



การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว

LUNG CANCER INHIBITORY ACTIVITY OF PURE COMPOUNDS EXTRACTED FROM
BOESENBERGIA ROTUNDA



วรรณ เยี่ยมอาจ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

LUNG CANCER INHIBITORY ACTIVITY OF PURE COMPOUNDS EXTRACTED FROM
BOESENBERGIA ROTUNDA



WANNA EIAMART

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY
(Ph.D. (Science of Pharmaceutical Products))
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว
ของ
วรรณา เอี่ยมอาจ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญตา ฉัตรวีระสกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยนุช วงศ์นันต์)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว
ผู้วิจัย	วรรณา เอี่ยมอาจ
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามมี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดของสารแพนดราทินเอ (PA) และพิโนสโตรบิน (PN) บริสุทธิ์ซึ่งแยกได้จากเหง้ากระชายขาวและกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (NSCLC) คือ เซลล์ A549 ที่มี EGFR ปกติและเซลล์ H1975 ที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR โดยสาร PA และ PN ถูกแยกจากเหง้ากระชายขาวโดยเทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลายเฮกเซน จากนั้นแยกสารให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียวด้วยเทคนิค centrifugal partition chromatography (CPC) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารออกจากเหง้ากระชายขาว คือ สกัดโดยใช้อนุภาคของผงกระชายขนาด 125 μm อัตราส่วนของผงกระชายต่อปริมาณของเฮกเซน เท่ากับ 1:30 กรัม/มิลลิลิตร และใช้เวลาในการสกัด 10 นาที ภายใต้สภาวะนี้พบว่าให้ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากเหง้ากระชายสูงได้ถึง $6.96 \pm 0.07\%$ โดยพบปริมาณ PA เท่ากับ 10.48 ± 0.34 มิลลิกรัม/กรัม และ PN เท่ากับ 35.68 ± 1.11 มิลลิกรัม/กรัม ซึ่ง PA และ PN จากสารสกัดหยาบถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC ซึ่งพบว่าระบบการแยกสารด้วยส่วนผสมของเฮกเซน/เมทานอล/น้ำ ที่อัตราส่วน 5/3.4/1.6, ปริมาตร/ปริมาตร ด้วย ascending mode สามารถสกัดสาร PA และ PN จากสารสกัดหยาบ 67 มิลลิกรัมได้ดีโดยให้ปริมาณ PA 0.4 มิลลิกรัม ที่ความบริสุทธิ์ 99% และ PN 2.16 มิลลิกรัม ที่ความบริสุทธิ์ 98% สารบริสุทธิ์ที่ได้ถูกยืนยันความถูกต้องของชนิดสารด้วย LC-MS/MS QTOF โดยเปรียบเทียบมวลและรูปแบบการแตกตัวกับฐานข้อมูล PubMed นอกจากนี้โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ PA และ PN ถูกพิสูจน์ด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ และจากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่า PA มีความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ทั้งสองสายพันธุ์ โดย A549 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $6.03 \pm 0.21 \mu\text{g/ml}$ และ H1975 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $5.58 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ และมีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติ MRC5 มีค่า IC_{50} เท่ากับ $12.96 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี western blot แสดงให้เห็นว่า PA สามารถลดความมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการยับยั้ง p-EGFR, p-STAT3 และ p-Akt ในเซลล์มะเร็งปอด NSCLC ทั้งสองสายพันธุ์ และกระตุ้น p-AMPK ในเซลล์ H1975 โดยสรุปจากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสาร PA สามารถพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งปอดชนิด NSCLC ทั้งที่มี EGFR ปกติและที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่ายาต้านมะเร็งมาตรฐาน

คำสำคัญ : แพนดราทินเอ, พิโนสโตรบิน, เหง้ากระชายขาว, เทคนิค centrifugal partition chromatography, มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก, ความมีชีวิตรอดของเซลล์

Title	LUNG CANCER INHIBITORY ACTIVITY OF PURE COMPOUNDS EXTRACTED FROM <i>BOESENBERGIA ROTUNDA</i>
Author	WANNA EIAMART
Degree	DOCTOR OF PHILOSOPHY
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Associate Professor Weerasak Samee , Ph.D
Co Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.
Co Advisor	Associate Professor Piyanuch Wonganan , Ph.D.

The objectives of this study are to assess the cytotoxicity of panduratin A (PA) and pinostrobin (PN), both isolated from *Boesenbergia rotunda* rhizome, and to elucidate their underlying mechanisms in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells, specifically those expressing wild-type EGFR (A549) and mutant EGFR (H1975). PA and PN were isolated from *B. rotunda* using an ultrasound-assisted extraction technique with n-hexane as the solvent, followed by a one-step purification process using centrifugal partition chromatography (CPC). The optimal conditions for high extraction efficiency prior to purification were a rhizome powder size of 125 μm , 10 minutes of ultrasound extraction with n-hexane, and a solid/liquid ratio of 1:30 g/ml. Under these conditions, the maximum yield of crude extract from *B. rotunda* rhizome was $6.96 \pm 0.07\%$, containing 10.48 ± 0.34 mg/g of PA and 35.68 ± 1.11 mg/g of PN. The mixture was partitioned and isolated using CPC with an optimal solvent composition of 5/3.4/1.6 (n-hexane/MeOH/water, v/v) in ascending mode. From 67 mg of crude extract, PA (0.4 mg, 99% purity) and PN (2.16 mg, 98% purity) were successfully purified. The purified compounds were accurately identified using LC-MS/MS QTOF by comparing their masses and fragmentation patterns to Pubmed library. The structures of PA and PN were further confirmed by $^1\text{H-NMR}$ analysis. *In vitro* cytotoxicity screening results demonstrated that PA exhibits potent cytotoxic effects on both A549 (IC_{50} of 6.03 ± 0.21 $\mu\text{g/ml}$) and H1975 (IC_{50} of 5.58 ± 0.15 $\mu\text{g/ml}$) NSCLC cell lines, with low toxicity against MRC5 normal lung cells (IC_{50} of 12.96 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$). Furthermore, western blot results showed that PA reduces cell viability by inhibiting p-EGFR, p-STAT3 and p-Akt in both NSCLC cell lines, and activating p-AMPK in H1975 cells. In summary, the results of this study indicate that PA can be developed as an anticancer drug for NSCLC, both with wild-type and mutant EGFR, with comparable or superior efficacy to standard anticancer drugs.

Keyword : panduratin A, pinostrobin, Boesenbergia rotunda rhizome, centrifugal partition chromatography, non-small cell lung cancer, cell viability

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และสนับสนุนเป็นอย่างดีจากอาจารย์ที่ปรึกษา คือ รศ. ดร. วีระศักดิ์ สามิ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมทั้ง 2 ท่าน คือ รศ. ดร. สริน ทัดทอง และ รศ. ดร. ปิยนุช วงศ์อนันต์ รวมทั้ง รศ.สุพิชา วิทยเลิศปัญญา และดร.สุทธีนี้ เพื่อก้าวผ่าน อาจารย์จากภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งอาจารย์ทุกท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ ข้อคิด ข้อเสนอแนะและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนกระทั่งการวิจัยครั้งนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ขอบคุณหัวหน้างานและเพื่อนร่วมงานจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคนที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยฉบับนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้ที่เกี่ยวข้องศึกษาต่อไป

วรรณา เขี่ยมอาจ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ท
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
ตัวแปรที่ศึกษา	5
กรอบแนวคิดงานวิจัย	6
สมมติฐานการวิจัย	6
บทที่ 2.....	7
ทบทวนวรรณกรรม	7
2.1 โรคมะเร็งปอด.....	7
2.2 วิธีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปอด	14
2.3 กระชายขาว (Kra-Chai khao).....	27
2.4 เทคนิคการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร	43

2.5 เทคนิคการแยกสารสำคัญจากสมุนไพรให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Centrifugal Partition Chromatography (CPC).....	50
บทที่ 3.....	58
วิธีดำเนินการวิจัย	58
3.1 เครื่องมือ	58
3.2 วัสดุ	59
3.3 สารเคมี	59
3.4 วิธีการทดลอง	61
3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีนอลิกและแทนนินด้วยเทคนิค คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย	61
3.4.2 การศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดกระชายขาวด้วยเทคนิค CPC.....	64
3.4.3 การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)	67
3.4.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติของสารฟีนอลิก และแทนนินที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยเทคนิค MTT	69
3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ Western blotting	71
3.4.6 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	72
3.4.7 การศึกษา Molecular docking	73
บทที่ 4.....	75
ผลการวิจัย.....	75
4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟีนอลิกและแทนนินด้วยเทคนิคคลื่น เสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย	75
4.2 ผลการศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดกระชายขาวด้วยเทคนิค CPC.....	94
4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์และการปนเปื้อนของสารอื่นในสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ จากเหง้ากระชายขาวด้วยเทคนิค LC-Q-TOFMS	104

4.4 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance (¹ H-NMR)	108
4.5 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยเทคนิค MTT.....	112
4.6 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน EGFR, Akt, STAT3 และ AMPK ในเซลล์ A549 และ H1975 หลังการทดสอบด้วยสารแพนดูราทินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยวิธี westrn blotting	122
4.7 ผลการศึกษาโมเลกุลาร์ต็อกกิงของแพนดูราทินเอในการยับยั้งการกระตุ้นโปรตีนที่ทำให้เกิดมะเร็งปอด.....	125
4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายขาว	129
บทที่ 5.....	132
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	132
บรรณานุกรม	139
ประวัติผู้เขียน.....	151

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดง cell line ชนิดต่างๆ.....	13
ตาราง 2 สรุปลยา EGFR-TKI ที่ได้รับอนุมัติให้ใช้ในการรักษามะเร็งปอด NSCLC	27
ตาราง 3 ตำรับที่มีกระชายเป็นส่วนประกอบ.....	29
ตาราง 4 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในกระชาย	30
ตาราง 5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารฟิโนสโตรบิน	34
ตาราง 6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารแพนดูราทินเอ	38
ตาราง 7 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอ	43
ตาราง 8 ตัวอย่างการสกัดสารสำคัญให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC	55
ตาราง 9 สภาวะของการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค UHPLC	63
ตาราง 10 สภาวะที่ใช้ในการแยกสารของเครื่อง CPC	65
ตาราง 11 สภาวะของการวิเคราะห์สาร.....	66
ตาราง 12 เกณฑ์การยอมรับการทดสอบ System suitability	67
ตาราง 13 เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำในการทำซ้ำตามมาตรฐาน AOAC guideline	68
ตาราง 14 เกณฑ์การยอมรับความถูกต้องของการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC guideline ...	69
ตาราง 15 เซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดลอง.....	69
ตาราง 16 ปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละตัวอย่าง	72
ตาราง 17 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกับโปรตีนเป้าหมาย	74
ตาราง 18 ประเภทของตัวทำละลาย.....	76
ตาราง 19 ผลการคำนวณค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท first-order และ second order สำหรับการทำนายค่าการละลายของสารฟิโนสโตรบิน.....	78

ตาราง 20 ผลการคำนวณค่าการละลายของอนุพันธ์กลุ่มย่อยประเภท first-order และ second order สำหรับการทำนายค่าการละลายของสารแพนดูราทินเอ	79
ตาราง 21 HSP parameters และค่า Ra ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่มีต่อสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอ ที่อุณหภูมิ 25 °C	79
ตาราง 22 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมตามการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m	81
ตาราง 23 ผลการคำนวณค่าการละลายของสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอที่อุณหภูมิต่างๆ ตามทฤษฎีของเฮนเซน.....	84
ตาราง 24 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมตามการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m.....	85
ตาราง 25 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m.....	86
ตาราง 26 ผลการศึกษาเวลาในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m	87
ตาราง 27 ผลการศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m.....	88
ตาราง 28 ร้อยละประสิทธิผลของการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอในผงกระชายขนาด 125 μ m.....	88
ตาราง 29 สรุปผลสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากเหง้ากระชายขาว	89
ตาราง 30 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอในเมทานอล	90
ตาราง 31 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน.....	92
ตาราง 32 ผลการทดสอบความแม่นยำในการทำซ้ำภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 25 μ g/ml	93
ตาราง 33 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	93

ตาราง 34 ค่า K และ α ในระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	94
ตาราง 35 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกแยกได้ด้วยระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	95
ตาราง 36 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกแยกได้ด้วยการฉีดสารเข้าระบบการแยกในปริมาตรที่แตกต่างกัน.....	97
ตาราง 37 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกแยกได้โดยการเปลี่ยนสารตัวพาตัวอย่าง	98
ตาราง 38 สรุปผลที่ได้รับจากการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิค CPC ใน 1 รอบ.....	98
ตาราง 39 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพิโนสโตรบิน 1250 ng และแพนดูราตินเอ 250 ng ในเมทานอล	100
ตาราง 40 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานพิโนสโตรบิน	102
ตาราง 41 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานพิโนสโตรบิน	103
ตาราง 42 ผลการทดสอบการทำซ้ำภายในวันเดียวกันและระหว่างวันอย่างแม่นยำ	104
ตาราง 43 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	104
ตาราง 44 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้ด้วยความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยเทคนิค LC-Q-TOFMS	105
ตาราง 45 การเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารมาตรฐานพิโนสโตรบิน	110
ตาราง 46 การเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม $^1\text{HNMR}$ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารมาตรฐานแพนดูราตินเอ	111
ตาราง 47 ค่า IC_{50} ของเซลล์ชนิด A549, H1975, MRC5 และค่า selectivity index.....	112
ตาราง 48 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ NSCLC ในเซลล์ A549 และ H1975 ที่ถูกทดสอบด้วยแพนดูราตินเอที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	113
ตาราง 49 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารแพนดูราตินเอ	114

ตาราง 50 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารแพนดูราตินเอ.....	114
ตาราง 51 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ MRC5 เมื่อได้รับสารแพนดูราตินเอ	115
ตาราง 52 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารเจฟิทิบ.....	116
ตาราง 53 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารเจฟิทิบ.....	117
ตาราง 54 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารโอซิเมอร์ติบ.....	118
ตาราง 55 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารโอซิเมอร์ติบ.....	118
ตาราง 56 การเกิดผลึกของสารฟิโนสโตรบินในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	119
ตาราง 57 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารฟิโนสโตรบิน	120
ตาราง 58 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารฟิโนสโตรบิน.....	120
ตาราง 59 แสดงค่าพลังงานการจับระหว่างแพนดูราตินเอและโปรตีนเป้าหมาย	125
ตาราง 60 ประเภทของ hydrogen bonds และ hydrophobic contacts ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของ แพนดูราตินเอและกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย.....	126
ตาราง 61 แสดงค่า IC_{50} ของแพนดูราตินเอ ฟิโนสโตรบินและวิตามินซีในการต้านอนุมูลอิสระ	129
ตาราง 62 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารแพนดูราตินเอ	130
ตาราง 63 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี	130

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กายวิภาคศาสตร์ (anatomy) ของปอดและระบบทางเดินหายใจ	7
ภาพประกอบ 2 แสดงภาพรวมของจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่และผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 10 อันดับแรกจากผลสำรวจ 185 ประเทศทั่วโลก ประจำปี 2022.....	8
ภาพประกอบ 3 มะเร็งปอดชนิด NSCLC	9
ภาพประกอบ 4 การกลายพันธุ์ของ EGFR.....	11
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ EGFR และกลไก Dimerization.....	12
ภาพประกอบ 6 กลไกการส่งสัญญาณและผลการกระตุ้น EGFR.....	15
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของโปรตีน Akt.....	16
ภาพประกอบ 8 กลไกการกระตุ้นวิถี PI3K/Akt ที่นำไปสู่การอยู่รอดของเซลล์และการควบคุมการกระตุ้นของวิถีนี้โดย PTEN, SHIP และ PHPLP	18
ภาพประกอบ 9 กลไกการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของ STAT3.....	19
ภาพประกอบ 10 กลไกของวิถี STAT3 ต่อการดื้อยาต้าน EGFR-TKIs	20
ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของหน่วยย่อย AMPK.....	21
ภาพประกอบ 12 AMPK เป็นศูนย์กลางการควบคุมการเผาผลาญพลังงานของเซลล์มะเร็งและกระบวนการ autophagy.....	22
ภาพประกอบ 13 กลไกการยับยั้ง AMPK ในยีน KRAS mutation.....	23
ภาพประกอบ 14 กลไกการต้านมะเร็งของยา Targeted therapy.....	25
ภาพประกอบ 15 การกลายพันธุ์ของ EGFR ชนิดต่างๆ และการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อยา EGFR-TKI.....	26
ภาพประกอบ 16 ส่วนประกอบของกระชายขาว	28
ภาพประกอบ 17 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกระชายขาว.....	31
ภาพประกอบ 18 โครงสร้างทางเคมีของสารพิโนสโตรบิน	32

ภาพประกอบ 19	ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารพิโนสโตรบิน.....	33
ภาพประกอบ 20	กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิโนสโตรบินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดโดยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ผ่านวิถีการส่งสัญญาณ Notch ในเซลล์ NSCLC	35
ภาพประกอบ 21	โครงสร้างทางเคมีของสารแพนดูราทินเอ	36
ภาพประกอบ 22	ผลการทบทวนวรรณกรรมในฤทธิ์การต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งกระเพาะอาหารของสารในกลุ่มซาโคลผ่านกลไกต่างๆ.....	37
ภาพประกอบ 23	แสดงกลไกการยับยั้งมะเร็งของสารกลุ่มซาโคล.....	39
ภาพประกอบ 24	กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับอ่อนในเซลล์ PANC-1 ผ่านกลไกการยับยั้ง PI3K / Akt / mTOR/autophagy ในสภาวะการอดอาหาร.....	39
ภาพประกอบ 25	กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารแพนดูราทินเอในเซลล์ A375 โดยการกระตุ้นการเกิด autophagy ผ่านวิถี mTOR และ AMPK.....	40
ภาพประกอบ 26	สารกลุ่มซาโคล (A) และฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (B)	41
ภาพประกอบ 27	ผลการแสดงออกของโปรตีนหลังการทดสอบด้วยสารอนุพันธ์.....	42
ภาพประกอบ 28	แผนผังการสกัดโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก (A) และการก่อดัวของฟองอากาศในอ่างอัลตราโซนิก (B)	45
ภาพประกอบ 29	ระบบการทำงานของ Ascending Mode และ Descending Mode	50
ภาพประกอบ 30	คอลัมน์ CPC (A) เครื่อง CPC (B)	51
ภาพประกอบ 31	แผนภาพขั้นตอนการทำงานของเครื่อง CPC	51
ภาพประกอบ 32	แสดงการกระจายตัวของสารตัวอย่างในระบบสองเฟส	52
ภาพประกอบ 33	องค์ประกอบของสารในระบบ Arizona 23 รายการ	53
ภาพประกอบ 34	ผลึกของแพนดูราทินเอบริสุทธิ์ที่แยกด้วยเทคนิค silica gel column chromatography	56
ภาพประกอบ 35	แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรก่อนนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย CPC .	57

ภาพประกอบ 36 เหย้ากระชายขาวแห้ง	62
ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงค่าการละลายของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ตามทฤษฎีของเฮนเซน	75
ภาพประกอบ 38 อนุพันธ์ในโครงสร้างของสารพินอสโตรบิน.....	77
ภาพประกอบ 39 อนุพันธ์ในโครงสร้างของสารแพนดูราตินเอ.....	78
ภาพประกอบ 40 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของเฮนเซนของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอกับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ	80
ภาพประกอบ 41 สารสกัดหยาบในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล	81
ภาพประกอบ 42 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอจากเหย้ากระชายขาว	82
ภาพประกอบ 43 โครมาโทแกรมของส่วนประกอบทางเคมีในกระชายขาวที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	83
ภาพประกอบ 44 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของเฮนเซนของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอกับเฮกเซนที่อุณหภูมิต่างๆ	84
ภาพประกอบ 45 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสาร	85
ภาพประกอบ 46 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร.....	86
ภาพประกอบ 47 โครมาโทแกรมของพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกสกัดซ้ำ 3 ครั้ง	88
ภาพประกอบ 48 เหย้ากระชายแห้ง (A), สารสกัดเฮกเซนจากเหย้ากระชาย (B) สารสกัดเฮกเซนถูกละลายด้วยเอทิลอะซิเตท (C) และ(D)โครมาโทแกรมของพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอในสารสกัดเฮกเซนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC	89
ภาพประกอบ 49 โครมาโทแกรมของตัวอย่าง Blank , สารละลายมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอความเข้มข้น 20 µg/ml (เส้นสีดำ) และสารสกัดเฮกเซน 25 µg/ml (เส้นสีชมพู)	91
ภาพประกอบ 50 กราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอ.....	92

