สารบริสุทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพจากตำแยช้าง

Isolated Compound and Its Biological Activities from *Dendrocnide stimulans*

บุษราคัม สิงห์ชัย* และ รัตนา จันทวี

Butsarakham Singchai* and Rattana Jantawe

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

Chemistry Division, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University

Received : 29 January 2019

Revised : 28 May 2019

Accepted : 15 August 2019

บทคัดย่อ

ตำแยช้าง (*Dendrocnide stimulans*) อยู่ในวงศ์กะลังตังช้าง (Urticaceae) เป็นพืชพิษยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดตำแยช้างได้แก่การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด ไวรัสเริม ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ จุลินทรีย์ 5 ชนิดได้แก่ *K. pneumoniae P. aeruginosa E. coli C. albicans* และ *A. baumannii* และการต้านออกซิเดชัน และเพื่อแยกสารบริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ ตัวอย่างพืชแห้งบดละเอียดสกัดด้วยเอทานอล การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิด 1 และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ด้วยวิธี GFP-based การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ 5 ชนิด ด้วยวิธี optical density microplate และทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm การแยกสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์อาศัยเทคนิคทางสเปคโทรสโกปี สถิติที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ค่าเฉลี่ย ร้อยละ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และการทดสอบที จากการศึกษาเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 50 μg/ml สารสกัดเอทานอลใบตำแยช้างแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดสูง ร้อยละการยับยั้ง 99.49±0.00 มีพิษต่อเซลล์ปกติและต้านออกซิเดชัน ในระดับปานกลาง สาร-1 แยกได้จากสารสกัดเอทิลแอซีเตทใบตำแยช้าง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางอินฟราเรดสเปคโทรสโกปีและนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนส์สเปคโทรสโคปีที่เคยมีรายงาน เป็นบีตา-ซิโทสเตอรอล และสารนี้แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดด้วยค่า IC_{50} มากกว่า 50 μg/ml โดยยาอิลลิปติซีนและโดโซรูบิซิน แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 2.23±0.47 และ 0.137±0.015 μg/ml ตามลำดับ

คำสำคัญ : ตำแยช้าง, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, บีตา-ซิโทสเตอรอล

***Corresponding author. E-mail** : sbung13@yahoo.com

Abstract

Dendrocnide stimulans are belongs in the Family Urticaceae, poisonous tree. There is no data of chemical study and biological activities. This research aims to study the biological activities of extracts of this plants, including inhibition of lung cancer cells (NCI-H187), anti-*Herpes simplex* virus cytotoxicity, and antimicrobials agents as *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* and *A. baumannii* and antioxidant activity and to isolated pure compound from the extract and biological activities of pure compound. The dried and ground leaves and branch samples were collected and extracted with ethanol, respectively. The tested of anti-lung cancer, anti-HSV-1 and cytotoxicity (Vero cell) were used GFP-based method. Five antimicrobial agents, were tested by optical density microplate. The antioxidation test was used DPPH method, measured absorption at wavelength of 517 nm. The isolation of pure compounds was successively separated by using chromatographic techniques. The identification of structure of it was using spectroscopic techniques. The statistics used in the research were mean, percentage, standard deviation, and t-test. According to preliminary studies, it was found that ethanolic leaves extracts showed interesting anti-lung cancer activity at 50 μg / ml with inhibition percentage of 99.49 ± 0.00. In addition, the leaves extract showed moderate cytotoxicity and antioxidant activity. The compound-1 was isolated from ethyl acetate leaves extract. Its structural identification was successively identified by compared with literature of Infrared spectral data and Nuclear Magnetic Resonance Spectral data. Conclusion, Compound-1 was β-sitosterol, showed anti-lung cancer activity of IC_{50} of more than 50 μg/ml.

