RT เท่ากับ 7.43 นาที ว่าเป็นสารประกอบ rhinacanthin หรือไม่ และเป็นสารอะไร ผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค LC-MS ในการวิเคราะห์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ เพื่อให้มี peak intensity สูงขึ้น และในระบบของ LC ได้มีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวชะใหม่เป็น methanol : 5 % Aq. Acetic acid (80 : 20) เพื่อทำให้ peak เดิมที่ 7.43 และ 8.29 นาที มี resolution ดีขึ้น ทำให้ลักษณะ chromatogram ที่ได้เปลี่ยนไป โดย peak เดิมที่ต้องการวิเคราะห์ (RT – 7.43 นาที) มี RT เปลี่ยนไปเป็น 12.40 นาที (รูปที่ 18)

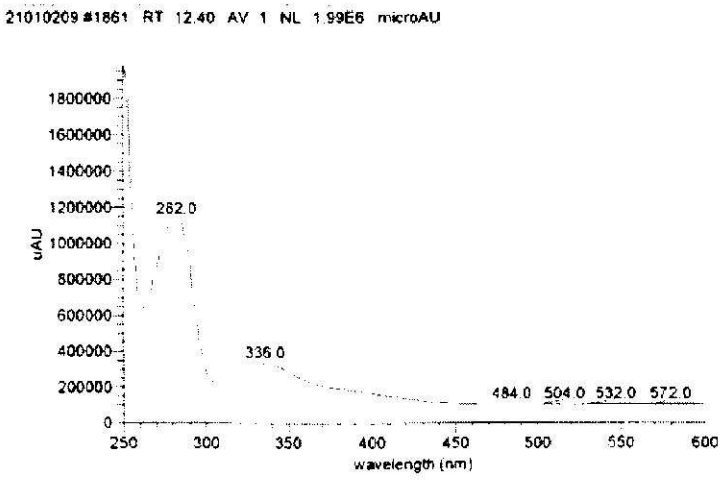


รูปที่ 17 HPLC chromatogram ของสารสกัดจากใบทองพันชั่ง เมื่อใช้ ODS-80Ts column และใช้ methanol : 5 % Aq. Acetic acid (85 : 15) เป็นตัวชะ

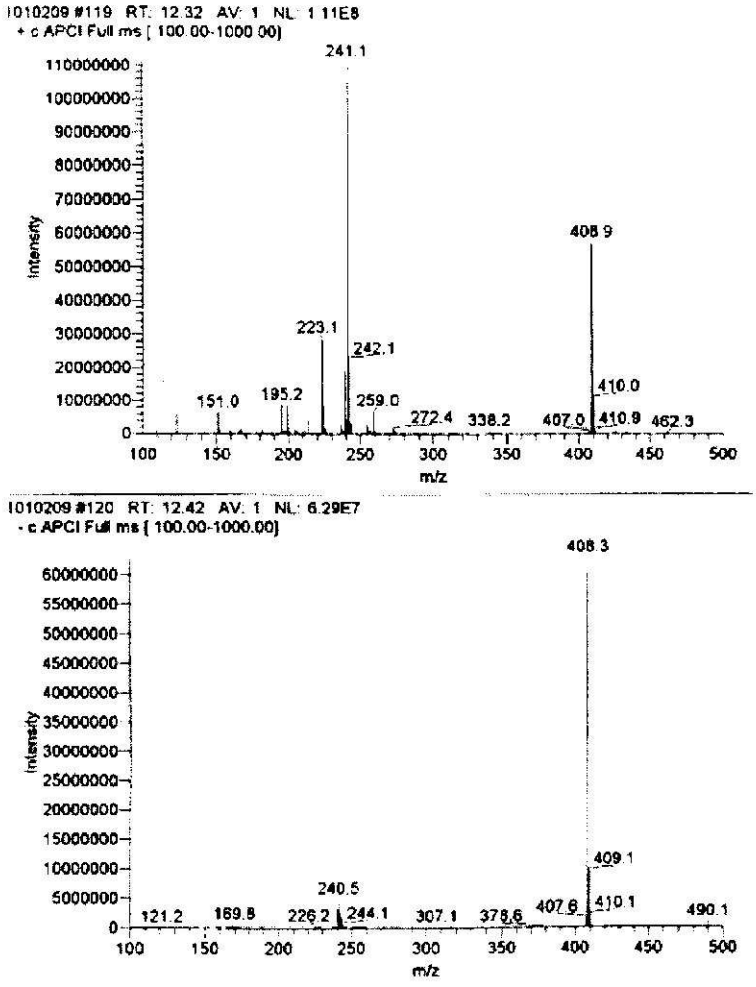


รูปที่ 18 HPLC chromatogram ของสารสกัดจากใบทองพันชั่ง เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS

(A)



(B)



รูปที่ 19 Absorption spectrum (A) และ Mass spectrum (B) ของ peak ที่ RT 12.40 นาทีเมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS

จากการวิเคราะห์ด้วยข้อมูล MS ($[M]^+$ = 408) และ absorption spectrum ของ peak ที่ 12.40 นาที (รูปที่ 19) สรุปในเบื้องต้นว่าคือสาร rhinacanthin B ซึ่งเคยมีรายงานว่าสามารถแยกได้จากราก ของต้นทองพันชั่ง (Wu, *et al.*, 1988)

จากลักษณะ ของ HPLC chromatogram ของสารสกัดใบทองพันชั่ง พบว่ามีสารประกอบหลักในกลุ่ม rhinacanthin 4 ชนิดได้แก่ rhinacanthin-B, rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N

4. การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

มีรายงานว่า rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสายพันธุ์ (cell line) KB, P-388, A-549, HT-29 และ HL-60 โดยมีค่า ED_{50} ดังแสดงในตารางที่ 5 (Wu, *et al.*, 1998b) เมื่อนำสาร rhinacanthin ทั้งสามชนิดที่แยกได้จากใบทองพันชั่งมาทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มเติม โดยทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม สายพันธุ์ MCF-7 และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก สายพันธุ์ Hela พบว่า rhinacanthin ทั้งสามชนิดมีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ในการทดสอบ โดยมีค่า ED_{50} ดังแสดงในตารางที่ 8 จากข้อมูลฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ และที่มีรายงานมาแล้ว (Wu, *et al.*, 1998b) แสดงให้เห็นว่า rhinacanthin ทั้งสามชนิดที่พบในใบทองพันชั่งมีฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด

ตารางที่ 8 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ Hela ของสาร rhinacanthin-C, -D และ -N

สาร	Cell line ED_{50} (μg/ml)	
	MCF-7	Hela
Rhinacanthin-C	1.02	0.85
Rhinacanthin-D	3.34	14.54
Rhinacanthin-N	2.78	1.59

จากรายงานการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ของทองพันชั่ง โดยป้อนสารสกัดทองพันชั่ง (50% EtOH) ให้หนูถีบจักร และการฉีดสารสกัดเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 10 g/kg (เทียบเป็น 3333 เท่าของขนาดที่ใช้ในตำรายา) พบว่าไม่แสดงอาการเป็นพิษในหนูถีบจักร (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2530; 2541) หรือการให้หนูกินใบทองพันชั่งในขนาด 0.5-1 g/kg น้ำหนักตัว (เทียบในมนุษย์จะเท่ากับการได้รับทองพันชั่ง 25 - 50 g หรือ 1 กำมือ) ไม่พบความเป็นพิษแต่อย่างใด (โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง, 2530) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพและความปลอดภัยของใบทองพันชั่งในด้านฤทธิ์ต้านมะเร็ง ซึ่งในอนาคตทองพันชั่งควรจะได้รับการศึกษาและพัฒนาไปใช้เป็นยาต้านมะเร็งต่อไป

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* พบว่า rhinacanthin-C, -D และ -N มีฤทธิ์ต้านเชื้อแกรมบวกชนิดกลม (*Staphylococcus aureus*) และชนิดแท่ง (*Bacillus subtilis*) แต่ไม่มีผลต่อเชื้อแกรมลบรูปแท่ง (*Escherichia coli*) ที่ใช้ในการทดสอบ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ต้านเชื้อ จุลินทรีย์ของ rhinachanthin-C, -D, –N เปรียบเทียบกับ tetracycline

สาร	Inhibition zone (mm)			
	S. aureus	*B. subtilis*	*E. coli*	*C. albicans*
Rhinacanthin-C (170 μg/disc)	12.2	11.8	-[a]	28.2
Rhinacanthin-D (60 μg/disc)	8.2	12.2	-	28.8
Rhinacanthin-N (255 μg/disc)	12.4	13.2	-	18.4
Tetracycline (30 μg/disc)	31.1	24.6	9.5	-
Negative control (DMSO)	-	-	-	-

[a] ไม่มี inhibition zone เกิดขึ้นรอบแผ่น disc

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* และแบคทีเรียของสาร rhinacanthins ทั้งสามชนิดที่แยกได้จากใบทองพันชั่ง พบว่าสาร rhinacanthin-C, -D และ -N ที่แยกได้จากใบของทองพันชั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* โดยในการทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค disc diffusion สาร rhinacanthin-C, -D และ -N ให้ค่า Inhibition zone ดังแสดงในตารางที่ 8

จากการวิเคราะห์ minimal inhibition concentration (MIC) และ minimal fungicidal concentration (MFC) ของสาร rhinacanthins (ตารางที่ 10) พบว่า rhinacanthin-C เมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดความขุ่น เมื่อนำไปเพาะเชื้อจึงไม่สามารถทราบได้ว่าความขุ่นที่เกิดขึ้นเกิดจากเชื้อหรือความขุ่นที่มีอยู่เดิม จึงต้องนำเชื้อจากทุกหลอดมาเลี้ยงบน SDA และ พบว่า 3 หลอดแรกที่มีความเข้มข้นสูงสุดไม่มีเชื้อขึ้นเมื่อเปรียบเทียบผลจาก DMSO ปรากฏว่าให้ผลเหมือนกัน แสดงว่าการที่เชื้อไม่ขึ้นใน 3 หลอดแรก เกิดจากผลการยับยั้งของ DMSO วิธีแก้ไขทำได้โดยเตรียม rhinacanthin-C ให้มีความเข้มข้นที่สูง เมื่อทำการเจือจางด้วย SDB จะทำให้ DMSO เจือจางไปมากจนหมดฤทธิ์ จึงจะหาค่า MIC และ MFC ของ rhinacanthin-C ได้ สำหรับ rhinacanthin-D นั้นไม่ขุ่นเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงไม่มีปัญหาในการอ่านผล จากผลการวิเคราะห์สรุปว่า rhinacanthin-D มีค่า MIC เท่ากับค่า MFC ซึ่งเท่ากับ 64 μg/ml ส่วน rhinacanthin-N มีความขุ่นเมื่ออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นกัน แต่พบว่าจาก 4 หลอดแรก ไม่มีเชื้อขึ้นบน SDA จึงสรุปว่า rhinacanthin-N มี MIC เท่ากับ 64 μg/ml และ มีค่า MFC เท่ากับ 128 μg/ml

ตารางที่ 10 ผลของสาร rhinacanthin-C (Rn-C), -D (Rn-D), และ -N (Rn-N) ต่อการเจริญของเชื้อ *C. albicans*

