



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชั้นจาก  
ชั้นโรงจากแหล่งต่างๆ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจาก  
พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

(The Investigation of Antiproliferative Activity of Stingless Bee Propolis  
Extracts from Different Surroundings under the plant Genetic  
Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness  
Princess Maha Chakri Sirindhorn)

เกศิขกรหญิง ดร.นภัสสร ฉันทธำรงค์ศิริ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

สัญญาเลขที่ 4/2559 (เพิ่มเติม อพ.สธ.)

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชันจาก  
ชันโรงจากแหล่งต่างๆ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุ์พืชอันเนื่องมาจาก  
พระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

(The Investigation of Antiproliferative Activity of Stingless Bee Propolis  
Extracts from Different Surroundings under the plant Genetic  
Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness  
Princess Maha Chakri Sirindhorn)

เภสัชกรหญิง ดร.นภัสสร ฉันทธำรงค์ศิริ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม พ.ศ. 2558

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

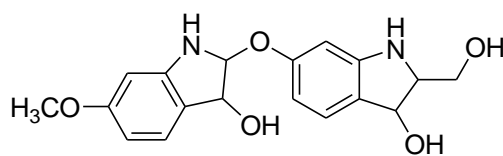
งานวิจัยเรื่องการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชันโรงจากชั้นโรงจากแหล่งต่าง ๆ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (The Investigation of Antiproliferative Activity of Stingless Bee Propolis Extracts from Different Surroundings under the plant Genetic Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn) ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 4/2559 (เพิ่มเติม)

**ชื่องานวิจัย** การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงจากแหล่งต่าง ๆ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

**ผู้เขียน** เกษัชกรหญิง ดร.นภัสสร ฉันทธำรงค์ศิริ

### บทคัดย่อ

ชั้นจากชั้นโรงเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงชั้นโรงของเกษตรกร เพื่อใช้ในการผสมเกสรเพื่อเพิ่มผลผลิตของผลไม้เศรษฐกิจ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของสารสกัดชั้นจากชั้นของชั้นโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pegdeni* ที่เก็บได้จากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ ป่าชายเลน สวนส้มโอ และสวนสมุนไพร พบว่าสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งดับ (HepG2 cell) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (SK-MEL-28 cell) ได้ดี ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 63.43 และ 18.71  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน doxorubicin ( $IC_{50}$  เท่ากับ 36.34 และ 5.95  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ) และแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติในระดับต่ำ ( $IC_{50}$  เท่ากับ 213.85  $\mu\text{g/mL}$ ) จึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และจากการแยกสารด้วยวิธี chromatography ได้แก่ flash column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , dichloromethane : methanol, 9:1 ตามด้วย  $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate, 1:1) และ HPLC (C18, 10-35% water in methanol, flow rate 2.3 mL/min, RT = 8.5 min) ได้สารบริสุทธิ์รายการแรกเป็นสารในกลุ่ม indole alcohol ได้แก่ 1*H*-indole-2-methanol-3-ol,2,3-dihydro-6-methoxy (**1**) สารบริสุทธิ์รายการที่ 2 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ dimethoxy ได้มาจากการแยกสารด้วย HPLC (C18, 55% water in acetonitrile, flow rate 2.6 mL/min, RT = 14.6 min) และสารบริสุทธิ์รายการที่ 3 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม terpene ได้มาจากการแยกสารด้วย HPLC (C18, 10% water in acetonitrile, flow rate 2.0 mL/min, RT = 15.4 min)



(1)

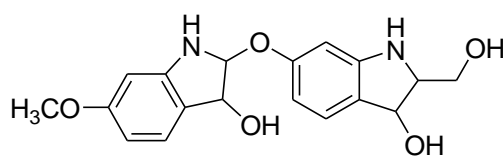
**คำสำคัญ:** ชั้น, ชั้นโรง, ชั้นโรงสายพันธุ์ขุนเงิน, ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

**Research Title** The Investigation of Antiproliferative Activity of Stingless Bee Propolis Extracts from Different Surroundings under the plant Genetic Conservation Project of the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

**Author** Naphatson Chanthathamrongsiri

### ABSTRACT

Stingless bee, *Tetragonula pegdeni*, is popular to culture by the farmers in Chanthaburi province because it can increase productivity of fruit in the orchard. Propolis is a by product from stingless bee culture. The cytotoxicity of propolis extracts from 3 sources, mangrove forest, herbal garden and *Citrus maxima* orchard, are investigated. The propolis extract from *Citrus maxima* orchard exhibits potent cytotoxicity to HepG2 and SK-MEL-28 cells with  $IC_{50} = 63.43$  and  $18.71 \mu\text{g/mL}$ , respectively, and using doxorubicin as standard ( $IC_{50} = 36.34$  and  $5.95 \mu\text{g/mL}$ , respectively). This extract also shows low toxicity to human fibroblast cell with  $IC_{50} = 213.85 \mu\text{g/mL}$ , lead to identify chemical constituents by chromatographic techniques. The extract was separated by flash column chromatography ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : methanol, 9:1 and  $\text{SiO}_2$ , hexane:ethyl acetate, 1:1) and purified by HPLC (C18, 10-35% water in methanol, flow rate 2.3 mL/min, RT = 8.5 min) while compound 2 was purified by HPLC (C18, 55% water in acetonitrile, flow rate 2.6 mL/min, RT = 14.6 min). Compounds 1 and 2 were identified as 1*H*-indole-2-methanol-3-ol,2,3-dihydro-6-methoxy and dimethoxy derivative, respectively by ESIMS and other spectroscopic data.



(1)

**Key word:** propolis, stingless bee, *Tetragonula pegdeni*

สารบัญเรื่อง  
(Table of Contents)

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	1
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)	7
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussions)	12
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง (Conclusions)	26
รายงานสรุปการเงิน	29
บรรณานุกรม (Bibilography)	31
ภาคผนวก (Appendix)	33
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	67
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi

**สารบัญตาราง**  
**(List of Tables)**

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดชั้นจากตัวอย่างชั้นจากแหล่งต่าง ๆ	12
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ของสารสกัดชั้นจากแหล่งต่าง ๆ	15
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของ fraction ที่ได้จากสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ	15
ตารางที่ 4 ข้อมูล $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ NMR ของสาร TP5/21	20
ตารางที่ 5 ข้อมูล $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ NMR ของสาร TP5/23_1 (A+B)	21
ตารางที่ 6 ข้อมูล $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ NMR ของสาร TP5/23_1 (A+C)	22
ตารางที่ 7 ข้อมูล $^1\text{H}$ และ $^{13}\text{C}$ NMR ของสาร TP5/25_1	24

**สารบัญภาพ**  
(List of Illustrations)

	<b>หน้า</b>
ภาพที่ 1 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป	2
ภาพที่ 2 แผนภาพการกำจัด wax และการสกัดตัวอย่างชั้นจากชั้นโรง	10
ภาพที่ 3 ตัวอย่างชั้นของชั้นโรงจากสวนสมุนไพร	12
ภาพที่ 4 ตัวอย่างชั้นของชั้นโรงจากป่าชายเลน	13
ภาพที่ 5 ตัวอย่างชั้นของชั้นโรงจากสวนส้มโอ	13
ภาพที่ 6 TLC chromatogram TP5/1 – TP5/4	14
ภาพที่ 7 TLC chromatogram TP5/5 – TP5/10	16
ภาพที่ 8 TLC chromatogram TP5/15 – TP5/20	16
ภาพที่ 9 HPLC chromatogram TP5/18	17
ภาพที่ 10 HPLC chromatogram TP5/23	18
ภาพที่ 11 HPLC chromatogram TP5/25	18
ภาพที่ 12 แผนภาพการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ	19
ภาพที่ 13 Partial structure และ chemical structure ของ TP5/21	20
ภาพที่ 14 Chemical structure ของ TP5/21 derivative	21
ภาพที่ 15 Chemical structure ของ TP5/23_1 (A+B)	23
ภาพที่ 16 Chemical structure ของ TP5/23_1 (A+C)	23



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

## (List of Abbreviations)

$\delta_{\text{H}}$	chemical shift of proton (ppm)
$\delta_{\text{C}}$	chemical shift of carbon (ppm)
$\lambda_{\text{max}}$	maximum wavelength
$\nu_{\text{max}}$	maximum wave number
br	broad (for NMR signals)
COSY	correlation spectroscopy
d	doublet (for NMR signals)
2D	two dimensional
HRESIMS	high resolution electron sprayed ionization mass spectrometry
HMBC	heteronuclear multiple bond multiple quantum correlation
HPLC	high performance liquid chromatography
IC50	inhibitory concentration at 50% of test subject
IR	infrared
$J$	coupling constant
$m/z$	mass over charge ratio
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium
rpm	round per minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 medium
UV	ultra violet

# บทที่ 1

## บทนำ

### (Introduction)

#### ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันทั่วโลกมีความสนใจใช้สมุนไพรมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประเมินการว่าตลาดสมุนไพรรวมทั่วโลกมีมูลค่ามากกว่า 4.4 ล้านล้านเหรียญสหรัฐอเมริกา และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี สำหรับประเทศไทยนั้น ประชาชนส่วนใหญ่มักหันมาดูแลสุขภาพของตนเองด้วยสมุนไพรรวมอย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปแบบของยารักษาโรค อาหารเสริมสุขภาพ และเครื่องสำอาง ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุข รายงานว่าในปี พ.ศ. 2555 ตลาดยาสมุนไพรรวมในประเทศไทยมีมูลค่าอยู่ที่ประมาณ 60,000 ล้านบาท แต่วัตถุดิบในการผลิตจากสารสกัดสมุนไพรรวมส่วนใหญ่ล้วนแต่นำเข้าจากต่างประเทศ ทั้งที่ประเทศไทยก็เป็นหนึ่งในประเทศที่มีความหลากหลายทางสมุนไพรรวมสูงทั้งวัตถุดิบด้านพืชและสัตว์

ผลิตภัณฑ์จากผึ้งถือเป็นวัตถุดิบอย่างหนึ่งที่ใช้กันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะส่วนที่เรียกว่าชัน (propolis) ซึ่งมีประวัติการใช้มายาวนานกว่า 300 ปีก่อนคริสตกาล เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ต้านอักเสบ และช่วยสมานแผลได้เป็นอย่างดี ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงผึ้งอยู่หลายสายพันธุ์ เช่น ผึ้งพันธุ์ ผึ้งโพรง และผึ้งชันโรง สำหรับภาคตะวันออกนั้น ชาวบ้านนิยมเลี้ยงชันโรง (stingless bee) ซึ่งเป็นแมลงขนาดเล็กที่มีรูปร่างคล้ายผึ้งรวงแต่ไม่มีเหล็กใน โดยชันโรงจะช่วยเพิ่มผลผลิตของพืชพรรณผลไม้ได้ดีอีกด้วย เมื่อศึกษาถึงภูมิปัญญาชาวบ้าน พบว่าชันของชันโรงถูกนำมาใช้รักษาบาดแผลและโรคผิวหนังเช่นเดียวกับชันที่ได้จากผึ้งรวง นอกจากนี้จากรายงานของสำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่าจังหวัดที่มีการเพาะเลี้ยงชันโรงมากที่สุดในประเทศไทยคือ จังหวัดจันทบุรีและมีมูลค่ารวมในปี พ.ศ. 2555 ถึง 6.2 ล้านบาท