Keywords : *Dendrocnide stimulants*, biological activities, β-sitosterol

บทนำ

ตำแยช้างหรือช้างร้อง (ภาพที่ 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Dendrocnide stimulans* จัดอยู่ในวงศ์ Urticaceae ชื่อพื้นเมืองเรียกว่า ตำแยช้างหรือสามแก้ว ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เป็นพืชสมุนไพรเป็นพืชที่มีหนาม ไม้พุ่ม ต้นขนาดเล็ก สูงได้ถึง 5 เมตร ผลัดใบ เปลือกสีเทา และมีประช่องระบายอากาศทั่วไป ใบเดี่ยวเรียงสลับหรือเวียนกัน ทรงใบรูปหอกกลับ โคนใบสอบ ปลายสุดของใบเรียวแหลม ผิวใบด้านล่างเป็นคราบขาว ดอกเล็กสีขาวปนเหลือง หรือสีม่วงอ่อน ออกรวมกันเป็นช่อยาวๆ ห้อยตามง่ามใบ ผลเล็ดกลมสีเขียว ขึ้นตามที่ชื้นในป่าทึบที่มีแสงสว่างปานกลาง แต่ถ้าเป็นป่าดงดิบ ต้นตำแยช้างจะขึ้นรวมกันอยู่ เป็นเปลือกต้น กิ่ง และราก เอาไปต้มอาบแก้อาการคันจากยางรัก (คนเมือง) ทั้งต้น ต้มน้ำดื่ม รักษาอาการโรคเอดส์ (กะเหรี่ยง) หากสัมผัสโดนต้นจะมีอาการคัน (Khamfachuea, *et al*., 2010) ถ้าสัมผัสกับผิวของเราจะทำให้เจ็บปวด ปวดแสบปวดร้อน ส่วนที่เป็นพิษคือ ขนหรือเกล็ดตามส่วนต่างๆ เช่น ใบ ช่อดอก จะทำให้เกิดอาการคัน ผิวหนังไหม้เกรียม หรือแดง เป็นผื่นและปวดมาก วิธีแก้เมื่อโดนพิษของตำแยช้างก็คือ ใช้ขี้ผึ้ง เช่น ยาหม่อง ถู ทา ตรงบริเวณปวดแสบปวดร้อน ห้ามล้างด้วยน้ำเด็ดขาด (Phengklai, 2018)

ภาพที่ 1 ตำแยช้าง

เพื่อนำสมุนไพรท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงสนใจนำสารสกัดจากพืชสมุนไพรทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและศึกษาหาสารบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ที่สำคัญและอาจนำไปสู่การพัฒนาโครงสร้างและนำไปสู่การนำมาใช้เป็นยารักษาโรคได้ เนื่องจากตำแยช้างพืชสมุนไพรหายากและมีพิษ จึงทำให้ยังไม่มีการศึกษาการแยกสารและฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดตำแยช้าง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมในการเสาะหายาต้านมะเร็งปอดได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>*การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น*</u> พืชตัวอย่างตำแยช้างที่ใช้ในการศึกษา เก็บมาจากบ้านในวงเหนือ ตำบลในวงเหนือ อำเภอละอุ่น จังหวัดระนอง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ตรวจเอกลักษณ์ด้วยรูปวิธานและเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี นำกิ่งและใบตำแยช้างมาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ บดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วยเอทานอล 3 วัน 3 ครั้ง นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation) จะได้สารสกัดเอทานอล เก็บสารสกัด 2 ส่วน ไว้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในข้อ 2

2. <u>*การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด*</u>

2.1 การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ทดสอบโดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ด้วยวิธี Rasazurin microplate assay (REMA) (Brien *et al*, 2000) ดังนี้ บ่มเชื้อมะเร็งในอาหาร (complete medium, RPMI-1640 Supplemented) ที่ประกอบด้วย 15% heat-inactivated fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, 2.5 g/L Glucose และ 2.2 g/L sodium bicarbonate) ที่สภาวะ 37 ^{0}C ใน 5% CO_2 นำเซลล์มะเร็งจำนวน 6.7×10^4 cells ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อชนิด 384-well เติมสารสกัด 5 μl เติม cell suspension 45 μl บ่มที่ 37 ^{0}C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 5 วันจากนั้นเติม 0.0625 mg/ml สารละลาย resazurin แล้วบ่มที่ 37 ^{0}C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm พลังงานกระตุ้นและที่ความยาวคลื่น

590 nm สำหรับการถ่ายเทพลังงาน โดยอาศัย bottom-reading mode ของเครื่อง SOFT Max fluorometer (Molecyla Devices, USA) ทำการทดลองสองซ้ำ และคำนวณค่าการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง ดังสมการ

$$\%\text{การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็ง} = (FU_T/FU_C) \times 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