หลอดที่	ความเข้มข้น	Sabouraud dextrose broth (SDB)				Sabouraud dextrose agar (SDA)			
	(μg/ml)	Rn-C	Rn-D	Rn-N	DMSO	Rn-C	Rn-D	Rn-N	DMSO
1	512	-	-	-	-	-	-	-	-
2	256	+	-	+	+	-	-	-	-
3	128	+	-	+	+	-	-	-	-
4	64	+	-	-	+	+	-	-	-
5	32	+	+	-	-	-	+	+	-
6	16	-	+	+	+	-	+	-	+
7	8	-	-	+	+	+	-	+	-
8	4	-	-	+	+	+	-	+	-
9	2	+	+	-	-	+	+	+	-
10	1	+	+	+	+	+	-	-	+
11	SDB + เชื้อ	-	-	+	+	+	-	-	+
12	SDB	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ :

+ = เกิดความขุ่นใน Sabouraud dextrose broth

+ = เชื้อเจริญบน Sabouraud dextrose agar

- = ไม่เกิดความขุ่นใน Sabouraud dextrose broth

- = เชื้อไม่เจริญบน Sabouraud dextrose agar

เมื่อพิจารณาจากค่า MIC ชี้ให้เห็นว่า rhinacanthin-D และ -N มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ได้ดีกว่า rhinacanthin-C (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albicans* ของ Rhinachanthin-C, -D and -N

สาร	Minimal Inhibitory Concentration (μg/ml)
Rhinacanthin-C	512
Rhinacanthin-D	64
Rhinacanthin-N	64

นอกจากฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคทีเรียดังกล่าวแล้วยังมีรายงานว่า rhinacanthin-C และ -D มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ชนิด cytomegalovirus ด้วยค่า ED_{50} เท่ากับ 0.02 μg/ml และ 0.22 μg/ml ตามลำดับ (Sendl, *et al.*, 1996)

6. การวิเคราะห์ปริมาณ rhinacanthins ในใบทองพันชั่ง

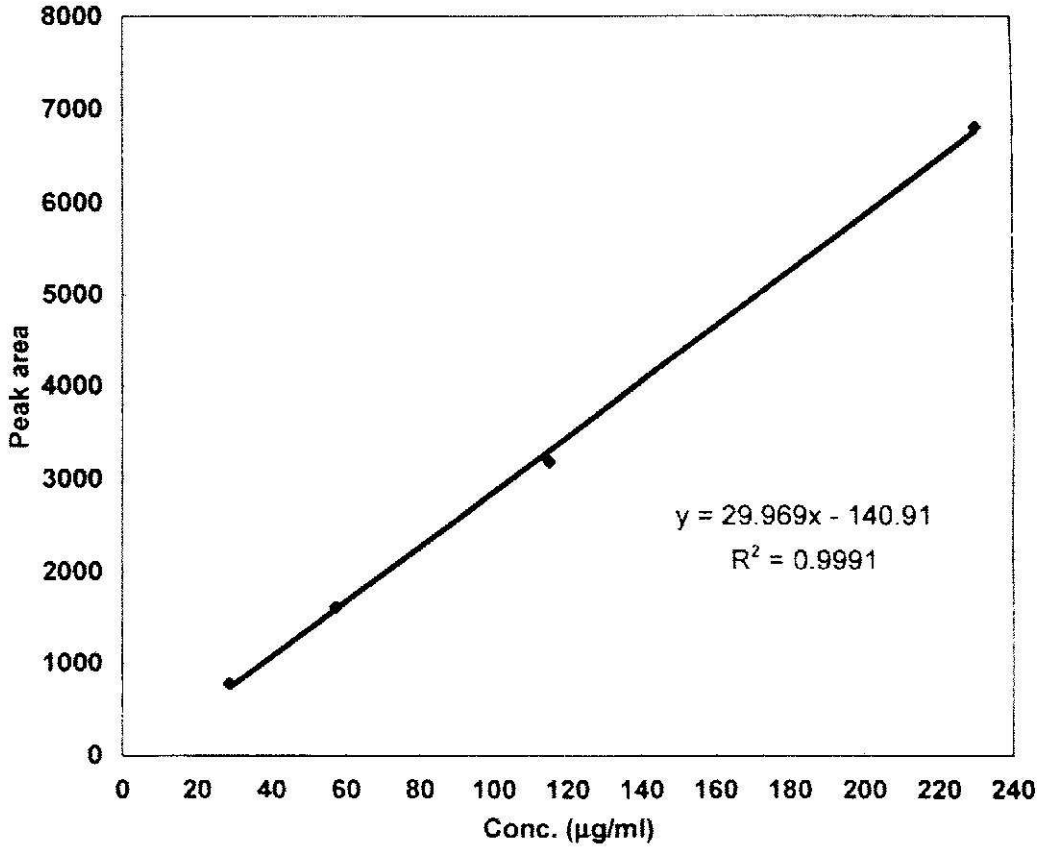
จากการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร rhinacanthins ที่พบในใบทองพันชั่งด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องตรวจวัดแบบ diode array detection พบว่าการชะสารออกจากคอลัมน์ ODS-80Ts โดยใช้ระบบตัวทำละลาย methanol-waterโดยทำการเปลี่ยนแปรสัดส่วนของน้ำต่อ methanol ที่ใช้เป็นตัวชะ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสามารถแยกสารได้ดี คือ น้ำ : methanol เท่ากับ 15 : 85 แต่ peak ของสารที่ได้ยังกว้าง (broad) เนื่องจากสาร rhinacanthin เป็นสารในกลุ่ม naphthoquinone ซึ่งสามารถเกิด ionisation ได้ในตัวกลางดังกล่าว ดังนั้นจึงแก้ไขโดยการปรับ pH ของตัวชะให้เป็นกรด โดยใช้ acetic acid จากการทดลองพบว่าการใช้ 5% aqueous acetic acid แทนน้ำในตัวชะโดยใช้สัดส่วนน้ำต่อmethanol เท่าเดิม จะทำให้ peak ของสาร rhinacanthins มีลักษณะ sharp และยกจากกันได้ดีมากขึ้น

