การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM AERIAL PARTS OF *BOESENBERGIA VIOLACEA* (K.LARSEN & TRIBOUN) MOOD & L.M.PRINCE

ปทิตตา ชูทรัพย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

ปทิตตา ชูทรัพย์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM AERIAL PARTS OF *BOESENBERGIA VIOLACEA* (K.LARSEN & TRIBOUN) MOOD & L.M.PRINCE

PATITTA CHOOSUB

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Chemistry)

Faculty of Science, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

ของ

ปทิตตา ชูทรัพย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สิริธร สโมสร)

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐพล อภิรติกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน
ผู้วิจัย	ปทิตตา ชูทรัพย์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สิริธร สโมสร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ

Boesenbergia violacea (K.Larsen & Triboun) Mood & L.M.Prince (ชื่อพ้อง : *Caulokaempferia violacea* K.Larsen & Triboun) หรือ “เปราะภูสีม่วง” เป็นพืชเฉพาะถิ่น สามารถพบได้ที่จังหวัดเลย ประเทศไทย เปราะภูสีม่วงถือเป็นพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและทำการแยกหาสารสำคัญในส่วนสกัดเปราะภูสีม่วง โดยนำพืชส่วนใบมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน ส่วนลำต้นมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน และส่วนลำต้นเหนือดินที่มีทั้งใบและลำต้นผสมกันมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กับเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และเซลล์ปกติชนิด Vero โดยใช้ MTT assay จากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าส่วนสกัดเฮกเซนของส่วนลำต้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.40±1.03 และ 89.66±1.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งส่วนสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero มีค่า IC_{50} เท่ากับ 183.3±1.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนสกัดเฮกเซนที่ได้ไปตรวจหาส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง พบว่าส่วนย่อย 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.39±1.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} กับเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A431 เท่ากับ 51.01±1.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ส่วนย่อยนี้ มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำการแยกหาสารออกฤทธิ์ นอกจากนี้ได้นำส่วนสกัดของส่วนลำต้นเหนือดินมาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าได้สารบริสุทธิ์ออแรนไทเอไมด์อะซีเตต ซึ่งยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโตสโกปี

คำสำคัญ : เปราะภูสีม่วง, ออแรนไทเอไมด์อะซีเตต, ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง

Title	STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM AERIAL PARTS OF *BOESENBERGIA VIOLACEA* (K.LARSEN & TRIBOUN) MOOD & L.M.PRINCE
Author	PATITTA CHOOSUB
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Siritron Samosorn
Co Advisor	Assistant Professor Dr. Piyada Jittangprasert

Boesenbergia violacea (K. Larsen & Triboun) Mood & L.M. Prince (Basionym: *Caulokaempferia violacea* K.Larsen & Triboun) is locally called *Por Phu Muang*. It is an endemic plant and can be found in the Loei province of Thailand. However, there is no data available on the biological activities and the chemical composition of *B. violacea*. Thus, this study aimed to evaluate biological activities and chemical composition of the extracts from aerial parts (leaf and stem) of *B. violacea*. The leaf was extracted by a liquid-liquid partition, while sequential extraction was used for the stem, and the whole aerial parts were extracted by soxhlet extraction. All extracts were screened for cytotoxicity against A375, A431, LoVo, SW1353, MDA-MB-231, PC3 cancer cell lines and Vero normal cell lines by MTT assay. The biological activity revealed that the *n*-hexane extract of the stem was more active than leaf and aerial part extracts with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 31.40±1.03 and 89.66±1.12 µg/mL against skin cancer cell lines A375 and A431, respectively. Interestingly, the *n*-hexane extract was nontoxic to Vero normal cells with an IC_{50} value of 183.30±1.06 µg/mL. The screening of bioactive compounds in the *n*-hexane extract was continued by Bioassay-guided fractionation. The fraction obtained from 1% methanol in dichloromethane was the most active with IC_{50} value of 38.39±1.04 and 51.01±1.04 against skin cancer cell lines A375 and A431, respectively. Unfortunately, this fraction was not enough to purify for active compound identification. In addition, the extract from the aerial parts was purified by column chromatography and provided Aurantiamide acetate as a pure compound confirmed by the spectroscopy technique.

Keyword : Por Phu Muang, Caulokaempferia violacea, Boesenbergia violacea, Aurantiamide acetate, Anticancer activity

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณายิ่งจาก รศ.ดร.สิริธร สโมสร และ ผศ.ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขปัญหา ข้อบกพร่องต่าง ๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัย รวมไปถึงการเขียนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ อีกทั้งทำให้ผู้วิจัยได้รับประสบการณ์ในการทำวิจัย ได้รับความรู้และเห็นคุณค่าของงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.พนม สุทธิศักดิ์โสภณ และนายกิตติธัช รมย์ทอง ภาควิชาสิ่งแวดล้อม คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการลงพื้นที่เก็บเปราะภูสีม่วงที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย ประเทศไทย

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการนำทาง รักษาความปลอดภัยและอำนวยความสะดวกในการลงพื้นที่

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รมิดา วัฒนโภคาสิน และนางสาวปัทมาพรรณ ถำวาปี ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการบันทึกข้อมูล NMR

ขอขอบพระคุณ ดร.กำธร อินทรพิชัย สำหรับทุนค่าลงทะเบียนการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ดร.ดวงแข ศรีคุณ โรงเรียนมหิดลวิทยานุสรณ์ สำหรับการสกัดด้วยเครื่องซอกห์เลต

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.บุญเอก ยิ่งยงณรงค์กุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ ผศ.ดร.ณัฐพล อภิรติกุล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานและกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เกรียงศักดิ์ ส่งศรีโรจน์ และ รศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานและกรรมการในการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และให้ความเมตตาแก่ผู้วิจัยเสมอมา ในการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

คุณค่าของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณต่อครอบครัวของผู้วิจัย ผู้วิจัยขอน้อมรำลึกถึงพระคุณมารดา และญาติสนิททุกท่านที่มอบกำลังใจ ความเอาใจใส่ และสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในครั้งนี้

ปทิตตา ชูทรัพย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 2

ความสำคัญของการวิจัย 2

ของเขตของการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

1 เปราะภูสีม่วง 4

1.1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุลกระชาย 9

1.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในกระชาย 14

2 วิธีการสกัดพืช 24

3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น 26

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 27

1.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 27

1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 27

1.3 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 28
2 การสกัดเปราะภูสีม่วงและการแยกองค์ประกอบทางเคมี 28
2.1 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Partition extraction) 29
2.2 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน (Sequential extraction) 30
2.3 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction) 31
3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 33
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell cultures) 33
3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ MTT assay 34
บทที่ 4 ผลการทดลอง 35
การศึกษาวิธีการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินที่เหมาะสมในการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ 35
1.1 วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน 35
1.2 วิธีการสกัดแบบลำดับส่วน 36
1.3 วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง 37
การแยกหาสารสำคัญในสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง 39
บทที่ 5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ 45
ข้อเสนอแนะ 47
บรรณานุกรม 48
ประวัติผู้เขียน 54

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 รายงานการค้นพบพืชในสกุล *Caulokaempferia* 6

ตาราง 2 รายงานการค้นพบพืชสกุล *Boesenbergia* ในประเทศไทย 8

ตาราง 3 ค่า IC_{50} ของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60 10

ตาราง 4 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ฟลาวาโนน 15

ตาราง 5 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ฟลาโวน 16

ตาราง 6 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไตรไฮดรอกซีฟลาโวนอล 17

ตาราง 7 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ชาลโคน 17

ตาราง 8 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไซโคลเฮกซินิลชาลโคน 18

ตาราง 9 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์เอสเทอร์ 19

ตาราง 10 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ซินนามอล 20

ตาราง 11 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ (แบบ Acyclic) 21

ตาราง 12 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ (แบบ Cyclic) 22

ตาราง 13 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบในกลุ่มอื่น ๆ 24

ตาราง 14 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน 36

ตาราง 15 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน 36

ตาราง 16 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง 37

ตาราง 17 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน 38

ตาราง 18 องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัด จากวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน 40

ตาราง 19 ค่า IC_{50} ของส่วนย่อยที่ทำการแยกมาจากส่วนสกัด BV(5) 42

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 พืชสกุลหลักที่อยู่ในพืชวงศ์ขิง และแสดงตำแหน่งของพืชสกุล *Caulokaempferia* 4

ภาพประกอบ 2 อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Caulokaempferia* 5

ภาพประกอบ 3 ส่วนลำต้นเหนือดินของเปราะภูสีม่วง 7

ภาพประกอบ 4 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในกระชาย 10

ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารประกอบ Panduratin A 11

ภาพประกอบ 6 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่พบในกระชาย 13

ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของฟลาวาโนน 15

ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของฟลาโวน 16

ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของไตรไฮดรอกซีฟลาโวนอล 16

ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของชาลโคน 17

ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของ ไซโคลเฮกซินิลชาลโคน 18

ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของเอสเทอร์ 19

ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของซินนามอล 20

ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างเครื่องซอกห์เลตที่ใช้ในการสกัดแบบต่อเนื่อง 25

ภาพประกอบ 15 การแบ่งส่วนของพืชที่จะนำมาทำการสกัด 28

ภาพประกอบ 16 ลำดับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนใบ 29

ภาพประกอบ 17 ลำดับตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีการสกัดลำดับส่วน 30

ภาพประกอบ 18 ตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง 31

ภาพประกอบ 19 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดและตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค Bioassay-guided fractionation 32

ภาพประกอบ 20 แสดง TLC ของส่วนสกัดส่วนลำต้นด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน..... 40

ภาพประกอบ 21 ลำดับของการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด BV(5) 41

ภาพประกอบ 22 แสดงผลึกรูปเข็มของสารบริสุทธิ์ BV(14) 43

ภาพประกอบ 23 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ BV(14) 44

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) เป็นวงศ์พืชขนาดใหญ่วงศ์หนึ่ง เป็นแหล่งสำคัญของผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมากมายและอยู่คู่คนไทยมาช้านาน โดยส่วนใหญ่มีการนำพืชในวงศ์นี้มาเป็นส่วนผสมในการประกอบอาหาร ใช้เป็นเครื่องเทศ ยารักษาโรค สีย้อม รวมไปถึงเป็นวัตถุดิบในการทำเครื่องสำอาง โดยพืชวงศ์นี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิประเทศเขตร้อนชื้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งคาดว่าน่าจะพบในโลกประมาณ 1,400 ชนิด สำหรับประเทศไทยพบประมาณ 300 ชนิด (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2008) ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในวงศ์นี้มากเช่น ขิง (*Zingiber officinale*) มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory) ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยับยั้งแบคทีเรีย (antibacterial) (Mao et al., 2019) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* (Bhamarapravati et al., 2006) ยับยั้งมะเร็ง (anticancer) (Kirana et al., 2003) ขมิ้น (*Curcuma longa* L.) มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ยับยั้งอนุมูลอิสระ ยับยั้งโปรโตซัว (anti-protozoal) และยับยั้งเชื้อเอชไอวี (anti-HIV) (Araújo & Leon, 2001) ซึ่งจากข้อมูลที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่าพืชในวงศ์ขิงนี้ มีสรรพคุณทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย

เมื่อไม่กี่ปีมานี้มีการค้นพบพืชท้องถิ่นชนิดใหม่ ซึ่งเป็นสมาชิกของพืชวงศ์ขิง อยู่ในสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen มีชื่อเรียกว่า “เปราะหินหรือเปราะภูเมือง” สามารถพบพืชชนิดนี้ทางตอนเหนือของประเทศไทย ที่จังหวัดเชียงใหม่ เลย (Larsen, 2002) แม่ฮ่องสอน (Phokham et al., 2015) หนองคาย และนครพนม (Picheansoonthon & Koonterm, 2008) ที่ความสูงระหว่าง 800 – 1400 เมตรจากระดับน้ำทะเล พืชชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ชื้น ตามซอกหินแตกที่มีตะไคร่ปกคลุม บริเวณลำธารหรือบริเวณที่มีแอ่งน้ำ (Larsen, 2002) มีการขยายพันธุ์โดยการใช้การแตกหน่อจากส่วนเหง้า จึงทำให้มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่ต่ำ (Bunnag et al., 2006) ซึ่งจากสภาวะการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ทำให้เปราะภูเป็นพืชท้องถิ่นที่หายากชนิดหนึ่งในประเทศไทย

ในปี 2014 มีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชสกุลนี้จาก *Caulokaempferia* เป็น *Boesenbergia* (K. Larsen & Triboun) Mood & L.M. Prince (Mood, Veldkamp, Dey, et al., 2014) โดยพืชสกุลนี้มีการนำมาใช้โดยแพทย์พื้นบ้าน นำไปรักษาอาการเจ็บป่วยต่าง ๆ (ethnomedicine) เช่น รักษาอาการหัวหมุน (Thongaram et al., 2005) บำบัดโรคกระเพาะ (Tiyaworanant, 2010) หรือแม้กระทั่งนำไปรักษาอาการเบื้องต้นของต่อมลูกหมากโต (prostatic hyperplasia) (Phokham et al., 2015)