เมื่อ FU_T and FU_C คือค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงแต่หลุมของเซลล์เมื่อเติมสารสกัดหรือสารควบคุมเชิงบวกและสารควบคุมเชิงลบ ตามลำดับ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ และฤทธิ์ต้านเริมชนิด 1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity against primate cell line (Vero)) (Hunt *et al*., 1999) กำหนดความเข้มข้นเบื้องต้น 50 μg/ml การความเป็นพิษต่อเซลล์นี้เป็นวิธีที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clonetech) โดยมีวิธีการสรุปดังนี้ นำสารสกัดที่เตรียมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 500 μg/ml ปริมาตร 5 ml ลงในถาดหลุมชนิด 384 หลุม เติมสารละลายที่มีเซลล์ปกติ (Vero cell) จำนวน $3.3x10^4$ cell/ml ปริมาตร 45 μl บ่มเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 37 °C ที่สภาวะ 5% CO_2 วัดการเรืองแสงที่สภาวะกระตุ้นและการปล่อยพลังงานที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices, USA) โดยสารอีลิปติซีน (Ellipticine) เป็นสารมาตรฐาน และร้อยละ 5 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในน้ำกลั่นเป็นสารละลายควบคุม คำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยสูตร เมื่อ FU_T = การเรืองแสงของเซลล์ที่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน และ FU_C = การเรืองแสงของเซลล์ที่ไม่มีสารสกัดหรือสารมาตรฐาน

$$\%\text{ ความเป็นพิษต่อเซลล์ } = [1-(FU_T/FU_C)] \text{ X } 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2)$$

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมชนิด 1 (*Herpes simplex* virus type 1, HSV-1) โดยเตรียมร้อยละ10 สารตัวอย่างใน DMSO แล้วเติมในถาดหลุมชนิด 96 หลุม ปริมาตร 10 μl /หลุม เติม 190 μl ของโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (GFP) และเซลล์ปกติ (Vero cell) $1X10^5$ cells /ml ผสมกับ $5x10^5$ PFU / ml ของเชื้อไวรัสเริม (HSV-1, ATCC VR 260) ในแต่ละหลุม แล้วนำถาดหลุมที่มีเชื้อไวรัสไปบ่มในตู้อบที่มีความชื้นร้อยละ 5 CO_2 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 วัน วัดค่าการเรืองแสงโดยใช้ SpectraMax M 5 ที่ความยาวคลื่น 485 และ 535 nm สารมาตรฐานเชิงบวกและเชิงลบได้แก่ ยาอะไซโคลเวียร์ (acyclovir) และ 5% DMSOในน้ำกลั่น ตามลำดับ และคำนวณร้อยละของการยับยั้งไวรัสโดยใช้สมการต่อไปนี้ :

$$\%\text{ การยับยั้งไวรัส} = \{1 - [(FU_C\text{-}FUV_T) / (FU_C\text{-}FUV_C)]\} \text{ x } 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

เมื่อ FU_C คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ไม่ติดเชื้อไวรัส FUV_T คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัสที่มียาหรือสารสกัด และ FUV_C คือ ค่าเฉลี่ยการเรืองแสงของเซลล์ปกติที่ติดเชื้อไวรัสที่ไม่มียาหรือสารสกัด ค่า IC_{50} จะทดสอบเมื่อสารสกัดแสดงร้อยละการยับยั้งมากกว่า 50 ที่ความเข้มข้นความเข้มข้นเบื้องต้น 50 μg/ml หาจาก

กราฟของการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเริมที่ความเข้มข้นเจือจางต่างๆ 6 ความเข้มข้นและเจือจางแตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นเป็นสามเท่า วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SOFTMax Pro software (Molecular device)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ในการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Wikler, 2006, Wikler *et al*., 2006) นี้ โดยห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ด้วยวิธีการวัดความหนาแน่นของแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml อะมิคาซิน (amikacin) ออฟโฟลซาซิน (ofloxacin) และแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก ดังนี้ การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดสอบ 5 ชนิด ดังนี้ *A. baumannii E. coli K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* และยีสต์ *C. albicans* ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร tryptic soy agar (TSA) อุณหภูมิ 37 ^{0}C 1 คืน แยกเชื้อcolony เดี่ยว ด้วยวิธี streak plate 5 ml Mueller hinton broth (MHB) เขย่าบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง วัดค่า OD_{600} ของcell suspension ได้ 0.1 (มีค่าสมมูลกับ 7X10^6 CFU/ml) นำเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนี้ไปทดสอบ ดังนี้เตรียม 384-well จำนวน 3 ถาด นำสารสกัดเอทานอลของใบและกิ่งตำแยช้าง ปริมาตร 5 μl รวมทั้งสารควบคุมเชิงบวก (positive control) และสารควบคุมเชิงลบ (negative control) เติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 45 μl บ่มที่ อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำไปวัดค่า OD_{600} โดยหักลบค่า OD_{600} ของ blank ก่อนคำนวณ ตามสูตร

$$\% \text{ การต้านเชื้อจุลินทรีย์} = [1-(OD_T/OD_C)] \times 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (4)$$