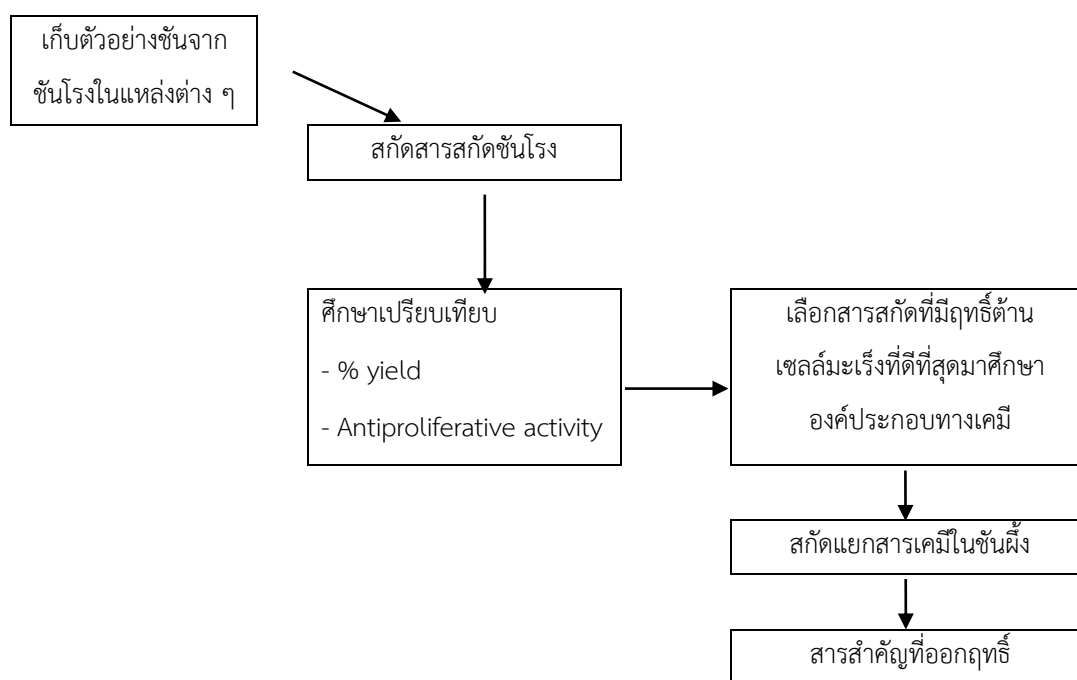
อย่างไรก็ดีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของชันจากชันโรงมีน้อยมาก และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า ชันผึ้งจากแหล่งต่างๆ ทั่วโลกมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันไปซึ่งอาจเกิดจากชนิดของผึ้งที่ต่างสายพันธุ์กัน หรือพรรณไม้ของแต่ละบริเวณที่ต่างกัน สำหรับผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งนิยมเลี้ยงทั่วไป มีการศึกษาพบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ จากสารสกัดชันผึ้ง แต่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ สารสกัดจากชันโรงบางสายพันธุ์เช่น *Melipona scutellaris*, *Trigona fuscibisca*, *Trigona incise*, *Trigona apicalis*, *Trigona laeviceps* มีการศึกษาพบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง แต่ก็ยังไม่ทราบถึงสารสำคัญในการ

ออกฤทธิ์ ส่วนสายพันธุ์ชั้นโรงที่นิยมเลี้ยงในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ *Tetragonula pagdeni* และยังไม่พบการรายงานฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของชันจากชันโรงในประเทศไทย ที่ได้เลี้ยงไว้ตามแหล่งต่างๆ และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมคุณภาพของชันจากชันโรง รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาพิษวิทยาของชันผึ้งจากชันโรงต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชันจากชันโรงที่เพาะเลี้ยงในแหล่งต่างๆ และพิสูจน์เอกลักษณ์สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง
2. เพื่อร่วมสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

### วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป/แนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



ภาพที่ 1 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสรุป

## การทบทวนวรรณกรรม

ชันโรง (stingless bees) จัดเป็นที่อยู่ในอันดับเดียวกับแมลงกลุ่มผึ้ง (Apoidea) ลักษณะโครงสร้างภายนอกของชันโรงประกอบด้วยส่วนหัวที่มีตาเดี่ยว (ocelli) จำนวน ตา 3 ตา มีตารวมขนาดใหญ่ (compound eyes) จำนวน 1 คู่ เพศผู้มักมีขนาดของตารวมที่ใหญ่กว่าเพศเมีย มีหนวดแบบข้อคอก (geniculate) เพศผู้มี 13 ปล้อง เพศเมียมี 12 ปล้อง มีปากแบบกัดเลีย (chewing lapping) มีขนปกคลุมมากที่ส่วนหัว ลำตัว และส่วนของขา โดยขาของชันโรงมี 3 คู่ ขาคู่หลังของชันโรงวรรณะทำงานจะมีอวัยวะเก็บเกสร (pollen basket) มีปีกจำนวน 2 คู่ ลักษณะบางใส (membrane) ปีกคู่หลังมีเส้นปีกน้อยกว่าปีกคู่หน้า เวลาบินปีกคู่หน้าและปีกคู่หลังเกาะติดกันด้วยตะขอ (hamuli) เรียงเป็นแถวบนขอบด้านหน้าของปีกคู่หลังเพื่อให้ปีกทั้งคู่กระพือขึ้นลงได้พร้อมกันทำและทำให้บินเร็วขึ้น (1)

ชันโรงจากทั่วโลกสามารถจำแนกได้เป็น 6 สกุล ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบชันโรงประมาณ 500 ชนิด โดยทั่วไปสามารถพบชันโรงได้ในเขต Neotropics จากเม็กซิโกถึงอาร์เจนตินา และในเขต Indo – Australian ตั้งแต่อินเดียและศรีลังกาจนถึงไต้หวัน ทางฝั่งตะวันออกของ Caroline Island และ Solomon Island ทางทิศใต้ของอินโดนีเซียทั้งหมด รวมถึงหมู่เกาะนิวกินีจนถึงประมาณละติจูดที่ 34 องศาใต้ในทวีปออสเตรเลีย (6, 9, 8) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการค้นพบชันโรงทั้งหมด 32 ชนิดกระจายอยู่ทั่วประเทศทุกภูมิภาค (3) โดยสายพันธุ์ที่กรมส่งเสริมการเกษตรนำมาให้เกษตรกรเลี้ยง ได้แก่ *Lepidotrigona terminata*, *Lepidotrigona ventralis* *Tetragonula pagdeni* และ *Trigona laeviceps* เป็นต้น เนื่องจากชันโรงเป็นแมลงที่ช่วยผสมเกสรซึ่งสามารถใช้เพิ่มผลผลิตของพืชเศรษฐกิจได้ เช่น ทูเรียน ทานตะวัน มะม่วง เป็นต้น ชันโรงมีรังที่มีปากกินประมาณ 300 เมตรจากรัง และยังสามารถสร้างน้ำผึ้งและเก็บไว้ในรัง ซึ่งน้ำผึ้งจากชันโรงมีราคาสูงกว่าผึ้งพันธุ์อื่น (10) นอกจากนี้ ชันโรงสามารถเลี้ยงและดูแลรักษาได้ง่าย เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และมีต้นทุนการเลี้ยงต่ำ ประมาณมูลค่าทางการตลาดของชันโรงในปี พ.ศ. 2555 อยู่ที่ 6.2 ล้านบาท โดยแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงมากที่สุด คือ จังหวัดจันทบุรี อย่างไรก็ตามการเลี้ยงชันโรงยังคงประสบปัญหาบางประการ เช่น การรวมกลุ่มผู้เลี้ยงชันโรงเพื่อจำหน่ายผลผลิตยังมีน้อย เกษตรกรยังไม่มีความรู้ในการเลี้ยงชันโรง และการศึกษาวิจัยชันโรงและผลิตผลจากชันโรงยังมีน้อยและอยู่ในวงจำกัด ดังนั้นการศึกษาวิจัยจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อช่วยเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรให้แก่เกษตรกรได้ (5)

ชันหรือชันผึ้ง (propolis) มีประวัติการใช้ประโยชน์มายาวนานและแพร่หลายทั่วโลกตั้งแต่ 300 ปีก่อนคริสตกาล ทั้งการใช้เป็นยาภายในและภายนอก ชาวกรีกโรมัน และอียิปต์ใช้ชันผึ้งในการรักษาบาดแผล แก้โรคผิวหนัง และลดการอักเสบ และจวบจนถึงปัจจุบันชันผึ้งยังคงได้รับความนิยมใน

การนำมาใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง และมีการแปรรูปโดยการผสมลงในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อย่างหลากหลาย ชั้นผึ้งมีลักษณะเป็นสารกึ่งแข็งกึ่งเหลว มีลักษณะเหนียว มีสีเหลืองเข้มจนถึงสีน้ำตาล เกิดจากสารคัดหลั่งจากตัวผึ้งผสมกับเกสรดอกไม้ (11) โดยทั่วไปองค์ประกอบของชั้นผึ้งในธรรมชาติ จะประกอบด้วยไขร้อยละ 30 เรซินและบัลซัมร้อยละ 50 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 เกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และสารอื่น ๆ อีกร้อยละ 5 โดยสีและสารสำคัญของชั้นผึ้งที่เก็บในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกก็จะแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น ชั้น Alecrim Brazilian จากประเทศบราซิล ซึ่งเก็บได้จากบริเวณที่มีพืชสกุล *Baccharis* ให้ชั้นสีเขียว และมีสารพวก Prenylated *p*-coumaric acids, diterpenic acids เป็นองค์ประกอบหลัก, ชั้น Red propolis จากประเทศคิวบาและเม็กซิโก จากบริเวณที่มีพืชสกุล *Dallbergia* จะให้ชั้นมีสีแดง และมีสารพวก Isoflavonoids (isoflavans, pterocarpan) เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ชั้นจากแถบยุโรปและอเมริกาเหนือ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Poplar ที่เก็บได้จากบริเวณที่มีพืชสกุล *Populus* พบรายงานว่ามีสารกลุ่ม flavones, flavanones, cinnamic acids and ester เป็นองค์ประกอบหลัก เป็นต้น (12)