สามารถวิเคราะห์ปริมาณของสาร rhinacanthin-C, -D และ -N ในใบทองพันชั่งได้ เพราะมีสารมาตรฐานที่ใช้ทำ calibration curve โดย calibration curve ของสาร rhinacanthin-C, -D และ -N และสมการเส้นตรงแสดงไว้ในรูปที่ 11, 12 และ 13 ตามลำดับ และปริมาณสาร rhinacanthin ที่วิเคราะห์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 12 สำหรับปริมาณสาร rhinacanthin-B ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ เพราะยังไม่สามารถแยกสาร rhinacanthin-B มาใช้เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากมีปริมาณน้อยมากในใบทองพันชั่ง หากสามารถแยก rhinacanthin-B มาใช้เป็นสารมาตรฐานได้ จะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ rhinacanthin หลักได้ครบทุกชนิดด้วยระบบ HPLC ที่สร้างขึ้น

ตารางที่ 12 ปริมาณสาร Rhinacanthin-C, -D และ -N ในผงใบทองพันชั่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

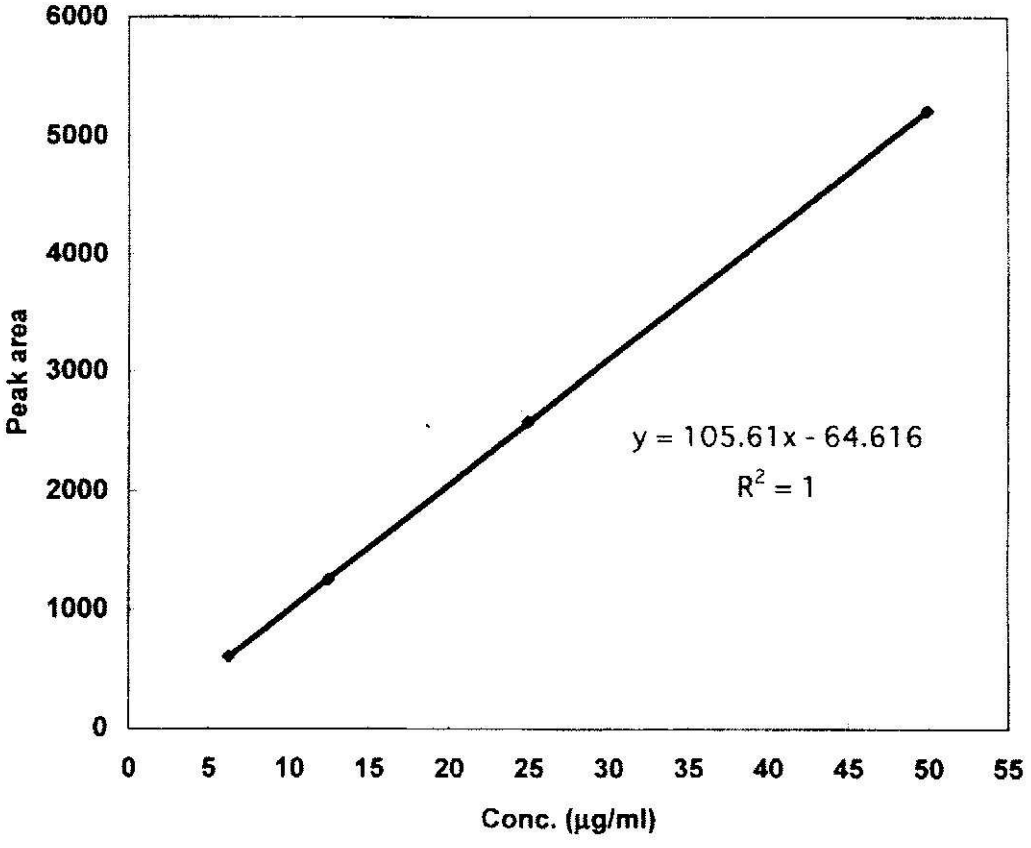
สาร	% w/w (± S.D.)
Rhinacanthin-C	1.94 ± 0.02
Rhinacanthin-D	0.12 ± 0.01
Rhinacanthin-N	0.07 ± 0.006

จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารประกอบ rhinacanthin ที่มีปริมาณมากที่สุดในใบทองพันชั่ง คือ rhinacanthin-C โดยมีปริมาณมากกว่า rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N ประมาณ 16 และ 27 เท่า ตามลำดับ



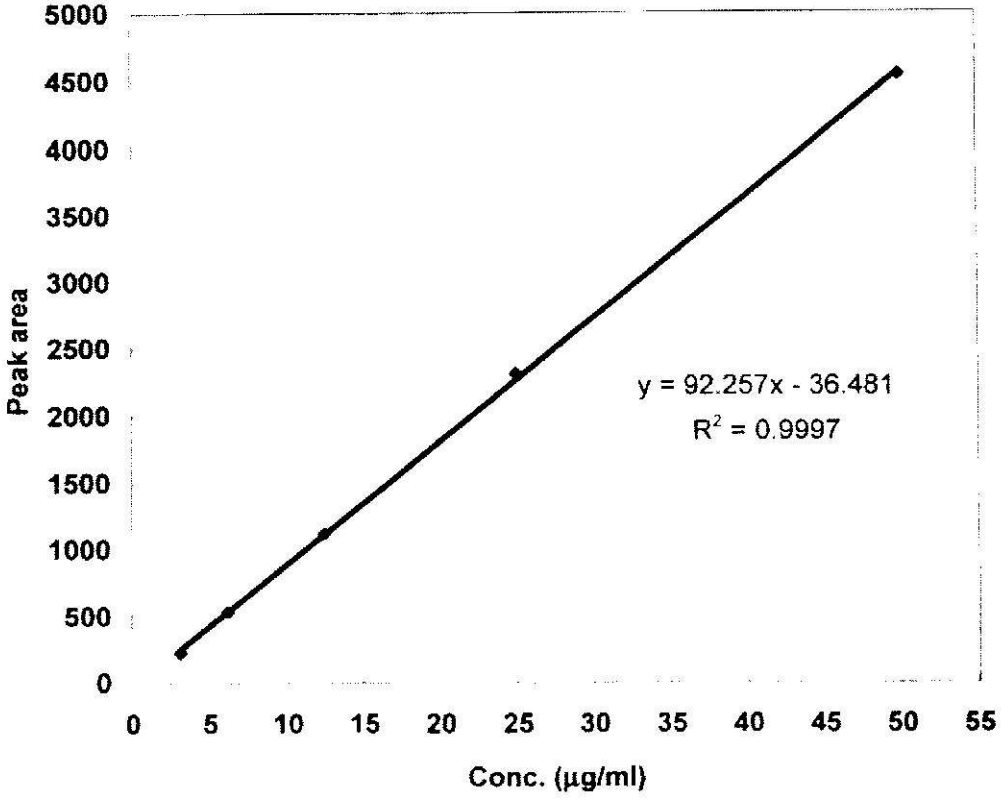
Conc. (µg/ml)	Peak Area
230	6800.66
115	3183.97
57.5	1605.16
28.75	770.5