เมื่อค่า OD_T และ OD_C คือ ค่า OD_{600} ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสารสกัดหรือสารควบคุมเชิงบวก และเชื้อจุลินทรีย์ที่มี 0.5% DMSO ตามลำดับ ถ้าสารสกัดมีค่าร้อยละการยับยั้งมากกว่า 90 จะคำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC, lowest concentration of extract exhibition 90% inhibition)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของสารสกัดด้วยวิธี DPPH (Singchai *et al*., 2017) เตรียมสารละลาย 0.02 mM 1, 1-diphenyl-2-picryl hydrazine (DPPH) 0.2 ml และสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5000 μg/ml ในเมทานอล 0.1 ml และเมทานอล 3.7 ml ลงในเมทานอล (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV) ที่ความยาวคลื่น 517 nm วิตามินซีเป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่าร้อยละการต้านออกซิเดชันจากสูตร

$$\% \text{ การต้านออกซิเดชัน} = (A_0-A_1)/A_0 \times 100 \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (5)$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนของสารควบคุม A_1 = ค่าการดูดกลืนของสารตัวอย่าง ถ้าสารสกัดแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 5000 μg/ml จะทำการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสกัด โดยการเทียบค่าในกราฟระหว่างความเข้มข้นและค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

3. การเตรียมสารสกัดสำหรับแยกสารบริสุทธิ์ นำตัวอย่างแห้งและบดละเอียดของใบตำแยช้าง น้ำหนัก 600 กรัม สกัดหมักแช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เรียงลำดับจากขั้วต่ำ ได้แก่ เฮกเซน เป็นเวลา 3 วัน 3 ครั้ง นำสารละลายระเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ จนได้สารสกัดเหนียวหนืด นำส่วนกากหมักแช่ต่อโดยเพิ่มขั้วของตัวทำละลาย ด้วยเอทิล แอซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ จนได้สารสกัดเฮกเซน เอทิล แอซีเตท และเมทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดทั้งหมดทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ความ

เข้มข้นเท่ากับ 50 μg/ml ในฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและเลือกสารสกัดที่น่าสนใจแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป โดยใช้วิธีการทดสอบวิธีเดียวกับการทดสอบสารสกัดเบื้องต้น

เนื่องจากสารสกัดเอทิลแอซีเตทและเฮกเซนใบตำแยช้างมีฤทธิ์ทางชีวภาพใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดเอทิล แอซีเตทมีองค์ประกอบพฤกษเคมีมากกว่าสารสกัดเฮกเซน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงนำสารสกัดเอทิลแอซีเตท (4.001 กรัม) แยกด้วยเทคนิกทางโครมาโทรกราฟี ขนาดคอลัมน์ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 เซนติเมตร และการตรวจสอบเพื่อรวมกลุ่มสารหรือการตรวจสอบสารว่าบริสุทธิ์ในเบื้องต้นใช้ TLC ส่องภายใต้ความยาวคลื่นช่วง UV ที่ 254 และ 366 นาโนเมตร พร้อมกับสังเกตการณ์ย้อมสีด้วย 10% กรดซัลฟิวริกเข้มข้นในเมทานอลควบคู่ไปด้วย หลังจากรวมส่วนย่อยทั้งหมด 3 ส่วน พบว่าส่วนย่อยรหัสที่ H1 เมื่อตรวจสอบลักษณะลายนิ้วมือจากแผ่น TLC พบสารมีขั้วต่ำมาก เมื่อตรวจสอบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แสดงค่า R_f 0.9-1.0 และส่วนย่อยรหัส H3 มีของแข็งปนของเหลวและเมื่อตรวจสอบลักษณะลายนิ้วมือจากแผ่น TLC พบสารหลายชนิดและมีขั้วไม่แตกต่างกันและมีขั้วต่ำมาก เมื่อตรวจสอบด้วยตัวทำละลายเฮกเซน แสดงค่า Rf 0.8-1.0 ส่วนย่อย H2 น้ำหนัก 0.318 กรัม เมื่อกรองและล้างผลึกด้วยเมทานอล ได้สาร 1 น้ำหนัก 18.0 มิลลิกรัม ไม่ดูดกลืนแสงยูวี แต่ทำปฏิกิริยากับ 10% H_2SO_4 in MeOH ได้สีม่วง และสารที่ดูดกลืนคลื่นแสงและเรืองแสงยูวีที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm ตามลำดับ ตรวจสอบเอกลักษณ์สารบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบข้อมูล NMR-spectroscopy จุดหลอมเหลว 143 ^{0}C ผงสีขาว มีค่า R_f เท่ากับ 0.65_ในระบบตัวทำละลาย เอทิลแอซีเตทต่อเฮกเซน อัตราส่วน 1:3 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน ไม่ละลายในเมทานอลและน้ำ

4. การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ของสารบริสุทธิ์เช่นเดียวกับการทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัด กำหนดความเข้มข้นเบื้องต้นเท่ากับ 50 μg/ml ถ้าสารบริสุทธิ์แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดมากกว่าร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml จะทำการทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์

ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลใบและกิ่งตำแยช้างด้วยวิธีที่ติดฉลากโปรตีนเรืองแสงสีเขียวชนิด pEGFP-N1 (Clonetech) ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml พบว่าสารสกัดใบและกิ่งแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด ร้อยละการต้าน 94.99 ± 0.00 และ 62.67± 0.12 ตามลำดับ สารสกัดเอทานอลใบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ร้อยละ 50.25 ± 0.33 แต่สารสกัดเอทานอลกิ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าร้อยละ 50 สารสกัดเอทานอลใบและกิ่งตำแยช้างไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ชนิด *A. baumannii E. coli K. pneumoniae P. aeruginosa* และ*C. albicans* และที่ความเข้มข้น 5000 μg/ml สารสกัดใบแสดงร้อยละการต้านออกซิเดชันร้อยละ 89.0 ± 1.0 สารสกัดเอทานอลกิ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่าร้อยละ 50 สารสกัดเอทานอลใบแสดงร้อยละการต้านออกซิเดชัน 89.0 ± 1.0 ส่วนสารสกัดเอทานอลกิ่งตำแยช้าง แสดงร้อยละการต้านออกซิเดชันน้อยกว่า ร้อยละ 50 และในการทดลองสารมาตรฐานเชิงบวกแสดงฤทธิ์ร้อยละ 100 ± 0.0 สารสกัดทั้งสองส่วนแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารสกัดใบและกิ่งตำแยช้าง

สารสกัด	ร้อยละการยับยั้ง ±SD			
	ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด	ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ	ฤทธิ์ต้านไวรัสเริมชนิด 2	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน*
ใบ	99.49±0.00	50.25±0.33	4.16±0.11	89.0±1.0
กิ่ง	62.67±0.12	1.92±0.00	2.18±0.24	23.5±1.7
อิลลิปติซีน	100.00±0.00	100.00±0.00	ND	ND
โดโซรูบิซิน	100.00±0.00	ND	ND	ND
อะไซโคลเวียร์	ND	ND	100.00±0.00	ND
วิตามินซี	ND	ND	ND	100.00±0.00

* ความเข้มข้นที่ทดสอบ 5,000 μg/ml

ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml สารสกัดส่วนใบและกิ่งไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ แต่สารมาตรฐานเชิงบวกอะมิคาซิน ออฟโฟลซาซิน และแอมโฟเทอริซินบี มีค่า MIC_{90} ± SD ระหว่าง 0.0156 ± 0.0022 - 6.25 ± 0.23 μg/ml (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัด	ร้อยละการยับยั้ง± SD				
	A. baumannii	*P.aeruginosa*	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*C. albicans*
ใบ	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	24.02±0.16
กิ่ง	0.00±0.00	0.00±0.00	4.44±0.20	0.00±0.00	18.50±0.22
สารมาตรฐานเชิงบวก	ค่า MIC_{90} ± SD μg/ml)				
อะมิคาซิน	6.25±0.23	0.781±0.213	2.00±0.21	0.500±0.090	-
ออฟโฟลซาซิน	0.391±0.013	0.391±0.100	0.0156±0.0022	1.00±0.22	-
แอมโฟเทอริซินบี	-				0.0981±0.0021