พืชสกุล *Boesenbergia* สปีชีส์ *violacea* หรือท้องถิ่นเรียกว่า “เปราะภูสีม่วง” สามารถพบได้ที่จังหวัดเลย ประเทศไทย (Larsen, 2002) เป็นพืชท้องถิ่นที่หายากชนิดหนึ่ง ซึ่งเปราะภูสีม่วงนี้ถือเป็นพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีการรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่แท้จริงและองค์ประกอบทางเคมีในพืชชนิดนี้มาก่อน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำเปราะภูสีม่วงมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมไปถึงองค์ประกอบทางเคมี เนื่องจากพืชชนิดนี้จัดเป็นพืชหายากงานวิจัยนี้จะทำการเก็บพืชสมุนไพรแบบอนุรักษ์ โดยจะเก็บเฉพาะส่วนของลำต้นเหนือดินเท่านั้น มาทำการศึกษาวิจัย เพื่อให้หัวใต้ดินของพืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยดูความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน
2. เพื่อทำการแยกหาสารสำคัญในส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง

ความสำคัญของการวิจัย

1. เพื่อให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน
2. เพื่อให้ทราบสารสำคัญในส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

ของเขตของการวิจัย

1. ทำการเก็บเปราะภูสีม่วงโดยเก็บเฉพาะส่วนลำต้นเหนือดินคือส่วนลำต้นและส่วนใบเท่านั้น

2. ทำการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน ด้วยวิธีการสกัดและตัวทำละลายที่เหมาะสม

3. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยดูความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

4. ทำการแยกหาสารสำคัญในส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

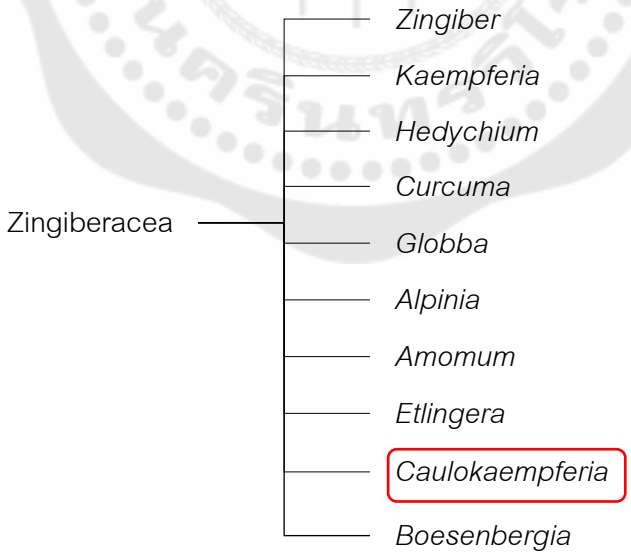
1 เปราะภูสีม่วง

2 วิธีการสกัดพืช

3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

1 เปราะภูสีม่วง

พืชวงศ์ขิงเป็นวงศ์พืชขนาดใหญ่ที่มีการกระจายพันธุ์ไปทั่วโลก สามารถเจริญเติบโตได้ดีในภูมิประเทศเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพืชในวงศ์นี้ประกอบด้วย 10 สกุลหลัก (Rachkeeree et al., 2018) ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 พืชสกุลหลักที่อยู่ในพืชวงศ์ขิง และแสดงตำแหน่งของพืชสกุล *Caulokaempferia*

สกุล *Caulokaempferia* K. Larsen เป็นสกุลหลักที่อยู่ในพืชวงศ์ขิง โดยมีอนุกรมวิธานดังภาพประกอบ 2 ซึ่งสกุลนี้ถูกจัดตั้งโดย Kai Larsen ในปี 1964 มีการกระจายพันธุ์ตั้งแต่เทือกเขาหิมาลัย อินเดีย (รัฐสิกขึม รัฐเมฆาลัย และรัฐมิโซแรม) ภูฏาน ทางตอนใต้ของจีน ลาว เวียดนาม และไทย (Phokham et al., 2015)

Kingdom Plantae
Class Monocotyledonae
Order Zingiberales
Family Zingiberaceae
Tribe Hedychium
Genus *Caulokaempferia*

ภาพประกอบ 2 อนุกรมวิธานของพืชสกุล *Caulokaempferia*

ที่มา: Larsen, K., et al. (2005). Further studies in the genus *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand with the description of two new species. *Nordic Journal of Botany, 23*, 401-406.

พืชสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ชื้น ตามซอกหินแตกที่มีตะไคร่ปกคลุม บริเวณลำธารหรือบริเวณที่มีแอ่งน้ำ มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า ลำต้นเทียมตั้งต้นหรือเกาะบนหิน และมีดอกหลายสีเช่น สีเหลือง สีขาว สีชมพูหรือสีม่วง ในปัจจุบันพืชสกุลนี้มีประมาณ 30 ชนิด และมีรายงานการค้นพบพืชสกุลนี้ในแถบเอเชีย ดังตาราง 1

ตาราง 1 รายงานการค้นพบพืชในสกุล *Caulokaempferia*

ชนิดของพืช	แหล่งที่พบ	เอกสารอ้างอิง
C. alba	ไทย	(Larsen, 1973)
C. saksuwaniae	ไทย	(Larsen, 1973)
C. appendiculata	ไทย	(Larsen, 2002)
C. bracteata	ลาว	(Larsen, 2002)
C. violacea	ไทย	(Larsen, 2002)
C. khaomaenensis	ไทย	(Picheansoonthon, 2004b)
C. phuluangensis	ไทย	(Picheansoonthon, 2004b)
C. jirawongsei	ไทย	(Picheansoonthon, 2004a)
C. limiana	ไทย	(Picheansoonthon, 2004a)
C. burttii	ลาว	(Larsen & Jenjittikul, 2004)
C. larsenii	ไทย	(Suksathan & Triboun, 2004)
C. amplexicaulis	ไทย	(Larsen et al., 2005)
C. pedemontana	ไทย	(Larsen et al., 2005)
C. laotica	ลาว	(Picheansoonthon & Mokkamul, 2006)
C. satunensis	ไทย	(Picheansoonthon et al., 2007)
C. phuwoaensis	ไทย	(Picheansoonthon & Koonterm, 2008)
C. phulangkaensis	ไทย	(Picheansoonthon & Koonterm, 2008)
C. phutokensis	ไทย	(Picheansoonthon & Koonterm, 2008)
C. sirirugsae	ไทย	(Ngamriabsakul, 2008)
C. chayaniana	ไทย	(Tiyaworanant, 2010)
C. coenobialis	จีน	(Intharapichai, 2015)
C. yunnanensis	จีน	(Intharapichai, 2015)
C. petelotii	เวียดนาม	(Intharapichai, 2015)
C. linearis	อินเดีย	(Intharapichai, 2015)
C. secunda	อินเดีย	(Intharapichai, 2015)
C. sikkimensis	อินเดีย	(Intharapichai, 2015)

โดยพืชสกุลนี้มีความเชื่อที่บอกเล่าต่อกันมาว่าในประเทศอินเดียแพทย์พื้นบ้านของชนเผ่าจักม่า (Chakma tribe) มีการนำ *C. linearis* ส่วนใบนำมาตำและพอกบริเวณศีรษะเพื่อแก้อาการหัวหมุน (Rai & Lalramnghinglova, 2010) หรือชนเผ่าเลปช่า (Lapcha tribe) ที่อาศัยอยู่ทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย มีการนำ *C. sikkimensis* ส่วนหัวนำมาตำและพอกบริเวณที่กระดูกเคลื่อนหรือแตกหักเพื่อช่วยสมานกระดูก (Pradhan & Badola, 2008) นอกจากนี้ในประเทศไทยพระเดินธุดงค์ในป่ามีการนำ *C. phutokensis* มาใช้ในการรักษาอาการเบื้องต้นของโรคต่อมลูกหมากโต (Phokham et al., 2015) และมีการนำ *C. chayaniana* มาบำบัดโรคกระเพาะอาหาร (Tiyaworanant, 2010) จากความเชื่อที่บอกเล่าต่อกันมาแสดงให้เห็นถึงบทบาททางเภสัชวิทยาที่สำคัญของพืชในสกุลนี้ แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในสกุลนี้ จึงทำให้ไม่สามารถยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพที่แน่นอนของพืชในสกุลนี้ได้ ทำให้พืชในสกุลนี้เป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่แท้จริงและองค์ประกอบทางเคมี

ภาพประกอบ 3 ส่วนลำต้นเหนือดินของเปราะภูสีม่วง

(เก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย ประเทศไทย)

พืชสกุลนี้เดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า “*Caulokeampferia*” เนื่องจากมีการรายงานการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอของเปราะภู ซึ่งพบว่าเปราะภูสีม่วงมีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสกุล *Boesenbergia* (Thongaram et al., 2005) จึงทำให้ในปัจจุบันมีการเปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชสกุลนี้เป็น “*Boesenbergia* (K.Larsen & Triboun) Mood & L.M.Prince” (Mood, Veldkamp, Dey, et al., 2014) (ภาพประกอบ 3)

สกุลกระชาย หรือ *Boesenbergia violacea* เป็นพืชสกุลหนึ่งในพืชวงศ์ขิง โดยพืชสกุลนี้มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก มีขนาดเล็ก ความสูงประมาณ 15 - 40 เซนติเมตร ใบมีลักษณะกว้างสีเขียวอ่อน มีกาบใบสีแดง มีเหง้าใต้ดินสีเหลือง (Sirirugsa, 1992) มีการค้นพบพืชในสกุลนี้ในประเทศไทยหลายสปีชีส์ ดังตาราง 2

ตาราง 2 รายงานการค้นพบพืชสกุล *Boesenbergia* ในประเทศไทย

ชนิดของพืชในสกุล *Boesenbergia*	เอกสารอ้างอิง
B. acuminata P.Sirirugsa	(Sirirugsa, 1987)
B. baimaii S.Saensouk & K.Larsen	(Saensouk & Larsen, 2002)
B. basispicata K.Larsen ex P.Sirirugsa	(Sirirugsa, 1987)
B. curtisii (Bak.) Schltr	(Sirirugsa, 1992)
B. isanensis Saensouk & P.Saensouk	(Saensouk & Saensouk, 2020)
B. longiflora (Wall.) Kuntze	(Mood et al., 2013)
B. longipes (King & Prain) Schltr.	(Sirirugsa, 1992)
B. longipes (King & Prain ex Ridl.) Schltr.	(Mood, Veldkamp, & Prince, 2014)
B. putiana Mood & L.M.Prince	(Mood et al., 2019)
B. phengklaii Mood	(Mood et al., 2019)
B. parvula (Wall. ex Bak.) Kuntze	(Sirirugsa, 1992)
B. petiolata P. Sirirugsa	(Sirirugsa, 1987)
B. plicata (Ridl.) Holttum	(Sirirugsa, 1992)
B. prainiana (King ex Bak.) Schltr.	(Sirirugsa, 1992)

ตาราง 2 (ต่อ)

ชนิดของพืชในสกุล *Boesenbergia*	เอกสารอ้างอิง
B. pulcherrima (Wall.) Kuntze	(Sirirugsa, 1992)
B. purpureorubra Mood & L.M.Prince	(Mood, Veldkamp, & Prince, 2014)
B. rotunda (L.) Mansf.	(Sirirugsa, 1992)
B. siamensis (Gagnep.) P. Sirirugsa	(Sirirugsa, 1992)
B. tenuispicata K.Larsen	(Larsen, 1993)
B. thorelii (gagnep.) Loes.	(Sirirugsa, 1992)
B. xiphostachya (Gagnep.) Loes.	(Sirirugsa, 1992)
B. violacea (K.Larsen & Triboun) Mood & L.M.Prince	(Mood, Veldkamp, Dey, et al., 2014)

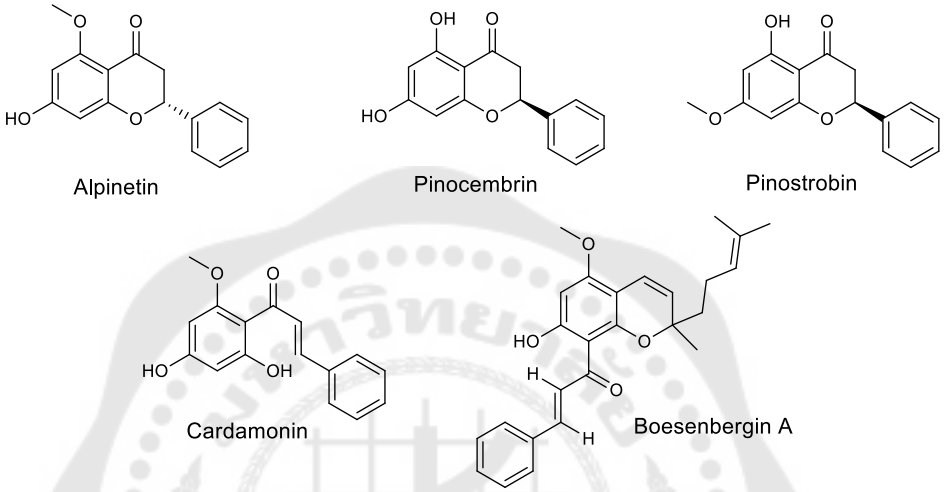
พืชสกุลกระชายเป็นพืชที่นิยมนำไปเป็นส่วนผสมอาหารสำหรับรับประทานในแถบเอเชีย เช่น ประเทศไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย และจีน นอกจากจะนำไปรับประทานแล้วกระชายยังถือเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่นำไปรักษาอาการเจ็บป่วยต่าง ๆ เช่น อาการเจ็บกล้ามเนื้อ โรคไขข้อ (Rheumatism) ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal disorders) ท้องอืด ท้องเฟ้อ (Carminative) อาหารไม่ย่อย (Dyspepsia) และอื่น ๆ อีกมากมาย (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2008) ส่งผลให้ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุลกระชายดังนี้