ภาพประกอบ 51 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอในตัวทำละลายเฟสบนและเฟสล้างของสารละลายผสม n-Hex/MeOH/H ₂ O ที่อัตราส่วน 5/3.4/1.6	95
ภาพประกอบ 52 โครมาโทแกรมของการแยกสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วย CPC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย n-Hex/MeOH/water ที่อัตราส่วนต่างๆ	96
ภาพประกอบ 53 โครมาโทแกรมของการแยกสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วย CPC	97
ภาพประกอบ 54 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอในสารสกัด	99
ภาพประกอบ 55 สารพินอสโตรบิน (A) และแพนดูราตินเอ (B) บริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค CPC	99
ภาพประกอบ 56 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินที่แยกได้เทียบกับตัวทำละลาย	100
ภาพประกอบ 57 โครมาโทแกรมของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับตัวทำละลาย	101
ภาพประกอบ 58 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับ	101
ภาพประกอบ 59 กราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและสมการเส้นตรง	102
ภาพประกอบ 60 กราฟมาตรฐานของสารแพนดูราตินเอและสมการเส้นตรง	103
ภาพประกอบ 61 Mass spectrum ของสารพินอสโตรบินที่แยกได้ด้วย LC-Q-TOFMS	106
ภาพประกอบ 62 รูปแบบการแตกตัวของสารพินอสโตรบินที่แยกได้เทียบกับพินอสโตรบินในฐานข้อมูลของ PubMed	106
ภาพประกอบ 63 Mass spectrum ของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้ด้วย LC-Q-TOFMS	107
ภาพประกอบ 64 รูปแบบการแตกตัวของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับแพนดูราตินเอในฐานข้อมูลของ PubMed	107
ภาพประกอบ 65 โครงสร้างทางเคมีของสารพินอสโตรบิน (A) และแพนดูราตินเอ (B) ที่แยกได้จากกระชาย	108
ภาพประกอบ 66 ¹ H-NMR spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์พินอสโตรบินที่แยกได้จากกระชาย	109
ภาพประกอบ 67 ¹ H-NMR spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์พินอสโตรบินที่แยกได้จากกระชายเทียบกับสารมาตรฐานพินอสโตรบิน	109

ภาพประกอบ 68 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์แพนดูราทินเอที่แยกได้จาก กระชายขาว	110
ภาพประกอบ 69 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์แพนดูราทินเอที่แยกได้จาก กระชายขาวเทียบกับสารมาตรฐานแพนดูราทินเอ.....	111
ภาพประกอบ 70 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 H1975 และ MRC5 ของ.....	116
ภาพประกอบ 71 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975	117
ภาพประกอบ 72 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975 ของ.....	119
ภาพประกอบ 73 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975	121
ภาพประกอบ 74 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ EGFR phosphorylation ในเซลล์ A549.....	122
ภาพประกอบ 75 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ EGFR phosphorylation ในเซลล์ H1975	122
ภาพประกอบ 76 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ STAT3 phosphorylation ในเซลล์ A549	123
ภาพประกอบ 77 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ STAT3 phosphorylation ในเซลล์ H1975	123
ภาพประกอบ 78 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ Akt phosphorylation ในเซลล์ A549.....	123
ภาพประกอบ 79 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ Akt phosphorylation ในเซลล์ H1975.....	124
ภาพประกอบ 80 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ A549	124
ภาพประกอบ 81 ผลของสารแพนดูราทินเอต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ H1975.....	124
ภาพประกอบ 82 แพนดูราทินเอที่ถูกระบุลำดับวงแหวน	126
ภาพประกอบ 83 แสดงอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายกับแพนดูราทินเอ .	129
ภาพประกอบ 84 ผลของสารแพนดูราทินเอและวิตามินซีต่อการต้านอนุมูลอิสระ	131
ภาพประกอบ 85 โครงสร้างของ (A) pinostrobin, (B) pinostrobin propionate และ (C) pinostrobin butyrate	134
ภาพประกอบ 86 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด DLD1, Kras WT และ Kras mutant (G12V) เมื่อได้รับยาต้าน cetuximab ที่ความเข้มข้นต่างๆ (A) และ	

ผลการแสดงออกของโปรตีน AMPK ในเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยยาต้าน cetuximab ที่ความเข้มข้น 5 nM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง..... 136

ภาพประกอบ 87 กลไกการยับยั้งฟอสโฟริเลชันของ EGFR, Akt, STAT3 และกระตุ้น AMPK ของสารแพนดูราตินเอต่อการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ EGFR wild-type และ EGFR mutant.... 137



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

โรคมะเร็งปอดเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย เนื่องจากเป็นโรคมะเร็งที่พบบ่อยและมีอัตราผู้เสียชีวิตมากที่สุดในโลกเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น และมีแนวโน้มอัตราการเกิดโรคสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง (1-3) มะเร็งปอดแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer) และมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC) ซึ่งมะเร็งปอดชนิด NSCLC เป็นชนิดที่พบได้มากถึง 85% ในกลุ่มผู้ป่วยที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่ (4, 5) โดย 60% เป็น NSCLC ชนิด adenocarcinoma (6) โดย 80 % ของการเกิดโรคส่วนมากเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนในร่างกาย (7) โดยยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปอดชนิด NSCLC ชนิด adenocarcinoma ส่วนมากเป็นการกลายพันธุ์ของยีน epidermal growth factor receptor (EGFR) ซึ่ง 85%–90% เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง exon 19 deletion และ exon 21 L858R substitution (8, 9) และยีนอื่นๆ ที่พบการกลายพันธุ์ได้แก่ KRAS, ALK, ROS, BRAF, AKT, HER2, MEK, MET, NRAS, PIK3CA และ RET ซึ่งการทราบชนิดของยีนที่ผิดปกติในผู้ป่วยสามารถนำมาใช้กำหนดเป้าหมายในการรักษาโรคมะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพและตรงเป้าหมาย (6)

เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิด NSCLC ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนมักพบในผู้ป่วยที่ไม่สูบบุหรี่อีกทั้งระยะเริ่มต้นมักไม่แสดงอาการ ทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยโรคได้ช้า ประมาณ 80-85% มักพบโรคในระยะแพร่กระจายหรือระยะลุกลามของเซลล์มะเร็ง (metastasis) (10) ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ โดยอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี ไม่ถึง 5% (11) ซึ่งการรักษาโรคมะเร็งปอดในระยะแพร่กระจายไม่สามารถรักษาแบบ local treatment ได้ จึงต้องใช้วิธีการรักษาโดยให้ยาเคมีบำบัด (chemotherapy) (12) ซึ่งสารมีการออกฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตหรือทำลายเซลล์แบบไม่จำเพาะเจาะจงทำให้เซลล์ปกติของร่างกายถูกทำลายด้วย จึงมีการพัฒนามาใช้การรักษาด้วยยามุ่งเป้า (targeted therapy) ที่สามารถออกฤทธิ์โดยพุ่งเป้าไปที่เซลล์มะเร็งโดยเฉพาะทำให้มีผลต่อเซลล์ปกติของร่างกายค่อนข้างน้อย ซึ่งยามุ่งเป้าที่ใช้ในการรักษามะเร็งปอด คือ ยาด้านอีจีเอฟอาร์ไทโรซีนไคเนส (EGFR TKIs) โดยจะใช้เฉพาะกับผู้ป่วยมะเร็งปอดที่มีสาเหตุการเกิดโรคจากการกลายพันธุ์ของยีนเท่านั้น ซึ่งผู้ป่วยจะตอบสนองกับยา EGFR TKIs ได้ดี โดยเมื่อเปรียบเทียบ

ระหว่างการให้ยาต้าน EGFR TKIs กับการให้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษานานแรกในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของยีน EGFR พบว่าการให้ยาต้าน EGFR TKIs สามารถตอบสนองและช่วยเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรค (progression-free survival, PFS) ได้มากกว่ายาเคมีบำบัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (13, 14)

ถึงแม้ว่ายากลุ่ม EGFR TKIs ส่งผลให้ผู้ป่วยมีอัตราการตอบสนองและการรอดชีวิตที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตามภายหลังที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับยาต้าน EGFR TKIs รุ่นที่หนึ่งหรือรุ่นที่สองไปเป็นระยะเวลาประมาณ 4-12 เดือนพบว่าผู้ป่วยมีภาวะดื้อต่อการรักษาด้วยยากลุ่ม TKIs (acquired resistance) หรือมีโรคลุกลามขึ้นภายหลังโรคสงบ (Dong และคนอื่น ๆ, 2018) การดื้อยาสามารถเกิดขึ้นได้หลายกลไก ซึ่งกลไกที่พบบ่อยที่สุดของสาเหตุในการดื้อยากลุ่ม TKIs คือ การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ในตำแหน่ง exon 20 (exon 20 insertion) และการแทนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 790 ของ exon 20 (T790M mutation) (Majeed, Manochakian, Zhao, และ Lou, 2021; S. G. Wu และ Shih, 2018) จากปัญหาการดื้อยาต้าน EGFR TKIs ของผู้ป่วยในโรคมะเร็งปอดซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างมากต่อประสิทธิผลในการรักษา ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาหาสารจากธรรมชาติที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดสูงแต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติต่ำเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาหรือตัวยับยั้งมะเร็งปอด NSCLC ที่ดื้อยาต้าน EGFR TKIs

กระชาย (Kra-Chai) หรือกระชายขาว หรือบางครั้งถูกเรียกว่ากระชายเหลือง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อนและในประเทศไทย สำหรับประเทศไทยกระชายเป็นสมุนไพรที่ได้รับการนิยมนำมาใช้ในการปรุงอาหาร รวมทั้งใช้เป็นยารักษาโรคและกลุ่มอาการต่างๆ ในทางการแพทย์พื้นบ้านและแพทย์แผนไทยมาอย่างยาวนาน ซึ่งกระชายได้ถูกระบุอยู่ในส่วนประกอบของตำรับยาแผนไทยหลายตำรับ ปัจจุบันมีรายงานการวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาและพบว่าสารสกัดจากกระชายมีสรรพคุณในด้านต่างๆ เช่นฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (15, 16) ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (17, 18) ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (19, 20) และต้านมะเร็งชนิดต่างๆ (21, 22) เป็นต้น จากฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีของกระชายขาว ทำให้กระชายเป็นหนึ่งในสิบห้าของสมุนไพร Herbal Champions ตามภายใต้แผนปฏิบัติการด้านสมุนไพรแห่งชาติ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2566-2570 ส่งเสริมการปลูกกระชายมากขึ้น เป็นผลให้กระชายเป็นสมุนไพรที่หาง่ายและราคาถูกลง นอกจากนี้กระชายยังถูกจัดเป็นพืชกินได้จึงนับว่าเป็นสมุนไพรที่มีความปลอดภัยสูงโดยถูกกำหนดเป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารตามหลักมาตรฐานสากลของ CODEX (เลขที่ HS 3368) และจัดเป็นพืชที่กินได้ตามฐานข้อมูลพืชของ USDA (รหัส BORO4) จากการศึกษาทางนิเวศวิทยาพบว่าสารสำคัญจากกระชายมีหลาย

ชนิด ได้แก่ naringenin, alpinetin, pinocembrin, cardamonin, pinostrobin chalcone, pinostrobin, 4-hydroxypanduratin A และ panduratin A (23-25) เป็นต้น โดยสารที่มีปริมาณมากในกระชายและมีฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 ชนิดหลัก คือ พิโนสโตรบิน (pinostrobin) และแพนดูราทินเอ (panduratin A) (26) ซึ่งสารทั้งสองชนิดถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปอด NSCLC ชนิด wild type (A549)(27, 28) ซึ่งปัจจุบันยังมีรายงานการศึกษาทางกลไกในการต้านมะเร็งปอดชนิด NSCLC อยู่อย่างจำกัดและยังไม่มีรายงานการศึกษาที่ชัดเจนถึงกลไกในการต้านมะเร็งปอดชนิด mutant EGFR (H1975) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาศักยภาพของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากกระชายขาวในการต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ทั้งแบบ wild type EGFR และ mutant EGFR ที่ไม่ตอบสนองต่อยาต้าน EGFR TKIs (29) เพื่อเพิ่มโอกาสในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งปอดที่สามารถลดปัญหาภาวะดื้อต่อการรักษาด้วยยากกลุ่ม TKIs อย่างไรก็ตามหากต้องการพัฒนาสารดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเภสัชกรรมและยารักษาโรคในทางการแพทย์จำเป็นต้องแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอให้บริสุทธิ์เพื่อควบคุมคุณภาพและกำหนดความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาต่อในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ แต่ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานในการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายและยังไม่มีรายงานการวิจัยในการแยกสารหลักในกระชายทั้ง 2 ชนิดให้บริสุทธิ์ได้พร้อมกันอยู่น้อย

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารสำคัญจากกระชายให้บริสุทธิ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายนั้น คือ เทคนิคการแยกสารด้วยคอลัมน์ (Column Chromatography) ซึ่งมีเฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งและเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลว เช่น silica gel column chromatography (30), Sephadex LH-20 column chromatography (31, 32), Flash Chromatography (15) และ Preparative High-Performance Liquid Chromatography (33) เป็นต้น ซึ่งเทคนิคดังกล่าวมีความซับซ้อนต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนและใช้เวลานาน (34) อีกทั้งตัวอย่างของสารสกัดสมุนไพรมีความหนืดสูงหรือเข้มข้นมาก ปัญหาส่วนใหญ่ที่พบในการใช้คอลัมน์ที่เป็นของแข็ง คือ เกิดการอุดตันได้ง่ายและไม่สามารถล้างทำความสะอาดได้หมด จำเป็นต้องเตรียมตัวอย่างให้สะอาดก่อนการแยกสาร ดังนั้นเพื่อลดปัญหาการอุดตันของคอลัมน์ อีกทั้งลดเวลาที่ใช้ในการแยกสารให้สั้นลง ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Centrifugal Partition Chromatography (CPC) ซึ่งเป็นเทคนิคในการแยกสารผสมออกจากกันโดยใช้หลักการ Liquid-Liquid Chromatography โดยมีเฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวสามารถแยกสารให้มีความบริสุทธิ์สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ด้วยขั้นตอนเดียว ทำให้ใช้เวลา

ดำเนินการสั้น ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษ ทำให้ต้นทุนต่ำ ได้ผลผลิตในปริมาณสูง อีกทั้งยังเป็นขั้นตอนที่ง่ายสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดจากการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากซับซ้อนด้วยวิธีแบบดั้งเดิมได้ (35)

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาการสกัดสารสกัดขั้นต้น (crude extract) จากกระชายขาวด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลายและแยกสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC
2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารสกัดและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS, LC-MS/MS QTOF (Liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry system) และ ^1H NMR (Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค DPPH และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ของสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยเทคนิค MTT
4. เพื่อตรวจสอบกลไกที่เป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ A549 และ H1975 ด้วยวิธี western blotting หลังการทดสอบด้วยสารสกัดบริสุทธิ์จากการขยายขาว

ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้เทคนิคใหม่ที่ใช้ในการแยกสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวให้บริสุทธิ์ รวมทั้งได้ข้อมูลของกลไกการยับยั้งมะเร็งปอดชนิด NSCLC ทั้งแบบ wild type และ mutant EGFR ของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาวซึ่งในปัจจุบันยังมีอยู่อย่างจำกัด เพื่อนำสารดังกล่าวไปพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งปอด NSCLC ที่ดื้อยาต้าน EGFR TKIs

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองมุ่งศึกษาวิธีการสกัดและแยกสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปศึกษาความเป็นพิษและกลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 โดยงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการสกัดหยาบของสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวด้วยเทคนิคอัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลาย

ชนิดต่างๆและหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบที่สามารถสกัด สารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอออกมาได้มากในขณะที่สกัดสารที่ไม่ต้องการออกมาน้อยที่สุด จากนั้นศึกษาการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากสารสกัดหยาบให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค CPC และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค LC-MS/MS รวมทั้งยืนยันความถูกต้องของชนิดสารและตรวจสอบสารตกค้างที่ไม่ต้องการด้วย LC-MS/MS QTOF พิสูจน์โครงสร้างโมเลกุลของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอด้วยเทคนิค NMR จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ด้วยเทคนิค MTT โดยนำสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดมาก แต่เป็นพิษกับเซลล์ปกติน้อยไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน EGFR, Akt, STAT3 และ AMPK ในเซลล์ A549 และ H1975 ด้วยวิธี western blotting ร่วมกับการศึกษา molecular docking เพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการส่งสัญญาณภายในเซลล์

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้

1. การศึกษาการสกัดและแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวให้บริสุทธิ์

ตัวแปรอิสระ: สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวให้บริสุทธิ์

ตัวแปรตาม: ความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอที่สกัดได้

2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากสารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาว

ตัวแปรอิสระ: ความเข้มข้นของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์จากกระชายขาวที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

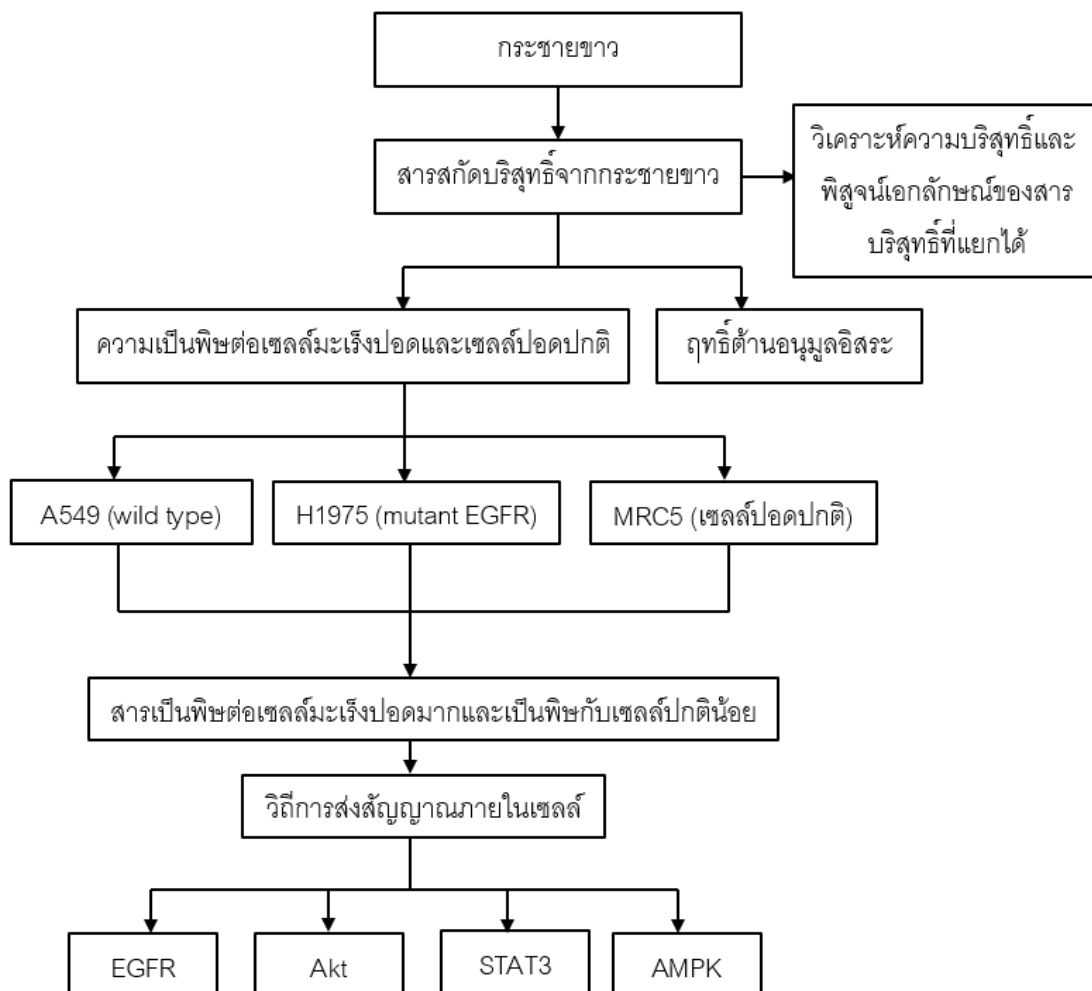
ตัวแปรตาม: 1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2) ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด

3. ศึกษากลไกที่เป็นสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์ A549 และ H1975

ตัวแปรอิสระ: โปรตีนเป้าหมาย ได้แก่ EGFR, Akt, STAT3 และ AMPK

ตัวแปรตาม: การแสดงออกของโปรตีนเป้าหมาย

กรอบแนวคิดงานวิจัย



สมมติฐานการวิจัย

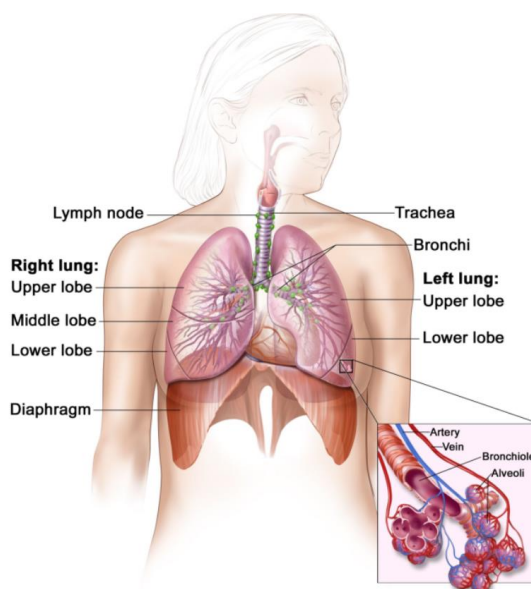
สารสกัดบริสุทธิ์จากกระชายขาวมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 ผ่านกลไกการยับยั้งวิถีสัญญาณ EGFR, Akt, STAT3 และกระตุ้นวิถีสัญญาณ AMPK