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านชีวภาพของสารสกัดส่วนใบและส่วนกิ่งตำแยช้างพบว่าสารสกัดส่วนใบแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจมากกว่ากิ่ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงสกัดสารแยกส่วนตามความมีขั้วของสารพฤกษเคมีในใบตำแยช้าง เพื่อตรวจสอบกลุ่มสารเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดจำแนกตามกลุ่มสารตามความมีขั้วได้ผลดังตารางที่ 3 พบว่า สารสกัดเมทานอลใบตำแยช้าง มีร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้งสูงที่สุด 10.8 และสูงกว่าสารสกัดเอทิล แอซิเตท และเฮกเซน สารสกัดเอทิลแอซีเตทแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดดีที่สุด

ตารางที่ 3 น้ำหนัก ร้อยละโดยน้ำหนักของสารสกัดใบตำแยช้างต่อน้ำหนักพืชแห้ง และฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (NCI-H187)และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

สารสกัดใบตำแยช้าง	น้ำหนัก (g)	% W/W	IC_{50}± SD (μg/ml)	
			ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด*	ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน**
เฮกเซน	9.001	1.8	11.35±2.83[a]	22.22±2.37
เอทิล แอซิเตท	8.872	1.8	7.82±1.18[a]	13.54±1.78
เมทานอล	53.586	10.8	>50.00[b]	3.46±0.45
อิลลิปติซีน	-	-	3.48±0.83[c]	-
โดโซรูบิซิน	-	-	0.110±0.059[d]	-
วิตามินซี				100.00±0.00

* อักษรที่แตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

** ที่ความเข้มข้น 5,000 μg/ml

สารสกัดเฮกเซนของใบตำแยช้างพบเฉพาะสารกลุ่มคูมารินและสเตียรอยด์ สารสกัดเอทิล แอซิเตทพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คูมาริน และสเตียรอยด์ ส่วนสารกัดเมทานอลพบสารพฤกษเคมีมากที่สุดพบทั้งกลุ่มแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน และสเตียรอยด์ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำที่สุด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมีของสารสกัดจากใบตำแยช้าง

สารสกัด	กลุ่มสารพฤกษเคมี*							
	แอลคาลอยด์	คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	แอนทรา-ควิโนน	ฟลาโวนอยด์	ซาโปนิน	แทนนิน	คูมาริน	สเตียรอยด์
เฮกเซน	-	-	-	-	-	-	++	++
เอทิล แอซิเตท	-	-	-	+	-	-	++	++
เมทานอล	+	-	-	++	-	-	++	+

* - หมายถึง ตรวจสอบไม่พบ + หมายถึง ตรวจสอบพบปริมาณน้อย ++หมายถึง ตรวจสอบพบปริมาณมาก

จากข้อมูล IR สเปกตรัม ใน $CHCl_3$ ที่ความถี่ 3200 cm^{-1} ของสาร 1 พบพีคหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) 2872 2837 cm^{-1} เป็นพีคของไฮโดรคาร์บอนชนิดพันธะเดี่ยว (-CH stretch) ที่ 1450 cm^{-1}. เป็นพีคของไฮโดรคาร์บอน (-CH bending vibration) และ 972 เป็นพีคของไฮโดรคาร์บอนชนิดพันธะคู่ (=CH) ข้อมูล ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) พบสัญญาณ 5.35 (1H,t, J=2.0 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3) และ สัญญาณของ CH_3 6 สัญญาณ ที่ δ 0.68 0.82 0.84 0.85 0.91 และ 1.02 ppm เป็นโปรตอนตำแหน่งที่ 18 27 29 26 21 และ 19 ตามลำดับ ข้อมูล ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz, $CDCl_3$) พบ 29 คาร์บอน ข้อมูล DEPT 90 และ 135 กับ ^{13}C-NMR พบว่ามี CH 9 ตำแหน่ง ได้แก่ 121.7, 71.8, 29.2, 50.2, 56.8, 56.1, 39.8, 50.2,