รูปที่ 20 Calibration curve ของ rhinacanthin-C



Conc. (µg/ml)	Peak Area
50	5214.25
25	2582.84
12.5	1246.99
6.25	598.75

รูปที่ 21 Calibration curve ของ rhinacanthin-D



Conc. (µg/ml)	Peak Area
50	4553.17
25	2318.5
12.5	1120.1
6.25	537.9
3.125	225.3

รูปที่ 22 Calibration curve ของ rhinacanthin-N

เอกสารอ้างอิง

โครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง. 2531. ทองพันชั่ง : แก้กลาก เกลื้อน สังคัง. ข่าวสารสมุนไพร 32 : 32-35.

นันทวัน บุณยะประภัศร, บรรณาธิการ. 2530. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 3 พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:ธรรกมลการพิมพ์.

นันทวัน บุณยะประภัศร, บรรณาธิการ. 2541. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน เล่ม 2 พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร :โรงพิมพ์ประชาชน.

มาโนช วามานนท์ และเพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, บรรณาธิการ. 2537. ยาสมุนไพร สำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

วรรณดี แต้โสตถิกุล. 2528. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรที่ใช้ลดความดันโลหิต. เชียงใหม่เภสัชสาร 4 (1):23-30.

Charlwood, B. V. and Rhodes, M. J. C. 1990. Secondary production from plant tissue culture. Oxford:Clarendon Press.

Constabel, F. and Vasil. I. K. 1987. Cell culture and somatic cell genetics of plants. San Diego:Academic Press.

Kernan, M.R., Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Blanc, P., Murphy, J.T., Stoddart, C.A., Nanakorn, W., Balick, M.J., and Rozhon, E.J. 1997. Two new lignas with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Natural Products 60 (6) :635-637.

Kongchai, N. and Panichayupakaranant, P. Quantitative determination of total rhinacanthins and antifungal activity of *Rhinacanthus nasutus* leaf extract. the 4th IMT-GT Uninet Conference 2002. p. 268. The City Bayview Hotel, Penang, Malaysia, 15-17 October, 2002 .

Kuwahara, S., Awai, N., and Kodama, O. 1995. A revised structure for Rhinacanthone. Journal of Natural Products 58 (9): 1455-1458.

Lorian, V. 1986. Antibiotic in laboratory medicine 3th. Philadelphia: Williams&Wilkins

Sendl, A., Chen, J.L., Jolad, S.D., Stoddart, C., Rozhon, E., and Kernan, M. 1996. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*., Journal of Natural Products 59 (8) : 808-811.

Solis, P. N., *et al*. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medica 59 : 250-252.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu. P.L.. Leu. Y.L.. Chan. Y. Y., Chern, C.Y., Yeh, M.Y., and Tien. H.J. 1998a. Napthoquinone esters from the root of *Rhinacanthus nasutus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 46 (3):413-418.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu. P.L., Teng, C.M., and Wu, Y.C. 1998b. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and its biological activity. Phytochemistry 49 (7) : 2001-2003.

Wu. T.S., Tien, J.J., Yeh, M.Y., and Lee, K.H. 1988. Isolation and cytotoxicity of rhinacanthin-A and - B. Two napthoquinones, from *Rhinacanthus nasutus*. Phytochemistry 27 (12) : 3787-3788.

Wu, T.S., Yang, C.C., Wu, PlL., and Liu, L.K. 1995. A quinol and steroids from the leaves and stems of Rhinacanthus nasutus. Phytochemistry 40 (4):1247-1249.

ภาคผนวก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ *แบบ วจ-1*

แบบเสนอโครงการวิจัย
ประกอบการของบประมาณเพื่อการวิจัย ประจำปี 2543-2544
****

ประเภททุน [/] ทั่วไป [ ] สอดคล้องกับนโยบายซึ่งมหาวิทยาลัยสนับสนุนเป็นพิเศษ [ ] แข่งขัน
ลักษณะของการวิจัย [/] การวิจัยเพื่อพัฒนาประเทศ [ ] การวิจัยอื่น
แผนงานวิจัย เพื่อพัฒนาการแพทย์และสาธารณสุข
แผนงานย่อย เพื่อพัฒนาวิชาการและเทคโนโลยีทางการแพทย์และสาธารณสุข

1. **ชื่อโครงการวิจัย**

(ภาษาไทย) การแยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารกลุ่มควิโนนที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์จากใบของ ต้นทองพันชั่ง

(ภาษาอังกฤษ) Isolation and Identification of Cytotoxic Quinoid from *Rhinacanthus nasutus* (Linn.) Kurz Leaves

2. **หน่วยงานที่รับผิดชอบงานวิจัยและที่อยู่**

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

3. **คณะผู้วิจัย**

หัวหน้าโครงการวิจัย : นายภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์
Mr. Pharkphoom Panichayupakaranant