บทที่ 2

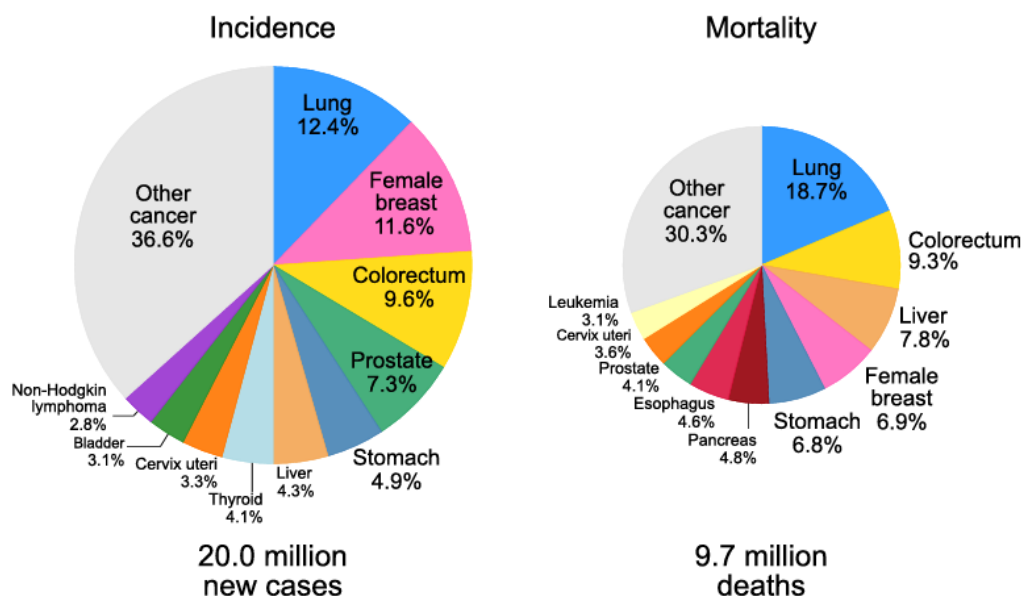
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 โรคมะเร็งปอด

มะเร็งปอดเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่เซลล์ของเนื้อเยื่อปอดเกิดการแบ่งตัวมากผิดปกติอย่างรวดเร็วโดยไม่สามารถควบคุมได้ทำให้เกิดเป็นกลุ่มก้อนของเซลล์ขนาดใหญ่ และสามารถลุกลามและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อที่อยู่ห่างไกล (metastatic growth) โดยเฉพาะระบบเลือดและน้ำเหลือง ซึ่งโรคมะเร็งปอดเป็นมะเร็งชนิดที่พบบ่อยและมีอัตราผู้เสียชีวิตมากที่สุดในโลกเมื่อเทียบกับโรคมะเร็งชนิดอื่น(12) จากข้อมูลสถิติจากสถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ องค์การอนามัยโลก (GLOBOCAN) ในปี ค.ศ. 2022 ซึ่งถูกสำรวจโดยองค์การวิจัยโรคมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer หรือ IARC) พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ประมาณ 20 ล้านคน ซึ่งมะเร็งปอดถูกพบผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่มากที่สุดถึง 2.5 ล้านคนต่อปี คิดเป็น 12.4% ของผู้ป่วยใหม่ทั้งหมด ตามด้วยมะเร็งเต้านม (11.6%) มะเร็งลำไส้ใหญ่ (9.6%) มะเร็งต่อมลูกหมาก (7.3%) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (4.9%) นอกจากนี้มะเร็งปอดยังเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตจากมะเร็งมากที่สุดในโลก มีผู้เสียชีวิต 1.8 ล้านคน หรือ 18.7% ของการเสียชีวิตจากมะเร็งทั้งหมด ตามด้วยมะเร็งลำไส้ใหญ่ (9.3%) มะเร็งตับ (7.8%) มะเร็งเต้านม (6.9%) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (6.8%) (3) ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 1 กายวิภาคศาสตร์ (anatomy) ของปอดและระบบทางเดินหายใจ



ภาพประกอบ 2 แสดงภาพรวมของจำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่และผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง 10 อันดับแรกจากผลสำรวจ 185 ประเทศทั่วโลก ประจำปี 2022

ที่มา: (3)

2.1.1 ชนิดของมะเร็งปอด

องค์การอนามัยโลกได้แบ่งมะเร็งปอดตามผลทางพยาธิวิทยาเป็น 2 ชนิดใหญ่ คือ

2.1.1.1 มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (small cell lung cancer) พบประมาณ 15-20 % จะเจริญเติบโตเร็วและแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว เมื่อตรวจพบโรคมักลุกลามเข้าต่อมน้ำเหลือง และแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจึงทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้อย่างรวดเร็ว ประกอบไปด้วยเซลล์ขนาดเล็ก ซึ่งเกิดจากเซลล์ neuroendocrine cell ที่สามารถสร้างฮอร์โมนและสารเคมีต่างๆ ได้หลายชนิด

2.1.1.2 มะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็ก (non-small cell lung cancer; NSCLC) เป็นมะเร็งปอดชนิดที่เกิดจากเซลล์เยื่อผิวของหลอดลมในปอดส่วนกลางจนถึงปลายของถุงลม พบได้ 80-85 % ของมะเร็งปอดทั้งหมด ซึ่งมะเร็งปอดชนิด NSCLC แบ่งย่อยได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

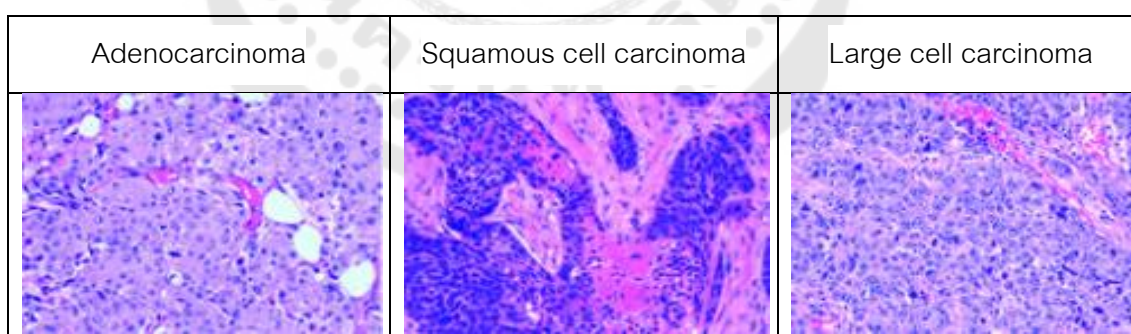
1) adenocarcinoma (พบได้ 50% ของ NSCLC ทั้งหมด) (37) เป็นมะเร็งปอดที่เซลล์มีการจัดเรียงตัวเป็น gland หรือมีการสร้างสาร mucin ตำแหน่งที่เกิดก่อนมะเร็งพบบ่อยที่สุด บริเวณชายปอด ภาพถ่ายรังสีทรวงอกมักพบก้อนบริเวณตรงชายปอดเป็นส่วนใหญ่

adenocarcinoma เป็นชนิดของเซลล์ที่พบได้บ่อยที่สุดของ NSCLC โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย มะเร็งปอด เพศหญิงที่ไม่สูบบุหรี่ (7)

2) squamous cell carcinoma (พบได้ 20%-30% ของ NSCLC ทั้งหมด) เป็น มะเร็งเยื่อผิวของหลอดลมที่มี intercellular bridge และมีการสร้าง keratin มะเร็งชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่เป็นอย่างมาก ตำแหน่งที่เกิดก้อนมะเร็งพบบ่อยที่สุดบริเวณหลอดลม ส่วนต้น ภาพถ่ายรังสีทรวงอก (CXR) มักพบก้อนบริเวณตรงกลางทรวงอกก้อนมะเร็งมีทั้งแบบที่ยื่นเป็นก้อนเข้าไปอุดตันท่อหลอดลม และแบบที่ลงลึกขยายเข้าไปในเนื้อเยื่อรอบข้างเนื้อมะเร็งมักมีสีเทาและอาจปนด้วยสีดำของ carbon pigment

3) large cell carcinoma (พบได้ 2%-5% ของ NSCLC ทั้งหมด) เป็นเซลล์มะเร็งที่มีขนาดใหญ่และไม่มีพัฒนารูปร่างไปเหมือนกับเซลล์ชนิดอื่น การเกิดมะเร็งสัมพันธ์กับการสูบบุหรี่ ตำแหน่งที่เกิดก้อนมะเร็งพบที่ส่วนกลางหรือบริเวณชายปอด และมักลุกลามไปยังเยื่อหุ้มปอด ผนังหน้าอกและรอบข้าง ตัวก้อนมะเร็งมีสีเทาปนชมพูและพบเนื้อเยื่อตายตรงส่วนกลางก้อนได้บ่อย

4) adenosquamous carcinoma เป็นเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่าง adenocarcinoma และ squamous cell carcinoma การย้อมพบการติดสีเข้าได้กับมะเร็งทั้งสองชนิด (38-40)



ภาพประกอบ 3 มะเร็งปอดชนิด NSCLC

ที่มา: (41)

2.1.2 ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับโรคมะเร็งปอด

Adenocarcinoma เป็นชนิดของเซลล์มะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดของ NSCLC โดยส่วนมากในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปอดที่ไม่สูบบุหรี่ สำหรับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของโรคมะเร็งปอด ปัจจุบันมีการศึกษาเป้าหมายทางชีวภาพ (biomarker) หลายหลายที่แน่ชัดสำหรับโรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC ซึ่งแบ่งออกได้เป็น predictive biomarker ที่ใช้ทำนายประสิทธิภาพในการรักษา และ prognostic biomarker ที่แสดงความก้าวร้าวของโรคมะเร็ง (tumor aggressiveness) ซึ่งใช้ในการทำนายระยะเวลาการรอดชีวิตของผู้ป่วย ในปัจจุบันการกลายพันธุ์ที่พบบ่อย คือ 1. การกลายพันธุ์ของ EGFR (EGFR mutation) ถูกพบได้พบอุบัติการณ์ในคนผิวขาวประมาณ 10- 20% แต่ในคนเอเชียพบได้มากขึ้นเป็น 30-50% ส่วนใหญ่พบในผู้หญิงที่ไม่สูบบุหรี่หรือเลิกบุหรี่มานานมากกว่า 10 ปีขึ้นไป 2. การกลายพันธุ์ของ KRAS พบประมาณ 25-35% 3. การเรียงตัวที่ผิดปกติของ ALK (ALK rearrangement) พบประมาณ 4-7% 4. การกลายพันธุ์ของ BRAF (BRAF mutation) พบประมาณ 1-3% 5. การเรียงตัวที่ผิดปกติของ ROS-1 (ROS-1 fusion gene) พบประมาณ 1-2% 6. การกลายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งพบน้อยมาก เช่น NTRK-fusion gene, MET exon 14 skipping, RET-fusion gene, HER2 mutation เป็นต้น (42)

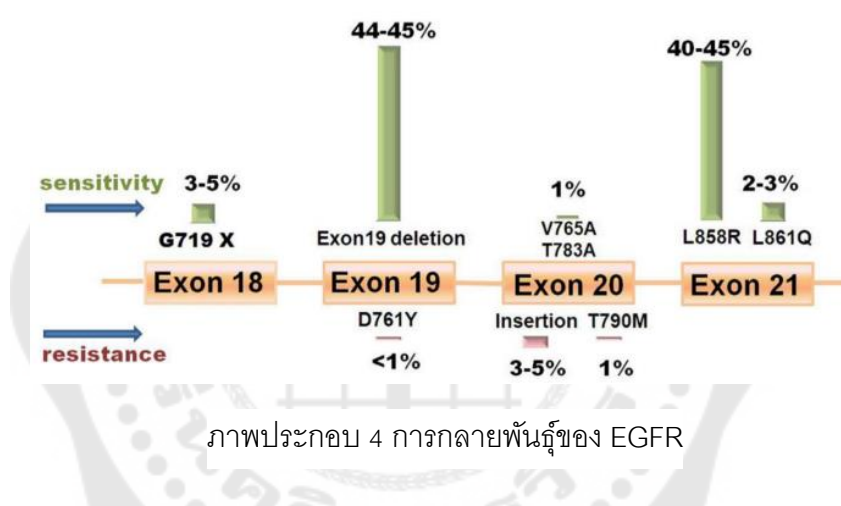
จากรายงานการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดในคนไทย ซึ่งอาจจะมีข้อมูลแตกต่างกันในแต่ละประเทศและผลจากการศึกษานี้จะนำไปสู่การพัฒนาและผลิตยาโดยคนไทยเพื่อคนไทย ซึ่งจากผลการศึกษาวิจัยทั้งหมดโดยการทำ Next generation sequencing ทั้งใน FFPE และใน Fresh frozen tumor tissue โดยทางทีมผู้วิจัยได้ศึกษาเฉพาะยีนกลายพันธุ์ที่ตรวจเจอได้บ่อยในผู้ป่วยมะเร็งปอด 159 ราย (178 samples) พบ EGFR mutation 54.7%, BRAF mutation 10.1%, KRAS mutation 28.3%, MET exon14 slice site 8.8%, AKT mutation 4.4%, ROS1 mutation 1.9%, PIK3CA mutation 0.63% และได้พบผู้ป่วยที่มียีนกลายพันธุ์มากกว่า 1 ยีน อีก 37 ราย (23%)(43)

2.1.3 Epidermal growth factor receptor (EGFR)

EGFR เป็น receptor ในตระกูล Receptor Tyrosine Protein Kinase (RTK) เมื่อมีการกระตุ้นการทำงานโดย growth factor ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ EGF และ TGF α ผ่าน EGFR ที่อยู่บนผิวเซลล์ จะทำให้มีการส่งสัญญาณลงมาภายในเซลล์มากกว่าปกติซึ่งมีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโต (cell growth), การแบ่งตัวและพัฒนาการของเซลล์ (differentiation), การเปลี่ยนรูป (transformation), การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis), การเคลื่อนที่ (migration) และการ

อยู่รอด (survival) มะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR จึงมีกระบวนการเหล่านี้เพิ่มขึ้นสูงมาก ทำให้เซลล์เติบโต แพร่กระจาย และดื้อต่อยาเคมีบำบัดและการฉายรังสี

EGFR เป็นการกลายพันธุ์ของยีนที่พบได้บ่อยในโรคมะเร็งปอด โดยพบว่าในมะเร็งปอดชนิด NSCLC มีจำนวน EGFR ที่เพิ่มมากกว่าเซลล์ปกติ (EGFR overexpression) หรือพบ EGFR ที่กลายพันธุ์ ชนิด EGFR mutation ที่พบได้บ่อยคือ การขาดหายไปของเบสที่ตำแหน่ง exon 19 (Exon19del) ซึ่งพบได้ถึงร้อยละ 45 ในผู้ป่วยที่มี EGFR mutation และการแทนที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 858 ของ exon 21 (L858R) ซึ่งพบได้ร้อยละ 40 -45 (44-46) ดังนั้น การศึกษากลไกการทำงานของ EGFR จึงมีความสำคัญเพื่อนำมาใช้ในการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาหรือกำหนดเป้าหมายในการรักษามะเร็งปอด NSCLC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

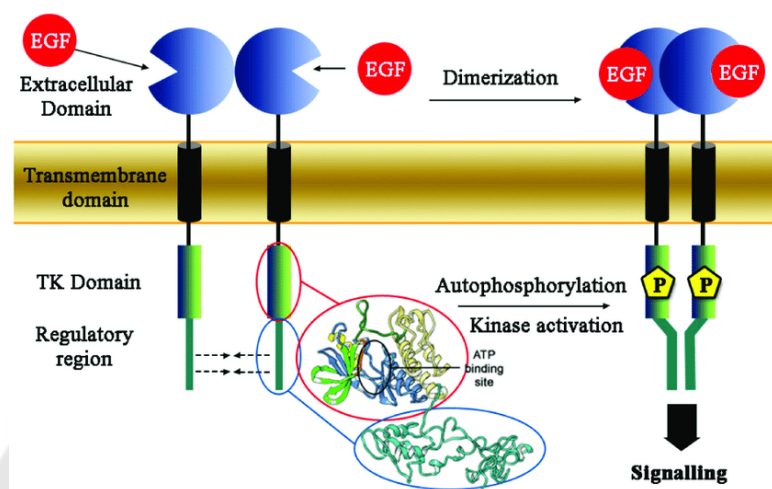


ที่มา: (46)

2.1.3.1 โครงสร้างของ EGFR

Epidermal growth factor receptor (EGFR) ประกอบด้วยสายโปรตีนโพลีเปปไทด์จำนวน 1186 กรดอะมิโนเรียงต่อกัน มีขนาด 170 KDa EGFR เป็น transmembrane receptor tyrosine kinase ที่แสดงออกในเยื่อบุผิวปกติ, mesenchymal และเนื้อเยื่อระบบประสาท โดย EGFR เป็น receptor ในกลุ่ม erbB ประกอบด้วยตัวรับ 4 ชนิด ได้แก่ erbB1 หรือ HER-1, erbB2 หรือ HER-2, erbB3 หรือ HER3 และ erbB4 หรือ HER4 โดยส่วนที่ยื่นนอกเซลล์ของตัวรับชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่น ซึ่งสามารถจับกับลิแกนด์ได้หลายชนิด เช่น epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, heparin-binding EGF, amphiregulin, betacellulin, และ neuregulin G2b เป็นต้น โครงสร้างของ EGFR ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ (1) ส่วนที่ยื่นนอกเซลล์ (extracellular ligand binding domain) ทำหน้าที่จับกับ

ลิแกนด์ (ligand) อย่างจำเพาะเจาะจง (2) α -helix transmembrane domain ทำหน้าที่รักษาเสถียรภาพของกระบวนการเข้าคู่กันและ (3) ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular domain with tyrosine kinase activity) ส่วนนี้เป็นบริเวณที่มีการเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต โดยการทำหน้าที่ของเอนไซม์ tyrosine kinase ในตัวรับ (47)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ EGFR และกลไก Dimerization

ที่มา: (48)

2.1.3.2 การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ชนิดทุติยภูมิแบบ T790M

การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ชนิดทุติยภูมิแบบ T790M เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง exon 20 ของยีน EGFR โดยมีการเปลี่ยนของกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) เป็นเมทไธโอนีน (methionine) ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 790 หรือที่เรียกว่าการกลายพันธุ์แบบ T790M (T790M mutation) โดยตำแหน่งนี้เป็นบริเวณที่จับกับอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP-binding pocket) เมื่อมีการกลายพันธุ์จะทำให้ตัวรับ EGFR สามารถจับกับอะดีโนซีนไตรฟอสเฟตได้ดีขึ้น และลดประสิทธิภาพของยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่งและรุ่นที่สอง (13, 49)

2.1.3.3 Cell lines ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนชนิดต่างๆ

ในการพัฒนายารักษามะเร็งปอดจำเป็นต้องมีการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง ซึ่ง Cell line ที่ใช้ในการทดสอบโรคมะเร็งปอดที่เกิดการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ มีดังนี้

ตาราง 1 แสดง cell line ชนิดต่างๆ

ชนิดเซลล์	ชนิดของมะเร็งปอด	ตำแหน่งการกลายพันธุ์ EGFR	การกลายพันธุ์ ตำแหน่งอื่น
A549	Adenocarcinoma	Wild-type EGFR, KRAS mutations (codon 12)	-
H226	Squamous carcinoma	Wild- type	-
PC-9	Adenocarcinoma	Del 19	-
PC9/AB2	Adenocarcinoma	Del 19	ETM
PC9/ZD	Adenocarcinoma	Del 19	T790M
H1975	Adenocarcinoma	L858R	T790M
HCC827	Adenocarcinoma	Del 19	-
H3255	Adenocarcinoma	L858R	-

ที่มา: (50)

2.1.4 ระยะของโรคมะเร็งปอด

ระยะของโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะตาม American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th edition ซึ่งประเมินจากขนาดและขอบเขตของก้อน การกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง และการแพร่กระจายไปอวัยวะอื่นโดยในแต่ละระยะจะมีการพยากรณ์โรคที่แตกต่างกัน ซึ่งในมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายจะมีพยากรณ์โรคที่แย่ที่สุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปีอยู่ที่น้อยกว่าร้อยละ 10 การแบ่งระยะมะเร็งปอดชนิด NSCLC มี 4 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ก้อนมะเร็งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 เซนติเมตรและยังไม่แพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลือง

ระยะที่ 2 ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่กว่า 5 เซนติเมตร มีการลุกลามไปยังเยื่อหุ้มปอดชั้นนอกและผนังหน้าอก หรือมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ๆกับก้อนมะเร็ง

ระยะที่ 3 ก้อนมะเร็งมีขนาดใหญ่ขึ้น มีการลุกลามไปยังอวัยวะที่อยู่ข้างเคียงและแพร่กระจายไปที่ปอดกลีบอื่นๆในข้างเดียวกันหรือมีการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองที่กลางช่องอก หรือไกลออกไปจากช่องอกข้างนั้นๆ

ระยะที่ 4 มะเร็งที่กระจายออกนอกช่องอกไปยังที่ไกลจุดเริ่มต้นและมะเร็งที่กระจายไปที่เยื่อหุ้มปอดหรือกระจายไปที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ต่อม้ำเหลืองที่คอ ตับ กระดูก ต่อมหมวกไตและสมอง เป็นต้น (51)