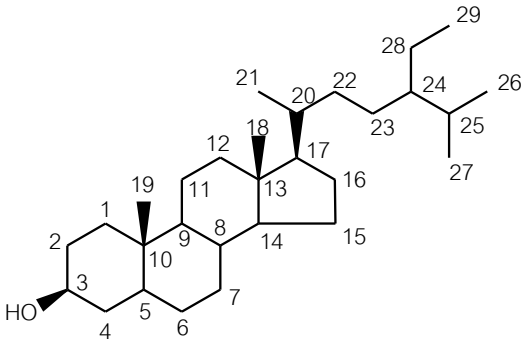
23.1 ppm CH_2 9 ตำแหน่ง ได้แก่ 37.3, 31.7, 45.9, 31.9, 24.3, 39.8, 23.1, 28.2, 34.0, 21.1, 26.1 ppm CH_3 6 ตำแหน่ง ได้แก่ 11.9, 19.4, 19.8, 18.8, 19.0, 12.0 ppm และ C ทั้งหมด 5 ตำแหน่ง ได้แก่ 140.8, 36.1, 42.3 ppm

ตารางที่ 5 ข้อมูล ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) ของสาร 1 และ β-sitosterol

ตำแหน่งที่	ค่าเคมิคัลชิฟ (ppm)		ตำแหน่งที่	ค่าเคมิคัลชิฟ (ppm)	
	DS-1	β-sitosterol*		DS-1	β-sitosterol *
1	37.3	36.7	16	28.2	28.9
2	31.7	29.7	17	56.1	56.0
3	71.8	72.0	18	11.9	12.1
4	45.9	42.4	19	19.4	19.1
5	140.8	140.9	20	34.0	35.3
6	121.7	121.3	21	19.8	23.1
7	31.9	31.7	22	34.0	33.9
8	29.2	29.2	23	21.1	29.0
9	50.2	50.0	24	50.2	51.3
10	36.1	36.2	25	23.1	23.0
11	24.3	24.3	26	18.8	20.1
12	39.8	39.8	27	19.0	20.8
13	42.3	40.4	28	26.1	25.3
14	56.8	56.9	29	12.0	12.1
15	23.1	24.3			

หมายเหตุ * ที่มา Govindarajan and Sarada, 2011

จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและสมบัติทางกายภาพของสาร 1 สอดคล้องกับสาร β-sitosterol ดังนั้นจึงสรุปว่าสาร 1 คือ สาร β-sitosterol (ภาพที่ 2) สารนี้เป็นสารไฟโตสเตียรอยด์ (phytosterol) ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml สาร 1 แสดงค่าร้อยละ ± SD การต้านมะเร็งปอด เท่ากับ 14.68 ± 1.45 ยาอิลลิปติซีนและโดโซรูบิซินแสดงร้อยละ 100 ± 0.00 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการเพิ่มเติมข้อมูลทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของตำแยช้างครั้งแรก



ภาพที่ 2 DS-1

วิจารณ์ผลการวิจัย

เนื่องจากตำแยช้างเป็นพืชพิษ (Khamfachuea, 2010) จะเกิดอาการคันเมื่อสัมผัสขนตามใบและกิ่งพบในหมู่บ้านของชาวกะหร่าง อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี (Prachuabaree, 2008) นำยอดอ่อนมาย่างไฟใช้เป็นอาหาร จึงยังไม่มีการนำมาศึกษาทางด้านระดับความเป็นพิษต่อมนุษย์ ด้านพฤกษเคมี และด้านฤทธิ์ทางชีวภาพทางการเกษตรและทางการแพทย์ ในการวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานด้านพฤกษเคมีเบื้องต้นของใบตำแยช้าง และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารพฤกษเคมีที่แยกได้ ซึ่งสอดคล้องกับพืชสกุลเดียวกัน *D. sinuata* พบในอินเดียพืชนี้ถูกใช้เป็นสมุนไพรรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ และจากการวิจัยสารสกัดเอทานอลของใบพืชแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ *E. coli P. aeruginosa* และ *E. aerogenes* ด้วยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ถึง 100 แต่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus B. subtilis* และ *Micrococus luteus* ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Tanti *et al*., 2010) สารสกัดเอทานอลใบตำแยช้างที่ความเข้มข้น 50 μg/ml ไม่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิดได้แก่ *A. baumannii E. coli K. pneumoniae P. aeruginosa* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml ด้วยวิธีการวัดความหนาแน่นของแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm (OD_{600}) เนื่องจากสารสกัดเอทานอลส่วนใบของตำแยช้างแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดสูงและน่าสนใจที่ ที่ความเข้มข้น 50 μg/ml จึงสกัดสารพฤกษเคมีของใบตำแยช้างแยกตามความมีขั้วของสารได้ 3 กลุ่มขั้วต่ำ ขั้วปานกลางและขั้วสูงตามชนิดตัวทำละลายที่ใช้สกัด พบว่าสารสกัดเฮกเซนและเอทิลแอซีเตทมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สนใจมากกว่าสารสกัดเมทานอล และกลุ่มสารที่คาดว่าแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจคือกลุ่มสเตียรอยด์ สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดเฮกเซนคือ β-sitosterol สารพฤกษเคมีชนิดนี้พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด มนุษย์ถ้าบริโภคไม่เกิน 400 mg ต่อวันสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และยับยั้งการดูดซึมคลอเรสเตอรอลได้ (Saeidnia *et al*., 2014) และนอกจากนี้ยังใช้ในการรักษาโรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง และระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเป็นต้น ดังนั้นการวิจัยนี้เพิ่มข้อมูลด้านการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดในหลอดทดลอง

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดเอทานอลเบื้องต้นส่วนใบตำแยช้างแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งปอด ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและการต้านออกซิเดชันสูงกว่าสารสกัดจากส่วนกิ่งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แต่สารสกัดทั้งสองส่วนไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิด 2 และเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ดังนี้ *A. baumannii E. coli K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa*

และยีสต์ *C. albicans* สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดเอทิลแอซีเตทส่วนใบตำแยช้างคือ β-sitosterol ซึ่งเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดที่ความเข้มข้น 50 μg/ml ต่ำ ดังนั้นควรมีการศึกษาหาสารบริสุทธิ์อื่นจากสารสกัดเอทิล แอซีเตท และจากสารสกัดส่วนอื่นควบคู่กับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น เพื่อเป็นแนวทางการเสาะหาสารออกฤทธิ์ทางยาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

เอกสารอ้างอิง

Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pogan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye of the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry, 267*, 5421-5426.

Govindarajan, P., & Sarada, D.V.L. (2011). Isolation and characterization of stigmasterol and β-sitosterol from *Acacia nilotica* (l.) *Delile* ssp Indica (benth.). *Journal of Pharmacy Research, 4*(10), 3601-3602.

Hunt, L., Jordan, M., De Jesus, M., & Wurm, F.M. (1999). GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode. *Biotechnol and Bioeng, 65*, 201-5.

Khamfachuea, K., Trisonthi, P., & Trisonthi, C. (2010. Ethnobotany of the Karen at Ban Chan and Chaem Luang subdistricts, Mae Chaem district, Chiang Mai province. *THAI JOURNAL OF BOTANY 2* (Special Issue), 275-297. (inThai)

Phengklai, C. (2018). *Toxic plants in Thailand (1).* Toxicology center. Botany Department, Office of the Royal Society. Retrieved August 15, 2018, from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=86.

Prachuabaree, L. (2008). Medicinal plants of Karang hill tribe in ban Pong-Lueg, Kaeng Krachan District, Phetchaburi Province. Master of Pharmacy program of Pharmacognosy. Silpakorn University. (inThai)

Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R., & Abdollahi, M. (2014). The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European Journal of Medicinal Plants, 4*(5), 590-609.

Singchai, B., Daengkhwanthong, U., & Pongputthachat, D. (2017). Phytochemicals and Biological Activities of *Opuntia elatior* Fruit. *Thai Science and Technology Journal, 26*(2), 236-245. (inThai)

Tant,i B., Buragohain, K. A., Gurung, L., Kakati, D., Das, A.K., & Borah, S.P. (2010). .Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Dendrocnide sinuate* (Blume) Chew leaves - A medicinal plant used by ethnic communities of North East India. *Indian Journal of Natural products and Resources., 1*(1),17-21.

Wikler, M.A. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 16th ed Informational Supplement. USA: Pennsylvania.

Wikler, M.A., Cockerill, F.R., Craig, W.A., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Hecht, D.W., Hindler, J.F., Ferraro, M.J., Swenson, J.M., Low, D.E., Sheehan, D.J., Tenover, F.C., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P.& Zimmer, B.L. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 7th Edition. USA: Pennsylvania.