ผึ้งจะใช้ชั้นผึ้งในการสร้างความแข็งแรงให้กับรัง และป้องกันรังจากภัยต่าง ๆ เช่น ใช้อูตรอยรั้วของรัง ใช้ห่อหุ้มซากศพของผู้รุกราน และใช้ป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่าง ๆ ดังนั้น จึงมีผู้สนใจศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของของชั้นผึ้งค่อนข้างมาก ตัวอย่างเช่น Marcucci และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงองค์ประกอบของชั้นผึ้งจากผึ้งในประเทศบราซิล พบว่าในชั้นผึ้งดังกล่าวมีสารสำคัญ 4 ตัวด้วยกัน คือ 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid (3), 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-8-prenyl-2H-1-benzopyrane (5), 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (8) และ 2,2-dimethyl-6-carboxyethenyl-8-prenyl-2H-1-benzopyran(4) ซึ่ง Marcucci พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trypanosoma cruzi* และแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis*. (8)

Berretta และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานชั้นผึ้ง (EPP-AF<sup>(R)</sup>) ต่อการรักษาบาดแผลที่ถูกกรีดในหนู Wistar เพศผู้ โดยพบว่าพยาธิสภาพของชั้นเนื้อบริเวณแผลที่ถูกกรีดของหนูในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเจลที่มี EPP-AF<sup>(R)</sup> เป็นส่วนผสมร้อยละ 2.4 และ 3.6 w/v ตามลำดับ จะมีปริมาณของ collagen fibers มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ได้รับเจลที่ไม่มีส่วนผสมของ EPP-AF<sup>(R)</sup> ซึ่ง collagen fibers เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการหายของบาดแผล นอกจากนี้ Berretta ยังได้ศึกษาถึงฤทธิ์ antimicrobial ของ EPP-AF<sup>(R)</sup> พบว่า EPP-AF<sup>(R)</sup> สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีแผลไหม้ได้ (7)

กัณฑ์นิษฐ์ และยิ่งมณี (2012) ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของชันผึ้ง นมผึ้ง และสมุนไพรรักษา ทะลายโจร ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคแผลในกระเพาะอาหาร *Helicobacter pylori* โดยพบว่าสารสกัดจากชันผึ้ง นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อ *H. pylori* ได้ โดยสารสกัดนมผึ้งสามารถยับยั้งได้ดีที่สุดในขณะที่สารสกัดชันผึ้งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้รองลงมา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารสำคัญหลายชนิด เช่น สาร กลุ่ม flavonoids หรือสารกลุ่ม phenolic ขณะที่การศึกษาของกิริติญา และยิ่งมณี (2012) พบว่าสาร สกัดชันผึ้งมีผลการยับยั้งเชื้อ *Shigella flexneri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และ เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay พบว่าสารสกัด ชันผึ้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าฟ้าทะลายโจรและนมผึ้ง (1, 2)

แต่อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่นิยมศึกษา คือ ผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ซึ่งเป็นคนละสายพันธุ์กับ ชันโรง ซึ่งรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสกัดชันจากชันโรงยังมีน้อย มาก โดยพบการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของชันจากชันโรงที่พบใน ประเทศบราซิล ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดชันจากชันโรงดังกล่าวประกอบด้วยสารทั้งหมด 78 ชนิด ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids, diterpenic acids, prenylated *p*-coumaric acids, caffeoyquinic acids, triterpenes, aromatic compounds และ sugars (8) ซึ่งสารที่พบในชันผึ้งจากชันโรงนั้นมีความใกล้เคียงกับสารที่พบในชันผึ้งที่ได้จากผึ้งพันธุ์ *Apis mellifera* ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษา ชันของชันโรงจากสายพันธุ์ *Trigona laeviceps* จากจังหวัดสมุทรสงคราม โดยพบฤทธิ์ยับยั้งการ แบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด ได้แก่ Chago, KATO-III, SW620, BT474 และ HepG2 แต่มีความเป็น พิษต่อเซลล์ปกติต่ำ ส่วนองค์ประกอบทางเคมียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดซึ่งอาจเนื่องมาจากสามารถเก็บชัน ได้เพียง 90 กรัม จึงมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะแยกสารบริสุทธิ์ออกมาได้ (14)

ส่วนการใช้ประโยชน์จากชันของชันโรงในปัจจุบันนั้นพบว่ายังไม่เป็นที่ยอมรับมากนัก เนื่องจากการขาดหลักฐานทางการแพทย์ยืนยัน และขาดข้อมูลด้านองค์ประกอบทางเคมี จึงเป็นปัญหา ในการพัฒนาหรือการแปรรูปชันเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในทางการแพทย์และในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ดังนั้น การศึกษาองค์ประกอบของชันจากชันโรงของไทย จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อใช้ในการยืนยันถึง คุณภาพ และเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยา พิษวิทยา และการพัฒนาเป็น ผลิตภัณฑ์ รวมถึงการช่วยสร้างเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรไทยได้ในอนาคต

## ขอบเขตของงานวิจัย

### 1. แหล่งที่มาของชันโรง

ตัวอย่างชิ้นจากชิ้นโรงที่นำมาศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและแยกสกัดเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ เป็นชิ้นจากสายพันธุ์ขงเงิน (*Tetragonula pegdeni*) ที่ได้มาจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดจันทบุรี

## 2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ใช้วิธี Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) assay โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cell) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 cell) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cell) และเซลล์ปกติ (normal human fibroblast)

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชิ้นจากชิ้นโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pegdeni* สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการควบคุมคุณภาพ และเพิ่มความน่าเชื่อถือในการนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์
2. สามารถตีพิมพ์เผยแพร่งานวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดชิ้นจากชิ้นโรง
3. เพิ่มมูลค่าให้ชิ้นจากชิ้นโรง ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้ ที่ได้จากการเลี้ยงชิ้นโรงของเกษตรกร
4. ถ่ายทอดความรู้ที่ได้จากงานวิจัยในการสอนนิสิตระดับปริญญาตรี

**บทที่ 2**  
**วิธีการดำเนินการวิจัย**  
**(Materials and Methods)**

**อุปกรณ์และสารเคมี**

**เครื่องมือ**

1. Centrifuge
2. Rotary evaporator
3. Water bath
4. Sonicator
5. Freeze dryer
6. Micropipette
7. Vacuum pump
8. UV cabinet (254 and 366 nm)
9. HPLC
10. IR spectrometer
11. UV spectrometer
12. CO<sub>2</sub> incubator
13. NMR spectrometer
14. Microplate reader
18. ESIMS spectrometer
19. Autoclave

**อุปกรณ์**

1. Centrifuge tube 100 mL
2. 96-well microplate
3. TLC plate (SiO<sub>2</sub>GF<sub>254</sub>)
4. Capillary for TLC analysis
5. Glass column for column chromatography (diameter 1.5 in and 2 in)



6. Sintered glass funnel 500 mL
7. Spraying bottle 50 mL
8. Glass bottle for fraction collector 100 mL
9. C18 HPLC column (250x10 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
10. Vacuum desiccator
11. HPLC solvent filter
12. Micro tube 1.5 mL
13. Erlenmeyer flask, Beaker, Glass cylinder
14. Duran bottle 1000 mL
15. Micro syringe 25  $\mu\text{L}$

#### สารเคมี

1. Methanol AR grade
2. Hexane AR grade
3. Dichloromethane AR grade
4. Ethyl acetate AR grade
5. Methanol HPLC grade
6. Acetonitrile HPLC grade
7. Deionized water
8. NMR solvent ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ )
9. Anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$
10. RPMI-1640 medium
11. Fetal bovine serum
12. Penicillin
13. Streptomycin
14. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)
15. Dimethyl sulfoxide (DMSO) AR grade

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### 1. การสกัดชั้นจากชั้นโรง

#### การกำจัด wax จากตัวอย่างชั้น

ตัวอย่างชั้นจากชั้นโรงที่เก็บได้จากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี จะถูกนำมาสกัดด้วย hexane เพื่อกำจัด wax ออกไปจากตัวอย่าง โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างชั้น ปริมาณ 60 g นำมาสกัดด้วย hexane ปริมาตร 600 mL โดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4500 rpm 25°C เป็นเวลา 5 นาที จะได้ supernatant ซึ่งเป็นสารสกัด hexane แยกชั้นสารสกัด hexane ออกไป ก่อนสกัด residue ที่เหลือด้วย hexane ซ้ำ จนได้สารสกัด hexane ที่มีสีจางลงจนคงที่

#### การสกัดสารสกัดชั้น

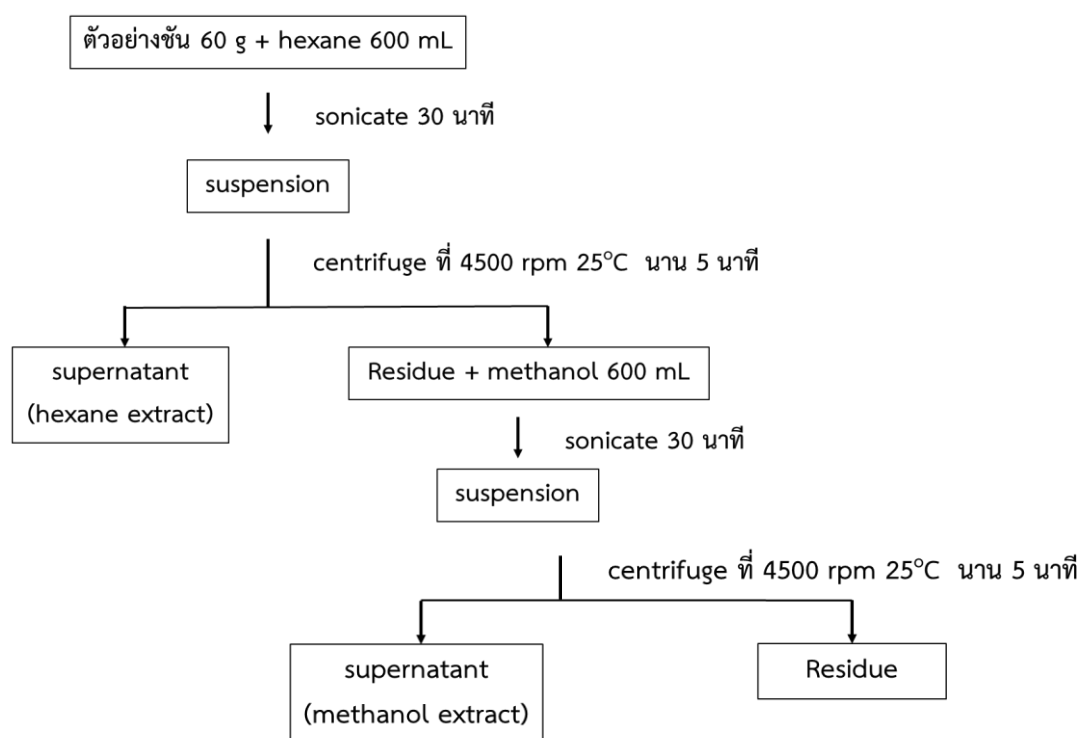
นำ residue ที่เหลือจากการกำจัด wax มาสกัดต่อด้วย methanol ปริมาตร 600 mL โดยโดยการ sonicate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 4500 rpm 25°C เป็นเวลา 5 นาที จะได้ supernatant ซึ่งเป็นสารสกัด methanol เก็บชั้นสารสกัด methanol ก่อนนำ residue ที่เหลือไปสกัดต่อด้วย methanol ซ้ำ จนได้สารสกัด methanol ที่มีสีจางลงจนคงที่ เก็บรวมสารสกัด methanol ก่อนนำไประเหยตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และคำนวณ %yield ของสารสกัด