4. **ประเภทของงานวิจัย**

การวิจัยพื้นฐาน

5. **สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย**

วิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช

6. **คำสำคัญ**

Rhinacanthus nasutus, Acanthaceae, quinoid, cytotoxic, ทองพันชั่ง

7. **ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ต้องการทำวิจัย**

มะเร็งเป็นโรคร้ายที่เกิดได้กับแทบทุกอวัยวะและทุกส่วนของร่างกาย และมักทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตหากไม่ได้รับการรักษาทันท่วงที เดิมทีการรักษาโรคมะเร็งมักอาศัยการผ่าตัดและการฉายรังสีเป็นหลัก จะนำยาต้านมะเร็ง

มาใช้ต่อเมื่อการผ่าตัดหรือการฉายรังสีไม่ได้ผลเท่านั้น แต่ปัจจุบันมีการนำยาต้านมะเร็งมาใช้มากขึ้น เนื่องจากการรักษาด้วยยาต้านมะเร็งสามารถช่วยยืดชีวิตผู้ป่วยด้วยโรคมะเร็งบางชนิดให้ยืดยาวและสามารถดำรงชีวิตได้เช่นคนปกติ

จากความสำคัญของยาต้านมะเร็งดังกล่าวทำให้มีการศึกษาเพื่อเสาะหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีผลข้างเคียงต่ำ โดยได้มุ่งความสนใจมาที่สารจากธรรมชาติ เพื่อค้นหาสารต้นแบบ (prototype) ของยาต้านมะเร็งที่มีโครงสร้างใหม่ๆ ซึ่งสารเหล่านี้ในบางครั้งอาจอยู่นอกเหนือความสามารถในจิตนาการของมนุษย์ที่จะสังเคราะห์ขึ้นเอง ดังนั้นการศึกษาสารจากธรรมชาติจึงอาจนำไปสู่การค้นพบยาต้านมะเร็งชนิดใหม่หรืออาจนำมาใช้เป็นสารต้นแบบในการสังเคราะห์ยาต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในการรักษาต่อไป

ต้นทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีการนำมาใช้กันแต่โบราณ ปัจจุบันต้นทองพันชั่งเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ถูกแนะนำให้ใช้เป็นยาสมุนไพรในสาธารณสุขมูลฐาน[1] โดยใช้ในการรักษาโรคผิวหนังอักเสบหรือโรคเชื้อราที่ผิวหนัง เช่น กลาก เกลื้อน เป็นต้น มีรายงานการศึกษาพบว่าต้นทองพันชั่งสร้างสารประกอบในกลุ่ม naphthoquinone หลายชนิด ได้แก่ rhinacanthin A, B, C และ D โดยพบว่า rhinacanthin B มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง[2] ส่วน rhinacanthin C และ D มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส[3]

สารกลุ่มควินอยด์เป็นสารที่มีฤทธิ์ cytotoxicity เนื่องจากเป็น biological alkylating agent โดยสารกลุ่มควินอยด์จะให้ metabolite ที่มี active methylene group ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุลของ DNA จึงเป็นอันตรายต่อเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว[4]

จากการทดสอบเบื้องต้นด้วย TLC ในการตรวจหาสารกลุ่มควินอยด์ (quinoid) ในสารสกัดจากใบของต้นทองพันชั่งที่สกัดด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ พบว่าประกอบด้วยสารในกลุ่มควินอยด์หลายชนิด และเมื่อทำการแยกสารสกัดทั้งสองชนิดเป็น fractions โดยใช้ column chromatography และนำแต่ละ fractions มาทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity เบื้องต้นโดยใช้ brine shrimp พบว่ามีหลาย fractions ที่มีสารควินอยด์เป็นส่วนประกอบและมีฤทธิ์ cytotoxicity ดีมาก ซึ่งผลดังกล่าวนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นในการตรวจหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ดังนั้นหากมีการแยกสาร กลุ่มควินอยด์ให้บริสุทธิ์เพื่อหาโครงสร้างของสารและนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยการทดสอบกับเซลล์มะเร็งโดยตรง จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะสามารถค้นหายาต้านมะเร็งที่ได้จากสาร ธรรมชาติ และอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยาต้านมะเร็งต่อไป

8. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกสารกลุ่มควินอยด์จากใบทองพันชั่งให้ได้สารบริสุทธิ์ และหาสูตรโครงสร้างของสาร
2. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งของสารกลุ่มควินอยด์ที่แยกได้
3. ศึกษาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณของสารกลุ่มควินอยด์ที่แยกได้ ในใบของทองพันชั่ง

9. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบโครงสร้างของสารกลุ่มควินอยด์ที่พบในใบของทองพันชั่ง ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนายาจากต้นทองพันชั่งและพืชสมุนไพรอื่นๆ ต่อไป

2. ได้สารกลุ่มควินอยด์ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีภาพอื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการพัฒนายาต่อไป

3. ได้สารต้านมะเร็งที่มีฤทธิ์ดี ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาหรือใช้เป็นต้นแบบในการคิดค้นยาต้านมะเร็งต่อไป

4. สามารถนำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้กับพืชสมุนไพรชนิดอื่นเพื่อเป็นการพัฒนาพืชสมุนไพรไทยต่อไป

10. หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

11. โครงการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับต้นทองพันชั่งในด้านการแยกสกัดสารประกอบจากต้นทองพันชั่งให้ได้สารบริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบเหล่านั้น ดังนี้

1. การแยกสกัดสารประกอบ rhinacanthin A และ B จากต้นทองพันชั่ง และการทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity ของ rhinacanthin A และ B โดยพบว่าสารประกอบ rhinacanthin B มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (KB tissue culture cell) โดยให้ค่า ED_{50} : 3.0 μg/ml งานนี้เป็นงานวิจัยที่ทำในประเทศสหรัฐอเมริกา และถูกตีพิมพ์เผยแพร่เมื่อปี 1988[2]