1.1 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุลกระชาย

1.1.1 ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นโรคที่มีความเสี่ยงสูงอันดับต้น ๆ ที่ทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิต มีการค้นคว้าวิธีการรักษาหรือตัวยาสำหรับยับยั้งมะเร็งชนิดต่าง ๆ แต่ยังคงมีปัญหาเรื่องผลข้างเคียงของการใช้ยา ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติของพืชในวงศ์ขิงมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ โดยมีรายงานดังนี้

ในปี 2001 Araújo และคณะ (Araújo & Leon, 2001) ได้ทำการสกัดกระชายและทำการแยกสารประกอบซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ Alpinetin Pinocembrin Pinostrobin Cardamonin และ Boesenbergin A (ภาพประกอบ 4) และนำมาทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60



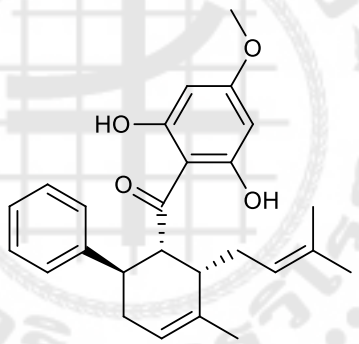
ภาพประกอบ 4 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในกระชาย

ตาราง 3 ค่า IC_{50} ของส่วนสกัดและสารบริสุทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60

สารที่ทดสอบฤทธิ์	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
ส่วนสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซน	8.5
ส่วนสกัดจากตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม	5.8
ส่วนสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล	> 30.0
Alpinetin	11.0
Pinocembrin	> 30.0
Pinostrobin	> 30.0
Cardamonin	23.2
Boesenbergin A	5.8

จากผลการทดลอง (ตาราง 3) พบว่าส่วนสกัด ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดเม็ดเลือดขาวชนิด HL60 ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 8.5 และ 5.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ดีกว่าส่วนสกัดที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และเมื่อทำการแยกสารบริสุทธิ์และนำไปทดสอบฤทธิ์ พบว่า Boesenbergin A มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL60 ได้เท่ากับส่วนสกัดจากคลอโรฟอร์ม โดยมีค่า IC_{50} ที่ 5.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปี 2005 Zaeoung และคณะ (Zaeoung et al., 2005) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LS174T โดยการนำน้ำมันหอมระเหยจากส่วนสกัดกระชายมาทำการทดสอบ จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วนสกัดกระชายมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ MCF7 เท่ากับ 31.7 ± 5.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ LS174T เท่ากับ 12.0 ± 1.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของสารประกอบ Panduratin A

ในปี 2006 Yun และคณะ (Yun et al., 2006) ได้ทำการแยก Paduratin A (ภาพประกอบ 5) จากส่วนสกัดกระชายแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และ DU145 จากผลการทดลองพบว่า Panduratin A แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และชนิด DU145 ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.5 และ 14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์ ซึ่งพบว่ามีการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในระยะ G2/M phase

ในปี 2008 Kirana และคณะ (Kirana et al., 2003) ได้มีการนำพืชวงศ์ขิงได้แก่ กระวาน (*Amomum cardamomum*) ขมิ้น ว่านมหาเมฆ (*C. aeruginosa*) ขมิ้นขาว (*C. manga*) ว่านชักมดลูก (*C. zanthorrhiza*) เปราะหอม (*Kaempferia galanga*) ว่านหาวนอน (*K. rotunda*) กระทือ (*Z. aromaticum*) ไพล (*Z. cassumunar*) ขิงและกระชาย มาทำการวิจัย

โดยนำมาทำการสกัดและนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และมะเร็งลำไส้ชนิด HT29 จากผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดกระชายมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.3 ± 0.3 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT29 เท่ากับ 20.2 ± 1.8 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นได้ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดกระชาย ได้สารประกอบ Panduratin A แล้วทำการทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดอีกครั้ง จากผลการทดลองพบว่าสารประกอบ Panduratin A มีฤทธิ์ที่ดีหรือเป็นสารสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} ต่อเซลล์ MCF7 เท่ากับ 3.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 6.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ต่อเซลล์ HT29 นอกจากนี้ได้มีการรายงานการศึกษาวัฏจักรและการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งพบว่าเมื่อเติม Panduratin A ลงไปสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะ G0/G1 ได้ 71% เมื่อเทียบกับ 33% ของเซลล์ที่ไม่ได้ทำการเติม Panduratin A

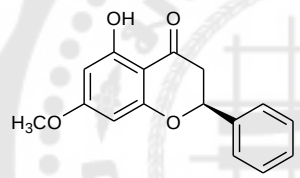
ในปี 2010 Jing และคณะ (Jing et al., 2010) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และ MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งรังไข่ (Ovarian cancer) ชนิด $CaOV_3$ เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT29 และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa ของสารสกัดกระชายหลายสปีชีส์ได้แก่ *B. rotunda B. pulchella* และ *B. armeniaca* ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าส่วนสกัดจากเหง้าของกระชายสปีชีส์ *B. rotunda* มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF7 และ MDA-MB-231 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.00 และ 66.50 ± 2.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด $CaOV_3$ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 71.00 ± 1.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด HT29 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 52.00 ± 4.24 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มีค่า IC_{50} เท่ากับ 65.50 ± 2.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ในปี 2011 Cheah และคณะ (Cheah et al., 2011) ได้ทำการแยกสารประกอบ Panduratin A จากส่วนสกัดกระชายและทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งปอด ซึ่งพบว่า Panduratin A แสดงการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

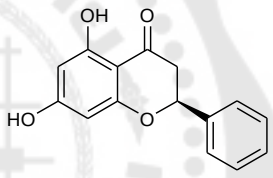
นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์โดยใช้เทคนิค Flow cytometry ซึ่งพบว่ามีการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ในระยะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว (mitotic/M phase)

1.1.2 ฤทธิ์ยับยั้งปรสิต

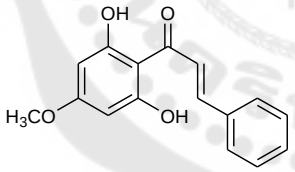
ในปี 2005 Sawangjaroen และคณะ (Sawangjaroen et al., 2005) ได้มีการนำ *B. rotunda* มาทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งปรสิตสายพันธุ์ไกอาเดีย (*Giardia lamblia*) โดยปรสิตไกอาเดียเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อไกอาเดีย ซึ่งการติดเชื้อนี้ก่อให้เกิดการอักเสบของลำไส้เล็กเป็นสาเหตุหลักของอาการท้องร่วง โดยมีการนำกระชายมาทำการสกัดโดยใช้เมทานอล และนำไปทดสอบฤทธิ์ โดยมีเมโทรนิดาโซล (Metronidazole) เป็นตัวยาอ้างอิง ซึ่งจากผลการทดลองพบส่วนสกัดกระชายมีฤทธิ์ในการยับยั้งปรสิตไกอาเดีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



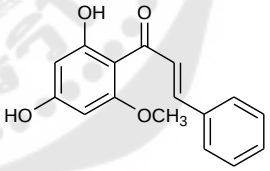
5-Hydroxy-7-methoxyflavanone



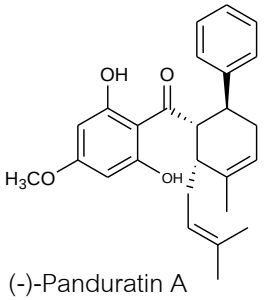
5,7-Dihydroxyflavanone



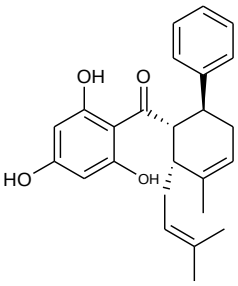
2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcone



2',4'-Dihydroxy-6'-methoxychalcone



(-)-Panduratin A



(-)-4-Hydroxypanduratin A

ภาพประกอบ 6 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีที่พบในกระชาย

1.1.3 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

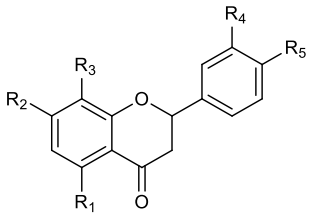
ในปี 2006 Shindo และคณะ (Shindo et al., 2006) ได้ทำการสกัดส่วนเหง้าของกระชาย (*B. pandurate*) ด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดกระชายพบ Panduratin A และสารประกอบอื่น ๆ ดังภาพประกอบ 6 หลังจากนั้นนำองค์ประกอบทางเคมีที่ได้ไปทำสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมองหนู จากผลการทดลองพบว่าสารประกอบ Panduratin A และ 4-Hydroxypanduratin A มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15 และ 4.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

1.1.4 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา

ในปี 2005 Phongpaichit และคณะ (Phongpaichit et al., 2005) ได้ทำการสกัดกระชาย (*B. rotunda*) ด้วยคลอโรฟอร์ม และนำส่วนสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์กับเชื้อราสายพันธุ์ *Candida albicans Crytococus neoformans* และ *Microsporum gypseum* ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคฉวยโอกาสในผู้ป่วย จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดกระชายมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ *C. neoformans* และ *M. gypseum* ที่ดีโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 64 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทั้ง 2 สายพันธุ์

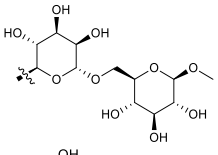
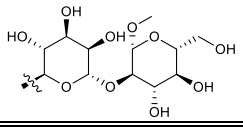
1.2 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในกระชาย

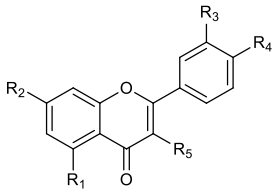
ในปัจจุบันมีการค้นพบองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดกระชายได้แก่อนุพันธ์ของสารประกอบฟลาวาโนน (flavanone derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบฟลาโวน (flavone derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบไตรไฮดรอกซีฟลาโวนอล (trihydroxyflavonols) อนุพันธ์ของสารประกอบชาลโคน (chalcones derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบไซโคลเฮกซินิลชาลโคน (cyclohexenylchalcone derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบเอสเทอร์ (ester derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบซินนามอล (cinnamoyl derivatives) อนุพันธ์ของสารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ (terpene and terpenoid derivatives) และสารประกอบในกลุ่มอื่น ๆ ดังรูปภาพและตารางต่อไปนี้



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของฟลาวาโนน

ตาราง 4 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ฟลาวาโนน

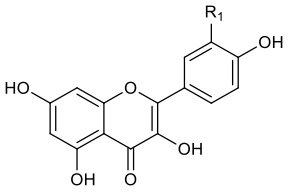
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
OH	OH	H	H	H	5,7-Dihydroxyflavanone (Pinocembrin)	(Jaipetch et al., 1982)
OH	OCH_3	H	H	OH	Sakuranetin	(Tuchinda et al., 2002)
OCH_3	OH	H	H	H	Alpinetin	(Win et al., 2007)
OH	OCH_3	H	H	H	Pinostrobin	(Jaipetch et al., 1982)
OCH_3	OCH_3	H	H	H	5,7-Dimethoxyflavanone	(Jaipetch et al., 1983)
OCH_3	OH	H	H	OH	7,4'-Dihydroxy-5-methoxyflavanone	(Win et al., 2007)
OH	OCH_3	H	H	OCH_3	5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone	(Jaipetch et al., 1983)
OH		H	OH	OCH_3	Hesperidin	(Jing et al., 2010)
OH		H	H	OH	Naringin	(Jing et al., 2010)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของฟลาโวน

ตาราง 5 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ฟลาโวน

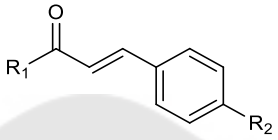
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
OH	OH	H	H	H	5,7-Dihydroxyflavone	(Jaipetch et al., 1983)
OH	OCH_3	H	OH	H	5-Hydroxy-7-methoxyflavone	
OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	3,5,7-Trimethoxyflavone	
OH	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	5-Hydroxy-3,7,3',4'-tetramethoxyflavone	
OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	5,7,3',4'-Tetramethoxyflavone	
OH	OCH_3	H	H	OCH_3	5-Hydroxy-3,7-dimethoxyflavone	
OH	OCH_3	H	OCH_3	OCH_3	5-Hydroxy-3,7,4'-trimethoxyflavone	
OCH_3	OCH_3	H	OCH_3	H	5,7,4'-Trimethoxyflavone	



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของไตรไฮดรอกซีฟลาโวนอล

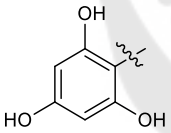
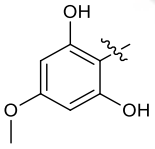
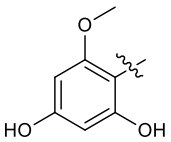
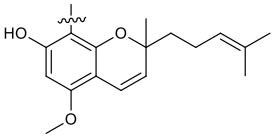
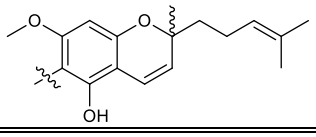
ตาราง 6 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไตรไฮดรอกซีฟลาโวนอล

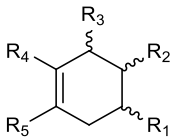
R_1	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
OH	Quercetin	(Jing et al., 2010)
H	Kaempferol	



ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของชาลโคน

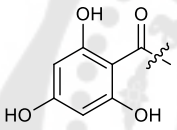
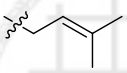
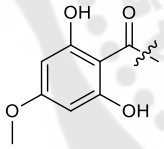
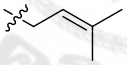
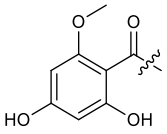
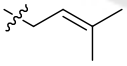
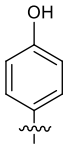
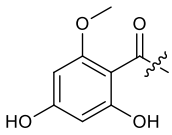
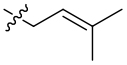
ตาราง 7 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ชาลโคน