### 2. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดชั้นในการต้านเซลล์มะเร็ง และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ใช้วิธี MTT assay เพื่อหาค่า  $IC_{50}$  ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cell) เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 cell) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cell) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยใช้ normal human fibroblast cell สารสกัดชั้นจากชั้นโรงจากแหล่งต่าง ๆ จะถูกนำไปละลายด้วย DMSO และเจือจางด้วย media เพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ในการนำไปทดสอบเพื่อหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดชั้นในการต้านเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษของเซลล์

เซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ จะถูกเลี้ยงในอาหารชนิด RPMI-1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin และ 1% streptomycin ใน  $CO_2$  incubator ที่มี 5%  $CO_2$  อุณหภูมิ 37°C เปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้น seed cell ลงใน 96-well

plate จำนวน 5,000 cell/well นำไปเพาะเลี้ยงใน CO<sub>2</sub> incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติมสารสกัดชั้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไป incubate เซลล์และสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยการเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 50 µg/well ที่ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา เติม DMSO ปริมาตร 100 µg/mL เพื่อละลายสีของ formazan ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm และหาค่า IC<sub>50</sub> แต่ละความเข้มข้นของสารสกัดทำการทดสอบฤทธิ์จำนวน 3 ซ้ำ และใช้ doxorubicin เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ (13)



ภาพที่ 2 แสดงแผนภาพการกำจัด wax และการสกัดตัวอย่างชันจากชันโรงแหล่งต่าง ๆ

### 3. การแยกสารบริสุทธิ์ (Separation and Purification)

ในการแยกสารสกัดชันจากชันโรง ใช้เทคนิคทาง chromatography ต่าง ๆ โดยเริ่มจากการทดลองหาระบบในการแยกสาร โดยใช้วิธี TLC ที่มี stationary phase เป็น SiO<sub>2</sub>GF<sub>254</sub> และ mobile phase ได้แก่ hexane, dichloromethane, ethyl acetate และ methanol และติดตามผลการแยกสารด้วยการดูสีของสารด้วยตาเปล่า การตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 nm และการใช้ spraying reagent ได้แก่ anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> และนำไปให้ความร้อนด้วย heater ที่ 120°C เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดชัน และหาระบบ mobile

phase ที่สามารถแยกสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดชั้นได้ดีที่สุด การแยกสารเริ่มจากการใช้วิธี chromatography ที่สามารถแยกสารได้ในปริมาณมาก ไปจนถึงวิธีที่สามารถแยกสารได้ในปริมาณน้อย โดยเริ่มจากการใช้วิธี vacuum liquid chromatography ตามด้วยการใช้วิธี flash column chromatography และการใช้ semi-preparative HPLC ในการแยกสาร เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ตามลำดับ

#### 4. การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี

สารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยกสารด้วยวิธีทาง chromatography ต่าง ๆ ถูกนำไปวิเคราะห์ เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี ในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ การวิเคราะห์ mass spectrometry เพื่อให้ได้ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุล ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์ molecular formula ของสารบริสุทธิ์ การวิเคราะห์  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy รวมถึงการวิเคราะห์ 2D-NMR เพื่อให้ได้ข้อมูลจำนวน proton และ carbon ในโมเลกุลของสารรวมถึงการจัดเรียง atom ของสารในโครงสร้างทางเคมี การวิเคราะห์ IR และ UV spectrometer เพื่อประโยชน์ในการได้มาซึ่งข้อมูลของ functional group ที่อยู่ในโครงสร้างของสาร

### บทที่ 3

## ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง (Results and Discussions)

### ผลการวิจัย (Results)

1. ตัวอย่างชันจากชันโรง ได้รับความอนุเคราะห์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นชันที่ได้จากชันโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pegdeni* โดยการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของตัวชันโรง ที่เก็บได้จากรังของชันโรง โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชามา พานแก้ว ภาควิชาเคมีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัดตัวอย่างชันจากชันโรงจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ ส่วนส้มโอ ป่าชายเลน และสวนสมุนไพร เมื่อนำมากำจัด wax และสกัดสาร ดังแสดงในแผนภาพการสกัด (ภาพที่ 1) ได้ปริมาณสารสกัด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดชันจากตัวอย่างชันจากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งที่มา	ปริมาณตัวอย่าง (g)	ปริมาณสารสกัด (g)	%yield
1. ป่าชายเลน	60.00	11.23	18.71
2. สวนส้มโอ	60.00	3.86	6.43
3. สวนสมุนไพร	60.00	12.89	21.48

จากตารางผลการทดลอง พบว่า %yield ของสารสกัดชันจากสวนสมุนไพรมี %yield มากที่สุด รองลงมาคือ ป่าชายเลน และสวนส้มโอตามลำดับ



ภาพที่ 3 ตัวอย่างชันจากสวนสมุนไพร



ภาพที่ 4 ตัวอย่างชันจากป่าชายเลน



ภาพที่ 5 ตัวอย่างชันจากสวนส้มโอ

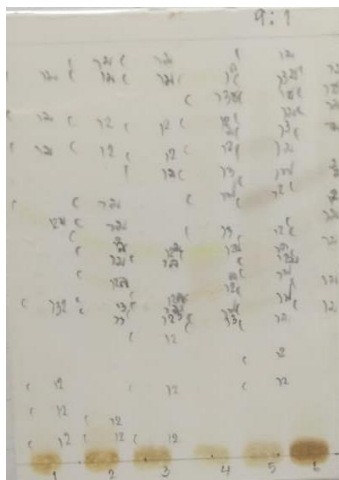
## 2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดชัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดชันจากแหล่งต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า สารสกัดชันจากสวนส้มโอ และสวนสมุนไพรมะนาว แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ดี โดยสารสกัดชันจากสวนสมุนไพรมะนาวแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดชันจากสวนส้มโอและป่าชายเลน สารสกัดชันจากสวนส้มโอแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) มะเร็งผิวหนัง (SK-MEL-28 cell) ได้ดี และดีกว่าสารสกัดชันจากป่าชายเลน โดยสารสกัดชันจากสวนส้มโอแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งดังกล่าว ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 63.43 และ 18.71  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ แต่สำหรับสารสกัดชันจากป่าชายเลน พบว่าแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cell) มะเร็งลำไส้ (Caco2 cell) และมะเร็งปากมดลูก (Hela cell) ได้ดี และดีกว่าสารสกัดชันจากสวนส้มโอ โดยสารสกัดชันจากป่าชายเลน โดยแสดงค่า  $IC_{50}$  ต่อเซลล์มะเร็งดังกล่าว เท่ากับ 59.10, 27.37 และ 38.87  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ

แต่เนื่องจากสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ แสดงค่า  $IC_{50}$  ของความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (normal fibroblast cell) ในระดับที่ต่ำกว่ากว่าสารสกัดชั้นจากป่าชายเลน ( $IC_{50} = 213.85$  และ  $15.25 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ) ทำให้มีความน่าสนใจในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอในงานวิจัยนี้

### 3. การแยกสารและการทำให้สารบริสุทธิ์

การแยกสารเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่อยู่ในสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ เริ่มจากการนำสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ ปริมาณ 5.0 g นำมาหาระบบที่เหมาะสมในการแยกสาร โดยการใช้วิธี TLC ใช้ stationary phase เป็น  $\text{SiO}_2/\text{GF}_{254}$  จากการศึกษาพบว่าระบบ mobile phase ที่มีความเหมาะสมในการแยกสาร คือ dichloromethane : methanol 9:1 จึงทำการแยกสารด้วยระบบดังกล่าว และได้สารสกัดจากการแยกสารในขั้นตอนแรก จำนวน 4 fractions ได้แก่ TP5/1 (31.6 mg), TP5/2 (988.5 mg), TP5/3 (481.0 mg) และ TP5/4 (374.45 mg) จากนั้น fraction ดังกล่าว ได้ถูกนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเรื้องต่าง ๆ และผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3



ภาพที่ 6 TLC chromatogram ของ TP5/1 – TP5/4  
( $\text{SiO}_2$ , dichloromethane : methanol 9:1)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของสารสกัดชั้นจากแหล่งต่าง ๆ

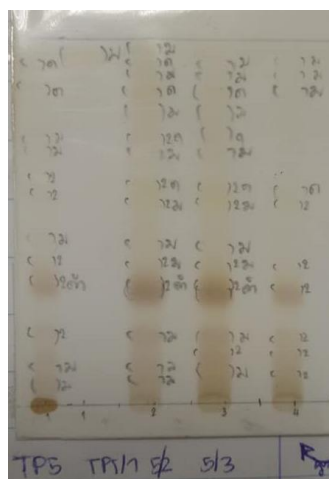
แหล่ง	IC <sub>50</sub> mg/ml					
	เซลล์มะเร็งช่องปาก	เซลล์มะเร็งตับ	เซลล์มะเร็งลำไส้	เซลล์มะเร็งผิวหนัง	เซลล์มะเร็งปากมดลูก	เซลล์ปกติ
	KB cell	HepG2 cell	Caco2 cell	SK-MEL-28 cell	HeLa cell	Hs cell
ป่าชายเลน	59.10	100.99	27.37	87.29	38.87	15.22
สวนส้มโอ	576.77	63.43	178.64	18.71	557.35	213.85
สวนสมุนไพร	305.41	2517.11	196.27	1456.47	272.42	96.22
Doxorubicin	7.81	36.34	32.75	5.95	7.95	-

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของ fraction ที่ได้จากสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ

แหล่ง	IC <sub>50</sub> mg/ml				
	เซลล์มะเร็งช่องปาก	เซลล์มะเร็งตับ	เซลล์มะเร็งลำไส้	เซลล์มะเร็งผิวหนัง	เซลล์มะเร็งปากมดลูก
	KB cell	HepG2 cell	Caco2 cell	SK-MEL-28 cell	HeLa cell
TP5/1	1296.62	357.767	2150.771	4919.09	1776.33
TP5/2	23.49	3.967	9.799	26.17	13.40
TP5/3	4.26	51.978	27.302	35.33	2.33
TP5/4	40.23	39.325	18.903	24.57	45.41
Doxorubicin	7.81	36.34	32.75	5.95	7.95