2.2 วิธีการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปอด

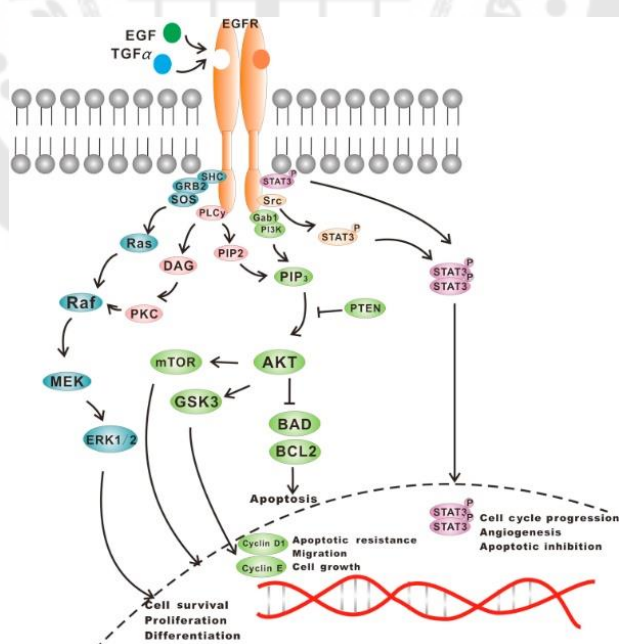
วิธีการส่งสัญญาณเข้าสู่เซลล์ (cellular signal transduction) คือ กระบวนการที่เซลล์ได้รับปัจจัยการกระตุ้นจากภายนอกแล้วส่งทอดสัญญาณนั้นผ่านการทำงานของโมเลกุลหลายชนิดภายในเซลล์นำไปสู่การตอบสนองของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) การเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) การเคลื่อนที่ (migration) การอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) การตายของเซลล์ (cell death) และเมแทบอลิซึม เป็นต้น กระบวนการถ่ายทอดสัญญาณของเซลล์ในภาวะปกติจะดำเนินไปอย่างเหมาะสมภายใต้การทำงานของโมเลกุลส่งสัญญาณและโมเลกุลควบคุมจำนวนมาก ดังนั้นหากเกิดความผิดปกติในการทำงาน เช่น โมเลกุลเหล่านี้ทำงานมากเกินไปหรือสูญเสียโครงสร้างและหน้าที่ เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ตามมาจะนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆได้รวมถึงโรคมะเร็ง

วิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่สำคัญกระบวนการหนึ่ง คือ กระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) และสลายหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุลของโปรตีนออก (dephosphorylation) ซึ่งกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตเป็นกลไกควบคุมการทำงานของเซลล์ที่สำคัญโดยเอนไซม์และตัวรับต่างๆมักถูกกระตุ้นหรือหยุดการทำงานของโปรตีน (activated/deactivated) ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตและเอาหมู่ฟอสเฟตออก คือ ไคเนส (kinases) และ เอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatase) ตามลำดับ ซึ่งประมาณ 1 ใน 3 ของโปรตีนทั้งหมดในร่างกายมนุษย์มนุษย์ถูกควบคุมการทำงานในกระบวนการนี้ โดยเอนไซม์ไคเนสจะนำเอาหมู่ γ -phosphate จาก adenosine triphosphate (ATP) เติมให้โปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ได้แก่ serine/threonine และ tyrosine โปรตีนไคเนสจึงแบ่งออกเป็นกลุ่มตามตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตว่า serine/threonine kinase และ tyrosine kinase ซึ่ง Tyrosine kinases โดยเฉพาะพวก receptor tyrosine kinases (RTKs) มีบทบาทต่อวิธีส่งสัญญาณภายในเซลล์ในแง่ของการเป็นตัวรับสัญญาณการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นต่างๆ และถ่ายทอดสัญญาณต่อไปยังโปรตีนอื่นๆ ส่วน STKs มีความสำคัญในการควบคุมการถ่ายทอดสัญญาณภายในเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณจาก RTKs ส่งสัญญาณต่อไปยังนิวเคลียสเนื่องจาก RTKs และ STKs ที่ทำงานผิดปกติสามารถส่งผลให้เกิดโรคมะเร็งปอดได้ ดังนั้นความ

ผิดปกติของโปรตีนไคเนสเหล่านี้จึงเป็นเป้าหมายที่สำคัญในการออกฤทธิ์ของยารักษามะเร็งปอด และซึ่งวิธีในการส่งผ่านสัญญาณของเซลล์ที่สำคัญในมะเร็งปอด มีดังนี้ (52)

2.2.1 วิธีการส่งสัญญาณของ EGFR (Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways)

การส่งสัญญาณของ EGFR เริ่มจากเมื่อมีลิแกนด์จับกับ EGFR ที่ extracellular ligand binding region ทำให้ receptor เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดการเข้าคู่กันของตัวรับ EGFR (homodimerization) ไปกระตุ้น tyrosine kinase จากนั้นเกิดกระบวนการ phosphorylation แบบอัตโนมัติที่ตำแหน่ง tyrosine kinase domain ที่อยู่ภายในเซลล์โดยในกระบวนการนี้จะมีโปรตีนตัวเชื่อมต่อ (adaptor proteins) ได้แก่ SHC และ Grb2 เชื่อมสัญญาณไปสู่เป้าหมายที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ EGFR วิธีที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและทราบถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ค่อนข้างแน่ชัดแล้วได้แก่ Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT และ STAT3 โดยทั้งสามวิธีนี้มีผลกระทบต่อการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิสทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ และยับยั้งกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (52)

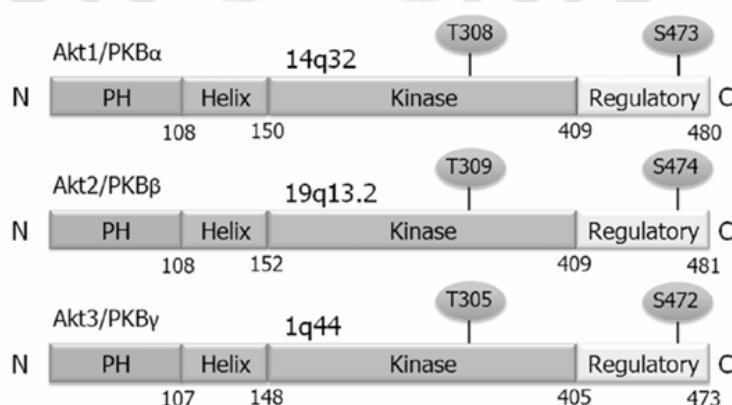


ภาพประกอบ 6 กลไกการส่งสัญญาณและผลการกระตุ้น EGFR

ที่มา: (53)

2.2.2 วิธีการส่งสัญญาณของ Akt

AKT หรือโปรตีนไคเนส B เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในกลุ่ม STKs โดยเป็นตัวกลางสำคัญในวิถีส่งสัญญาณของเซลล์ที่ควบคุมการเจริญเติบโต การรอดชีวิต การแบ่งเซลล์ กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคส การสร้างโปรตีนและความเสถียรของจีโนม นอกเหนือจากบทบาทหน้าที่ในกระบวนการทำงานปกติของร่างกายแล้ว AKT ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดและการพัฒนาของมะเร็งด้วยในมนุษย์ AKT มี 3 ชนิดย่อยได้แก่ AKT1, AKT2 และ AKT3 ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันถูกสร้างมาจากยีนที่อยู่บนโครโมโซมต่างกันแต่มีตำแหน่งที่สามารถถูกเติมหมู่ฟอสเฟตของ Akt ทั้ง 3 ชนิดใกล้เคียงกัน โดย AKT1 มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ AKT2 เกี่ยวข้องกับพลังงานและการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ส่วน AKT3 เป็นชนิดที่ได้รับการศึกษาน้อย เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของสมองและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสมอง โครงสร้างของ AKT ประกอบด้วย (1) pleckstrin homology (PH) domain ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย N ทำหน้าที่ในการจับของ AKT กับฟอสโฟลิปิดที่เซลล์เมมเบรน (2) ส่วน catalytic domain ทำหน้าที่เป็น kinase domain มีตำแหน่งของกรดอะมิโน Thrine ซึ่งเมื่อถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะทำให้กลายเป็น AKT ที่อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน (3) ส่วน regulatory domain ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย C ในส่วนนี้มีตำแหน่งของกรดอะมิโน Serine ซึ่งจำเป็นสำหรับกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตและการกระตุ้นการทำงานของ AKT

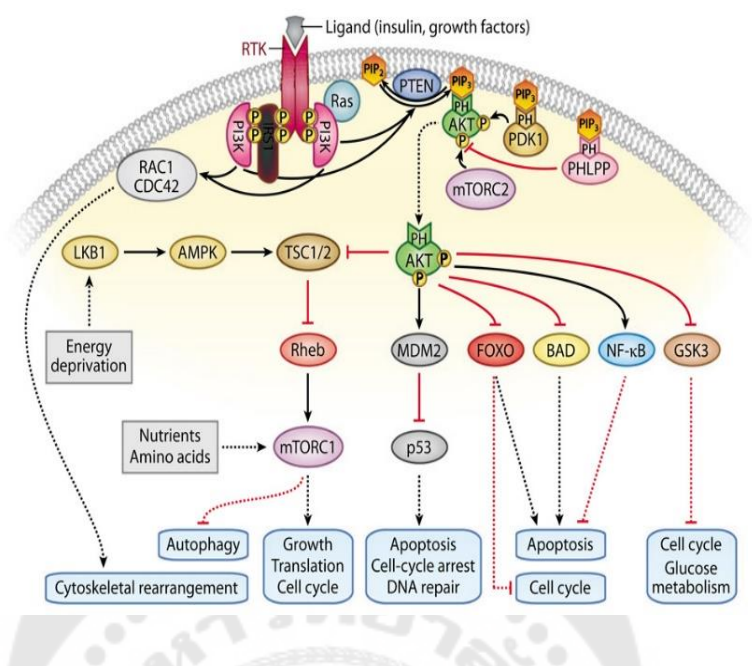


ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของโปรตีน Akt

ที่มา: (54)

กลไกการกระตุ้นและการควบคุมการทำงานของวิถี Akt เริ่มจากตัวกระตุ้นที่จำเพาะ (specific ligand) ซึ่งได้แก่ growth factor, สารไซโตไคน์ และฮอร์โมนจับกับ receptor tyrosine kinase บนผิวเซลล์แล้วทำให้เกิดการจับคู่และเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีน ของ receptor ส่งผลให้เกิด การกระตุ้น kinase domain ของ RTK ซึ่งจะทำการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาที่พบว่า PI3K สามารถ ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้โดยไม่ผ่านทางกระตุ้นตัวรับที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วย เช่น ในเซลล์ที่มีโปรตีน Ras ทำงานอยู่ตลอดเวลา เป็นต้น โปรตีน PI3K เป็นโมเลกุลที่จัดอยู่ในกลุ่มลิปิดไคเนส จำแนก ตามโครงสร้างได้เป็น 4 ชนิดได้แก่ PI3K class IA, IB, II และ III แต่ชนิดที่พบว่ามีผลสำคัญใน การควบคุมการเจริญเติบโต เมแทบอลิซึม และการรอดชีวิตของเซลล์คือ class IA

จากนั้น PI3K จะถูกดึงมาที่พลาสมาเมมเบรนผ่านการจับระหว่าง SH2 domain บน adaptor subunit ของ PI3K กับ receptor บริเวณกรดอะมิโนไทโรซีนที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตนำไปสู่ การกระตุ้นการทำงานของ PI3K โดยไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ PIP2 กลายเป็น PIP3 ซึ่ง PIP3 ทำหน้าที่เป็นสารสื่อสัญญาณตัวที่สองในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดย PIP3 จะดึง Akt มายัง พลาสมาเมมเบรนผ่านทาง PH domain จากนั้น Akt จะถูกกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตสอง ตำแหน่งคือ ทรีโอซีน 308 (T308) ของ kinase domain และ เซอรีน 473 (S473) ของบริเวณ regulatory domain การเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่งแรกเกิดขึ้นโดยใช้เอนไซม์ชื่อ phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) และเอนไซม์ mammalian target of rapamycin kinase ที่ อยู่ในรูปของ mTORC2 complex จะมาเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Akt ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนไทโรซีน เมื่อ ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตแล้ว Akt จะอยู่ในสภาพที่พร้อมทำงาน โดยมันสามารถไปเติมหมู่ฟอสเฟต ให้กับโปรตีนเป้าหมายต่อไป ดังนั้นการพัฒนาที่มีความจำเพาะและมีเป้าหมายไปยังโมเลกุลหลักที่ทำงานในวิถี Akt จึงเป็นที่สนใจในการประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาโรคมะเร็ง(54)



ภาพประกอบ 8 กลไกการกระตุ้นวิถี PI3K/Akt ที่นำไปสู่การอยู่รอดของเซลล์และการควบคุมการกระตุ้นของวิถีนี้โดย PTEN, SHIP และ PHPLP

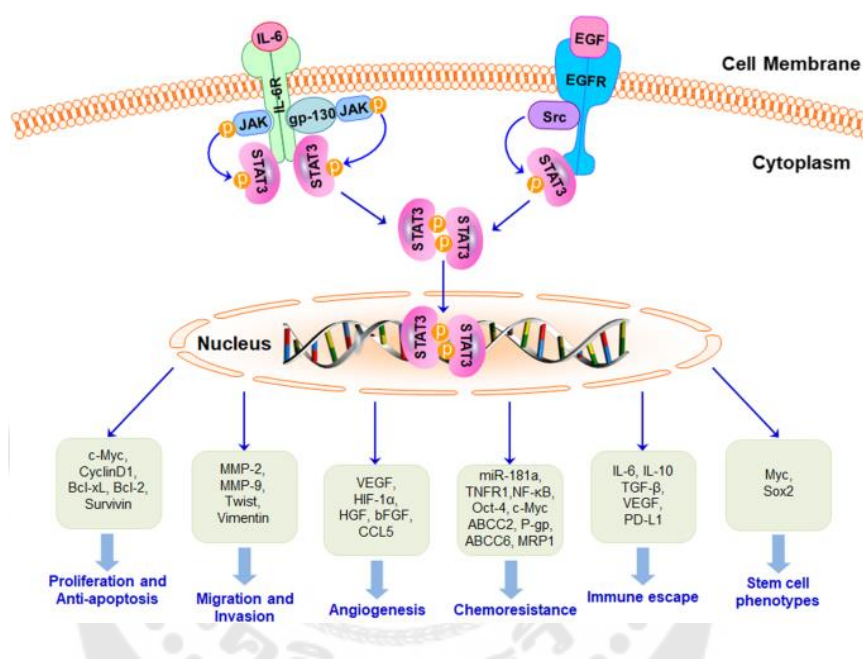
ที่มา: (55)

2.2.3 วิธีการส่งสัญญาณของ STAT3

STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) เป็นสมาชิกของตระกูล transcription factor เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวถ่ายทอดสัญญาณและตัวกระตุ้นการถอดรหัสซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ของเซลล์ ซึ่งหากการทำงานของ STAT3 ถูกกระตุ้นอย่างไม่เหมาะสมทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การรอดชีวิตของเซลล์ และการยับยั้งการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาพบว่า STAT3 สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์ (apoptosis resistance) เช่น Bcl-2, Bcl-xL, และ VEGF(10)

กลไกการกระตุ้นและการควบคุมการทำงานของวิถี STAT3 ในมะเร็งปอดเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยและสัญญาณชีวภาพที่สำคัญ ซึ่งการกระตุ้นวิถี STAT3 เริ่มจากการที่ตัวรับบนผิวเซลล์ เช่น receptor tyrosine kinases หรือ cytokine receptors (เช่น IL-6 receptor) จับกับ ligand ที่เหมาะสม เช่น growth factors หรือ cytokines ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวรับนั้นๆ หลังจากตัวรับจับกับ ligand แล้ว จะเกิดการฟอสโฟรีเลชันของ tyrosine residues บนตัวรับ ทำให้เกิดการเรียกหาและผูกกับโปรตีน JAK (Janus kinase) ซึ่งจะฟอสโฟรีเลต STAT3

ที่อยู่ใกล้เคียง หลังจากที่ถูกฟอสโฟริเลตที่ tyrosine residue แล้วจะจับคู่กัน (dimerization) และย้ายเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่เป็น transcription factor โดยจับกับ histone acetyl transferase (HAT) และ histone deacetylase (HDAC) และไปจับกับดีเอ็นเอ ตำแหน่ง interferon-stimulated response element (ISRE) มีเป้าหมายที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของเซลล์ ได้แก่ c-Myc, bcl-2, bcl-xl, p21, VEGF, HIF- α , Cyclin D1, Cyclin B และ MMP-2, -7, -9 (56, 57)



ภาพประกอบ 9 กลไกการกระตุ้นวิถีการส่งสัญญาณของ STAT3

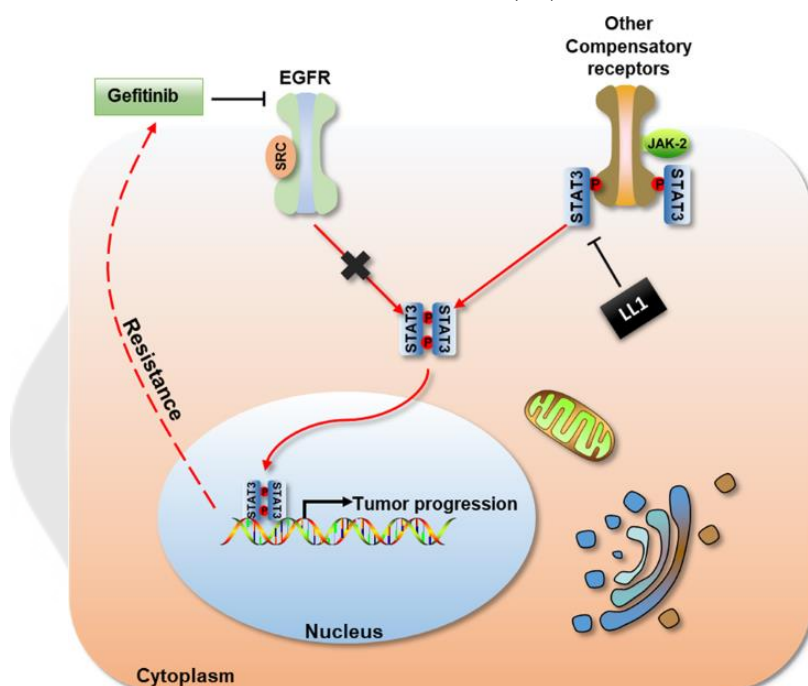
ที่มา: (57)

หลายงานวิจัยแสดงว่า STAT3 มีบทบาทในการดื้อยา โดยเฉพาะในเซลล์มะเร็ง สาเหตุและกลไกของการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับ STAT3 มีดังนี้

1. การกระตุ้นการส่งสัญญาณการอยู่รอดของเซลล์ โดย STAT3 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เช่น BCL-2 และ MCL-1 ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถหลีกเลี่ยงการตายของเซลล์ (apoptosis) ที่เป็นผลมาจากการรักษาด้วยยา(58)
2. การกระตุ้นเส้นทางการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งผ่านการควบคุมเส้นทางการส่งสัญญาณต่างๆ เช่น JAK/STAT pathway, และ PI3K/AKT pathway(56)

3. การยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน STAT3 มีบทบาทในการยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เซลล์มะเร็งสามารถหลีกเลี่ยงการถูกโจมตีจากระบบภูมิคุ้มกัน ส่งผลให้การรักษาด້วยยาที่พึ่งพาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีประสิทธิภาพลดลง(59)

4. การปรับตัวของเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งที่มีการกระตุ้น STAT3 สูงสามารถปรับตัวเพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบจากยาด้าน EGFR-TKIs ดังนั้นการกำหนดเป้าหมาย STAT3 อาจเป็นกลยุทธ์ใหม่ในการเอาชนะการดื้อยา EGFR-TKI ในมะเร็งปอด(60)



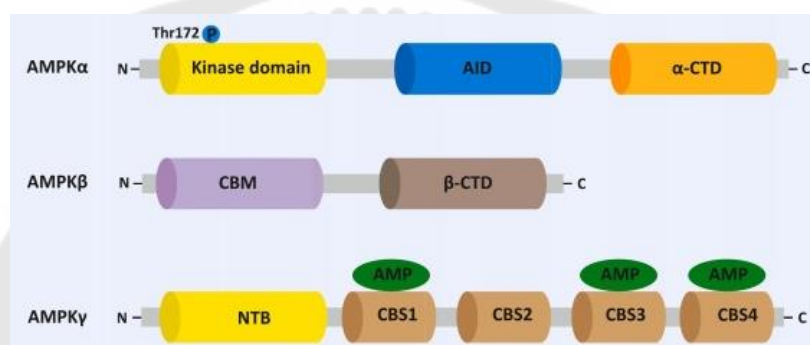
ภาพประกอบ 10 กลไกของวิถี STAT3 ต่อการดื้อยาด้าน EGFR-TKIs

ที่มา: (61)

2.2.4 วิธีาส่งสัญญาณของ AMPK

AMPK คือ Adenosine monophosphate-activated protein kinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในระบบควบคุมการเผาผลาญของร่างกายและเข้ามามีบทบาทเพื่อสร้างสมดุลระหว่างการใช้ ATP และการสร้าง ATP โดยการยับยั้งกระบวนการที่ใช้พลังงานมากและส่งเสริมกระบวนการที่ผลิตพลังงาน AMPK มี 3 ชนิดย่อย ได้แก่ AMPK α , AMPK β และ γ AMPK โดยหน่วยย่อย α , β และ γ ทำหน้าที่หลักในการเร่งปฏิกิริยา (catalysis) การควบคุม (regulation)