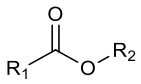
R_1	R_2	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
	H	Pinocembrin chalcone	(Trakoontivakorn et al., 2001)
	H	Pinostrobin chalcone	(Jaipetch et al., 1982)
	H	Cardamonin	(Jaipetch et al., 1982)
	H	(±)-Boesenbergin A	(Win et al., 2007)
	H	(±)-Boesenbergin B	(Win et al., 2007)



ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของ ไซโคลเฮกซินิลชาลโคน

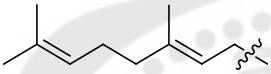
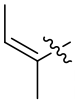
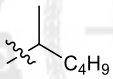
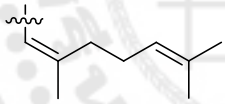
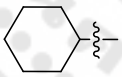
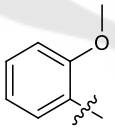
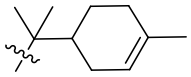
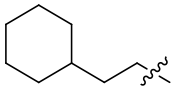
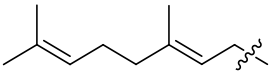
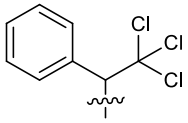
ตาราง 8 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ไซโคลเฮกซินิลชาลโคน

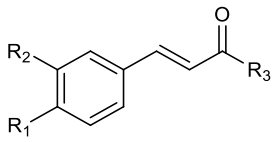
R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
Ph			CH_3	H	(+)-4-Hydroxypanduratin A (1R,2R,3S); (-)-4-Hydroxypanduratin A (1S,2S,3R)	(Tuchinda et al., 2002)
Ph			CH_3	H	(+)-Panduratin A (1R,2R,3S); (-)-Panduratin A (1S,2S,3R)	(Tuchinda et al., 2002)
Ph			CH_3	H	(+)-Isopanduratin A (1R,2R,3S); (-)-Isopanduratin A (1S,2S,3R)	(Tuchinda et al., 2002)
			CH_3	H	Panduratin C	(Cheenpracha et al., 2006)



ภาพประกอบ 12 โครงสร้างของเอสเทอร์

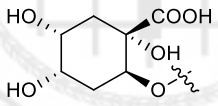
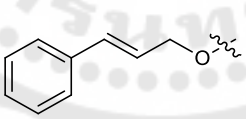
ตาราง 9 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์เอสเทอร์

R_1	R_2	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
Ph		Geranyl benzoate	(Sukari et al., 2008)
$C_{14}H_{29}$	C_4H_9	*n*-Butyl-*n*-pentadecanoate	(Sukari et al., 2008)
CH_3	C_8H_{17}	Methyl-*n*-nonanoate	(Sukari et al., 2008)
	C_6H_{13}	*n*-Hexyl angelate	(Sukari et al., 2008)
C_2H_5		*t*-2-Hexanyl-*n*-propionate	(Sukari et al., 2008)
CH_3		Neryl acetate	(Jantan et al., 2001)
C_2H_5		Cyclohexyl-*n*-propionate	(Sukari et al., 2008)
Ph	C_2H_5	Ethyl benzoate	(Sukari et al., 2008)
C_9H_{19}		Guaiacol *n*-capraoate	(Sukari et al., 2008)
C_4H_9		Terpinyl valerate	(Sukari et al., 2008)
CH_3		2-Cyclohexylethyl acetate	(Sukari et al., 2008)
H		Geranyl formate	(Jantan et al., 2001)
CH_3		Rosephenone	(Sukari et al., 2008)

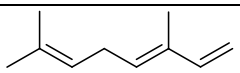
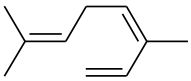
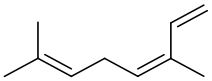
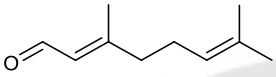
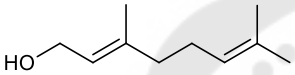
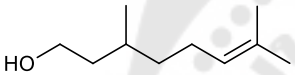
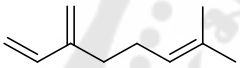
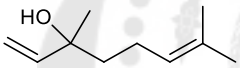
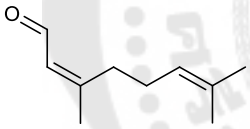
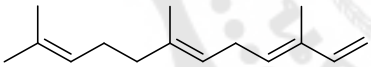
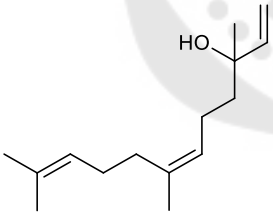


ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของซินนามอล

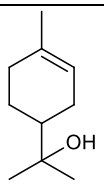
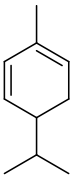
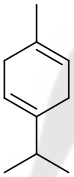
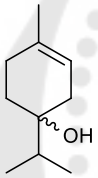
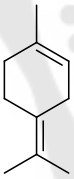
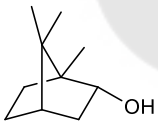
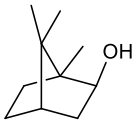
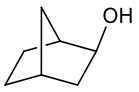
ตาราง 10 แสดงหมู่แทนที่ของอนุพันธ์ซินนามอล

R_1	R_2	R_3	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
H	H	OCH_3	Methyl cinnamate	(Jing et al., 2010)
OH	OH	OH	Caffeic acid	(Jing et al., 2010)
H	OH	OH	*ρ*-Coumaric acid	(Jing et al., 2010)
OH	OH		Chlorogenic acid	(Jing et al., 2010)
H	H		Cinnamyl cinnamate	(Sukari et al., 2008)

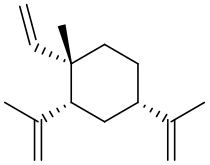
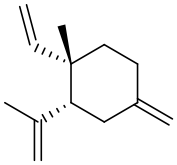
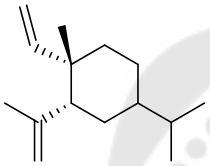
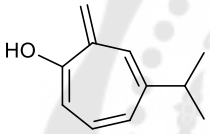
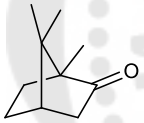
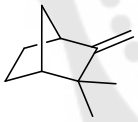
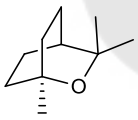
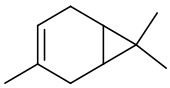
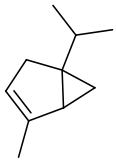
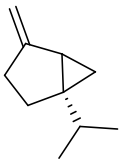
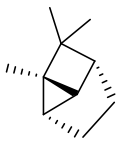
ตาราง 11 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ (แบบ Acyclic)

โครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
	*Z*-**β**-Ocimene	(Jantan et al., 2001)
	*E*- **β**-Ocimene	(Jantan et al., 2001)
	AlloOcimene	(Jantan et al., 2001)
	Geranial (E-Citral)	(Jantan et al., 2001)
	Geraniol	(Jantan et al., 2001)
	Citronellol	(Sukari et al., 2008)
	Myrcene	(Jantan et al., 2001)
	Linalool	(Jantan et al., 2001)
	Neral	(Jantan et al., 2001)
	(*E*,*E*)-**α**-Farnesene	(Jantan et al., 2001)
	(*Z*)-Nerolidol	(Jantan et al., 2001)

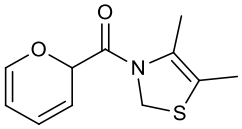
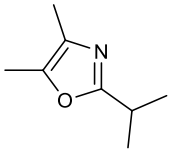
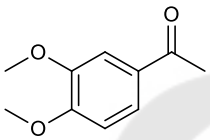
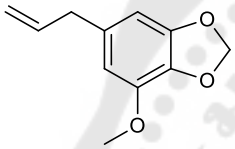
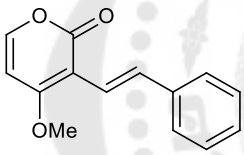
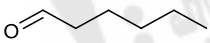
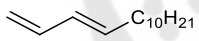
ตาราง 12 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์ (แบบ Cyclic)

โครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
	α-Terpineol	(Jantan et al., 2001)
	α-Phellanderne	(Jantan et al., 2001)
	γ-Terpinene	(Jantan et al., 2001)
	Terpinen-4-ol	(Jantan et al., 2001)
	Terpinolene	(Jantan et al., 2001)
	Borneol	(Jantan et al., 2001)
	Isoborneol	(Jantan et al., 2001)
	Bicyclo(2.2.1)heptan-2-ol	(Sukari et al., 2008)
	α-Pinene	(Jantan et al., 2001)
	β- Pinene	(Jantan et al., 2001)

ตาราง 12 (ต่อ)

โครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
	*β*-Elemene	(Jantan et al., 2001)
	*γ*- Elemene	(Jantan et al., 2001)
	*δ*- Elemene	(Jantan et al., 2001)
	*β*-Thujaplicin	(Jantan et al., 2001)
	Camphor	(Jantan et al., 2001)
	Camphene	(Jantan et al., 2001)
	1,8-Cineole	(Sukari et al., 2008)
	3-Carene	(Jantan et al., 2001)
	α-Thujene	(Jantan et al., 2001)
	Sabinene	(Jantan et al., 2001)
	Tricyclene	(Jantan et al., 2001)

ตาราง 13 โครงสร้างอนุพันธ์ของสารประกอบในกลุ่มอื่น ๆ

โครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	เอกสารอ้างอิง
	2-*n*-Pyroyl-4,5-dimethylthiazole	(Sukari et al., 2008)
	2-Isopropyl-4,5-dimethyloxazole	(Sukari et al., 2008)
	3',4'-Dimethoxyacetophenone	(Sukari et al., 2008)
	Myristicin	(Sukari et al., 2008)
	5,6-Dehydrokawain	(Win et al., 2007)
	*n*-Hexanal	(Sukari et al., 2008)
	1,3-Tetradecadiene	(Sukari et al., 2008)

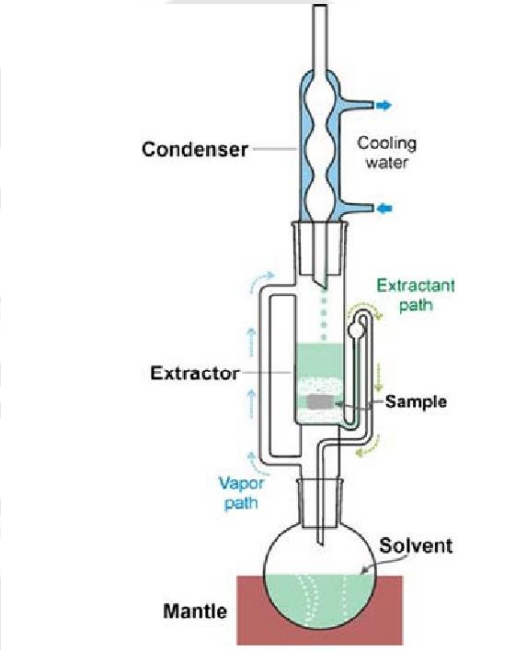
2 วิธีการสกัดพืช

การสกัดคือกระบวนการที่ทำให้สารประกอบภายในสารตัวอย่างเกิดการเคลื่อนย้ายจากวัฏภาคหนึ่ง ไปสู่อีกวัฏภาคหนึ่ง โดยที่สารตัวอย่างทั้งหมดจะไม่มีการละลายในวัฏภาคที่ใช้สกัด สารที่ใช้สกัดอาจเป็นของเหลวหรือแก๊สขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของตัวอย่าง

Solid-liquid extraction เป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายสกัดสารออกจากของผสมหรือตัวอย่างที่เป็นของแข็งเช่น ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ (แม้น อมรสิทธิ์, 2010)

Liquid-liquid extraction เป็นวิธีการสกัดจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกตัวหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก (แม้น อมรสิทธิ์, 2010)

การสกัดต่อเนื่อง (Continuous extraction) เป็นวิธีการสกัดที่เหมาะกับสารตัวอย่างหรือพืชมีปริมาณน้อย และจำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายสำหรับสกัดในปริมาณมาก การสกัดวิธีนี้จะใช้เครื่องมือที่สามารถทำการสกัดได้ต่อเนื่อง เรียกเครื่องมือนี้ว่า “ซอกห์เลต” (Soxhlet apparatus) (ภาพประกอบ 14) การสกัดวิธีนี้จะใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ โดยขั้นแรกจะให้ความร้อนกับตัวทำละลายจนกลายเป็นไอแล้วกลั่นเป็นหยดลงมาสู่ขวดกลั่นที่บรรจุตัวอย่าง จากนั้นตัวทำละลายก็จะกลายเป็นไอและควบแน่นเป็นหยดของเหลวพาสารสกัดตกลงมาสู่ขวดกลั่นแบบซ้ำแล้วซ้ำอีก จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ (แม้น อมรสิทธิ์, 2010)



ภาพประกอบ 14 ตัวอย่างเครื่องซอกห์เลตที่ใช้ในการสกัดแบบต่อเนื่อง

ที่มา: Dabbs, D. M., et al. (2006). Solvothermal removal of the organic template from L_3 ("sponge") templated silica monoliths. *Journal of Nanoparticle Research, 8*, 603-614.