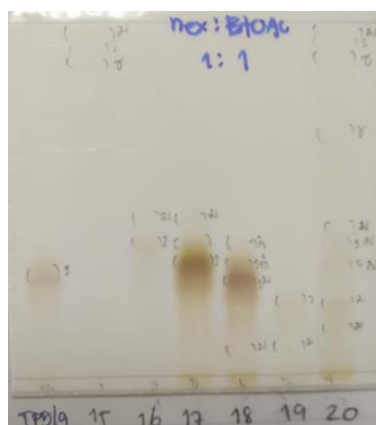
TP5/2 (988.5 mg) เป็น fraction ที่ถูกนำมาแยกสารต่อ เนื่องจากแสดง major spot ใน TLC ( $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate 1:1) และมีปริมาณที่เหมาะสมในการแยกสาร โดยการแยกสารด้วยวิธี flash column chromatography โดยใช้  $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate 1:1 ได้สารจำนวน 6 fractions ได้แก่ TP5/5 (29.3 mg), TP5/6 (196.1 mg), TP5/7 (88.9 mg), TP5/8 (132.7 mg), TP5/9 (278.4 mg) และ TP5/10 (47.7 mg)



ภาพที่ 7 TLC chromatogram ของ TP5/5 – TP5/10

( $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate 1:1)

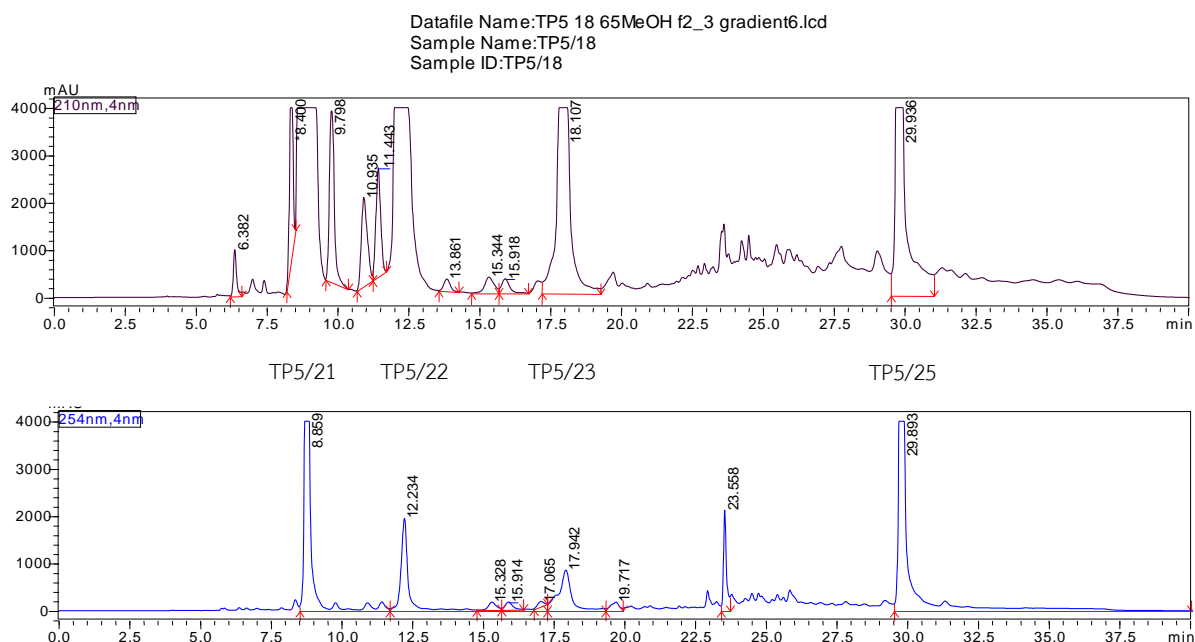
TP5/9 (278.4 mg) แสดง major spot ใน TLC ( $\text{SiO}_2$ , hexane:ethyl acetate 1:1) ได้ถูกนำมาแยกสารต่อด้วยระบบดังกล่าว ด้วย flash column chromatography ได้สารจำนวน 6 fractions ได้แก่ TP5/15 (6.3 mg), TP5/16 (3.5 mg), TP5/17 (18.4 mg), TP5/18 (107.3 mg), TP5/19 (4.1 mg) และ TP5/20 (11.6 mg)



ภาพที่ 8 TLC chromatogram ของ TP5/15 – TP5/20

( $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate 1:1)

TP5/18 (107.3 mg) แสดง major spot ใน TLC (SiO<sub>2</sub>, hexane : ethyl acetate 1:1) จึงมีความน่าสนใจในการนำมาแยกสารต่อ แต่เนื่องจากปริมาณสารมีไม่มาก ทำให้เลือกใช้วิธีการแยกสารด้วยวิธี HPLC โดยระบบที่ใช้แยกสาร คือ C18 column (5 μm, 10x250 mm), gradient system, 1-20 minute = 35% water in methanol, flow rate 2.3 mL/min, 20-30 minute = 10% water in methanol, flow rate 2.3 mL/min, 30-37 minute = 35% water in methanol, flow rate 2.3 mL/min ได้สารจำนวน 3 fractions ได้แก่ TP5/21 (RT= 8.5, 16.0 mg), TP5/22 (RT= 9.6, 2.1 mg), TP5/23 (RT = 12.1, 9.4 mg), TP5/24 (RT= 17.6, 1.9 mg) และ TP5/25 (RT=30.0, 2.9 mg)

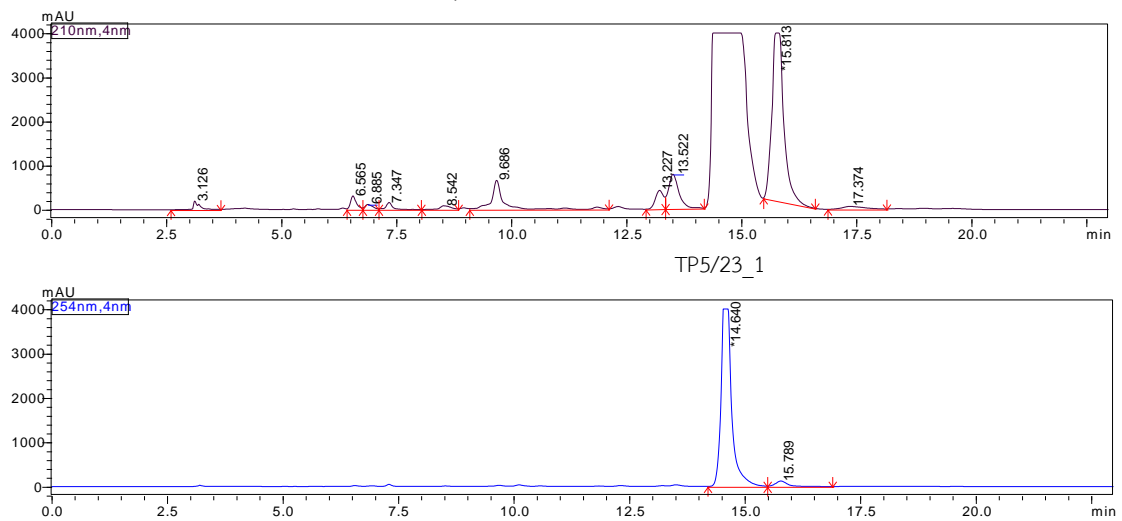


ภาพที่ 9 HPLC chromatogram ของ TP5/18

(C18, gradient system 10-35%water in methanol, flow rate 2.3 mL/min)

TP5/23 (9.4 mg) ถูกนำมาแยกสาร ด้วยวิธี HPLC โดยใช้ C18 column (5 μm, 10x250 mm), 55% water in acetonitrile, flow rate 2.6 mL/min ได้สาร TP5/23\_1, RT = 14.6 min เป็นสารบริสุทธิ์รายการที่ 2 ปริมาณ 3.3 mg

Datafile Name:TP5 23 45ACN f2 6 2.lcd  
 Sample Name:TP5/23  
 Sample ID:TP5/23

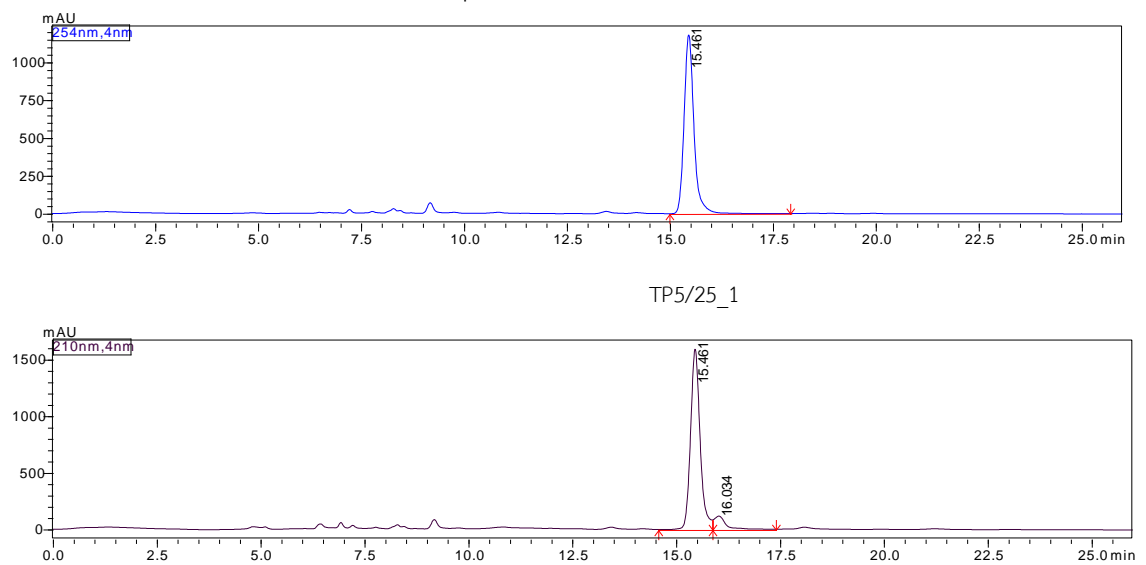


ภาพที่ 10 HPLC chromatogram ของ TP5/23

(C18, 55% water in acetonitrile, flow rate 2.6 mL/min)