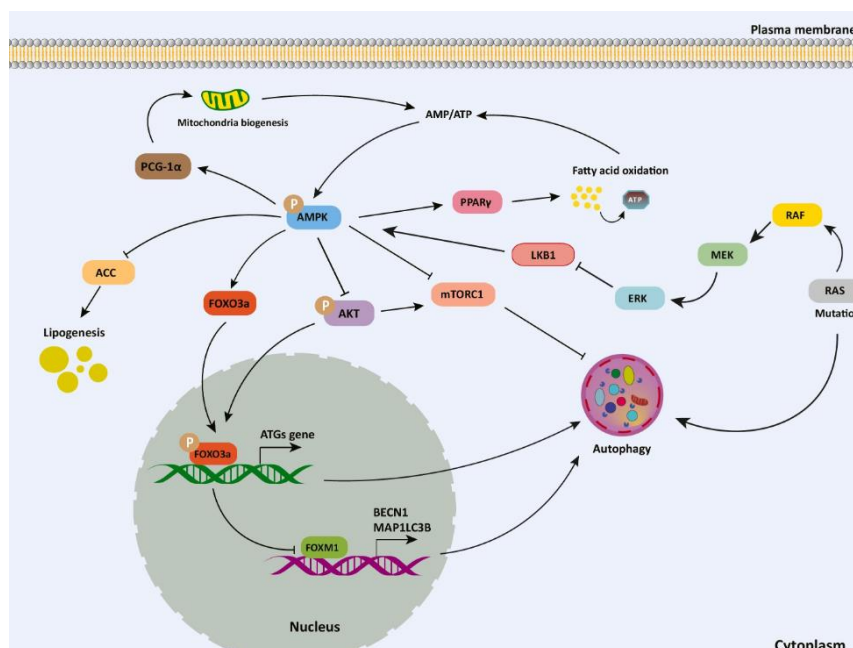
และทำหน้าที่ในการจับของ AMPK (binding) ตามลำดับ หน่วยย่อย α ประกอบด้วยไคเนสโดเมน autoinhibitor structural domain (AID) คือบริเวณของโปรตีนที่มีบทบาทในการควบคุมการทำงานของ AMPK เอง โดยการยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงาน และ carboxy-terminal structural domain (α -CTD) มีหน้าที่ในการควบคุมและรักษาเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีน โดยรูปแบบที่ออกฤทธิ์ของ AMPK α ส่วนใหญ่ถูกกระตุ้นโดยฟอสโฟริเลชันที่ตำแหน่ง Thr172 หน่วยย่อย β ประกอบด้วย β -CTD และ CBM ที่เชื่อมโยงระหว่างหน่วยย่อย α และ γ ส่วนหน่วยย่อย γ มีโดเมนโครงสร้าง N-terminal (NTD) และ cystathione β synthase (CBS) โดเมน 4 ซ้ำ ซึ่งเป็นโดเมน CBS ที่ผูก AMP ซึ่งมีบทบาทในการรับรู้และตอบสนองต่อระดับพลังงานของเซลล์



ภาพประกอบ 11 โครงสร้างของหน่วยย่อย AMPK

ที่มา: (62)

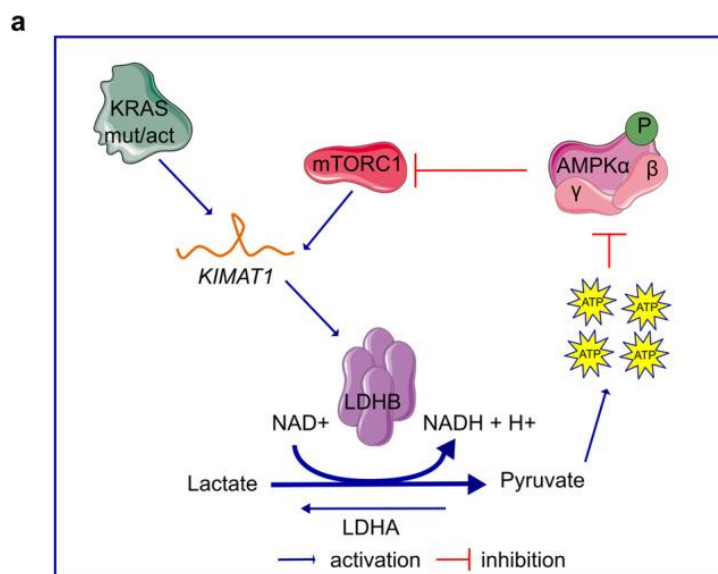
ปัจจุบัน AMPK ถูกนำมาเป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการรักษามะเร็งเนื่องจากมีบทบาทในการควบคุม Macroautophagy โดย AMPK ส่งเสริมขบวนการเก็บกวาดของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีความเสียหายใน DNA จะเข้าสู่ขบวนการย่อยสลายตัวเอง เพื่อ recycle องค์ประกอบต่างๆ กลับคืนสู่ระบบ (63) เนื่องจาก AMPK เป็นตัวควบคุมหลักในการปรับสมดุลพลังงานและการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในสภาวะที่ขาดแคลนพลังงานและสารอาหาร โดยการกระตุ้นกระบวนการ autophagy โดยเซลล์มะเร็งสามารถย่อยสลายส่วนประกอบที่ไม่จำเป็นและนำสารอาหารที่ได้กลับมาใช้ใหม่ เพื่อช่วยการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์ โดยเซลล์มะเร็งจะมีรูปแบบเมตาบอลิซึมที่อาศัยไกลโคไลซิส เพื่อผลิตพลังงานและสารชีวโมเลกุลที่จำเป็น เนื่องจาก AMPK สามารถควบคุมการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์และการสลายกลูโคสผ่านไกลโคไลซิส ดังนั้น AMPK จึงกลายเป็นเป้าหมายที่น่าสนใจสำหรับการรักษามะเร็ง (62)



ภาพประกอบ 12 AMPK เป็นศูนย์กลางการควบคุมการเผาผลาญพลังงานของเซลล์มะเร็งและกระบวนการ autophagy

ที่มา: (62)

อย่างไรก็ตาม Montagna และคณะได้ศึกษาพบว่า AMPK สามารถทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งหรือกระตุ้นมะเร็งได้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมของเซลล์ จากการศึกษาในหลอดทดลอง และในร่างกายสามารถสนับสนุนบทบาททั่วไปของ AMPK α 1 และ AMPK α 2 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ AMPK ซึ่งสามารถยับยั้งมะเร็งใน NSCLC ซึ่งการสูญเสีย AMPK α เพียงอย่างเดียวสามารถเกิดพัฒนาการของมะเร็งปอดเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการกลายพันธุ์ของยีน KRAS ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลให้ AMPK ลดลงและนำไปสู่การส่งเสริมการลุกลามของมะเร็งปอด โดยเมื่อ KRAS ถูกกระตุ้นส่งผลให้ KIMAT1 เกิดการจับและ stabilizes LDHB โดยการส่งเสริมการแลกเปลี่ยนแลคเตตไปเป็นไพรูเวตส่งผลต่อให้ระดับพลังงาน ATP เพิ่มขึ้นและส่งผลให้เกิดฟอสโฟริเลชันของ AMPK ลดลง ในทางกลับกันการลดลงของ AMPK α ส่งผลให้ยับยั้ง mTOR ได้ลดลงซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้น KIMAT1 อย่างต่อเนื่องทำให้เกิดมะเร็งเพิ่มขึ้น (64) ดังแสดงในภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 13 กลไกการยับยั้ง AMPK ในยีน KRAS mutation

ที่มา:(64)

2.2.5 การรักษาโรคมะเร็งปอดชนิด NSCLC ด้วยยามุ่งเป้า

ยามุ่งเป้าเป็นยาในรูปแบบรับประทาน รักษาโดยมุ่งเป้าทำลายเซลล์มะเร็ง โดยออกฤทธิ์เฉพาะที่ตัวมะเร็งเป็นหลักมีผลต่อเซลล์ปกติเพียงเล็กน้อย ส่วนใหญ่ต้องมีการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนก่อนจึงสามารถให้ยากลุ่มนี้ได้ กลไกการรักษาของยาจะรบกวนหรือยับยั้งการทำงานของ EGFR ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งปัจจุบันมี 2 กลุ่มได้แก่

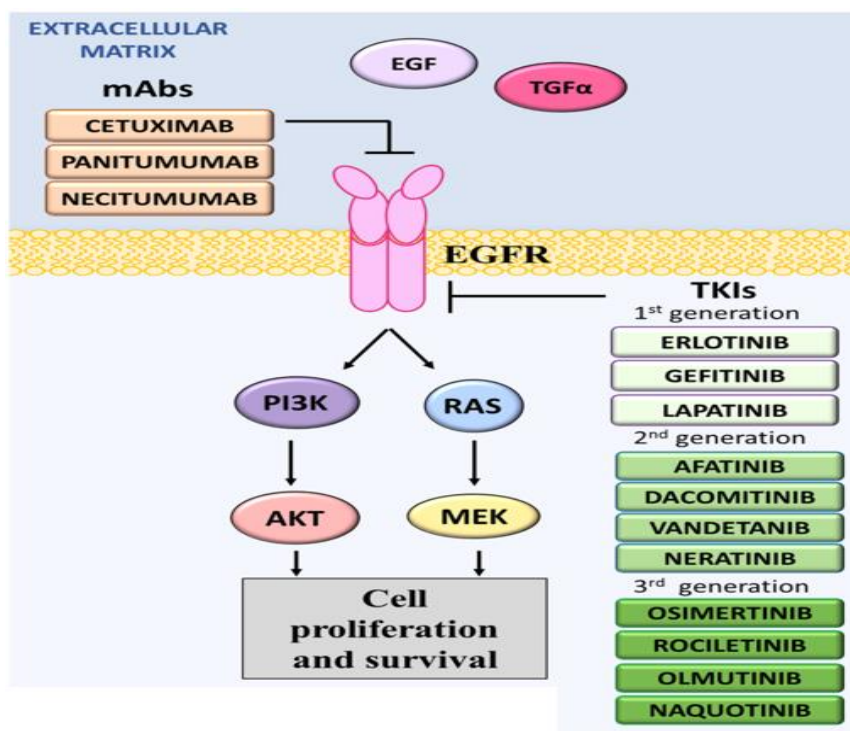
2.2.5.1 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibodies) ยาในกลุ่มโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกฤทธิ์บนผิวเซลล์ที่ extracellular binding domain ของ erbB/HER โดยตรง การให้ยาต้องให้ผ่านทางหลอดเลือดดำตัวอย่างยา เช่น cetuximab, trastuzumab, panitumumab และ matuzumumab ซึ่งยาเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับ EGFR ซึ่งจะไปจับกับ ligand binding site ของ EGFR ทำให้ EGFR ไม่สามารถจับกับ ligand ได้ ทำให้ EGFR ไม่สามารถเกิด dimerization และขัดขวางการทำงานของ EGFR ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลง

2.2.5.2 EGFR tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKIs) เป็นยาชนิดรับประทานที่จะแย่งกับ adenosine triphosphate (ATP) ในการจับกับ tyrosine kinase domain ของ EGFR ทำ

ให้ kinase ทำงานไม่ได้ จึงไม่เกิดการ phosphorylation ของ EGFR ส่งผลให้ไม่เกิดการส่งสัญญาณต่อไปได้

ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดที่มีการกลายพันธุ์ปฐมภูมิของยีน EGFR จะมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาฆ่ามะเร็งกลุ่มยาต้าน EGFR-TKI โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างการให้ยา gefitinib หรือ erlotinib ซึ่งเป็นยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่ง (first-generation EGFR-TKI) กับการให้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาขนานแรกในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของยีน EGFR พบว่าการให้ยาต้านสามารถช่วยเพิ่ม ระยะเวลาปลอดการลุกลามโรค (progression-free survival, PFS) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย เพิ่มค่าระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคเฉลี่ย (median PFS) จากประมาณ 4 – 6 เดือนในกลุ่มที่ได้ยาเคมีบำบัดเป็น 9 – 13 เดือนในกลุ่มที่ได้ยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่ง

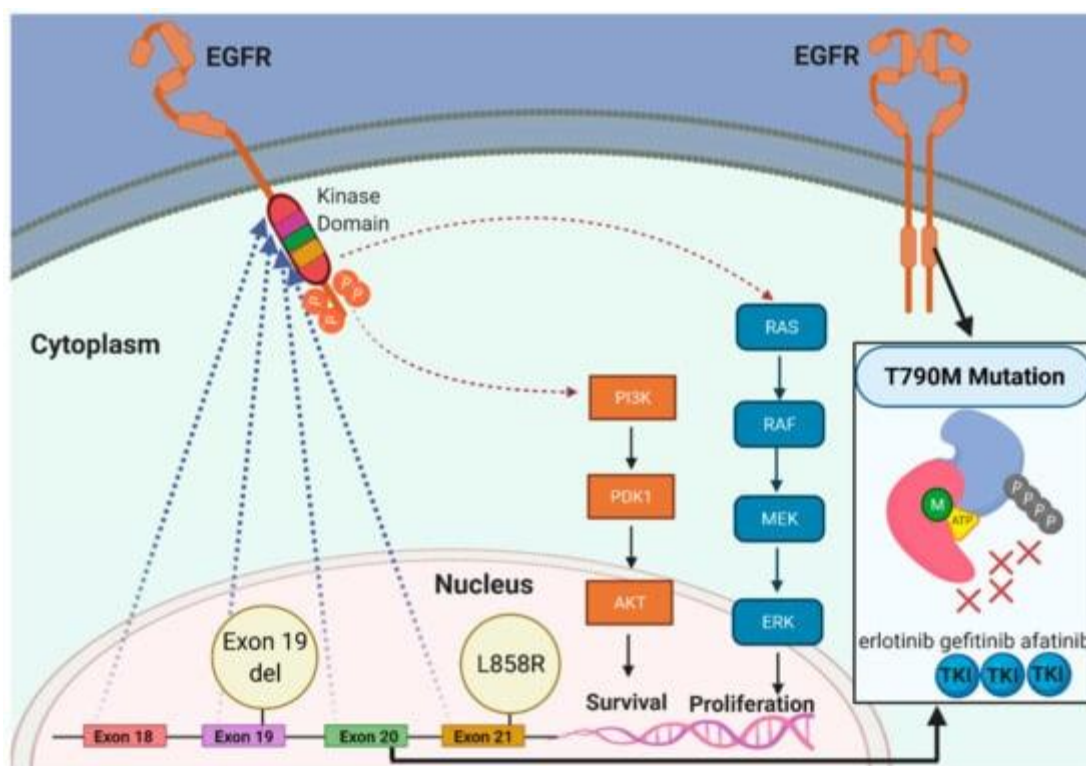
หลังจากนั้นได้มีการพัฒนายาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่สอง (second-generation EGFR-TKI) ได้แก่ afatinib และ dacomitinib ซึ่งเชื่อว่ามีประสิทธิภาพเหนือกว่ายาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่ง เนื่องจากยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่สองเป็นตัวยับยั้งแบบถาวร(irreversible inhibitor) ต่อตัวรับ EGFR และตัวรับไทโรซีนไคเนสอื่นๆ ที่อยู่ในตระกูล ErbB ได้แก่ HER2 และ HER4 ในขณะที่ยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่งเป็นตัวยับยั้งแบบชั่วคราว (reversible inhibitor) และจับจำเพาะกับตัวรับ EGFR เท่านั้น ซึ่งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการให้ยา afatinib กับการให้ยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาขนานแรกในผู้ป่วยมะเร็ง ปอดระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR พบว่า การให้ยา afatinib สามารถช่วยเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลาม โรคเฉลี่ยจาก 5 – 7 เดือนเป็น 11 เดือน และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการให้ยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่สองกับรุ่นที่หนึ่งเป็นการรักษาขนานแรก ในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR พบว่า การให้ยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่สองสามารถเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคเฉลี่ยจาก 10.9 เดือนเป็น 11.0 เดือนเมื่อให้ยา afatinib เทียบกับยา gefitinib และเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคเฉลี่ยจาก 9.2 เดือนเป็น 14.7 เดือนเมื่อให้ยา dacomitinib เทียบกับยา gefitinib (13, 44)



ภาพประกอบ 14 กลไกการต้านมะเร็งของยา Targeted therapy

ที่มา: (65)

อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่ง หรือรุ่นที่สองไปเป็นระยะเวลาหนึ่งจะพบว่าการดื้อยาเกิดขึ้นและทำให้มีการดำเนินโรคมากขึ้น กลไกของการดื้อยาด้าน EGFR-TKI อาจเป็นได้จากหลายสาเหตุโดยสาเหตุที่พบบ่อยที่สุด คือ การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ชนิดทุติยภูมิแบบ T790M ซึ่งสามารถพบได้ประมาณร้อยละ 50 ถึงร้อยละ 60 ของผู้ป่วยที่มีการดำเนินโรคมากขึ้นภายหลังจากที่ได้รับยาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่งหรือรุ่นที่สอง (66)



ภาพประกอบ 15 การกลายพันธุ์ของ EGFR ชนิดต่างๆ และการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อยา

EGFR-TKI

ที่มา: (67)

การกลายพันธุ์ของ EGFR ชนิดทุติยภูมิแบบ T790M มีความสำคัญ เนื่องจากในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาต้าน EGFR-TKI รุ่นที่สามคือ osimertinib ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อทั้งการกลายพันธุ์ของยีน EGFR ชนิดปฐมภูมิและชนิดทุติยภูมิแบบ T790M โดยพบว่า เมื่อศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการใช้ยา osimertinib กับการให้ยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งปอด ระยะแพร่กระจายที่มีการกลายพันธุ์ของ EGFR และมีการดำเนินโรคมากขึ้นภายหลังการรักษาด้วยยา EGFR-TKI รุ่นที่หนึ่งและตรวจพบการกลายพันธุ์ของ EGFR ชนิดทุติยภูมิแบบ T790M พบว่าการให้ยา osimertinib มีประสิทธิภาพเหนือกว่ายาเคมีบำบัด โดยสามารถเพิ่มระยะเวลาปลอดการลุกลามโรคเฉลี่ยจาก 4.4 เดือนเป็น 10.1 เดือน (13) (68)

ตาราง 2 สรุปยา EGFR-TKI ที่ได้รับอนุมัติให้ใช้ในการรักษามะเร็งปอด NSCLC

รุ่นของยา	ชื่อยา	ความจำเพาะ ในการรักษา	Reversible/Irreversible	การอนุมัติใช้
1st	Gefitinib	WT EGFR	Reversible	FDA, EMA
	Erlotinib	WT EGFR	Reversible	FDA, EMA
	Icotinib	WT EGFR	Reversible	CFDA
2nd	Afatinib	WT EGFR	Irreversible	FDA, EMA, CFDA
3rd	Osimertinib	Mutant EGFR	Irreversible	FDA, EMA
	Olmotinib	Mutant EGFR	Irreversible	KFDA (conditional)

ที่มา: (69)

2.3 กระชายขาว (Kra-Chai khao)

2.3.1 ข้อมูลทั่วไปของกระชายขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่อพ้อง: *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr.,

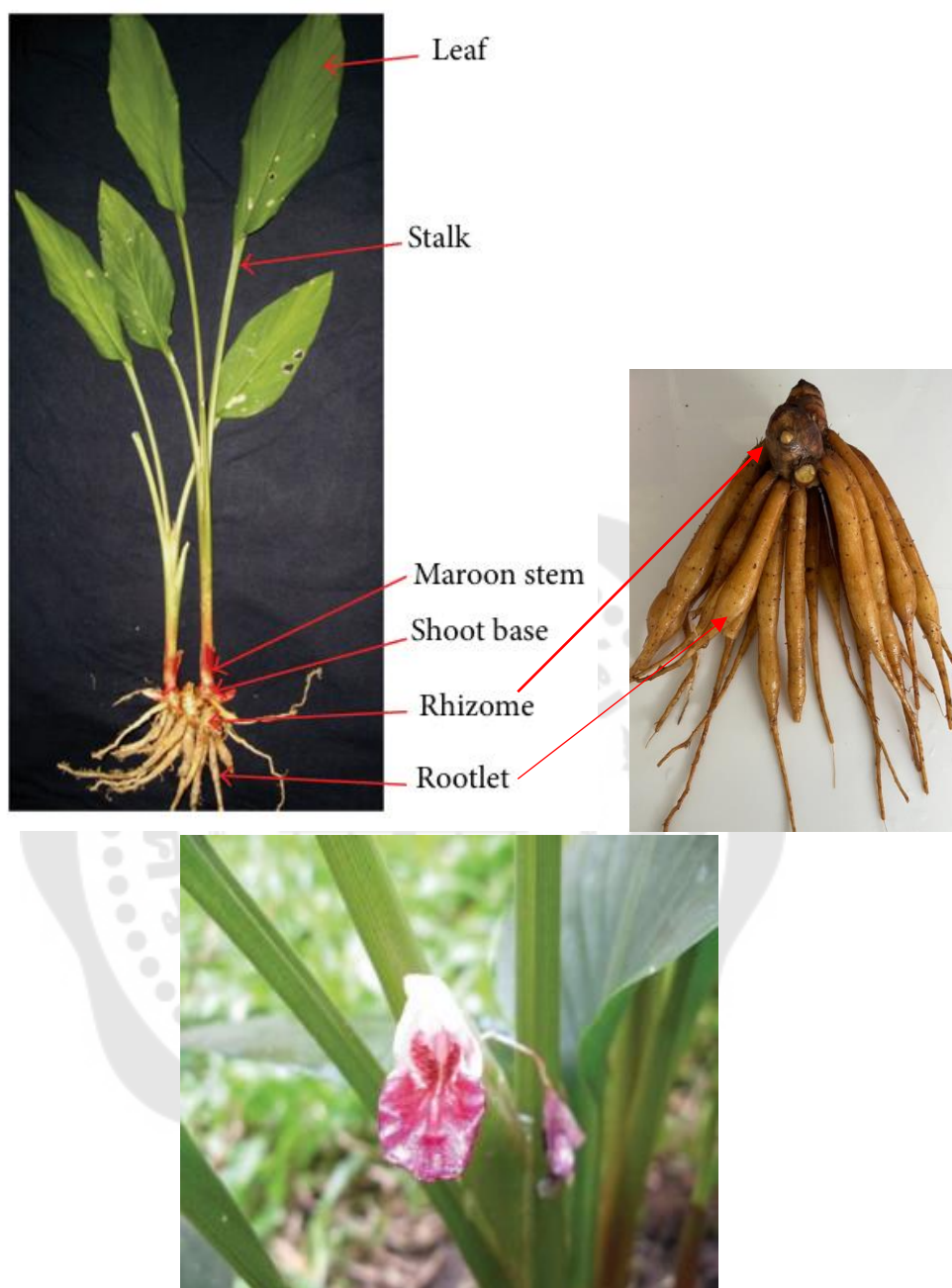
ชื่ออังกฤษ: Fingerroot, Chinese ginger, Chinese keys