3 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของสาร ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพงและใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย โดยเทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของสารระหว่างวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) ที่ถูกเคลือบไว้บนกระจกหรือแผ่นอลูมิเนียม และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่เคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับ แต่เดิมเทคนิค TLC นำไปใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพสำหรับสารประกอบอินทรีย์ที่มีปริมาณน้อย เพื่อหาจำนวนสารที่อยู่ในสารผสม และใช้พิสูจน์ชนิดของสารโดยการเปรียบเทียบ Rf (Retention factor) ระหว่างสารกับสารมาตรฐาน (แม้น อมรสิทธิ์, 2010)

ในปัจจุบันนิยมนำเทคนิค TLC มาใช้สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพืชสมุนไพร โดยนำมาประยุกต์กับรีเอเจนต์หรือตัวทำปฏิกิริยาต่าง ๆ ในการระบุกลุ่มสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) โดยกลุ่มสารพฤกษเคมีคือสารประกอบที่พืชสร้างขึ้นในธรรมชาติจากกระบวนการชีวเคมี (Biosynthesis) ซึ่งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoid) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เป็นต้น (แม้น อมรสิทธิ์, 2010)

รีเอเจนต์ที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค TLC ในการระบุกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ พารา-อนิซาลดีไฮด์ (*p*-Anisaldehyde) ซึ่งรีเอเจนต์ชนิดนี้ใช้สำหรับตรวจสอบสารประกอบหลายกลุ่ม และเมื่อทำการทดสอบจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารประกอบบนแผ่น TLC ได้แตกต่างกัน ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตียรอยด์ เมื่อทำการพ่นรีเอเจนต์ชนิดนี้ลงบนแผ่น TLC ที่ทำการแยกองค์ประกอบของส่วนสกัดแล้ว นำแผ่น TLC ไปให้ความร้อนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารประกอบทั้ง 2 กลุ่มนี้บนแผ่น TLC โดยเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีน้ำเงิน รีเอเจนต์เฟอร์ริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) ใช้สำหรับตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก เมื่อทำการพ้นรีเอเจนต์นี้บนแผ่น TLC จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของสารประกอบกลุ่มนี้เป็นโทนสีทึบ และดราเจนดรอฟฟ์ (Dragendroff's reagent) ใช้สำหรับตรวจสอบสารกลุ่มแอลคาลอยด์เมื่อทำการพ่นรีเอเจนต์นี้บนแผ่น TLC จะปรากฏสีส้ม (Wagner & Bladt, 1996)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2 การสกัดเปราะภูสีม่วงและการแยกองค์ประกอบทางเคมี

3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1.1.1 เครื่องอัลตราโซนิค (Ultrasonic) รุ่น D13 จากบริษัท GT SONIC

1.1.2 เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง (Rotary evaporator) รุ่น R114 จากบริษัท BÜCHI

1.1.3 เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) 300 เมกะเฮิร์ต รุ่น Avance II จากบริษัท Bruker

1.1.4 เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ 500 เมกะเฮิร์ต รุ่น JNM-ECZS จากบริษัท Jeol

1.1.5 เครื่อง SOXTHERM® จากบริษัท Gerhardt

1.1.6 เครื่องโฟโตมิเตอร์ไมโครเพลต (Microplate reader) รุ่น Multiskan EX จากบริษัท Thermo electron corporation จากประเทศฟินแลนด์

1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.2.1.1 เฮกเซน (*n*-Hexane)

1.2.1.2 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, DCM)

1.2.1.3 เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate)

1.2.1.4 บิวทานอล (*n*-Butanol)

1.2.1.5 โพรพานอล (*n*-Propanol)

1.2.1.6 เมทานอล (Methanol)

1.2.1.7 เอทานอล (Ethanol)

1.2.1.8 ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO)

1.2.1.9 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, thiazolyl blue) ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.2.0 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640)

1.2.2.1 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)

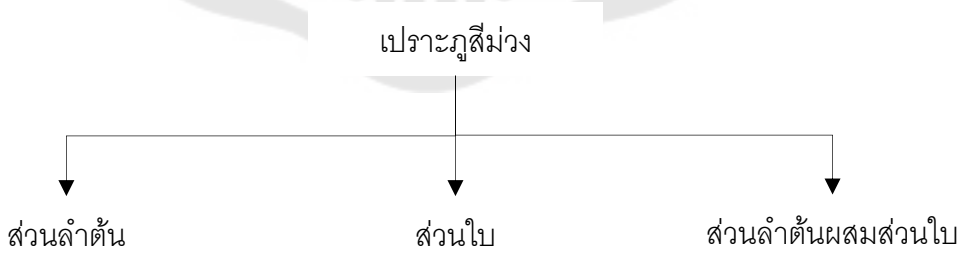
1.2.2.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM)

1.3 ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

เปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน (ส่วนลำต้นและใบ) เก็บจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย ประเทศไทย วันที่ 11 กรกฎาคม 2563 (020/2563)

2 การสกัดเปราะภูสีม่วงและการแยกองค์ประกอบทางเคมี

ขั้นตอนแรกนำเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินมาทำการแบ่งพืชออกเป็น 3 ส่วน ส่วนลำต้น ส่วนใบ และส่วนลำต้นผสมส่วนใบ นำไปตากแห้งและนำมาบดให้มีขนาดเล็ก (ภาพประกอบ 15) นำแต่ละส่วนทำการสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน



ภาพประกอบ 15 การแบ่งส่วนของพืชที่จะนำมาทำการสกัด

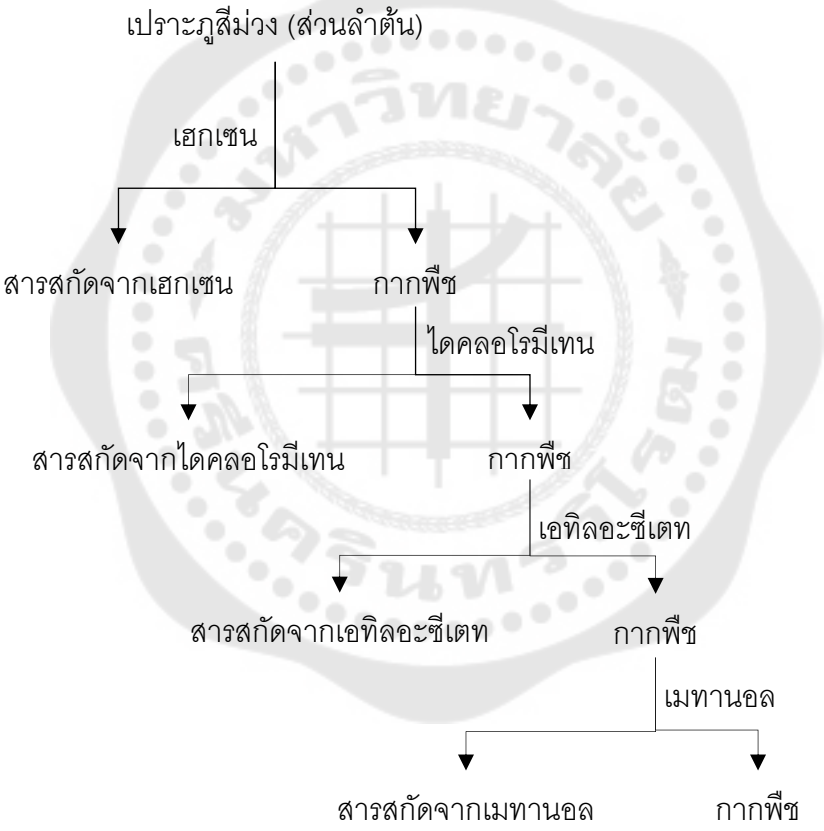
2.1 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน (Partition extraction)

การสกัดวิธีนี้จะนำพืชส่วนใบ (89.56 กรัม) มาทำการสกัด โดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วสูงได้แก่ สารละลาย 50%เอทานอล (aqueous ethanol) 450 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดมาระเหยจนเข้มข้น (crude ethanolic extract) โดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง นำสารสกัดที่ระเหยจนเข้มข้นแล้วมาทำการสกัดแบบแบ่งส่วนโดยการเรียงลำดับจากตัวทำละลายขั้วต่ำไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วสูงได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล (ภาพประกอบ 16) โดยใช้กรวยแยกสาร หลังจากนั้นนำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้มาระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง และทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้

ภาพประกอบ 16 ลำดับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนใบ

2.2 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน (Sequential extraction)

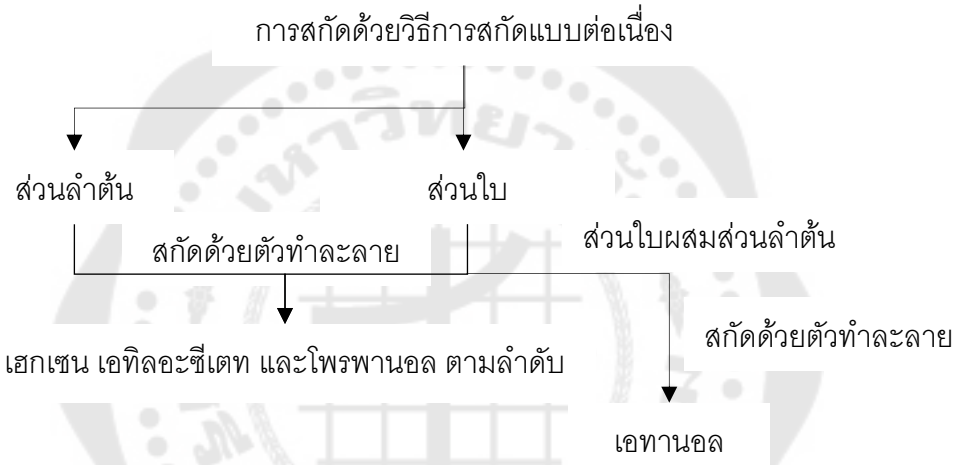
การสกัดวิธีนี้จะนำพืชส่วนลำต้น (36.37 กรัม) มาทำการสกัด โดยขั้นตอนแรกจะทำการแช่พืชแต่ละส่วนในตัวทำละลาย ในอัตราส่วน 1 ส่วนต่อ 5 ส่วน เรียงลำดับจากตัวทำละลายขั้วต่ำไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วสูงได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล (ภาพประกอบ 17) การสกัดแต่ละตัวทำละลายทำการสกัดโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิค เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดซ้ำ 3 ครั้งทุกตัวทำละลาย หลังจากนั้นนำสารสกัดมาระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง และทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้



ภาพประกอบ 17 ลำดับตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีการสกัดลำดับส่วน

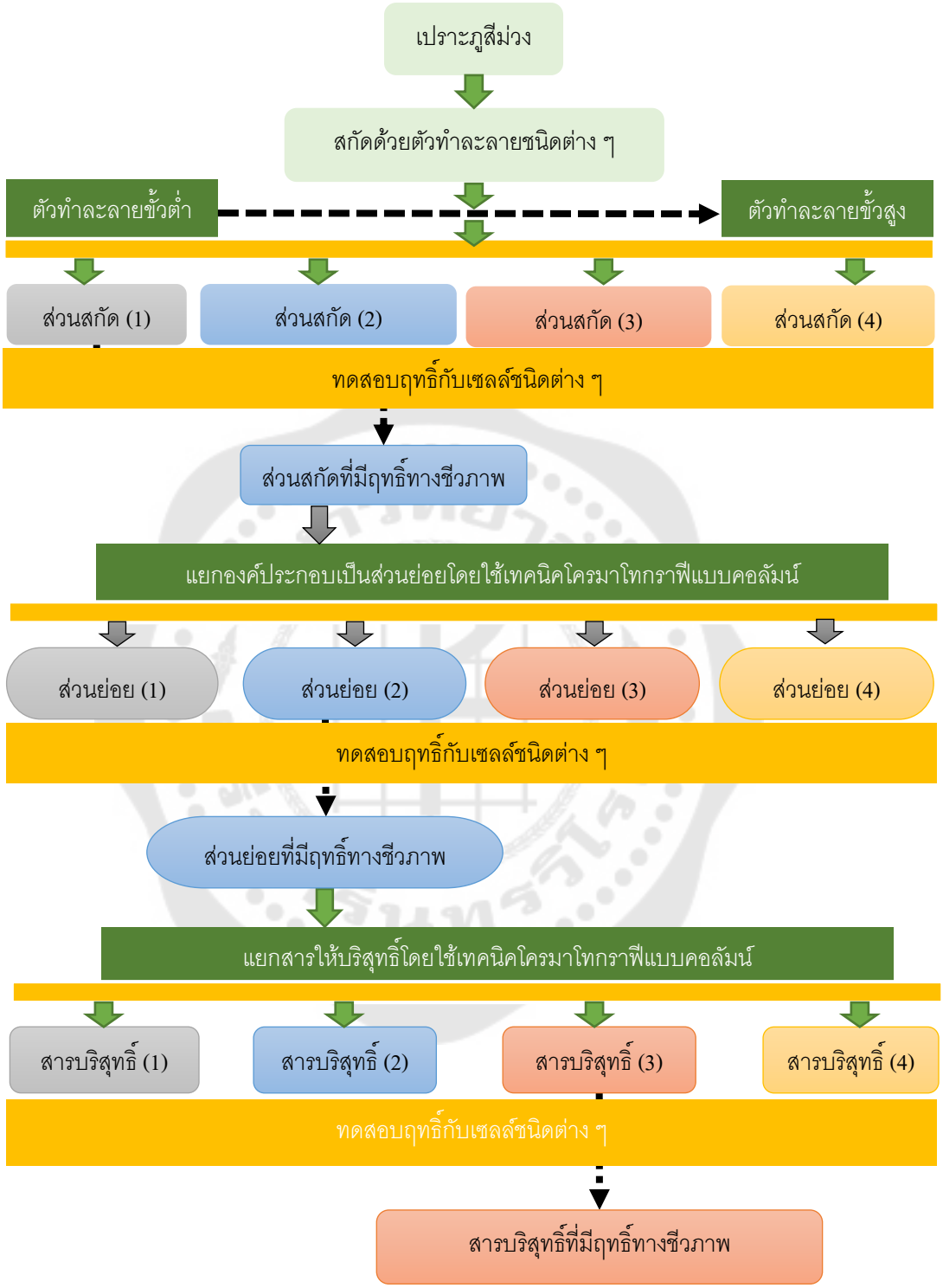
2.3 การสกัดเปราะภูสีม่วงด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous extraction)

การสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้ จะใช้เครื่องซอกห์เลต (SOXTHERM®) ในการสกัด วิธีนี้จะใช้พืชทั้ง 3 ส่วนมาทำการสกัด โดยพืชส่วนลำต้น (38.86 กรัม) พืชส่วนใบ (58.64 กรัม) และพืชส่วนลำต้นผสมส่วนใบ (97.50 กรัม) โดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซีเตท โพรพานอล และเอทานอล ตามลำดับ (ภาพประกอบ 18) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารสกัดมาระเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุนเหวี่ยง และทำการชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้



ภาพประกอบ 18 ตัวทำละลายที่ใช้ในวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง

หลังจากทำการสกัดพืชทุกส่วนด้วยวิธีที่แตกต่างกัน นำส่วนสกัดที่ทำการระเหยแห้งแล้ว มาทำการคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้เทคนิค Bioassay-guided fractionation (ภาพประกอบ 19) โดยทำการทดสอบฤทธิ์กับเซลล์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และเซลล์ปกติชนิด Vero



ภาพประกอบ 19 แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัดและตรวจหาสารออกฤทธิ์ด้วยเทคนิค Bioassay-guided fractionation

จากผลการทดสอบฤทธิ์จะทำให้ทราบว่าส่วนสกัดส่วนไหนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นำส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพมาทำการแยกองค์ประกอบเป็นส่วนย่อย (fraction) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ (Column chromatography) และนำแต่ละส่วนย่อยกลับไปทดสอบฤทธิ์กับเซลล์ชนิดต่าง ๆ ทำตามแผนภาพและแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมา จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และแมสสเปกโทรเมตรี

3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell cultures)

จากงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์กับเซลล์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และเซลล์ปกติชนิด Vero โดยเซลล์ทุกชนิดทำการซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดจะทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันโดย เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI-1640 เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM และเซลล์ปกติชนิด Vero ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด EMEM

นอกจากนี้การเลี้ยงเซลล์ทุกชนิดจะทำการเติม 10%ฟีทัลโบวายซีรั่ม (Fetal Bovine Serum, FBS) เพนิซิลลิน (Penicillin) ปริมาณ 100 ยูนิต/มิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน (Streptomysin) ปริมาณ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมี 5%คาร์บอกไดออกไซด์ภายในตู้บ่มเพาะเซลล์ โดยจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจนประมาณ 90% จะทำการเปลี่ยนถ่ายภาชนะเลี้ยงเซลล์หรือซับคัลเจอร์ โดยใช้ 0.25% ทริพซิน-อีดีทีเอ

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ MTT assay

ในงานวิจัยนี้จะทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดต่าง ๆ โดยสีที่นิยมใช้ทดสอบได้แก่ Thiazolyl blue หรือ MTT เป็นสารละลายสีเหลือง โดยกลไกการทดสอบของสารตัวนี้คือ MTT จะถูกรีดิวซ์โดยการทำงานของเอนไซม์ซักซีเนต ดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต ได้เป็นผลึกฟอร์มาแซน (Formazan) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน ไม่ละลายน้ำและค้างอยู่ภายในเซลล์ ปริมาณผลึกฟอร์มาแซนจะถูกวิเคราะห์โดยการดูดกลืนแสงหลังจากที่ละลายด้วยตัวทำละลายเช่น ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ ได้สารละลาย MTT-ฟอร์มาแซน สีม่วงน้ำเงิน โดยปริมาณของสารละลายที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้สามารถนำมาใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

ขั้นตอนแรกทำการกระจายเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม เซลล์แต่ละชนิดจะใช้จำนวนที่แตกต่างกันโดย เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 จำนวน 8×10^3 เซลล์/หลุม เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 และเซลล์ปกติชนิด Vero จำนวน 5×10^3 เซลล์/หลุม และเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 จำนวน 1×10^4 เซลล์/หลุม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยมี 5%คาร์บอกไดออกไซด์ภายในตู้บ่มเพาะเซลล์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเติมส่วนสกัดแต่ละส่วนที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีการใช้ไดเมธิลซัลฟอกไซด์เป็นสารควบคุม (negative control) มีปริมาณสุดท้ายไม่เกิน 0.5% นำไปบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการเติมสารละลาย MTT 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีก 3 ชั่วโมง ทำการเติมสารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 100 ไมโครลิตร เพื่อทำการละลายผลึกฟอร์มาแซน หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องโฟโตมิเตอร์ไมโครเพลต โดยการทดลองทั้งหมดทำซ้ำ 3 ครั้ง และมีการใช้ข้อมูลของซิสพลาติน (cisplatin) ดอกโซรูบิซิน (doxorubisin) อิลิปติซีน (ellipticine) และ 5-ฟลูออโรยูราซิล (5-fluoruracil) เป็นตัวยาอ้างอิง

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์โดยใช้ GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Software Inc., San Deigo, CA) และรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้ร้อยละ 50 (Half Maximal Inhibitory Concentration, IC_{50})

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินและทำการหาองค์ประกอบทางเคมีในส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Bioassay-guide fractionation โดยขอนำเสนอผลการวิจัยดังหัวข้อต่อไปนี้

1 การศึกษาวิธีการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินที่เหมาะสมในการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

2 การแยกหาสารสำคัญในสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง

การศึกษาวิธีการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินที่เหมาะสมในการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากงานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยเปราะภูสีม่วงนั้นทำการเก็บมาจากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย ประเทศไทย โดยวิธีการเก็บนั้นจะทำการเก็บเฉพาะส่วนลำต้นเหนือดิน (ส่วนลำต้นและใบ) เพื่อให้หัวหรือเหง้าใต้ดินสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ในฤดูกาลถัดไป

ขั้นตอนแรกหลังจากเก็บพืชมาแล้ว ทำการแบ่งออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ ส่วนลำต้น ส่วนใบ และส่วนลำต้นผสมใบ นำไปผึ่งลมให้แห้งและบดให้มีขนาดเล็ก นำมาทำการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1.1 วิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน

วิธีการสกัดนี้ นำไปสกัดพืชส่วนใบ 89.56 กรัม โดยการสกัดวิธีนี้จะนำพืชไปสกัดกับสารละลาย 50%เอทานอล กรองสารสกัดที่ได้ นำไประเหยตัวทำละลายออกจนเข้มข้น หลังจากนั้นนำสารละลายที่เข้มข้นมาทำการสกัดแบบแบ่งส่วน โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากต่ำไปสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งและรายงานเป็นปริมาณร้อยละของส่วนสกัดดัง ตาราง 14

ตาราง 14 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบแบ่งส่วน

วิธีการสกัด	ส่วนลำต้นเหนือดิน	ส่วนของสารสกัด	รหัสสาร	ร้อยละของส่วนสกัด
การสกัดแบบแบ่งส่วน	ใบ	50%เอทานอล เข้มข้น	-	-
		เฮกเซน	BV(1)	0.220
		ไดคลอโรมีเทน	BV(2)	0.320
		บิวทานอล	BV(3)	2.990
		สารสกัดชั้นน้ำ	BV(4)	13.945

1.2 วิธีการสกัดแบบลำดับส่วน

วิธีการสกัดนี้ นำไปสกัดพืชส่วนลำต้น 36.37 กรัม โดยการสกัดวิธีนี้จะทำการเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากต่ำไปสูง ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยแห้งและรายงานเป็นปริมาณร้อยละของส่วนสกัดดัง ตาราง 15

ตาราง 15 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน

วิธีการสกัด	ส่วนลำต้นเหนือดิน	ส่วนของสารสกัด	รหัสสาร	ร้อยละของส่วนสกัด
การสกัดลำดับส่วน	ลำต้น	เฮกเซน	BV(5)	1.370
		ไดคลอโรมีเทน	BV(6)	0.900
		เอทิลอะซีเตท	BV(7)	0.357
		เมทานอล	BV(8)	2.540

1.3 วิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง

วิธีการสกัดนี้ นำไปสกัดพืชทั้ง 3 ส่วนโดยพืชส่วนลำต้น 38.86 กรัม ส่วนใบ 58.64 กรัม และส่วนลำต้นผสมใบ 97.50 กรัม ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท โพรพานอล และเอทานอล ในการสกัด หลังจากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไปทำให้แห้งและรายงานเป็นปริมาณร้อยละของส่วนสกัดดัง ตาราง 16

ตาราง 16 แสดงร้อยละของส่วนสกัด ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง

วิธีการสกัด	ส่วนลำต้นเหนือดิน	ส่วนของสารสกัด	รหัสสาร	ร้อยละของส่วนสกัด
การสกัดแบบต่อเนื่อง	ใบ	เฮกเซน	BV(9)	0.058
		เอทิลอะซีเตท	BV(10)	0.232
		โพรพานอล	BV(11)	0.568
	ลำต้น	เฮกเซน	BV(12)	0.412
		เอทิลอะซีเตท	BV(13)	0.355
		โพรพานอล	BV(14)	0.926
	ใบผสมลำต้น	เอทานอล	BV(15)	0.154

การสกัดทั้ง 3 วิธี มีการใช้ตัวทำละลายที่เรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากต่ำไปสูง เพื่อเป็นการคัดกรองความมีขั้วของกลุ่มส่วนสกัดเบื้องต้น ซึ่งแต่ละวิธียังได้ร้อยละของส่วนสกัดที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นนำส่วนสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ดังนี้ เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และเซลล์ปกติชนิด Vero โดยใช้ MTT assay และรายงานออกมาเป็นค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยผลการทดสอบฤทธิ์ดัง ตาราง 17

ตาราง 17 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน

ส่วนสกัด	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)						
	A375	A431	LoVo	SW1353	MDA-MB-231	PC3	Vero
BV(1)	143.8	109.9	361.0	587.16	NT	NT	NT
BV(2)	>1,000	NT	>1,000	NT	NT	NT	NT
BV(3)	194.3	576.0	>1,000	>1,000	>1,000	867.4	NT
BV(4)	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	>1,000	654.5	NT
BV(5)	34.40 ±1.03	89.66 ±1.12	62.34	>1000	NT	NT	183.30 ±1.06
BV(6)	>1,000	278.4	383.5	>1,000	NT	NT	NT
BV(7)	53.11	176.3	99.34	>1,000	141.7	417.9	NT
BV(8)	471.3	>1,000	~1,000	>1,000	>1,000	>1,000	NT
BV(9)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
BV(10)	74.25	175.0	159.8	>1,000	317.2	>1,000	NT
BV(11)	73.85	245.3	147.1	>1,000	>1,000	>1,000	NT
BV(12)	91.17	185.6	96.32	>1,000	NT	NT	NT
BV(13)	84.22	224.4	167.8	>1,000	>1,000	295.8	NT
BV(14)	59.3	692.0	234.5	>1,000	>1,000	165.9	NT
BV(15)	102.6	156.2	197.8	>1,000	NT	NT	NT
ซิสพลาติน	-	-	-	-	-	40.95	-
ดอกโซรูบิซิน	0.005	0.73	-	81.53	0.92	-	
อิลิปติซีน	-	-	-	-	-	-	0.48
5-ฟลูออโรยูราซิล			27.66		-	-	-

NT คือส่วนสกัดที่ไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นพบว่าส่วนสกัด BV(5) คือส่วนสกัดส่วนลำต้น ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลายนั้น มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 34.40 ± 1.03 และ 89.66 ± 1.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo มีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนั้นส่วนสกัด BV(5) ยังไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 183.30 ± 1.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

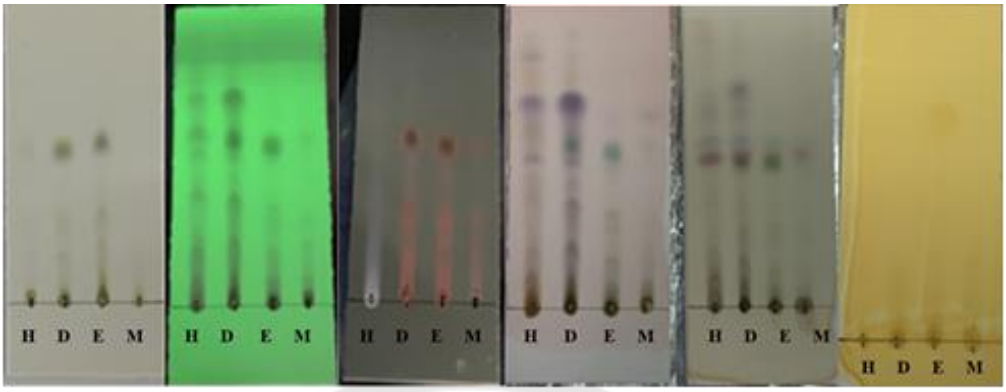
การแยกหาสารสำคัญในสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน โดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง

การแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดิน จะทำการแยกส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยส่วนสกัด BV(5) เป็นส่วนสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 และเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo ดังนั้นจึงนำส่วนสกัดนี้มาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

ขั้นตอนแรกจะทำการหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นภายในส่วนสกัดโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง บนซิลิกาเจล TLC ทำการตรวจสอบภายใต้แสงยูวี (ultraviolet lights) ที่ความยาวคลื่น 254 (short wave) และ 365 (long wave) นาโนเมตร ร่วมกับรีเอเจนต์ต่าง ๆ ได้แก่ รีเอเจนต์พารา-อนิซาลดีไฮด์ใช้สำหรับตรวจสอบสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตียรอยด์ 1%เฟอร์ริคคลอไรด์ใช้สำหรับตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก และดราเจนดรอฟฟ์ใช้สำหรับตรวจสอบสารกลุ่มแอลคาลอยด์

จากผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นบน TLC (ภาพประกอบ 20) พบว่าส่วนสกัด BV(5) ปรากฏสีม่วงและสีน้ำเงินกับพารา-อนิซาลดีไฮด์รีเอเจนต์ แสดงว่ามีสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์และสเตียรอยด์ในสารสกัด และปรากฏสีทึบกับเฟอร์ลิคคลอไรด์ แสดงว่ามีสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด และนอกจากนี้เมื่อทำปฏิกิริยากับรีเอเจนต์ดราเจนดรอฟฟ์ไม่ปรากฏสารประกอบสีส้มบน TLC แสดงว่าไม่มีสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์ในสารสกัด (ตาราง 18)

Visible Short wave (λ: 254 nm) Long wave (λ: 365 nm) Anisaldehyde 1%$FeCl_3$ Dragendorff's



ภาพประกอบ 20 แสดง TLC ของส่วนสกัดส่วนลำต้นด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน

ระบบของตัวทำละลาย: 100%ไดคลอโรมีเทน; จุด: H [BV(5)] D [BV(6)] E [BV(7)] M [BV(8)]

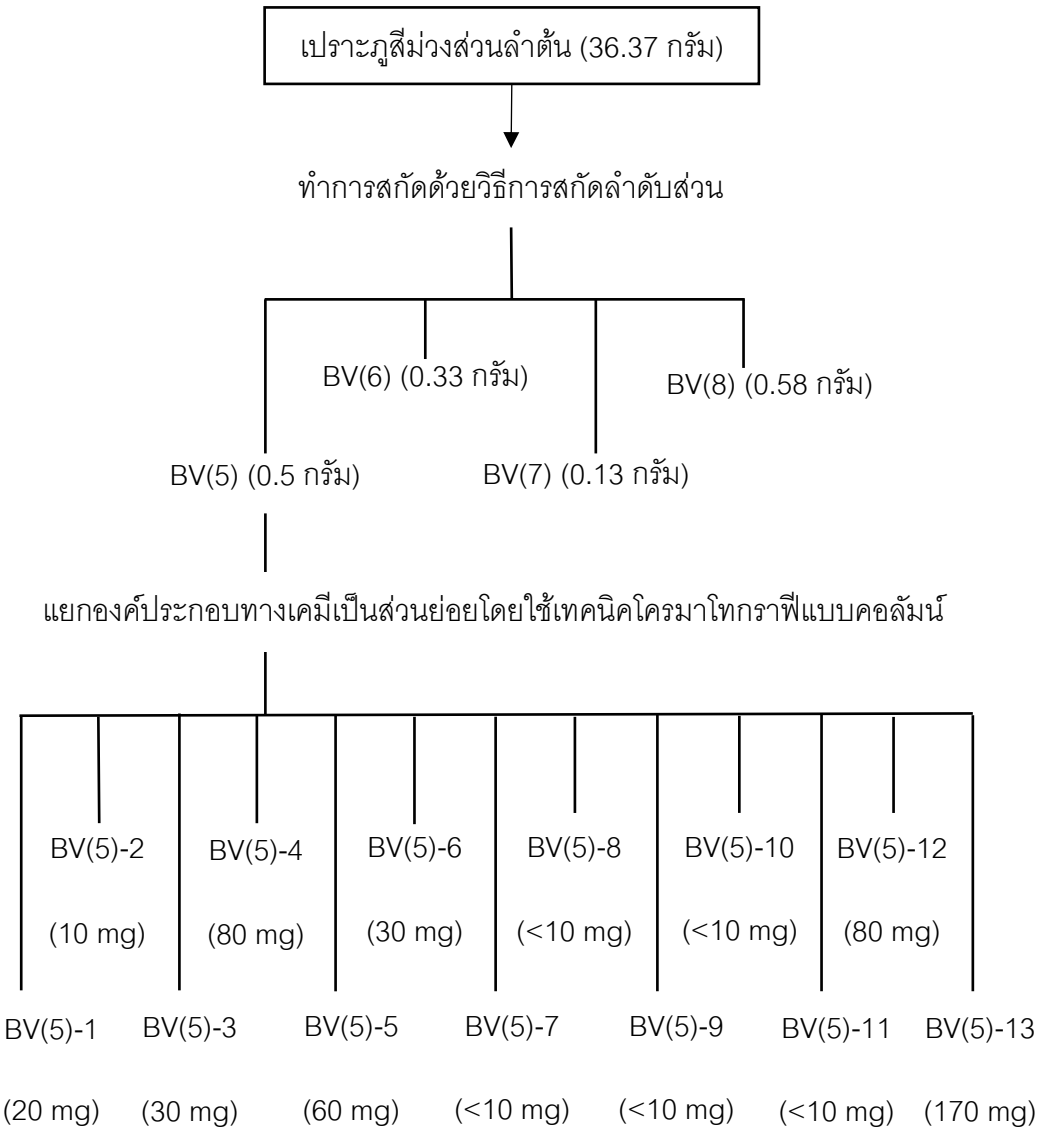
ตาราง 18 องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัด จากวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน

วิธีการสกัด	ส่วนสกัด	เทอร์พีนอยด์	สเตียรอยด์	สารประกอบฟีนอลิก	แอลคาลอยด์
การสกัดลำดับส่วน	BV(5)	+	+	+	-
	BV(6)	+	+	+	-
	BV(7)	+	+	+	-
	BV(8)	+	+	+	-

(+) คือพบสารประกอบนั้น ๆ ภายในสารสกัด

(-) คือไม่พบสารประกอบนั้น ๆ ภายในสารสกัด

จากการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นแล้ว ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีเป็นส่วนย่อยโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และใช้ระบบตัวชะจาก 100%เฮกเซนจนถึง 10%เมทานอล (ภาพประกอบ 21)



ภาพประกอบ 21 ลำดับของการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัด BV(5)

เนื่องจากส่วนสกัดเฮกเซน BV(5) มีฤทธิ์ที่ดีกับเซลล์มะเร็งผิวหนังทั้ง 2 ชนิด จึงนำส่วนย่อยของส่วนสกัด BV(5) ได้แก่ BV(5)-1 จนถึง BV(5)-13 ที่มีปริมาณมากกว่า 10 มิลลิกรัม กลับไปทดสอบฤทธิ์กับเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 อีกครั้ง แต่เนื่องจากส่วนย่อยบางส่วนมีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ได้ จากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าส่วนย่อย BV(5)-12 คือส่วนย่อยที่ 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.39 ± 1.04 และ 51.01 ± 1.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับส่วนสกัด BV(5) พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 ใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพในการยังยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A431 ได้ดีกว่า แต่เนื่องจากส่วนย่อย BV(5)-12 มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำการแยกสารออกฤทธิ์ได้

ตาราง 19 ค่า IC_{50} ของส่วนย่อยที่ทำการแยกมาจากส่วนสกัด BV(5)

ส่วนย่อยจากส่วนสกัด BV(5)	รหัสสาร	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	
		A375	A431
100%เฮกเซน	BV(5)-1	>1,000	>1,000
10%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	BV(5)-2	116.3 ± 1.03	110.4 ± 1.06
20%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	BV(5)-3	145.2 ± 1.09	152.3 ± 1.28
30%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	BV(5)-4	43.97 ± 1.05	70.27 ± 1.08
40%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	BV(5)-5	>1,000	>1,000
50%ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน	BV(5)-6	72.33 ± 1.10	138.1 ± 1.05
1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	BV(5)-12	38.39 ± 1.04	51.01 ± 1.04
10%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน	BV(5)-13	39.88 ± 1.05	136.2 ± 1.47

นอกจากนี้ส่วนย่อย BV(5)-13 คือ 10%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 ใกล้เคียงกับส่วนย่อย BV(5)-12 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 39.88± 1.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

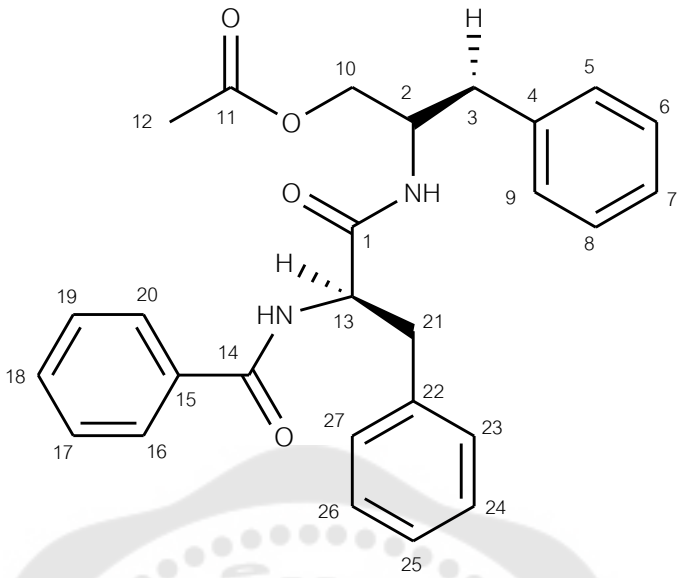
มีปริมาณเพียงพอที่จะทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ แต่เนื่องจากส่วนย่อยนี้มีขั้วสูง จึงทำให้ทำการแยกสารประกอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ในระบบปกติ (normal phase) ไม่ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดที่กล่าวมานี้พบว่าวิธีการสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินที่ให้ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน และเมื่อนำส่วนสกัดมาทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์พบว่าส่วนย่อยที่ 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังทั้ง 2 ชนิด

ดังนั้นจึงได้นำวิธีการทดลองนี้มาประยุกต์ใช้กับพืชส่วนลำต้นเหนือดิน (ใบผสมลำต้น) โดยการนำพืชส่วนนี้มา 129.27 กรัม มาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดลำดับส่วน โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย ได้ร้อยละส่วนสกัดเท่ากับ 1.44 (1.86 กรัม) หลังจากนั้นนำมาแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งทำให้ได้ส่วนย่อยที่ 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน 76.1 มิลลิกรัม ส่วนย่อยของพืชส่วนนี้มีปริมาณเพียงพอ ทำให้สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดนี้ได้ โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และนำมาตกผลึกเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ในระบบ 0.5%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน

หลังจากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีและแมสสเปกโทรเมตรี ของสารบริสุทธิ์ BV(14) (ภาพประกอบ 24) มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข้ม (ภาพประกอบ 23) ไม่มีสี ผลิตภัณฑ์ที่ได้เท่ากับ 1.59 มิลลิกรัม

ภาพประกอบ 22 แสดงผลึกรูปเข็มของสารบริสุทธิ์ BV(14)



ภาพประกอบ 23 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ BV(14)

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีและแมสสเปกโทรเมตรีได้ผลดังนี้

ESI-MS: m/z $[M+Na]^+$ เท่ากับ 467.1935 คำนวณสำหรับ $C_{27}H_{28}N_2NaO_4$ เท่ากับ 467.1941

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)

2.00 (s, 3H, H-12), 2.68-2.79 (m, 2H, H-3), 2.99-3.09 (m, 1H, H-21b), 3.17-3.26 (m, 1H, H-21a), 3.75-3.82 (m, 1H, H-10b), 3.88-3.93 (m, 1H, H-10a), 4.28-4.37 (m, 1H, H-2), 4.70-4.78 (m, 1H, H-13), 5.917 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH), 6.727 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH), 7.05-7.71 (m, 15H, ArH)

^{13}C NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm)

20.8 (C-12), 37.3 (C-3), 38.3 (C-21), 49.3 (C-2), 54.9 (C-13), 64.5 (C-10), 126.7-136.5 (ArC), 127.0-133.5 (ArC), 127.1-136.6 (ArC), 167.0 (C-14), 170.1 (C-1), 170.7 (C-11)

บทที่ 5
สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเปราะภูสีม่วงส่วนลำต้นเหนือดินและทำการแยกหาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนย่อยโดยใช้ฤทธิ์ทางชีวภาพนำทาง โดยขั้นตอนแรกนำพืชส่วนลำต้นเหนือดินได้แก่ ส่วนใบ ส่วนลำต้น และส่วนใบผสมลำต้น มาทำการสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่การสกัดแบบแบ่งส่วน โดยวิธีการสกัดวิธีนี้จะนำพืชส่วนใบมาทำการสกัดกับสารละลาย 50%เอทานอล หลังจากนั้นนำไปสกัดแบบแบ่งส่วนกับตัวทำละลายที่เรียงลำดับความมีขั้วจากต่ำไปสูงได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และบิวทานอล ซึ่งวิธีการสกัดวิธีนี้ก่อให้เกิดอีมัลชั่นขณะทำการสกัด หลังจากนั้นทำการสกัดพืชส่วนลำต้น ซึ่งพืชส่วนนี้มีปริมาณน้อยจึงเปลี่ยนมาทำการสกัดด้วยวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน ซึ่งวิธีการสกัดวิธีนี้เหมาะสำหรับนำมาสกัดกับพืชที่มีปริมาณน้อยและไม่ก่อให้เกิดอีมัลชั่นขณะทำการสกัด โดยวิธีการสกัดแบบลำดับส่วนจะเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากต่ำไปสูงได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล นอกจากนี้ทำการสกัดพืชส่วนใบ ส่วนลำต้นและส่วนใบผสมลำต้น ด้วยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องด้วยเครื่องซอกห์เลต โดยวิธีการสกัดนี้จะนำพืชส่วนใบและลำต้นมาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และโพรพานอล หลังจากนั้นจะนำพืชทั้ง 2 ส่วนมารวมกันและทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธีที่กล่าวมาข้างต้นให้ร้อยละผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกัน

หลังจากนั้นนำส่วนสกัดแต่ละส่วนไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 เซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo เซลล์มะเร็งกระดูกชนิด SW1353 เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MDA-MB-231 เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากชนิด PC3 และเซลล์ปกติชนิด Vero จากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าส่วนสกัด BV(5) คือส่วนสกัดจากลำต้นโดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย มีฤทธิ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 โดยมี IC_{50} เท่ากับ 31.40 ± 1.03 และ 89.66 ± 1.12 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ชนิด LoVo มีค่า IC_{50} เท่ากับ 62.34 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และที่น่าสนใจคือสารสกัด BV(5) นี้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติชนิด Vero มีค่า IC_{50} เท่ากับ 183.3 ± 1.06 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดพบว่าวิธีการสกัดแบบลำดับส่วน ให้สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ที่ทำการสกัดพืชส่วนเดียวกันและตัวทำละลายเดียวกัน [BV(12)] จึงนำส่วนสกัด BV(5) มาทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยใช้รีเอเจนต์อนิซาลดีไฮด์ เฟอร์ลิคคลอไรด์ และดราเจนดรอฟฟ์ พบว่าในส่วนสกัด BV(5) มีสารประกอบกลุ่มเทอร์พีนอยด์ สเตียรอยด์ และสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบของส่วนสกัด นอกจากนี้ยังไม่พบคลอโรฟิลล์เป็นองค์ประกอบของส่วนสกัด ซึ่งคลอโรฟิลล์อาจทำให้เกิดการบดบังของสารประกอบอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพส่งผลให้ส่วนสกัด BV(5) มีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าส่วนสกัดอื่น

นำส่วนสกัด BV(5) มาทำการแยกหาสารออกฤทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ระบบตัวชะจาก 100%เฮกเซน จนถึง 10%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน และนำส่วนย่อยที่มีปริมาณมากกว่า 10 มิลลิกรัม กลับไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังชนิด A375 และ A431 จากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าส่วนย่อย BV(5)-12 คือส่วนย่อย 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนังทั้ง 2 ชนิดใกล้เคียงกับส่วนสกัดโดยมีค่า IC_{50} 38.39 ± 1.04 และ 51.01 ± 1.04 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เนื่องจากส่วนสกัด BV(5)-12 มีปริมาณไม่เพียงพอจึงทำให้ไม่สามารถแยกสารออกฤทธิ์ได้

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าวิธีการสกัดแบบลำดับส่วนให้ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และเมื่อนำมาแยกหาสารออกฤทธิ์พบว่าส่วนย่อย 1%เมทานอลในไดคลอโรมีเทน เป็นส่วนย่อยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงนำการทดลองทั้งหมดนี้มาทำการทดลองซ้ำกับพืชส่วนใบผสมลำต้น และจากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ BV(14) ได้และทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีและแมสสเปกโทรเมตรี พบว่า BV(14) คือ Aurantiamide acetate หรือ Repensine ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไดเปปไทด์และมีการรายงานการค้นพบสารตัวนี้แล้วในพืชหลายชนิดได้แก่ *Daphne genkwa* Sieb.et Zucc. (Li et al., 2013) *Pongamia glabra* Vent (Talapatra et al., 1980) *Piper aurantiacum* Wall (Banerji & Ray, 1981) *Pierreodendron kerstingii* (Ampofo & Waterman, 1985) *Aster tataricus* (Ng et al., 2003) *Clausena anisate* (Songue et al., 2012) *Cratylia mollis* Martius ex Benth (Alves et al., 2013) และ *Clematis terniflora* DC (Yang et al., 2015) เป็นต้น

และนอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานการพบ Aurantiamide acetate ในเปราะภูสีม่วง ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ทำการแยก Aurantiamide acetate ในสารสกัดเปราะภูสีม่วง

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดเปราะภูสีม่วงเพิ่มเติม

2. ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

3. ทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติม

บรรณานุกรม

Alves, C. Q., et al. (2013). *In vitro* acetylcholinesterase activity of peptide derivatives isolated from two species of Leguminosae. *Pharmaceutical Biology, 51*, 936-939.

Ampofo, S., & Waterman, P. G. (1985). Aurantiamide acetate, quassinoids, and a canthinone from the stem bark of *Pierreodendron kerstingii*. *Journal of Natural Products, 48*, 863-864.

Araújo, C. C., & Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 96*(5), 723-728.

Banerji, A., & Ray, R. (1981). Aurantiamides: A new class of modified dipeptides from *Piper aurantiacum*. *Phytochemistry, 20*, 2217-2220.

Bhamarapravati, S., et al. (2006). Antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and *Myristica fragrans* Houtt. against *Helicobacter pylori*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 28*, 157-163.

Bunnag, S., et al. (2006). An effective protocol for clonal propagation of "Proh Phu" (*Caulokaempferia thailandica* Larsen). *KKU Research Journal, 11*, 97-102.

Cheah, S., et al. (2011). Panduratin A inhibits the growth of A549 cells through induction of apoptosis and inhibition of NF-KappaB translocation. *Molecules, 16*, 2583-2598.

Cheenpracha, S., et al. (2006). Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14*, 1710-1714.

Intharapichai, K. (2015). *The medicinal plants genus Caulokaempferia K. Larsen (Zingiberaceae) in India, China and Vietnam.* Mahasarakham University, The Graduate School.

Jaipetch, T., et al. (1982). Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*): Isolation, crystal structure and synthesis of (±)-Boesenbergin A. *Australian Journal of Chemistry, 35*, 351-361.

Jaipetch, T., et al. (1983). Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry, 22*, 625-626.

Jantan, I. B., et al. (2001). Constituents of the rhizome oils of *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlecht from Malaysia, Indonesia and Thailand. *Flavour and Fragrance Journal, 16*, 110-112.

Jing, L. J., et al. (2010). Phytochemicals, antioxidant properties and anticancer investigations of the different parts of several gingers species (*Boesenbergia rotunda*, *Boesenbergia pulchella* var *attenuata* and *Boesenbergia armeniaca*). *Journal of Medicinal Plants Research, 4*, 27-32.

Kirana, C., et al. (2003). Screening for antitumor activity of 11 species of Indonesian Zingiberaceae using human MCF-7 and HT-29 cancer cells. *Pharmaceutical Biology, 41*, 271-276.

Larsen, K. (1973). Studies in Zingiberaceae VI. *Botanisk Tidsskrift, 68*, 157-159.

Larsen, K. (1993). *Boesenbergia tenuispicata* (Zingiberaceae): a new species from Thailand. *Nordic Journal of Botany, 13*, 281-283.

Larsen, K. (2002). Three new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand with a discussion of the generic diversity. *Nordic Journal of Botany, 22*, 409-417.

Larsen, K., & Jenjittikul, T. (2004). A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Laos. *Edinburgh Journal of Botany, 60*, 509-512.

Larsen, K., et al. (2005). Further studies in the genus *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand with the description of two new species. *Nordic Journal of Botany, 23*, 401-406.

Li, S., et al. (2013). Isolation of anticancer constituents from flos genkwa (*Daphne genkwa* Sieb.et Zucc.) through bioassay-guided procedures. *Chemistry Central Journal, 7*, 1-9.

Mao, Q., et al. (2019). Bioactive compounds and bioactivities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods, 8*, 185-206.

Mood, J. D., et al. (2013). The history and identity of *Boesenbergia longiflora* (Zingiberaceae) and descriptions of five related new taxa. *Gardens' Bulletin Singapore, 65*, 47-95.

Mood, J. D., et al. (2014). Nomenclatural changes in Zingiberaceae: *Caulokaempferia* is a superfluous name for *Monolophus* and *Jirawongsea* is reduced to *Boesenbergia*. *Gardens' Bulletin Singapore, 66*, 215-231.

Mood, J. D., et al. (2019). Three new species of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) from Thailand and Lao P.D.R. *Gardens' Bulletin Singapore, 71*, 477-498.

Mood, J. D., et al. (2014). A new species and a new record of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) for Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore, 66*, 207-214.

Ng, T. B., et al. (2003). Antioxidant activity of compounds from the medicinal herb *Aster tataricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 136*, 109-115.

Ngamriabsakul, C. (2008). Caulokaempferia sirirugesae sp. nov. (Zingiberaceae) from southern Thailand. *Nordic Journal of Botany, 26*, 325-328.

Phokham, B., et al. (2015). *Caulokaempferia pubescens* (Zingiberaceae) a new from northern Thailand. *Taiwania, 60*, 77-80.

Phongpaichit, S., et al. (2005). Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. *Mycoses, 48*, 333-338.

Picheansoonthon, C. (2004a). A new species of *Caulokaempferia* from souther Thailand. *Folia Malaysiana, 5*, 1-8.

Picheansoonthon, C. (2004b). Two new *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. *Folia Malaysiana, 5*, 69-80.

Picheansoonthon, C., & Koonterm, S. (2008). Three new species of the yellow-flowered *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. *Taiwania, 53*, 248-257.

Picheansoonthon, C., et al. (2007). A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from souther Thailand. *Folia Malaysiana, 8*, 53-61.

Picheansoonthon, C., & Mokkamul, P. (2006). A new species of Caulokaempferia (Zingiberaceae) from souther Laos. *Natural History Bulletin of Siam Society, 54*, 75-80.

Pradhan, B. K., & Badola, H. K. (2008). Ethnomedicinal plant use by Lepcha tribe of Dzongu valley, bordering Khangchendzonga Biosphere Reserve, in North Sikkim, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 4*, 1-18.

Rachkeeree, A., et al. (2018). Nutritional compositions and phytochemical properties of the edible flowers from selected Zingiberaceae found in Thailand. *Frontiers in Nutrition, 5*, 1-10.

Rai, P. K., & Lalramnghinglova, H. (2010). Lesser known ethnomedicinal plants of Mizoram, north east India: An Indo-Burma hotspot region. *Journal of Medicinal Plants Research, 4*, 1301-1307.

Saensouk, S., & Larsen, K. (2002). *Boesenbergia baimaii*, a new species of Zingiberaceae from Thailand. *Nordic Journal of Botany, 21*, 595-597.

Saensouk, S., & Saensouk, P. (2020). *Boesenbergia isanensis* (Zingiberaceae), a new species from Thailand. *Journal of Japanese Botany, 95*, 65-68.

Sawangjaroen, N., et al. (2005). The *in ivtro* anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand *Parasitology Research, 95*, 17-21.

Shindo, K., et al. (2006). Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. rhizome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70*, 2281-2284.

Sirirugsa, P. (1987). Three new species and one new combination in *Boesenbergia* (Zingiberaceae) from Thailand. *Nordic Journal of Botany, 7*, 421-425.

Sirirugsa, P. (1992). A revision of the genus *Boesenbergia* Kuntze (Zingiberaceae) in Thailand. *Natural History Bulletin of Siam Society, 40*, 67-90.

Songue, J. L., et al. (2012). Chemical constituents from stem bark and roots of *Clausena anisata*. *Molecules, 17*, 13673-13686.

Sukari, M. A., et al. (2008). Chemical constituents variations of essential oils from rhizomes of four Zingiberaceae species. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences, 12*, 638-644.

Suksathan, P., & Triboun, P. (2004). A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand. *Edinburgh Journal of Botany, 60*, 513-516.

Talapatra, S. K., et al. (1980). Pongglabol, a new hydroxyfuranoflavone, and aurantiamide acetate, a dipeptide from the flowers of *Pongamia glabra*. *Phytochemistry, 19*, 1199-1202.

Thongaram, D., et al. (2005). Classification of the genus *Caulokaempferia* K. Larsen (Zingiberaceae) based on the molecular phylogenetic analysis. *KKU Research Journal, 10*, 5-12.

Tiyaworanant, S. (2010). A new *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand. *Telopea, 12*, 479-484.

Trakoontivakorn, G., et al. (2001). Structure analysis of a novel antimutagenic compound, 4-hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a thai spice, fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49*, 3046-3050.

Tuchinda, P., et al. (2002). Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry, 59*, 169-173.

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis*. Heidelberg Universitiy: Springer Verlag Berlin.

Win, N. N., et al. (2007). Bioactive secondary metabolites from *Boesenbergia pandurata* of Myanmar and their preferential cytotoxicity against human pancreatic cancer PANC-1 cell line in nutrient-deprived medium. *Journal of Natural Products, 70*, 1582-1587.

Yang, Y., et al. (2015). Aurantiamide acetate suppresses the growth of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo* by inhibiting autophagic flux. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 19*, 1055-1064.

Yun, J., et al. (2006). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145. *Carcinogenesis, 27*, 1454-1464.

Zaeoung, S., et al. (2005). Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 27*, 799-812.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. (2008). การศึกษาพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย. *Naresuan University Journal, 5*(2), 119-128.

แม้น อมรสิทธิ์. (2010). หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: ชวนพิมพ์ 50.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปทิตตา ชูทรัพย์
วัน เดือน ปี เกิด	1 กุมภาพันธ์ 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2555 มัธยมปลาย สายวิทย์-คณิต โรงเรียนสันติราษฎร์วิทยาลัย พ.ศ. 2559 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	181/31 ซอย สิงหฤกษ์ ถนน ประชาราษฎร์ 2 เขต บางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800