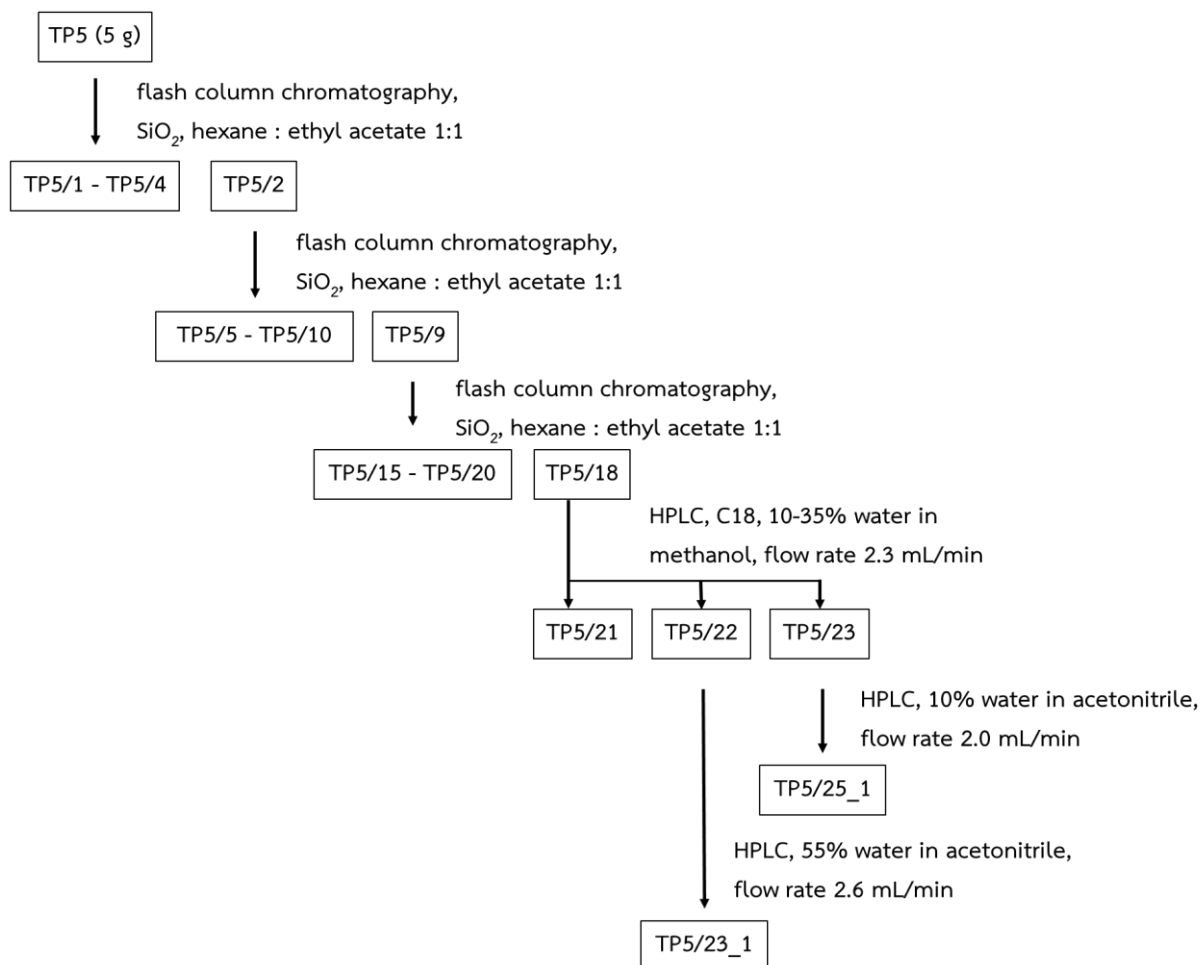
TP5/25 (3.9 mg) ถูกนำมาแยกสารต่อ ด้วยวิธี HPLC ด้วยระบบ C18, 10% water in acetonitrile, flow rate 2.0 mL/min ได้สาร TP5/25\_1, RT = 15.4 min ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ รายการที่ 3 ปริมาณ 2.8 mg

Datafile Name:TP5 25 90ACN f2 t6.lcd  
 Sample Name:TP5/25  
 Sample ID:TP5/25



ภาพที่ 11 HPLC chromatogram ของ TP5/25

(C18, 10% water in acetonitrile , flow rate 2.0 mL/min)



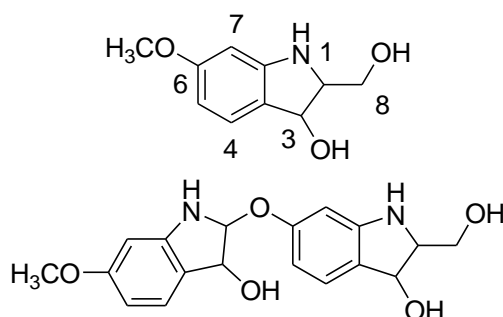
ภาพที่ 12 แผนภาพการแยกสารบริสุทธิ์ จากสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่ได้จากสวอนส้มโอ

#### 4. การพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์

เมื่อนำสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่ได้จากสวอนส้มโอ ปริมาณ 5 g มาแยกสารด้วยวิธี chromatography ต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่าได้สารบริสุทธิ์ จำนวน 3 รายการ ได้แก่ TP5/21 (16.0 mg), TP5/23\_1 (3.3 mg) และ TP5/25\_1 (2.0 mg) และมีข้อมูลทาง spectroscopy ของสาร ดังนี้

**1*H*-indole-2-methanol-3-ol,2,3-dihydro-6-methoxy (TP5/21)** เป็นของแข็งใส, UV  $\lambda_{\max} = 214, 230, 278$  nm, IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max} 3502$  (-NH), 3359 (-OH), 3055, 2963, 2938, 2850, 1603, 1513, 1156, 1031, 732  $\text{cm}^{-1}$  ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ TP5/21 ดังแสดงในตารางที่ 4, ESIMS  $m/z$  (%relative intensity) 381  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 701  $[2\text{M}-16+\text{H}]^+$  (80), 739  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  (51), HRESIMS  $m/z$  381.1337 สามารถวิเคราะห์สูตรโมเลกุลได้เท่ากับ  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$  ซึ่งคำนวณได้ 381.142643

จากข้อมูล ESIMS spectra (ภาคผนวก) พบ molecular ion peak (base peak) ที่  $m/z$  เท่ากับ 381  $[M+Na]^+$  และ  $[2M+Na]^+$  ที่  $m/z$  เท่ากับ 739 ประกอบกับข้อมูล  $^1H$  และ  $^{13}C$  NMR spectra (ตารางที่ 4) ทำให้ทราบว่าในโครงสร้างของ TP5/21 ประกอบด้วย carbon จำนวน 10 atoms โดยจากข้อมูล DEPT90 และ 135 experiment พบว่าเป็น 1 methyl, 1 methylene, 5 methines และ 3 quaternary carbons รวมถึงข้อมูลจาก IR และ UV spectra (ภาคผนวก) ของสาร TP5/21 พบสัญญาณของหมู่ amine ที่  $3502\text{ cm}^{-1}$  และ hydroxyl ที่  $3359\text{ cm}^{-1}$  ทำให้สามารถวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ TP5/21 ได้ดังภาพที่ 13

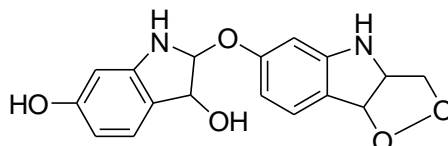


ภาพที่ 13 Partial structure และ chemical structure ของ TP5/21

ตารางที่ 4 ข้อมูล  $^1H$  และ  $^{13}C$  NMR ของสาร TP5/21 ( $CDCl_3$ , 400 MHz)

ตำแหน่ง	$^{13}C$ (mult)	$^1H$ ( $J$ in Hz)	HMBC correlation (C to H)
1 -NH	-	2.02	-
2	54.1 (CH)	3.12, ddd ( $J = 4.4, 4.4, 4.6$ )	H-3, H-8a, H-8b
3	85.9 (CH)	4.76, d ( $J = 4.4$ )	H-2, H-8a, H-8b, H-4, H-5
3'	145.2 (C)	-	H-4, H-5
4	108.6 (CH)	6.92, d ( $J = 8.0$ )	H-3, H-5
5	118.9 (CH)	6.84, dd ( $J = 1.6, 8.0$ )	H-3, H-4
6	146.7 (C)	-	H-4, H-6 ( $OCH_3$ )
7	114.3 (CH)	6.91, s	-
7'	132.9 (C)	-	H-2, H-4, H-5, H-3, H-7
8	71.9 ( $CH_2$ )	4.27, dd ( $J = 4.6, 9.2$ )	H-2, H-3
		3.90, dd ( $J = 4.4, 9.2$ )	
3, 8 -OH	-	5.70, br s	-
6 - $OCH_3$	55.9 ( $CH_3$ )	3.92, s	-

จาก  $m/z$  ใน mass spectra ของ TP5/21 ยังพบ peak ที่มี 80% relative abundance ซึ่งน้อยกว่า  $M^+$  เท่ากับ 16 unit จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารพบว่าหมู่ methyl alcohol ที่ตำแหน่งที่ 2 และ -OH group ที่ตำแหน่งที่ 3 สามารถเกิดการสร้างวง 1,2-dioxalane ได้ เป็น 5-membered ring cyclic peroxide รวมถึงการที่หมู่ methoxy ในตำแหน่งที่ 6 ถูกแทนที่ด้วย หมู่ hydroxy ทำให้สามารถเสนอโครงสร้างของอนุพันธ์ของ TP5/21 ได้ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 Chemical structure ของ TP5/21 derivative

1 *H*-indole-2-methanol,2,3-dihydro-3,7-methoxy (TP5/23\_1) เป็นของแข็งใส, UV  $\lambda_{\max}$  = 200, 227, 277 nm, IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\max}$  3544 (-NH), 3420 (-OH), 3056, 2958, 2934, 2848, 1603, 1513, 1262, 1233, 1139, 1025, 733  $\text{cm}^{-1}$  ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ TP5/23\_1 ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6, ESIMS  $m/z$  (%relative intensity) 395  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), 739  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$  (94), HRESIMS  $m/z$  395.1506 สามารถวิเคราะห์สูตรโมเลกุลได้เท่ากับ  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$  ซึ่งคำนวณได้ 395.15829

ตารางที่ 5 ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร TP5/23\_1 (A+B) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

ตำแหน่ง	TP5/23_1 (A)		TP5/23_1 (B)	
	$^{13}\text{C}$ (mult)	$^1\text{H}$ ( $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ (mult)	$^1\text{H}$ ( $J$ in Hz)
1 -NH	-	-	-	-
2	54.1 (CH)	3.13, br dd ( $J$ = 2.0, 2.0)	54.1 (CH)	3.13, br dd ( $J$ = 2.0, 2.0)
3	85.9 (CH)	4.77, dd ( $J$ = 5.9, 4.7)	85.8 (CH)	4.77, dd ( $J$ = 5.9, 4.7)
3'	145.2 (C)	-	145.2 (C)	-
4	148.6 (C)	-	109.2 (CH)	6.93, br d ( $J$ = 1.6)
5	118.9 (CH)	6.85, dd ( $J$ = 8.4, 1.6)	146.8 (C)	-
6	111.0 (CH)	6.87, dd ( $J$ = 8.4, 8.4)	114.2 (CH)	6.92, br d ( $J$ = 1.6)
7	108.6 (CH)	6.92, br d ( $J$ = 8.4, 1.6)	149.23 (C)	-