ชื่อท้องถิ่น: กระแอน, ขิงทราย, จัป, ซีฟู, เป้าะซอไร๊ะ, เป้าะลี, ระแอน, ว่านพระ

อาทิตย์ เป็นต้น

2.3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กระชายเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กสูงประมาณ 15–40 ซม. ลำต้นเทียมที่อยู่เหนือดินมีสีแดงปนเขียวอ่อน ใบเป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับ ลักษณะใบเป็นรูปรียาว ปลายใบเรียวแหลม โคนใบมน ขอบใบเรียบ แผ่นใบมีสีเขียว ออกดอกเป็นช่อแทรกอยู่ระหว่างกาบใบ กลีบดอกสีชมพู ปลายแยกเป็น 3 กลีบ เกสรและก้านดอกมีสีขาว มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้า มีรากลักษณะอวบน้ำติดเป็นกระจุกรูปทรงกระบอกปลายเรียวแหลม ภายนอกมีผิวสีน้ำตาล ส่วนเนื้อด้านในมีสีเหลืองอ่อนและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวที่เป็นเอกลักษณ์ ซึ่งเหง้าและรากคือส่วนที่นำมาใช้ในการประกอบอาหารและนำมาใช้ประโยชน์ทางยา



ภาพประกอบ 16 ส่วนประกอบของกระชายขาว

ที่มา: (70)

2.3.3 กระชายในการแพทย์แผนไทย

กระชายเป็นยาสมุนไพรที่มีรสเผ็ดร้อน มีสรรพคุณขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนด แก่โรคที่เกิดในปาก เป็นต้น จัดเป็นเครื่องยาที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นส่วนประกอบของตำรับยามากมาย เฉพาะในตำราการแพทย์ไทยเดิม (แพทยศาสตร์ สงเคราะห์ ฉบับอนุรักษ์) เล่มที่ 1 พบว่ามีตำรับยาที่ประกอบด้วยกระชายถึง 55 ตำรับ โดยถูกบันทึกไว้ใน 11 คัมภีร์ จากทั้งหมด 13 คัมภีร์ (71) ดังแสดงในตาราง 3 ปัจจุบันกระชายยังเป็นส่วนประกอบในตำรับยา 5 ตำรับในบัญชียาจากสมุนไพรบัญชียาหลักแห่งชาติ ได้แก่ ยาหอมทิพโอสถ, ยาประสะกานพลู, ยาสมเพชรสสังฆาตสูตร 2, ยาเลื่อดงามและยากษัยเส้น ซึ่งจากการนำกระชายเป็นส่วนประกอบในตำรับยาหลายตำรับสามารถสะท้อนให้เห็นถึงศักยภาพและความปลอดภัยในการรักษาโรค

ตาราง 3 ตำรับที่มีกระชายเป็นส่วนประกอบ

ลำดับที่	คัมภีร์	จำนวนตำรับที่มีกระชายเป็นส่วนประกอบ
1	โรคนิทาน	1
2	ธาตุวิงศ์	1
3	ธาตุวิวรรณ์	1
4	ประถมจินดา	18
5	ฉันทศาสตร์	1
6	มหาโชตรัต	11
7	ธาตุบรรจบ	4
8	มูจณาปักขันทิกา	1
9	ชวดาร	1
10	กษัย	14
11	สรรพคุณยา	2
12	สมุฏฐานวินิจจัย	ไม่พบ
13	ตักกะศิลา	ไม่พบ

ที่มา: (71)

2.3.4 สารสำคัญที่พบในเหง้ากระชาย

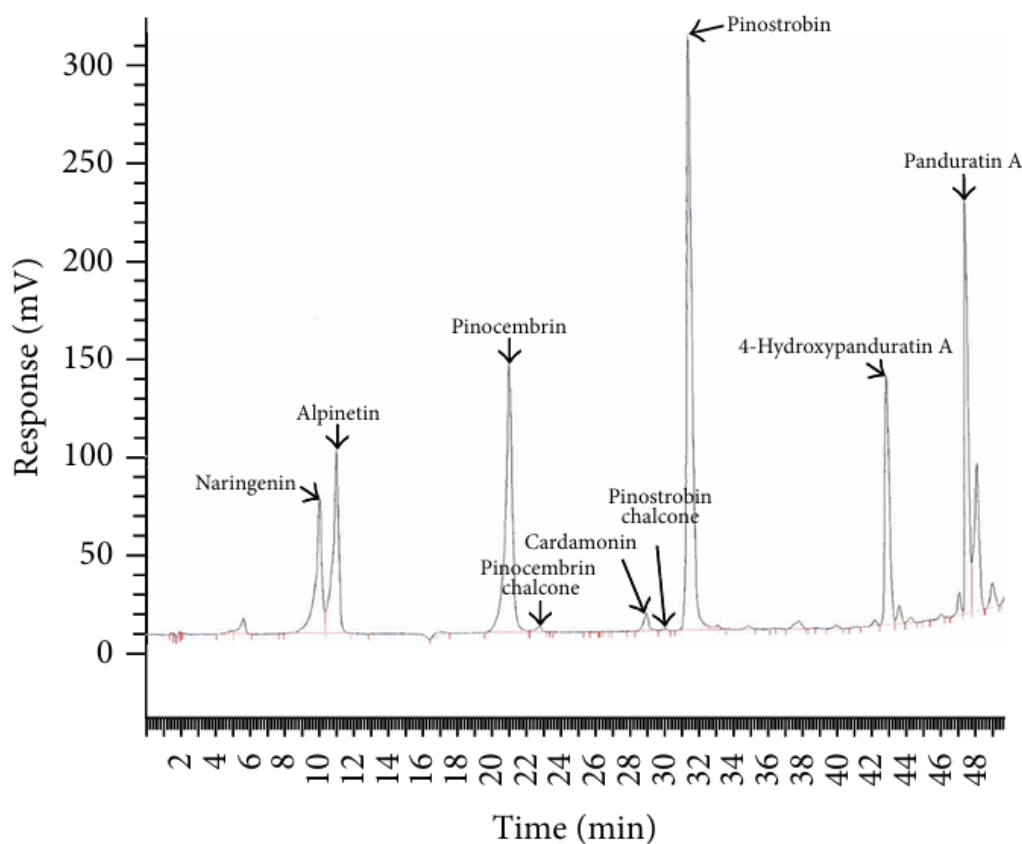
สารสำคัญที่พบในเหง้ากระชายมีหลายชนิด แต่กลุ่มที่พบมากที่สุดคือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ดังแสดงในตาราง 4 (23, 26, 72)

ตาราง 4 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในกระชาย

Type	Compound	Formula	MW (g/mol)	LogP	PubChem ID	Method
Chalcones	Cardamonin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.28	2.5424	641785	HPLC
	Boesenbergin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₄	404.5	6.0866	6313827	NMR
	Panduratin A	C ₂₆ H ₃₀ O ₄	406.5	6.0094	6483648	HPLC
	4-Hydroxypanduratin A	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	392.5	–	636530	HPLC
	Isopanduratin A	C ₂₆ H ₃₀ O ₄	406.5	–	10069916	HPLC
	Pinostrobin chalcone	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.2	–	5316793	HPLC
Flavanones	Alpinetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.28	2.7771	154279	HPLC
	Pinocembrin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.25	2.5014	68071	HPLC
	Pinostrobin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270.28	2.7771	73201	HPLC
	Naringenin 5-methyl ether	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286.28	-0.744	188424	HPLC

ที่มา: (23, 26, 72)

Tan และคณะ(70)ได้ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณของสารฟลาโวนอยด์และอนุพันธ์ชาลโคนในเหง้ากระชายที่ปลูกแบบดั้งเดิมและปลูกแบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสกัดสารสำคัญออกจากกระชายด้วยเมทานอลและวิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบสารฟลาโวนอยด์และอนุพันธ์ชาลโคนที่สกัดได้จากกระชายมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ดังแสดงในภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดกระชายขาว

ที่มา: (70)

2.3.5 สารพิโนสโตรบิน

เป็นสารฟลาวาโนน (flavanone) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ โดยกระชายเป็นแหล่งสร้างสารพิโนสโตรบินที่สำคัญสามารถพบได้ทุกส่วนของพืช ซึ่งส่วนของเหง้าจะพบสารชนิดนี้สูงที่สุด รองลงมาคือส่วนของรากสะสมอาหาร

2.3.5.1 คุณสมบัติทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของสารพิโนสโตรบิน (73)

ชื่อทางเคมี: 5-ไฮดรอกซี-7-เมทอกซี ฟลาวาโนน (5-hydroxy-7-methoxy flavanone)

สูตรโมเลกุล: $C_{16}H_{14}O_4$

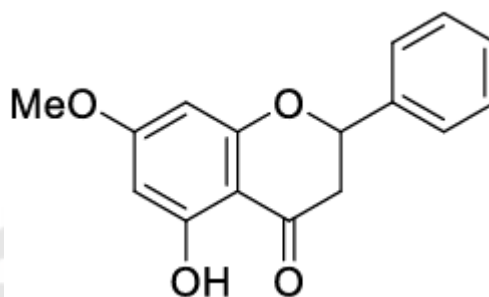
มวลโมเลกุล: 270.28 g/mol

ความสามารถในการดูดกลืนแสง (UV-Vis Absorption): มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ประมาณ 288 นาโนเมตรในสารละลายเอทานอลหรือเมทานอล

ลักษณะทางกายภาพของสารพิโนสโตรบิน: ขงแข็งสีขาวนวล (off-white powder)

จุดหลอมเหลว : ประมาณ 95-98 °C

ความสามารถในการละลาย: ละลายในตัวละลายอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ เอทานอล เมทานอล และสารละลายอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี แต่ละลายได้น้อยในน้ำ

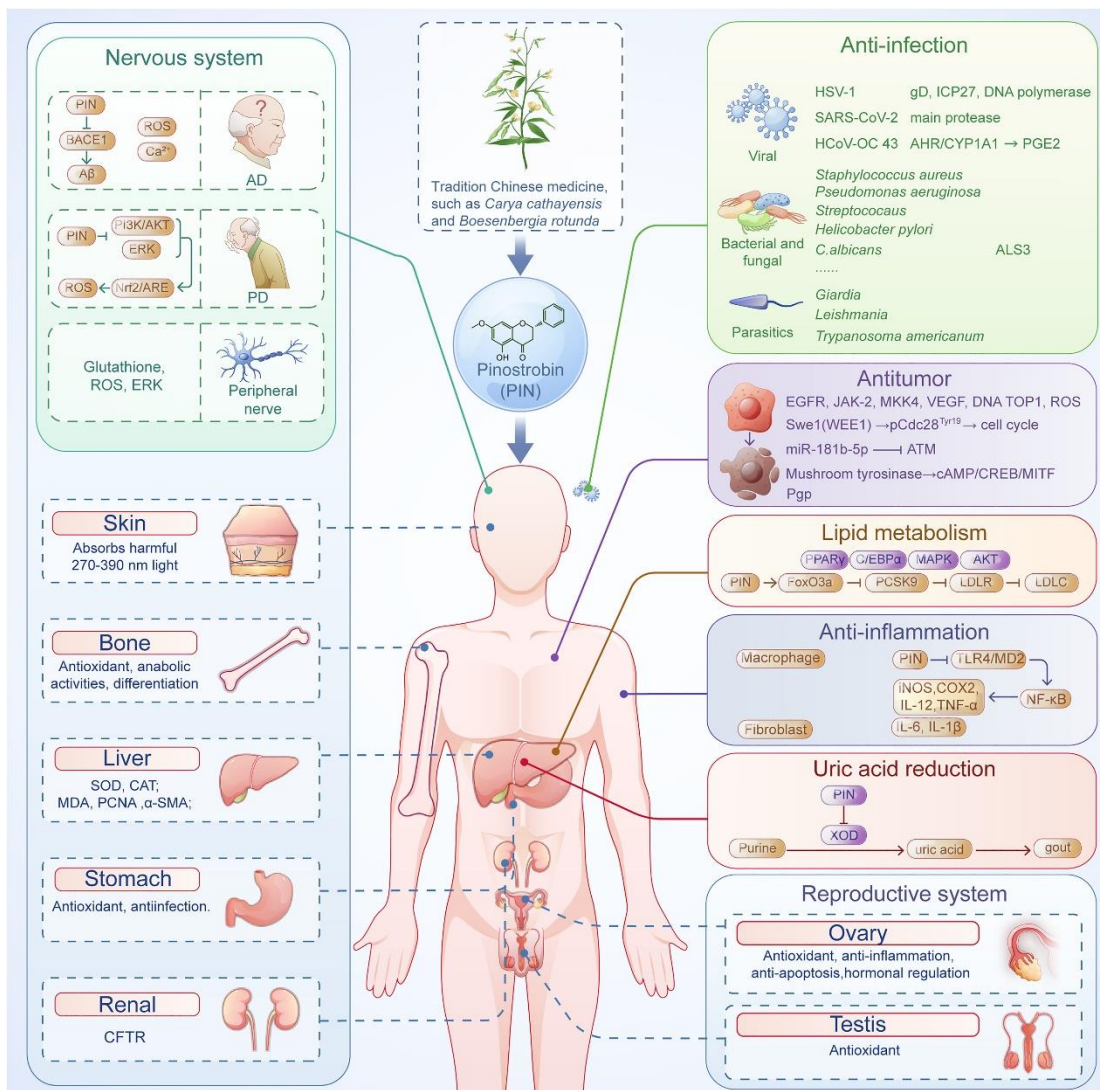


ภาพประกอบ 18 โครงสร้างทางเคมีของสารพิโนสโตรบิน

ที่มา: (74)

2.3.5.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพิโนสโตรบิน

สารพิโนสโตรบินมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ได้แก่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ (anti-microbia) ต้านไวรัส (antivirus) ต้านกิจกรรมของ aromatase (anti-aromatase activities) ต้านกิจกรรมที่ทำให้เกิดเชื้อ HIV (anti-HIV activity) ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ในลำไส้ลดการเกิด estrogen-induced cell proliferation ยับยั้งการเจริญเติบโตและกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณในการรักษาโรคความจำเสื่อม โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหาร และโรคมะเร็งชนิดต่างๆ เป็นต้น ดังแสดงในภาพประกอบ (26, 75)



ภาพประกอบ 19ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารพิโนสโตรบิน

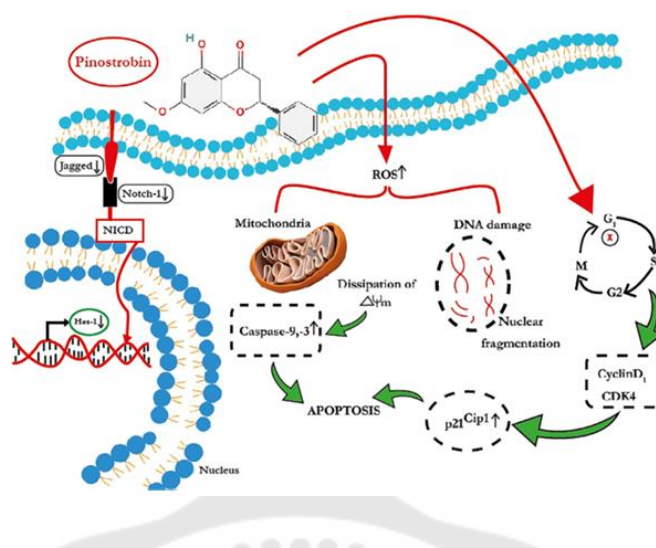
ที่มา: (73)

2.3.5.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารพินอสโตรบิน

ตาราง 5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารพินอสโตรบิน

โมเดล	IC ₅₀	อ้างอิง
MDA-MB-231 cells	IC ₅₀ = 20.42 µg/mL	(26)
HT-29 cells	IC ₅₀ = 22.51 µg/mL	(26)
A549 cells	IC ₅₀ = 78.7 µg/mL	(26)
A549 cells	IC ₅₀ = 25.30 ± 2.62 µg/mL	(19)
T47D cells	IC ₅₀ = 2.93 mM, (SI=0.4)	(76)

Tiwari และคณะ(28)ได้ศึกษาศักยภาพในการต้านมะเร็งของสารพินอสโตรบินและกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งปอด A549 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารพินอสโตรบินสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ A549 แบบอะพอพโทซิสและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น โดยสารพินอสโตรบินสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสผ่านการสร้างอนุมูลอิสระ นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของตัวควบคุมการตายของเซลล์ เช่น Bax, Bad และ Bcl2 และไซโตโครม ซี (Cytochrome c) ถูกปล่อยออกมาจากไมโทคอนเดรียและทำให้เกิด cleavage caspase-3 และ -9 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส นอกจากนี้สารพินอสโตรบินยังสามารถยับยั้งการตายของเซลล์โดยการหยุดวัฏจักรชีวิตของเซลล์ในระยะ G0/G1 โดยกระตุ้นให้ยีน p21 สร้างโปรตีน p21 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของ Cyclin D1 และ CDK4 นอกจากนี้ยังพบว่าพินอสโตรบินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ A549 โดยการยับยั้งวิถีสัญญาณ Notch-1/Jagged-1/ Hes-1 ดังแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิโนสโตรบินในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอดโดยการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสและยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ผ่านวิถีการส่งสัญญาณ Notch ในเซลล์ NSCLC

ที่มา: (28)

ถึงแม้ว่าสารพิโนสโตรบินจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีในหลายๆ ด้านแต่อย่างไรก็ตามสารพิโนสโตรบินก็ยังคงมีข้อจำกัดในการนำไปใช้งานทางเภสัชกรรม เนื่องจากสารพิโนสโตรบินมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำมาก ดังนั้น Kicuntod และคณะ(77)จึงได้ศึกษาการเพิ่มคุณสมบัติด้านการละลายน้ำเพื่อให้สารสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีขึ้น โดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารพิโนสโตรบินกับ cyclodextrin และอนุพันธ์ของ cyclodextrin ได้แก่ Beta-cyclodextrin (β CD), 2,6-dimethyl- β CD (2,6-DM β CD) และ hydroxypropyl- β CDs (2-HP β CD, 6-HP β CD และ 2,6-DHP β CD) โดยสารพิโนสโตรบินจะถูกเก็บหรือห่อหุ้มไว้ภายในโครงสร้างของ cyclodextrin หรืออนุพันธ์ของ cyclodextrin ผ่านกระบวนการ non-covalent interactions เช่น van der Waals forces, hydrogen bonding, และ hydrophobic interactions จากผลการทดสอบพบว่าพิโนสโตรบินสามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับ cyclodextrin และอนุพันธ์ของ cyclodextrin ได้โดยให้ความเสถียรของโครงสร้างใหม่และเพิ่มการการละลายได้ดีขึ้น โดยมีผลแตกต่างกัน ดังนี้ 2,6-DHP β CD > 2,6-DM β CD > 2-HP β CD > 6-HP β CD > β CD

2.3.6 สารแพนดูราทินเอ

แพนดูราทินเอเป็นอนุพันธ์ของกลุ่มชาโคล (cyclohexenyl chalcone) ที่แยกได้จากกระชาย และจัดเป็นสารธรรมชาติที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งโครงสร้างของชาโคลมีลักษณะเฉพาะประกอบด้วยหมู่คีโตนไม่อิ่มตัว (α,β unsaturated ketone) เชื่อมต่อกับวงแหวนอะโรมาติก 2 วง (33)

2.3.6.1 คุณสมบัติทางเคมีและลักษณะทางกายภาพของสารแพนดูราทินเอ (23)

ชื่อทางเคมี : (2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-[(1R,2S,6R)-3-methyl-2-(3-methylbut-2-enyl)-6-phenylcyclohex-3-en-1-yl]methanone

สูตรโมเลกุล: $C_{26}H_{30}O_4$

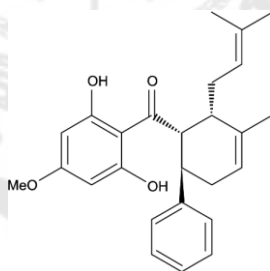
มวลโมเลกุล: 406.5 g/mol

ความสามารถในการดูดกลืนแสง (UV-Vis Absorption): มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ประมาณ 290 นาโนเมตรในสารละลายเอทานอล

ลักษณะทางกายภาพของสารแพนดูราทินเอ: ผลึกของแข็งสีเหลืองอ่อน

จุดหลอมเหลว : ประมาณ 138-140 °C

ความสามารถในการละลาย: ละลายในเอทานอล เมทานอล และสารละลายอินทรีย์อื่นๆ ได้ดี แต่ละลายได้น้อยในน้ำ