2. การแยกสกัดสารประกอบ rhinacanthin C และ D จากต้นทองพันชั่ง และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสของ rhinacanthin C และ D โดยพบว่าสารประกอบ rhinacanthin C และ D มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส โดยให้ค่า EC_{50} = 0.02 และ 0.22 μg/ml ตามลำดับ งานนี้เป็นงานวิจัยที่ทำในประเทศสหรัฐอเมริกา และถูกตีพิมพ์เผยแพร่เมื่อปี 1996[3]

3. การสกัดแยกสารจากต้นทองพันชั่ง และการวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารประกอบอนุพันธ์ของ naphthopyran ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา โดยได้สารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างเป็น 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphthol[2,3-b]pyran-5,10-dione งานนี้เป็นงานวิจัยที่ทำในประเทศญี่ปุ่น และถูกตีพิมพ์เผยแพร่เมื่อปี 1993[4]

4. การแก้ไขสูตรโครงสร้างของ rhinacanthone โดยเป็นการแก้ไขสูตรโครงสร้างของสารประกอบอนุพันธ์ของ naphthopyran ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและแยกได้จากต้นทองพันชั่ง ซึ่งเดิมถูกรายงานว่ามีสูตรโครงสร้างเป็น 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphthol[2,3-b]pyran-5,10-dione นั้นแก้ไขเป็น 3,4-dihydro-3,3-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione งานนี้เป็นงานวิจัยที่ทำในประเทศญี่ปุ่น และถูกตีพิมพ์เผยแพร่เมื่อปี 1995[5]

5. การแยกสกัดสารและหาสูตรโครงสร้างของสารกลุ่ม lignans ได้แก่ rhinacanthin E และ rhinacanthin F จากต้นทองพันชั่ง โดยพบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสชนิด influenza virus type A งานนี้เป็นงานวิจัยที่ทำในประเทศสหรัฐอเมริกา และถูกตีพิมพ์เผยแพร่เมื่อปี 1997[7]

12. เอกสารอ้างอิง

1. Fransworth, N. R. and Bunyapraphatsara, N. 1992 Thai medicinal plants : Recommended for primary health care system. Bangkok : Prachachon Co.,Ltd.

2. Wu, T., et al. 1988. Isolation and cytotoxicity of rhinacanthin A and rhinacanthin B two naphthoquinones, from *Rhinacanthus nasutus*. Phytochemistry 27 (12) : 3787-3788.

3. Sendl, A., et al. 1996. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Natural Products 56 : 808-811.

4. เอมอร โสมนะพันธ์ นพมาศ สรรพคุณ วีณา จิรัจฉริยากูล และ อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2533. ยาจากสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

5. Kodama, O., *et al.* 1993. Isolation and identification of an antifungal naphthopyran derivative from *Rhinacanthus nasutus*. Jornal of Natural Products 56 (2) : 292-294.

6. Kuwahara, S., *et al.* 1995. A revised structure for rhinacanthone. Journal of Natural Products 58 (9) : 1455-1458.

7. Kernan, M. R., *et al.* 1997. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. Journal of Natural Products 60 : 635-637.

8. Wagner, H., Bladt, S. and Zgainski, E. M. 1984. Plant Drug Analysis : A thin layer chromatography atlas. Belin Heidelberg : Springer-Verlag.

9. Solis, P. N., *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medica 59 : 250-252.

13. ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างใบทองพันชั่งจากศูนย์เพาะชำกล้าไม้เขต 12 กระมปาไม้ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา เพื่อนำมาใช้ในการสกัดสารกลุ่มควินอยด์

2. การสกัดสารกลุ่มควินอยด์

นำใบทองพันชั่งที่อบแห้งมาบดให้ละเอียดและสกัดโดยวิธีการ reflux ด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ

3. การแยกสารกลุ่มควินอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ให้ได้สารบริสุทธิ์

3.1 นำสารสกัดทั้งสองชนิดมาตรวจหาสารกลุ่มควินอยด์โดยใช้เทคนิค TLC ร่วมกับวิธีการตรวจหาสารกลุ่มควินอยด์โดยวิธีของ Borntrager[10]

3.2 ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่มควินอยด์โดยใช้เทคนิคทาง chromatography และแยกสารโดยใช้ chromatography ชนิดต่างๆ เช่น

- Quick column chromatography
- Flash column chromatography
- Conventional column chromatography
- Gel filtration chromatography
- Medium pressure liquid chromatography (MPLC)

3.3 ติดตามฤทธิ์ cytotoxicity ของสารกลุ่มควินอยด์โดยใช้ brine shrimp assay[31]

4. การหาสูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

นำสารประกอบที่แยกได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทาง spectroscopy เช่น MS, IR, UV และ NMR

5. ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารกลุ่มควินอยด์ที่แยกได้ โดยส่งตัวอย่างทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เช่น KB-cell (Human nasopharynx carcinoma) และ P-388 lymphocytic leukemia เป็นต้น

6. ทดลองหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มควินอยด์ที่แยกได้ ในใบทองพันชั่งโดยใช้เทคนิค TLC densitometry หรือ HPLC

6.1 ทดลองหาวิธีการเตรียมสารสกัดที่จะใช้ทำการวิเคราะห์ โดยต้องกำจัดสารอื่นๆ ที่มีผลรบกวนการวิเคราะห์ออก อาจใช้วิธีการของ liquid-liquid extraction (partition) หรือ chromatography

6.2 ทดลองหา stationary phase และ solvent system และสภาวะการทดลองอื่นๆ ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

14. ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการวิจัยที่เกี่ยวกับการค้นหาตัวยาสำคัญจากพืชสมุนไพรไทยเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

15. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ระยะเวลา 2 ปี โดยเริ่มต้นตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2542 ถึง 30กันยายน 2544

16. แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ขั้นตอนการทำวิจัย	เดือนที่											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. การเก็บตัวอย่างพืช	↔											
2. การสกัดสารกลุ่มควินอยด์	←	→										
3. การแยกสารกลุ่มควินอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ให้ได้สารบริสุทธิ์	←					→						
4. การหาสูตรโครงสร้างของสารประกอบ					←					→		
5. ส่งตัวอย่างทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง								←			→	
6. ทดลองหาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มควินอยด์ในใบทองพันชั่ง									←			→

17. สถานที่ทำการทดลองและ/หรือเก็บข้อมูล

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

18. อุปกรณ์ในการวิจัย

18.1 อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

1. เครื่องแก้ว
2. column ขนาด 3 cm x 60 cm และ 5 cm x 60 cm

18.2 อุปกรณ์ที่ต้องการเพิ่ม

1. column ขนาด 2.5 cm x 120 cm (สำหรับ gel filtration chromatography)
2. RP-18 preparative HPLC column
3. RP-18 analytical HPLC column

19. รายละเอียดงบประมาณของโครงการตามหมวดเงินประเภทต่าง ๆ

งบประมาณปี 2543

หมวดค่าจ้างชั่วคราว		
ค่าจ้างนักศึกษา 1 คน (อัตรารายเดือน 1,590.-)	9,500.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าจ้างชั่วคราว		9,500.-
หมวดค่าใช้สอย		
ค่าวัสดุสำนักงาน	1,000.-	
ค่าใช้จ่ายในการเดินทางไปเก็บตัวอย่างพืช	4,000.-	
ค่าถ่ายเอกสาร ค่าฟิล์มและล้าง-อัดรูป	1,500.-	
ค่าส่งตัวอย่างวิเคราะห์ทาง spectroscopy	10,000.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าใช้สอย		16,500.-
หมวดค่าวัสดุ		
ค่าสารเคมี		
- ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) commercial grade	50,000.-	
- Chromatographic material for column chromatography (Silica gel, Sephadex G-25)	30,000.-	
- precoated TLC plate (silica gel, RP-18)	14,000.-	
RP-18 preparative column	15,000.-	
column 2.5 cm x 120 cm	3,000.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าวัสดุ		112,000.-
รวมค่าใช้จ่ายในปี 2543 ทั้งสิ้น		138,000.-

งบประมาณปี2544

หมวดค่าจ้างชั่วคราว

ค่าจ้างนักศึกษา 1 คน (อัตรารายเดือน 1,590.-)	19,080.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าจ้างชั่วคราว		19,080.-

หมวดค่าใช้สอย

ค่าจัดทำรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	2,500.-	
ค่าใช้จ่ายในการเดินทางเพื่อค้นเอกสาร/หาข้อมูลเพิ่มเติม		
เข้าร่วมประชุม/สัมมนาหรือเสนอผลงานทางวิชาการ	8,000.-	
ค่าถ่ายเอกสาร ค่าฟิล์มและล้าง-อัดรูป	1,500.-	
ค่าส่งตัวอย่างวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านมะเร็ง	15,000.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าใช้สอย		27,000.-

หมวดค่าวัสดุ

ค่าสารเคมี		
- ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent)		
commercial grade	20,000.-	
analytical and HPLC gade	80,000.-	
- Chromatographic material for column chromatography	30,000.-	
- precoated TLC plate (silica gel, RP-18)	14,000.-	
RP-18 analytical column	25,000.-	
ค่าวัสดุสำนักงาน	1,500.-	
รวมค่าใช้จ่ายหมวดค่าวัสดุ		170,500.-
รวมค่าใช้จายปี 2544 ทั้งสิ้น		216,580-

รวมค่าใช้จ่ายตลอดโครงการ (138,000.- + 216,580.-) 354,580.-

ลงชื่อ.....ผู้ดำเนินการวิจัย

(นายภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์)

วันที่ 10 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2542

โครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาและความเห็นชอบจากคณะเภสัชศาสตร์ อนุมัติให้ใช้สถานที่ อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและติดตามผลงาน เพื่อให้การวิจัยสำเร็จตามความมุ่งหมาย

ลงชื่อ.....

(นายภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์)

หัวหน้าภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

วันที่ 10 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2542

ลงชื่อ.....

(ดร. ศิริรัศมิ์ ปิ่นสุวรรณ)

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนคณบดี

วันที่.....เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2542

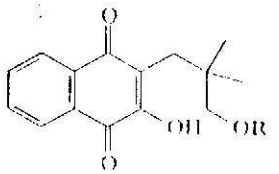
POSTER PRESENTATION

ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NAPHTHOQUINONES FROM *RHINACANTHUS NASUTUS* LEAVES

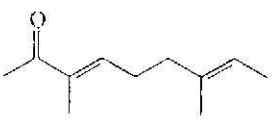
Pharkphoom Panichayupakaranant[1], Yutaka Ebizuka[2], Sanae Kaewnopparat[1] and Supredee Sungkarak[1]

[1]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand.
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

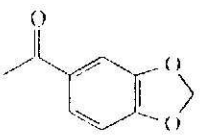
Three naphthoquinones named rhinacanthin-C [1], rhinacanthin-D [2], and rhinacanthin-N [3] were isolated from the leaves of *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz (Acanthaceae). Their structures were determined by analysis of their spectoscopic data, in particular, 2D NMR. All three naphthoquinones exhibited antifungal activity against *Candida albicans* with minimal inhibitory concentration (MIC) of 512, 64 and 64 µg/ml, respectively. These MIC values were equal to minimal fungicidal concentration (MFC) in all cases. In addition, the naphthoquinones also possessed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, but not *Escherichia coli*.



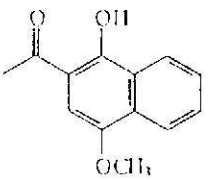
1 R =



2 R =



3 R =



พิมพ์ที่ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

พ.ศ. 2545