7'	132.9 (C)	-	133.5 (C)	-
8	71.70 (CH <sub>2</sub> )	4.27, dd ( <i>J</i> = 8.9, 6.9)	71.73 (CH <sub>2</sub> )	4.27, dd ( <i>J</i> = 8.9, 6.9)
		3.90, m		3.90, m
-OH	-	5.70, br s	-	5.63, br s
-OCH <sub>3</sub>	55.97 (CH <sub>3</sub> )	3.90, s	55.94 (CH <sub>3</sub> )	3.92, s
-OCH <sub>3</sub>	-	-	54.1 (CH <sub>3</sub> )	3.93, s

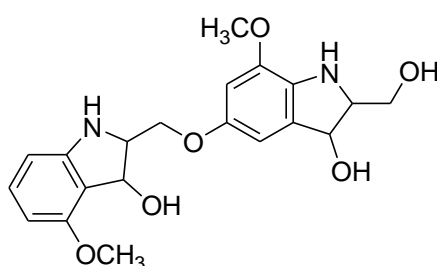
ตารางที่ 6 ข้อมูล <sup>1</sup>H และ <sup>13</sup>C NMR ของสาร TP5/23\_1 (A+C) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

ตำแหน่ง	TP5/23_1 (A)		TP5/23_1 (C)	
	<sup>13</sup> C (mult)	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C (mult)	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> in Hz)
1 -NH	-	-	-	-
2	54.1 (CH)	3.13, br dd ( <i>J</i> = 2.0, 2.0)	54.1 (CH)	3.13, br dd ( <i>J</i> = 2.0, 2.0)
3	85.9 (CH)	4.77, dd ( <i>J</i> = 5.9, 4.7)	85.8 (CH)	4.77, dd ( <i>J</i> = 5.9, 4.7)
3'	145.2 (C)	-	146.7 (C)	-
4	148.6 (C)	-	149.2 (C)	-
5	118.9 (CH)	6.85, dd ( <i>J</i> = 8.4, 1.6)	118.2 (CH)	6.92, br d ( <i>J</i> = 1.6)
6	111.0 (CH)	6.87, dd ( <i>J</i> = 8.4, 8.4)	114.2 (CH)	6.91, dd ( <i>J</i> = 5.6, 5.6)
7	108.6 (CH)	6.92, br d ( <i>J</i> = 8.4, 1.6)	109.2 (CH)	6.93, br d ( <i>J</i> = 1.6)
7'	132.9 (C)	-	133.5 (C)	-
8	71.70 (CH <sub>2</sub> )	4.27, dd ( <i>J</i> = 8.9, 6.9)	71.73 (CH <sub>2</sub> )	4.27, dd ( <i>J</i> = 8.9, 6.9)
		3.90, m		3.90, m
-OH	-	5.70, br s	-	5.63, br s
-OCH <sub>3</sub>	55.97 (CH <sub>3</sub> )	3.90, s	55.94 (CH <sub>3</sub> )	3.92, s
-OCH <sub>3</sub>	-	-	54.1 (CH <sub>3</sub> )	3.93, s

จาก *m/z* ของ TP5/23\_1 มีค่ามากกว่า TP5/21 จำนวน 14 unit ทำให้มีความน่าจะเป็นที่ TP5/23\_1 มี methoxy group แทนที่หมู่ hydroxyl group ในโครงสร้าง ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล <sup>1</sup>H และ <sup>13</sup>C spectra ที่พบว่ามีสัญญาณของ methoxy group เพิ่มเติมที่  $\delta_{\text{H}}$  3.93 (-CH<sub>3</sub>) และ  $\delta_{\text{C}}$  54.1 (-CH<sub>3</sub>) จาก <sup>13</sup>C ใน NMR spectrum พบสัญญาณของ <sup>13</sup>C จำนวน 2 ชุด ซึ่งสัญญาณในช่วงของ benzene ring สามารถแยกได้เป็น 2 ชุดอย่างชัดเจน และจาก <sup>1</sup>H NMR spectra พบสัญญาณของ proton ของ benzene ring ในช่วง  $\delta_{\text{H}}$  6.84 – 6.93 มีค่า coupling constant แตกต่างไปจาก

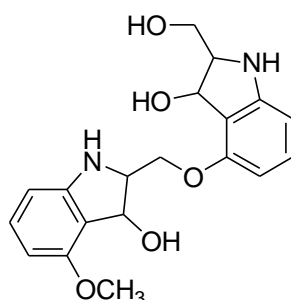
TP5/21 โดยข้อมูลจาก NOESY experiment พบว่า methoxy group ของ TP5/23\_1 อยู่ในตำแหน่งที่ 4 ของโครงสร้าง เนื่องจากพบ correlation ระหว่าง  $\delta_H$  3.90 ( $-OCH_3$ ) และ  $\delta_H$  4.77 ( $-CH$ ) ในตำแหน่งที่ 3

จาก  $^1H$  spectrum พบรูปแบบของการ coupling แบบ doublet of doublet ที่มีค่า  $J = 1.6$  Hz ที่  $\delta_H$  6.92 และ  $\delta_H$  6.93 และจาก HMBC spectra แสดงให้เห็นถึง correlation ระหว่าง methoxyl group ที่  $\delta_H$  3.90, 3.92 และ 3.93 ไปยัง  $sp^2$  carbon ของ benzene ring ทำให้สามารถเสนอโครงสร้างทางเคมีของ TP5/23\_1 ได้ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 Chemical structure ของ TP5/23\_1 (A+B)

และจาก  $^1H$  spectrum พบรูปแบบของการ coupling แบบ doublet of doublet ที่มีค่า  $J = 5.6, 5.6$  Hz ที่  $\delta_H$  6.91 และ  $J = 8.0, 8.0$  Hz ที่  $\delta_H$  6.87 แสดงให้เห็นว่า proton ทั้ง 3 atoms บน benzene ring ที่ตำแหน่งที่ 5, 6 และ 7 และยืนยันด้วย จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น สามารถเสนอโครงสร้างทางเคมีของ TP5/23\_1 ได้ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 Chemical structure ของ TP5/23\_1 (A+C)

เนื่องจากสัญญาณของ proton ใน  $^1H$  NMR spectrum ของ TP5/23 ในช่วง  $\delta_H$  6.85 – 6.93 มีรูปแบบในการ coupling ที่ซ้อนทับกัน ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ ค่า coupling constant ของ proton ดังกล่าว รวมถึงการศึกษา correlation ระหว่าง  $^1H$ - $^1H$  ใน COSY spectra



และ  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ใน HMBC spectra ซึ่งมีความสำคัญต่อการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสาร ดังนั้น เพื่อให้ข้อมูลเพียงพอต่อการวิเคราะห์ จึงตรวจสอบเปลี่ยนตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบ NMR จาก  $\text{CDCl}_3$  เป็น benzene- $d_6$  เพื่อให้สามารถศึกษาค่า coupling constant ของ proton ในช่วงดังกล่าว ได้ดียิ่งขึ้น หรือใช้เทคนิคอื่นในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี เช่น X-ray crystallography เพื่อยืนยันโครงสร้างทางเคมีของ TP5/23\_1

จากโครงสร้างทางเคมีของ TP5/21 และ TP5/23\_1 พบว่ามี core structure เป็น indole ring ซึ่งน่าจะมี biosynthesis มาจาก tryptophan ซึ่งเป็น amino acid ที่เป็นสารตั้งต้นของสารในกลุ่ม indole alkaloid

TP5/25\_1 เป็นของแข็งสีเหลือง, UV  $\lambda_{\text{max}} = 200, 243, 315 \text{ nm}$ , IR (FTIR-ATR)  $\nu_{\text{max}}$ , 3500, 3197, 2963, 2938, 2850, 1645, 1605, 1577, 1374, 1457, 1280, 1186, 1156, 1083, 732  $\text{cm}^{-1}$  ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของ TP5/25\_1 แสดงในตารางที่ 7, ESIMS  $m/z$  (% relative intensity) 511  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (100), HRESIMS  $m/z$  511.2346

ตารางที่ 7 ข้อมูล  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  NMR ของสาร TP5/25\_1 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

No.	$^{13}\text{C}$ (mult)	$^1\text{H}$ ( $J$ in Hz)
1	16.4 ( $\text{CH}_3$ )	1.84, s
2	17.6 ( $\text{CH}_3$ )	1.57, s
3	21.6 ( $\text{CH}_2$ )	3.56, d ( $J = 7.9$ ), 2H
4	23.0 ( $\text{CH}_3$ )	1.81, s
5	25.6 ( $\text{CH}_3$ )	1.62, s
6	26.4 ( $\text{CH}_2$ )	2.03, m, 2H
7	26.5 ( $\text{CH}_2$ )	4.11, d ( $J = 5.9$ ), 2H
8	39.7 ( $\text{CH}_2$ )	2.03, m, 2H
9	62.0 ( $\text{CH}_3$ )	3.82, s
10	63.0 ( $\text{CH}_2$ )	4.38, s, 2H
11	63.7 (C)	-
12	93.8 (CH)	6.35, s
13	101.5 (CH)	6.83, s
14	123.2 (CH)	5.28, t, ( $J = 5.1$ )
15	124.3 (CH)	5.05, t, ( $J = 5.1$ )
16	127.0 (CH)	5.50, t, ( $J = 7.3$ )

17	154.5 (C)	-
18	169.6 (C)	-
19	188.0 (C)	-
20	192.6 (C)	-
-OH	-	6.44, br s
-COOH	-	13.87, s

จากข้อมูล  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra พบว่า TP5/25 มีจำนวน carbon 20 atoms และ  $^1\text{H}$  32 atoms ซึ่งจาก DEPT experiment พบว่ามี 5 methyls, 5 methylenes, 5 methines และ 5 quaternary carbons และมีสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของ carboxylic acid ที่  $\delta_{\text{H}}$  13.87 (-COOH) และ  $\delta_{\text{C}}$  188.0 (-COOH) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณของ ketone ที่  $\delta_{\text{C}}$  192.6 (-CO-) ซึ่งยืนยันด้วยการพบสัญญาณของหมู่ carboxylic acid และ ketone ใน IR spectra ที่ 3500 (-COOH), 1645 (-CO-) และ 1605 (-CO-)  $\text{cm}^{-1}$

เนื่องจาก TP5/25\_1 มีปริมาณสารน้อย (2.8 mg) ทำให้ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสาร แต่สามารถคาดการณ์ได้ว่ามีความน่าจะเป็นสารในกลุ่ม terpene จากจำนวน carbon atoms และ จำนวน methyl group ในโมเลกุล ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารนี้ จำเป็นต้องมีการแยกสารเพิ่มเติมจาก fraction ข้างเคียง หรือต้องส่งสารเพื่อวิเคราะห์ข้อมูล NMR ด้วยเครื่องมือที่มีค่าความถี่สูงกว่า 400 MHz จะทำให้ได้สัญญาณที่มี resolution ที่ดีกว่า ทำให้ได้ข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารเพิ่มเติม