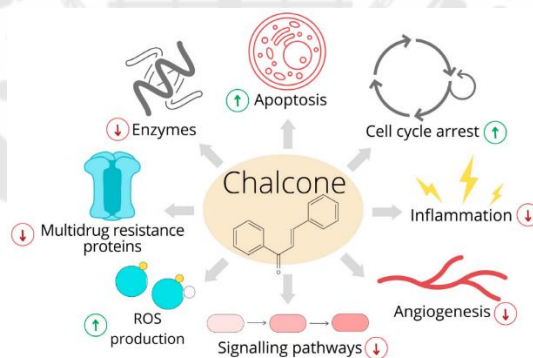
ภาพประกอบ 21 โครงสร้างทางเคมีของสารแพนดูราทินเอ

ที่มา: (78)

2.3.6.2ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแพนดูราทินเอ

แพนดูราทินเอเป็นสารอนุพันธ์ชาโคลโคนจากธรรมชาติที่ส่วนมากถูกพบในกระชาย และเป็นสารที่ถูกรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการ ซึ่งจากการศึกษาทางวิจัยพบว่าแพนดูราทินเอมีฤทธิ์ต้านไวรัสโดยมีศักยภาพในการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสบางชนิด รวมถึงไวรัสที่

ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ เช่น HIV(79) ด้านการอักเสบโดยสามารถยับยั้งการสร้างสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น Nitric Oxide, iNOS และ NF-KB รวมทั้ง pro-inflammatory cytokines ได้แก่ TNF- α , IL-1 β , และ IL-6 (80) นอกจากนี้ยังพบว่าแพนดูราตินเอนนำมาใช้ในการรักษาโรคเหงือกอักเสบหรือโรคปริทันต์โดยสามารถลดการกระตุ้นของ matrix metalloproteinases ได้แก่ MMP-2, -8 และ -9 ลดการอักเสบโดยการลดการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) และลดการแสดงออกของ NFKB transcription factor(81)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยช่วยปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งมีความสำคัญในการป้องกันโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคเบาหวาน และโรคเกี่ยวกับการเสื่อมของระบบประสาท(82) และต้านมะเร็งต่างๆ โดยแพนดูราตินเอนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ และมะเร็งกระเพาะอาหารโดยมีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์, การกระตุ้นการตายแบบ apoptosis และการยับยั้งการเกิด angiogenesis หรือการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (83, 84) นอกจากนี้จากผลการทบทวนวรรณกรรมของ Michalkova และคณะพบว่าสารกลุ่มชาโคมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งกระเพาะอาหาร โดยกลไกระดับโมเลกุลที่อาจเป็นไปได้ในการทำให้เซลล์มะเร็งตายดังแสดงในภาพประกอบ 22



ภาพประกอบ 22 ผลการทบทวนวรรณกรรมในฤทธิ์การต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งกระเพาะอาหารของสารในกลุ่มชาโคผ่านกลไกต่างๆ

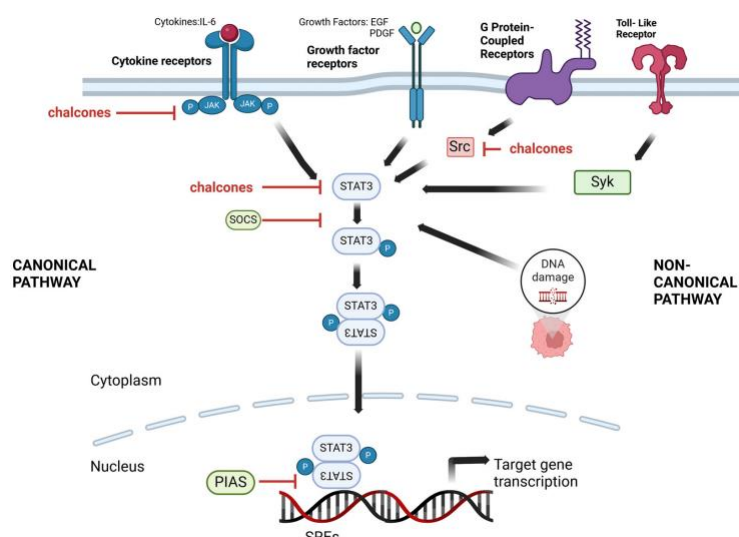
ที่มา: (84)

2.3.6.3 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารแพนดูราทินเอ

ตาราง 6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารแพนดูราทินเอ

โมเดล	โมเลกุลเป้าหมาย	IC ₅₀	อ้างอิง
A549	NF-kappa B signaling (↓)	IC ₅₀ = 4.4 µg/mL	(85)
A549	NF-kappa B signaling (↓) MMP-2(↓)	IC ₅₀ = 5 µg/mL	(86)
MCF-7	Cell cycle (CDKs/cyclins) (↓)	IC ₅₀ = 15 µM	(87)
HT-29	COX-2 (↓)	IC ₅₀ = 28 µM	(88)
MCF-7	Induced apoptosis,	IC ₅₀ = 3.75 µg/ml/ MCF-7	(33)
HT-29	Cell cycle (G0/G1)	IC ₅₀ = 6.56 µg/ml/ HT-29	
A375	p-AMPK (↑) mTOR (↓)	—	(89)
HUVECs	VEGF(↓), MMP-2(↓)	6.91±0.85 µM	(90)

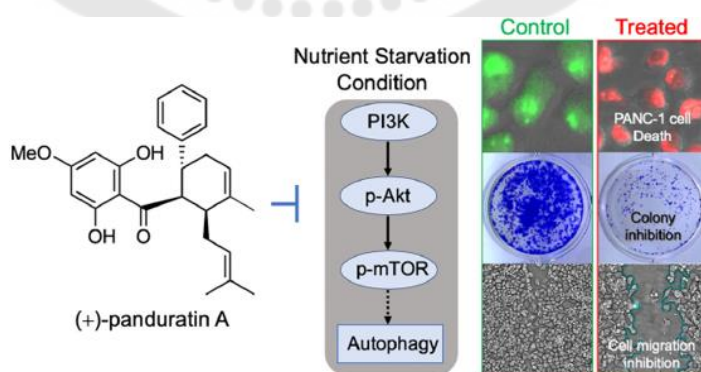
Kuzniak และคณะ(91)ได้ทบทวนงานวิจัยจากฐานข้อมูลต่างๆ ได้แก่ PubMed, Scopus, Web of Science และ Google Scholar จากผลการศึกษาลายงานวิจัยได้สำรวจศักยภาพของสารกลุ่มชาลโคน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้ง STAT ซึ่งสามารถสรุปกลไกได้ดังภาพประกอบ 23 แสดงให้เห็นว่าสารชาลโคนสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของ STAT3 ได้โดยยับยั้งกระบวนการฟอสโฟรีเลชันของโปรตีน STAT3 และยับยั้งการทำงานของโคเอนไซม์ เช่น JAK และ Src ซึ่งการกำหนดเป้าหมายเพื่อยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณ STAT3 ได้กลายเป็นกลยุทธ์การรักษาโรคมะเร็งที่น่าสนใจ



ภาพประกอบ 23 แสดงกลไกการยับยั้งมะเร็งของสารกลุ่มชาโลโคน

ที่มา: (91)

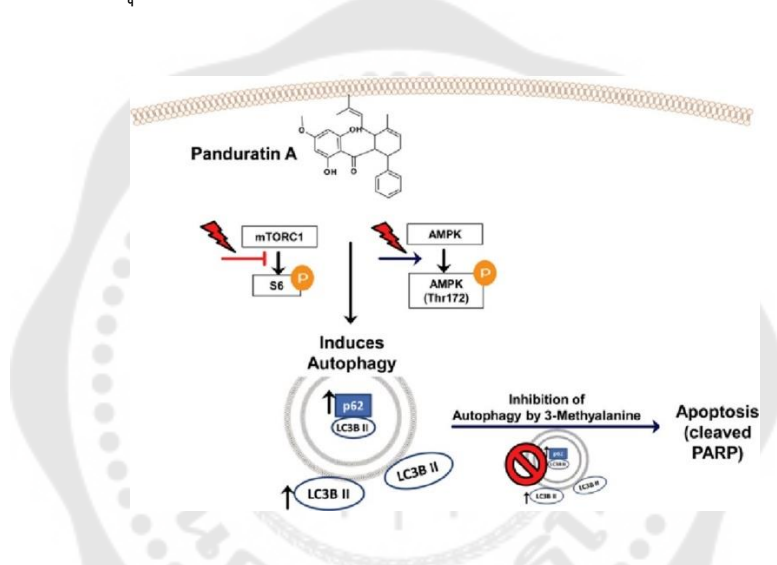
Sun และคณะ(92)ได้ศึกษาหาสารที่มีศักยภาพจากกระชายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับอ่อน PANC-1 โดยศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ภายใต้สภาวะอดอาหาร เนื่องจากในสภาวะนี้เซลล์มะเร็งจะปรับตัวให้ลดการเกิด autophagy เพื่อลดการตายของเซลล์ จากการศึกษาพบว่าแพนดูราทินเอเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นในกระชายโดยการยับยั้งการแพร่และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ผ่านวิถีการส่งสัญญาณ PI3K / Akt / mTOR ส่งผลให้กระตุ้นการเกิด autophagy เพิ่มขึ้น เพิ่มตายต่อเซลล์มะเร็ง



ภาพประกอบ 24 กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับอ่อนในเซลล์ PANC-1 ผ่านกลไกการยับยั้ง PI3K / Akt / mTOR/autophagy ในสภาวะการอดอาหาร

ที่มา: (92)

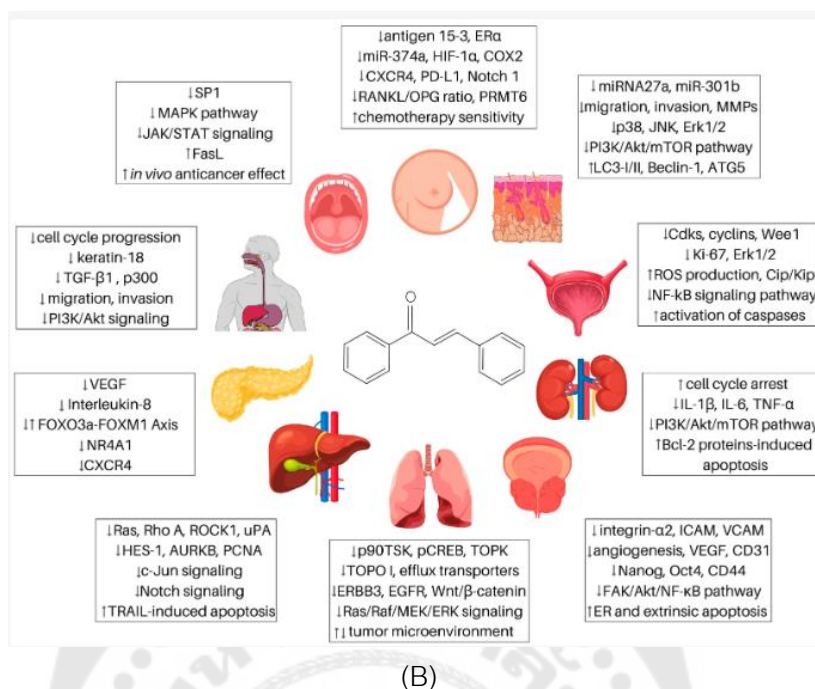
Lai และคณะ(89)ได้ศึกษาฤทธิ์และกลไกการต้านมะเร็งผิวหนังในเซลล์ A375 ของสารแพนดูราตินเอ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งผิวหนังสามารถรักษาสสมดุลพลังงานและความอยู่รอดได้โดยการลดการเกิด autophagy ผ่านวิถี mTOR และ AMPK โดยพบว่าแพนดูราตินเอสามารถยับยั้งวิถีการส่งสัญญาณของ mTOR และกระตุ้น AMPK ส่งเสริมให้กระตุ้นการเกิด autophagy นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใส่ 3-Methyalanine ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง autophagy สารแพนดูราตินเอสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแพนดูราตินเอช่วยเพิ่มการตายของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการกำหนดเป้าหมายยับยั้งที่ mTOR และการกระตุ้น AMPK สามารถเพิ่มผลกระทบต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังได้



ภาพประกอบ 25 กลไกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารแพนดูราตินเอในเซลล์ A375 โดยการกระตุ้นการเกิด autophagy ผ่านวิถี mTOR และ AMPK

ที่มา: (89)

Michalkova และคณะ(93) ได้ทบทวนวรรณกรรมฤทธิ์ต้านมะเร็งชนิดต่างๆ ได้แก่ มะเร็งเต้านม ระบบทางเดินอาหาร ต่อมลูกหมาก มะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งไต และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของสารกลุ่มชาโคไน ซึ่งสารกลุ่มชาโคไนที่ได้ทบทวนวรรณกรรมมีสารแพนดูราตินเอและพิโนสโตรบิน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารกลุ่มชาโคไนมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งปอดผ่านกลไกระดับโมเลกุล โดยการยับยั้งกระบวนการฟอสโฟริเลชันของโปรตีนต่างๆ ได้แก่ EGFR, Ras/Raf/Mek/Erk เป็นต้น ดังแสดงในภาพประกอบ 26

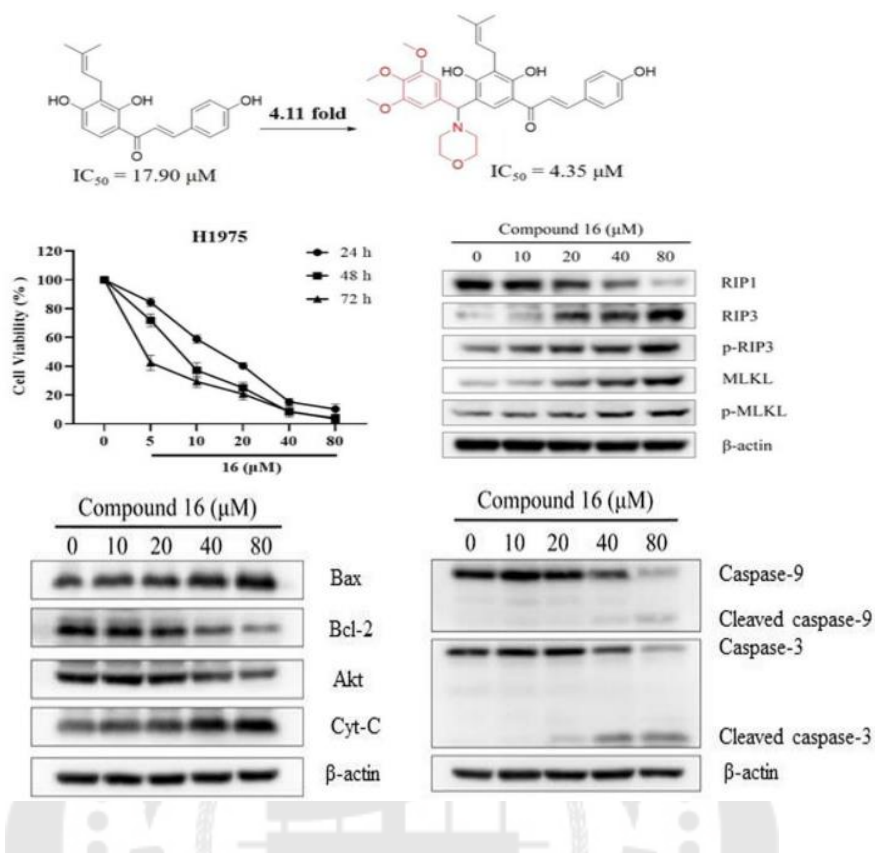


ภาพประกอบ 26 สารกลุ่มชาโคล (A) และฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ (B)

ที่มา:(93)

อย่างไรก็ตาม แม้จะสารกลุ่มชาโคลโคนจะมีศักยภาพในการเป็นสารต้านมะเร็งได้ดี แต่คุณสมบัติของสารกลุ่มชาโคลโคนบางชนิดยังมีการดูดซึมที่จำกัดเนื่องจากมีความสามารถในการละลายต่ำ ทำให้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ไม่เต็มศักยภาพ

Chen และคณะ(94)ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไอโซบาวาชาโคน (IBC) (1-17) สิบเจ็ดชนิด และประเมินฤทธิ์ทางพิษต่อเซลล์ต่อเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า compound 16 แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ H1975 และ A549 มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 4.35 และ 14.21 μM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างเดิมระหว่าง IBC กับ compound 16 ที่สังเคราะห์ขึ้น พบว่ามีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 4.11 เท่าในเซลล์ H1975 ซึ่งการยับยั้งโดยกระตุ้นการตายของเซลล์ผ่าน apoptosis และ necroptosis โดย compound 16 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายผ่านการเพิ่มอัตราส่วน Bax/Bcl-2 และระดับโปรตีน Cyt C การควบคุมระดับโปรตีน Akt ให้ลดลง เกิด caspase-9 และ caspase-3 ซึ่งควบคุมระดับ RIP3, p-RIP3, MLKL และ p-MLKL ทำให้เกิดการตายของเซลล์ นอกจากนี้ compound 16 ยังทำให้เกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย ซึ่งส่งผลให้ระดับ ATP ของเซลล์ลดลง เกิดและ ROS มากเกินไปส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านการสร้างอนุมูลอิสระ



ภาพประกอบ 27 ผลการแสดงผลของโปรตีนหลังการทดสอบด้วยสารอนุพันธ์
ของไอโซบาวาชาลโคน

ที่มา: (94)

จากการทบทวนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสารฟิโนสไตรบินและแพนดูราทินเอพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งปอดได้ ซึ่งกระบวนการพัฒนาและค้นหายาใหม่ จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical properties) ของสารเพื่อนำข้อมูลมาทำนายการดูดซึม การกระจาย การเปลี่ยนแปลง และการขับออกของสารในร่างกาย ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารฟิโนสไตรบินและแพนดูราทินเอมีคุณสมบัติที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นยาตามเกณฑ์ของ Lipinski's rule of five คือ $MW \leq 500$, LogP (partition coefficient between n-octanol and water) ≤ 5 , จำนวนของ hydrogen bond donors (HBD) ≤ 5 และจำนวนของ hydrogen bond acceptors (HBA) ≤ 10 และตามเกณฑ์ของ Veber's rule คือ rotatable bond count (RB) ≤ 10 และ topological polar surface area (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (95, 96) ดังแสดงในตาราง

ตาราง 7 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอ

สาร	MW	HBD	HBA	LogP	TPSA	RB
พินอสโตรบิน	270.28	1	4	2.7771	55.76	2
แพนดูราตินเอ	406.52	2	4	6.0094	66.76	6

ที่มา: (95)

2.4 เทคนิคการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร

2.4.1 การเตรียมตัวอย่างสมุนไพร

2.4.1.1 ล้างสมุนไพร นำพืชสมุนไพรสดมาล้างน้ำให้สะอาด โดยเฉพาะส่วนที่หลุดจากดิน เช่น เหง้า หรือรากต้องล้างดินออกให้หมด

2.4.1.2 อบหรือตากให้แห้ง เนื่องจากสมุนไพรที่มีความชื้นมากเกินไปจะทำให้เกิดเชื้อราและแบคทีเรียได้ สมุนไพรจำพวกรากหรือลำต้นใต้ดิน เปลือกไม้ เนื้อไม้ หรือผล ควรหั่นหรือฝานเป็นชิ้นให้บางก่อนทำให้แห้ง ซึ่งจะทำให้สมุนไพรแห้งง่ายขึ้น สำหรับการทำให้แห้งมีหลายวิธี เช่น การตากแดด ตากลม การอบโดยใช้ความร้อนซึ่งอาจทำในตู้อบหรือโรงอบขนาดใหญ่ขึ้นอยู่กับปริมาณวัตถุดิบ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ว่าทนความร้อนได้มากหรือน้อยเพียงใด ซึ่งอุณหภูมิการอบสมุนไพรให้เหมาะสมกับส่วนของสมุนไพรที่นำไปใช้ มีดังนี้

ตาราง 8 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสมุนไพรส่วนต่างๆ

ส่วนของสมุนไพร	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
ดอก ใบ และพืชล้มลุก	≤ 40
เปลือก ราก และกิ่ง	≤ 65
แก่น ผล และเมล็ด	≤ 80
สมุนไพรที่มีสารระเหยง่าย	≤ 45

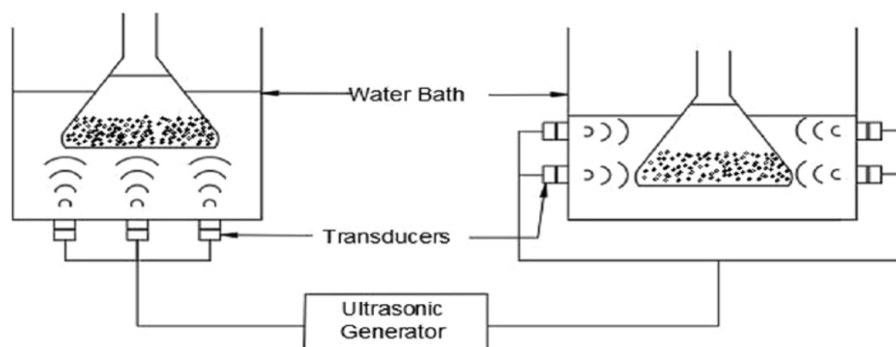
ที่มา: (97)

2.4.1.3 การบดเป็นผง นำตัวอย่างสมุนไพรที่แห้งแล้วมาบดเป็นผง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างตัวอย่างและตัวทำละลาย ทำให้ตัวอย่างและตัวทำละลายสัมผัสกันได้ดีขึ้น เครื่องมือที่ใช้