ในการสกัดตัวอย่างชั้นจากชั้นโรงในขั้นตอนแรกด้วย hexane จนสารละลาย hexane มีสีจางลงจนสีคงที่ เพื่อกำจัด wax ก่อนการสกัด residue ที่เหลือด้วย methanol ทำให้สารที่ไม่มีขี้บางชนิด ที่อาจมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ถูกกำจัดออกไปพร้อมกับสารละลาย hexane ทำให้สารสำคัญในกลุ่มดังกล่าวไม่ได้ถูกนำมาศึกษาในการศึกษาวิจัยนี้ ดังนั้นในการกำจัด wax ออกจากตัวอย่างชั้น จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดให้ได้สารสกัดชั้นที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ครบถ้วน ก่อนนำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

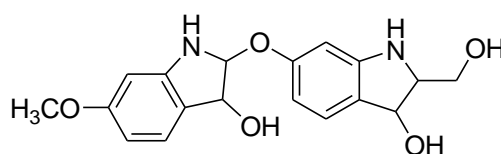
### (Conclusions)

#### สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดจันทบุรี พบว่าตัวอย่างชั้นจากชั้นโรง เป็นชั้นที่ได้จากชั้นโรงสายพันธุ์ *Tetragonula pegdeni* ที่เก็บได้จากในพื้นที่จังหวัดจันทบุรี โดยในการศึกษาวิจัยนี้ ได้ศึกษาตัวอย่างชั้นจากชั้นโรงจำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ สวนสมุนไพรร สวนส้มโอ และป่าชายเลน จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ พบว่าสารสกัด methanol ของชั้นจากสวนส้มโอและป่าชายเลน มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ดี โดยสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) และมะเร็งผิวหนัง (SK-MEL-28 cell) ได้ดี และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (human fibroblast cell) ในระดับต่ำ โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 63.43 และ 18.71  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดชั้นจากป่าชายเลน แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB cell), เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco2 cell) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell) ได้ดี โดยแสดงฤทธิ์ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 59.10, 27.37, และ 38.87  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ แต่เนื่องจากสารสกัดชั้นจากป่าชายเลนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติสูงกว่าสารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ โดยมีค่า  $IC_{50}$  ต่อ human fibroblast cell เท่ากับ 15.22 และ 213.85  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ ทำให้สารสกัดชั้นจากสวนส้มโอ มีความน่าสนใจในการนำมาสกัดแยกสารด้วยวิธีต่าง ๆ ทาง chromatography เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดชั้นจากชั้นโรง

จากการสกัดแยกสารสกัดชั้นจากชั้นโรงสวนส้มโอด้วย vacuum chromatography ( $\text{SiO}_2$ , dichloromethane : methanol, 9:1), flash column chromatography ( $\text{SiO}_2$ , hexane : ethyl acetate, 1:1) และ HPLC (C18, gradient system, 10-30% water in methanol, flow rate 2.6 mL/min, RT = 8.5 min) ได้สารบริสุทธิ์รายการแรก คือ TP5/21 (16 mg) สารบริสุทธิ์รายการที่ 2 คือ TP5/23\_1 (3.3 mg) ได้มาจากการ purify fraction TP5/23 ด้วย HPLC (C18, 55% water in acetonitrile, flow rate 2.6 mL/min, RT = 14.6 min) และสารบริสุทธิ์รายการที่ 3 คือ TP5/25\_1 (2.8 mg) ได้มาจากการ purify TP5/25 ด้วย HPLC (C18, 10% water in acetonitrile, flow rate 2.0 mL/min, RT = 15.4 min)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ทั้ง 3 รายการ ได้แก่ TP5/21 คือ 1*H*-indole-2-methanol-3-ol,2,3-dihydro-6-methoxy และ TP5/23\_1 ซึ่งเป็น dimethoxy derivative ของ TP5/21 ซึ่งสารทั้งสองชนิดเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักเป็น indole alcohol ซึ่งมี tryptophan เป็นสารตั้งต้นในวิถีชีวสังเคราะห์



TP5/21

สารบริสุทธิ์รายการที่ 3 ที่ได้จากการแยกสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่เก็บได้จากสวนส้มโอ คือ TP5/25\_1 เป็นของแข็งสีเหลือง แต่เนื่องจากสารที่แยกได้มีปริมาณน้อย เพียง 2.8 mg และด้วยข้อจำกัดเกี่ยวกับศักยภาพของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ทำให้ข้อมูลที่สำคัญในการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมียังไม่เพียงพอ ทำให้ไม่สามารถแปลสูตรโครงสร้างได้ทั้งหมด แต่จากการศึกษา  $^1\text{H}$  และ  $^{13}\text{C}$  MNR spectra เบื้องต้นพบว่าเป็นสารในกลุ่ม terpene มีจำนวน 20 carbons จำแนกได้เป็น 5 methyls, 5 methylenes, 5 methines และ 5 quaternary carbons มี functional group ที่สำคัญ ได้แก่ carboxylic acid และ ketone ในโครงสร้างทางเคมี ซึ่งยืนยันได้จากสัญญาณ  $\delta_{\text{H}}$  13.87 (-COOH) และ  $\delta_{\text{C}}$  188.0 (-COOH) ของ carboxylic group และ  $\delta_{\text{C}}$  192.6 (-CO-) ของ ketone ซึ่งยืนยันด้วยการพบสัญญาณของหมู่ carboxylic acid และ ketone ใน IR spectra ที่ 3500 (-COOH), 1645 (-CO-) และ 1605 (-CO-)  $\text{cm}^{-1}$

### ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดชั้นจากชั้นโรง *Tetragonula pegdeni* การศึกษาวิถีชีวสังเคราะห์ และการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง

## ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลการวิจัยที่ได้

เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษา SAR (Structure Activity Relationship) ของสารกลุ่ม indole alcohol ที่มีผลต่อกลไกในการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคต

## ผลผลิตและผลลัพธ์ (Output/Outcome)

### ผลผลิต (Outputs)

1. ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในสารสกัดชั้นจากชั้นโรง *Tetragonula pegdeni* ที่เก็บได้จากสวนส้มโอ
2. ทราบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งต่าง ๆ ของสารสกัดชั้นจากชั้นโรงที่ได้จากสวนส้มโอ สวนสมุนไพรร และป่าชายเลน

### ผลลัพธ์ (Outcomes)

1. เพิ่มมูลค่าให้กับชั้นจากชั้นโรง ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้ ที่เกษตรกรได้จากการเลี้ยงชั้นโรงเพื่อใช้ในการผสมเกสรผลไม้เศรษฐกิจ
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการศึกษา SAR และกลไกในการออกฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่ม indole alkaloids
3. ประยุกต์ใช้ในการเรียนการสอนด้านการวิจัยเพื่อค้นคว้าหาวิทยาใหม่จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
4. ตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดชั้นจากชั้นโรง

## รายงานสรุปการเงิน

สัญญาเลขที่ 4/2559 (เพิ่มเติม)

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

มหาวิทยาลัยบูรพา

**ชื่อโครงการ** การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัดชันโรงจากแหล่งต่าง ๆ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

**ชื่อหัวหน้าโครงการ** เกษัชกรหญิง ดร.นภัสสร ฉันทธำรงค์ศิริ

รายงานในช่วง วันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงวันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2562

ระยะเวลาการดำเนินการ ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2562

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	202,500 บาท	เมื่อ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2559
งวดที่ 2 (40%)	162,000 บาท	เมื่อ 29 กันยายน พ.ศ. 2559
งวดที่ 3 (10%)	40,500 บาท	เมื่อ -
รวม	405,000 บาท*	

\*จำนวนเงินรวม 450,000 บาท หักค่าสาธารณูปโภค 45,000 บาท คงเหลือ 405,000 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	40,000	40,000	0
2. ค่าจ้าง	-	-	-
3. ค่าวัสดุ	265,000	342,176.52	เกิน 77,176.52
4. ค่าใช้สอย	100,000	23,673.00	เหลือ 76,327.00
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าสาธารณูปโภค	45,000	45,000	0
รวม	450,000	450,849.52	เกิน 849.52

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

นางสาว นภััสสร ฉันทอำรังศิริ

## บรรณานุกรม (Bibliography)

1. กัณฑ์กนิษฐ สุธริยะจันทร์ และ ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว. คุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคใน กระเพาะอาหาร *Helicobacter pylori* ของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 4<sup>th</sup> Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012.
2. กীরติญา เอี่ยมถาวร และ ยิ่งมณี ตระกูลพั้ว. การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพรพอลิส นมผึ้ง และฟ้าทะลายโจร. การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานระดับชาติ The 4<sup>th</sup> Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012.
3. พันธุ์ญา พบสุข. ชีววิทยาของชันโรง (Apidae: *Trigona* spp., *Hypotrigona* spp.) ในโครงการทองผาภูมิ 72 พรรษามหาราช อำเภทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2549.
4. วันทา ทวีผล. การศึกษาชีววิทยาของชันโรง *Trigona* (*Lepidotrigona*) *terminata* Smith และประสิทธิภาพการช่วยผสมเกสรทุเรียนพันธุ์ชะนี (*Durio zibethinus* L.) Cultivar Chane. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2546
5. สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555 <http://www.agriman.doae.go.th/home/news/of%20newsyear%202555.html> สืบค้นเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2556.
6. สุรพงศ์ สายบุญ. ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของชันโรง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2539.
7. Berretta. A.A, Nascimento, A,P, Bueno P.C., Vaz, M.M., Marchetti, J.M. *Propolis standardized extract ( EPP- AF( R) ), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds.* INT J BIOL SCI. 2012;8(4):512-21.



8. Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., et al. *Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities*. J ETHNOPHARMACOL. 2001;74(2):105-12.
9. Michener, C.D. *The Bee of the World*. The Johns Hopkins University press. 2000.
10. Schwarz, H. F. *The Indo-Malayan species of Trigona*. B AM MUS NAT HIST. 2008;111(1939): 83-141.
11. Sforcin, J.M. *Propolis and the immune system: a review*. J ETHNOPHARMACOL. 2007;113(1):1-14.
12. Sforcin, J.M., Bankova, V. *Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?* J ETHNOPHARMACOL. 2011;133(2):253-60.
13. Shahruzaman, S.H., Mustafa, M.F., Ramili, S., Maniam, S., Fakurazi, S., and Maniam, S. *The cytotoxicity properties of Baeckea frutescens Branches extracts in eliminating breast cancer cells*. EVID-BASED COMPL. ALT. 2019; 2019:9607590: 1-9.
14. Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Chanchao, C. *In vitro antiproliferative activity of partially purified Trigona laeviceps propolis from Thailand on human cancer cell lines*. BMC. COMPLEM. ALTERN. M. 2011;11(1):1-8.