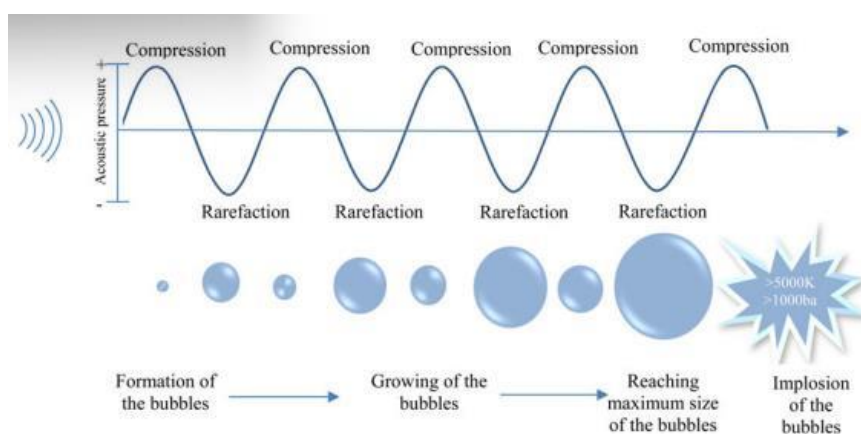
ในการบัดมีหลายชนิด เช่น ครกหิน ครกบดยา หรือเครื่องบดไฟฟ้า หลังจากผ่านกระบวนการบดแล้วให้นำไปผ่านตะแกรงร่อนซึ่งมีขนาดต่างๆ เพื่อให้ขนาดผงมีความละเอียดสม่ำเสมอหรือขนาดเล็กตามความต้องการ เมื่อพืชสมุนไพรผ่านการบดแล้วควรเก็บในภาชนะปิดภายใต้สภาวะอากาศแห้ง เช่น ถุงพลาสติกที่มีการปิดมิดชิด หรือตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเพื่อป้องกันความชื้นแมลง เชื้อราและแบคทีเรีย (97)

2.4.2 การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถทำให้เกิดการสกัดได้เนื่องจาก ปฏิกิริยาการเกิดช่องว่าง โดยเมื่อคลื่นดังกล่าวผ่านไปยังตัวกลางของเหลวตัวอย่างจะทำให้เกิดการบีบอัดและขยายของอนุภาคของตัวกลางในทิศทางแนวเดียวกับการเคลื่อนที่ของคลื่นใน พื้นที่ที่คลื่นเดินทางไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดัน เกิดช่องว่างและเกิดฟองแก๊ส ฟองแก๊สที่เกิดขึ้นนี้มีการเปลี่ยนแปลงขนาดในแต่ละรอบของการบีบอัดและขยายได้ ฟองแก๊สจะค่อย ๆ ขยายใหญ่ขึ้นเมื่อผ่านไปในแต่ละรอบจนถึงขนาดวิกฤตซึ่งจะเกิดการแตกออกอย่างรุนแรงเพื่อปลดปล่อยพลังงานทำให้เกิดเป็นฟองแก๊สขนาดเล็ก ซึ่งจะค่อย ๆ ขยายใหญ่ขึ้นและระเบิดแตกออกเข้าไปเรื่อย ๆ การระเบิดแตกออกเป็นฟองแก๊สขนาดเล็กที่จุดนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 5000 K ความดันประมาณ 50-1000 บรรยากาศซึ่งเรียกว่าจุดร้อน (hot spot) เมื่อฟองแก๊สเกิดการแตกออกใกล้ผิวของแข็งจะปลดปล่อยความดันและอุณหภูมิสูงทำให้เกิดคลื่นกระแทกขนาดเล็ก (shock wave) คลื่นกระแทกขนาดเล็กนี้มีผลต่อการสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทำให้เกิดการลอกผิว การกัดเซาะ การแตกออกของผนังเซลล์และปลดปล่อยสารออกสู่ตัวกลาง โดยปรากฏการณ์การสั่นเมื่อคลื่นเสียงความถี่สูงผ่านไปยังของเหลวตัวกลางดังแสดงในภาพประกอบ 28 กลไกการสกัดแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1. การให้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดเข้าสู่เมทริกซ์ของแข็งตัวอย่าง ซึ่งการลดขนาดตัวอย่างทำให้เพิ่มการซึมทะลุผ่านของตัวทำละลายได้ดีขึ้น 2. การปลดปล่อยสารสกัดจากเมทริกซ์ ซึ่งต้องอาศัยพื้นที่ผิวที่สัมผัสผกกันระหว่างเฟสของแข็งและเฟสของเหลว ซึ่งในช่วง 10-20 นาทีของการสกัด ตัวถูกละลายหรือสารสำคัญจะถูกสกัดออกมาได้มากถึง 90 % และในช่วง 60-100 นาทีตัวถูกละลายจะแพร่ออกมาได้ช้า ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้ทำให้เพิ่มการส่งผ่านมวลตัวทำละลายสามารถซึมทะลุผ่านตัวอย่างดีขึ้น อัตราการสกัดสูงขึ้นและปริมาณของสารที่สกัดได้เพิ่มขึ้น โดยใช้เวลาในการสกัดสั้น อีกทั้งใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยจึงลดตัวทำละลายที่มีพิษได้ (98)



(A)



(B)

ภาพประกอบ 28 แผนผังการสกัดโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก (A) และการก่อตัวของฟองอากาศในอ่างอัลตราโซนิก (B)

ที่มา: (98)

2.4.3 การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรด้วยตัวทำละลาย

2.4.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้สกัดได้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยทั่วไปหลักการเลือกตัวทำละลายนั้นนิยมเลือกจากความเหมือนกันของสภาพขั้วระหว่างตัวทำละลาย และตัวถูกละลายหรือที่เรียกว่า Like Dissolve Like กล่าวคือ หากสภาพขั้วของตัวทำละลาย และตัวถูกละลายเหมือนกันจะสามารถละลายกันได้ดี สามารถนำไปออกแบบการทดลองและหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว หรือ Distribution Coefficient (K_d) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากอัตราส่วนของความเข้มข้นตัวถูกละลายที่ละลายอยู่ในวัฏภาคอินทรีย์และความเข้มข้นที่ละลายอยู่ในน้ำ แต่วิธีการนี้จำเป็นต้องใช้ทรัพยากร ตัวทำละลาย และเวลาเป็นจำนวนมาก เนื่องจากต้องออกแบบการทดลอง เพื่อเลือกตัวทำละลายที่มีขั้วหรือไม่มีขั้วเป็นจำนวนมากแล้วจึงสามารถสรุป

ได้ว่าตัวทำละลาย ตัวใดที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพในการสกัดได้ดีที่สุด หนึ่งในคุณสมบัติของสารอินทรีย์ที่ใช้แสดงความสามารถในการละลาย คือพารามิเตอร์การละลาย (Solubility Parameter) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารเพื่อช่วยในการเลือกตัวทำละลาย ได้อย่างเหมาะสม โดยสารอินทรีย์ที่มีค่าพารามิเตอร์การละลายใกล้เคียงกันจะสามารถละลายเข้าด้วยกันได้ดี ปัจจุบันค่าพารามิเตอร์การละลายมีใช้กันอยู่หลายชนิด โดยงานวิจัยนี้ เลือกใช้ค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter) เพื่อช่วยในการทำนายหาค่าการละลายที่เหมาะสม และช่วยในการลดจำนวนชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลองลดค่าใช้จ่าย และลดเวลาในการทดลอง นับเป็นการพัฒนาการหาตัวทำละลายใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น(99)

2.4.3.2 ค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen Solubility Parameter) (100, 101)

การหาค่าพารามิเตอร์การละลายสามมิติ คือ การศึกษาแรงระหว่างโมเลกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1. ค่าการละลายของแรงลอนดอน (Dispersion Force, δ_d) ซึ่งจะคิดจากแรงลอนดอน ซึ่งเป็นแรงภายในโมเลกุลที่พบได้ในสารที่ไม่มีขั้วหรือโมเลกุลที่อยู่ในรูปทรงสมมาตรมีแรงยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลต่ำ 2. ค่าการละลายของแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (Dipolar Intermolecular Force, δ_p) คือ พลังงานที่คิดจากแรงดึงดูดระหว่างขั้วที่อยู่ภายในโมเลกุลกระทำกัน ทำให้รูปทรงของโมเลกุลนั้นไม่สมมาตร 3. ค่าการละลายของพันธะไฮโดรเจน (The Energy From Hydrogen Bond, δ_h) คือ พลังงานของสารที่มีหมู่ฟังก์ชันในโมเลกุลที่สามารถให้และรับโปรตอน โดยหมู่ที่สามารถให้ โปรตอนได้นั้น ส่วนมากจะเป็นหมู่ที่มีไฮโดรเจนจับอยู่กับอะตอมของฟลูออรีน ออกซิเจนและไนโตรเจน เมื่อนำค่าการละลายทั้ง 3 ค่าดังกล่าวมารวมกันได้ออกมาเป็นค่าการละลายของฮิลเดอบรอน ดังสมการที่ (4) โดย ค่าดังกล่าวมีหลักการพื้นฐานมาจากสารที่มีลักษณะขั้วเหมือนกันหรือโมเลกุลที่มีแรงยึดเหนี่ยวเหมือนกัน จะสามารถละลายเข้ากันได้ แต่มีข้อจำกัดคือค่าพารามิเตอร์ สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ และอาจขาดความแม่นยำเนื่องจากค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าสถิต เป็นต้น โดยค่าการละลายมีหน่วยเป็น MPa^{1/2} ใน SI UNIT

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad \text{สมการ (1)}$$

เมื่อ δ_d , δ_p และ δ_h คือพารามิเตอร์การละลายของอันตรกิริยาของส่วนไม่มีขั้ว ส่วนที่มีขั้ว และพันธะไฮโดรเจน ตามลำดับ

จากสมการพบว่าหากสารที่ไม่มีขั้วและไม่มีพันธะไฮโดรเจน ค่าการละลายที่เกิดจากแรงลอนดอนนั้นเท่ากับค่าการละลายของฮิลเดอบรอน แสดงว่าค่าการละลายของแรงลอนดอนสามารถหาได้จากวิธีเดียวกันกับการหาค่าพารามิเตอร์การละลายของฮิลเดอบรอน คือการถอดรากที่สองของพลังงานยึดเหนี่ยวหนาแน่น

2.4.3.3 วิธีการทำนายค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนด้วยวิธีการกระจายแบบกลุ่ม

การทำนายค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซน (Hansen solubility parameters (HSPs) ได้รับการพัฒนาเพื่อทำนายความสามารถในการละลายได้แม่นยำมากขึ้น โดยเมื่อนำแรงระหว่างโมเลกุลทั้ง 3 ชนิด หาค่าด้วยปริมาตรต่อโมล (molar volume) จะทำให้ได้กำลังสองของค่าการละลายทั้งหมด (δ_t^2) เท่ากับกำลังสองของแรงระหว่างโมเลกุลทั้ง 3 ชนิด (D, P และ H) รวมกัน ดังแสดงในสมการ 2 และ 3

$$\frac{\delta_t}{V} = \frac{\delta_d}{V} + \frac{\delta_p}{V} + \frac{\delta_h}{V} \quad \text{สมการ (2)}$$

$$\delta_t^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad \text{สมการ (3)}$$

ความเข้ากันได้ระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลายที่สนใจสามารถวัดได้ด้วยค่ารัศมี (R_a) ซึ่ง R_a คือระยะห่างระหว่างตัวถูกละลายกับตัวทำละลาย ดังนั้นหากพารามิเตอร์ระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลายมีค่าใกล้เคียงกัน ก็จะทำให้ค่า R_a ต่ำ ซึ่งแสดงผลได้ว่าตัวทำละลายนั้นเหมาะสมกับการนำไปใช้ละลายตัวถูกละลาย

$$R_a^2 = 4 (\delta_{di} - \delta_{dj})^2 + (\delta_{pi} - \delta_{pj})^2 + (\delta_{hi} - \delta_{hj})^2 \quad \text{สมการ (4)}$$

เมื่อ i คือค่าการละลายของตัวถูกละลายและ j คือค่าการละลายของตัวทำละลาย

Stefanis และ Panayiotou ได้สร้างโมเดลทางคณิตศาสตร์เชิงเส้นจากการทดลอง เพื่อการหาค่าการละลายของสาร โดยการแบ่งกลุ่มย่อยของสารออกเป็นสองประเภท คือ First-Order Group (UNIFAC Groups) ซึ่งจะครอบคลุมโครงสร้างของกลุ่มย่อยทั่วไป และ Second-Order Group ซึ่งจะแบ่งโดยใช้หลักตามทฤษฎีคอนจูเกต ทำให้สามารถทำนายค่าของ

สารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนไม่ว่าจะเป็น Multi-Ring, Aromatic Structure และ Heterocyclic หรือแม้กระทั่งสารประเภทชีวเคมี ยา อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น โดย Stefanis และ Panayiotou ได้ให้สมการในการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ของแฮนเซนไว้ ดังสมการที่ (5)–(7) มีหน่วยเป็น MPa^{1/2} โดยที่ค่า C และ D หาได้จากตาราง 2 และ 3

$$\delta_a = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 17.3231) \text{ MPa}^{1/2} \quad \text{สมการ (5)}$$

$$\delta_p = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.3548) \text{ MPa}^{1/2} \quad \text{สมการ (6)}$$

$$\delta_h = (\sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j + 7.9793) \text{ MPa}^{1/2} \quad \text{สมการ (7)}$$

โดยที่ C_i หมายถึง ค่าการละลายของตัวถูกละลายในกลุ่ม first-order ที่มีอยู่ในโครงสร้างสาร, N_i หมายถึง คือ จำนวนที่ซ้ำกันของกลุ่มย่อยในกลุ่ม first-order และ D_j คือค่าการละลายของตัวถูกละลายในกลุ่ม second-order ที่มีอยู่ในโครงสร้างสาร, M_j หมายถึง จำนวนที่ซ้ำกันของกลุ่มย่อยในกลุ่ม second-order โดยที่ค่าคงที่ W เท่ากับ 0 สำหรับสารประกอบที่ไม่มีกลุ่ม second-order และเท่ากับ 1 สำหรับโครงสร้างสารที่มีกลุ่ม second-order

ตาราง 9 ตัวอย่างค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท first-order

Groups	δ_a	δ_p	δ_h
ACH	0.1105	-0.5303	-0.4305
AC	0.8446	0.6187	0.0084
ACOH	0.5288	1.1010	6.9580
>C=O (except as above)	-0.4343	0.7905	1.8147
O (except as above)	0.0472	3.3432	0.0256
-CH ₂	-0.0269	-0.3045	-0.4119
-CH<	0.645	0.6491	-0.2018
-CH ₃	-0.9714	-1.6448	-0.7813
-CH=C<	0.5372	-0.9024	-1.8872
-CH ₃ O	-0.5828	0.1764	0.1460

ตาราง 10 ตัวอย่างค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท second-order

Groups	δ_d	δ_p	δ_h
AC-O-C	0.2568	0.8153	0.6092
Ccyclic =O	-0.2981	0.4497	-0.4794
C-O-C=C	0.2063	0.6080	1.1344
CH3-C=	-0.0785	0.3316	0.3875

ตาราง 11 ตัวอย่างค่าการละลายและคุณสมบัติทางเคมีของตัวทำละลายชนิดต่างๆ

Solvents	δ_d	δ_p	δ_h	ค่าความหนืด (cP) ที่ 25 °C	ความหนาแน่น (g/ml) ที่ 25 °C
Ethanol	15.8	8.8	19.4	1.1	0.785
Methanol	14.7	12.3	22.3	0.543	0.792
Dichloromethane	17.8	3.1	5.7	0.413	1.362
Ethyl acetate	15.8	5.3	7.2	0.428	0.902
Hexane	14.9	0	0	0.310	0.661

2.4.3.4 ค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนที่อุณหภูมิต่างๆ

เนื่องจากสภาวะการสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมมักขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด ดังนั้นจึงสามารถประมาณค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนของตัวทำละลายที่อุณหภูมิต่างๆ (102) ดังสมการที่ (8)–(10)

$$\delta_d = \delta_{d,ref} \left(\frac{V_{ref}}{V} \right)^{1.25} \quad \text{สมการ (8)}$$

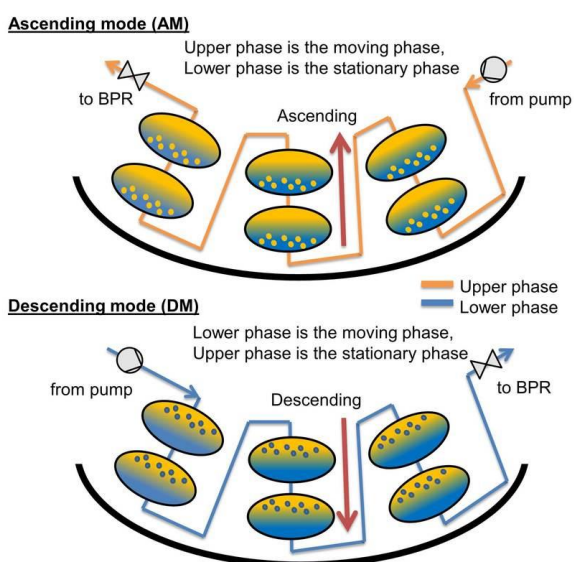
$$\delta_p = \delta_{p,ref} \left(\frac{V_{ref}}{V} \right)^{0.5} \quad \text{สมการ (9)}$$

$$\delta_h = \delta_{h,ref} \left[e^{\left(-1.32 \times 10^{-3} (T_{ref} - T) - \left(\frac{V_{ref}}{V} \right)^{0.5} \right)} \right]^{-1} \quad \text{สมการ (10)}$$

โดยที่ $\delta_{d,ref}$, $\delta_{p,ref}$ และ $\delta_{h,ref}$ คือ ค่าพารามิเตอร์การละลายที่อุณหภูมิอ้างอิง ($\text{MPa}^{1/2}$), V_{ref} คือ ปริมาตรโมลาร์ (มล./โมล) ที่อุณหภูมิอ้างอิง (T_{ref}) และความดันอ้างอิง (P_{ref}) และ V คือ ปริมาตรโมลาร์ (มล./โมล) ที่อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) และความดัน (MPa) ที่ต้องการ

2.5 เทคนิคการแยกสารสำคัญจากสมุนไพรให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Centrifugal Partition Chromatography (CPC)

CPC เป็นเทคนิคการแยกสารผสมให้บริสุทธิ์โดยใช้หลักการ Chromatography ด้วยกระบวนการ Liquid/Liquid Chromatography โดยจะมีเฟสคงที่ (Stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นของเหลว โดยเฟสอยู่กับที่ที่เป็นของเหลวจะอาศัยแรงหมุนเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifugal Force) ทำให้อยู่ภายในคอลัมน์ CPC ขณะทำการแยกสารได้ และเฟสเคลื่อนที่จะถูกปั๊มและเคลื่อนที่ผ่านเฟสคงที่ การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ Ascending Mode (Normal Phase) และ Descending Mode (Reverse Phase) โดยการแยกสารด้วย ascending mode จะเหมาะกับการแยกสารประเภทมีขั้วต่ำ ระบบของเฟสเคลื่อนที่จะอยู่ส่วนบน (upper) และเฟสคงที่จะอยู่ส่วนล่าง (lower) ส่วน Descending Mode จะเหมาะกับการแยกสารประเภทค่อนข้างมีขั้ว ระบบของเฟสเคลื่อนที่จะอยู่ส่วนล่างและเฟสคงที่จะอยู่ส่วนบน(103) ดังแสดงในภาพประกอบ 29



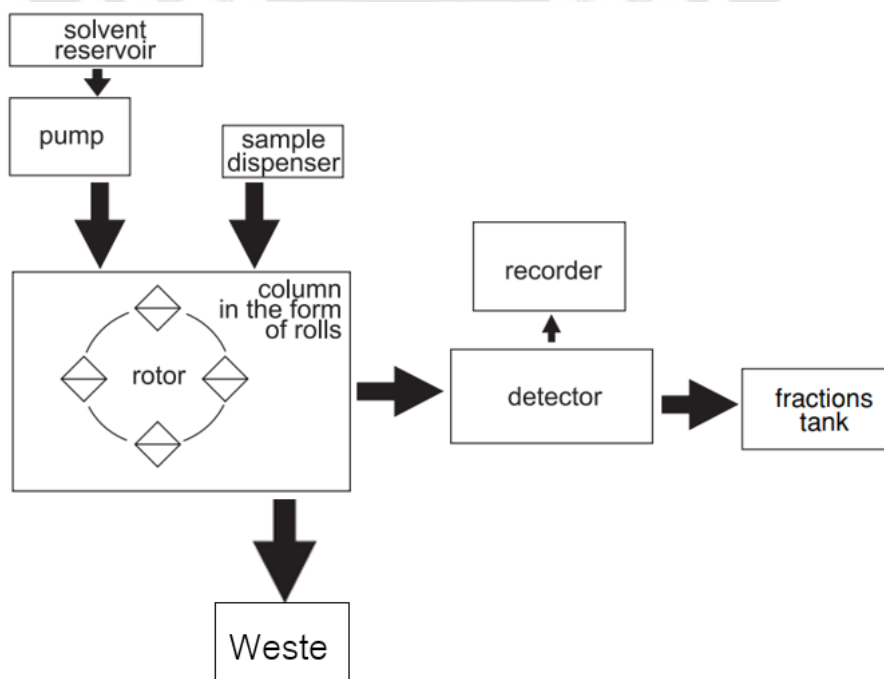
ภาพประกอบ 29 ระบบการทำงานของ Ascending Mode และ Descending Mode

ส่วนประกอบของเครื่อง CPC ประกอบด้วยปั๊ม (Pump), ส่วนการฉีดสาร (injector), คอลัมน์ (Column), ส่วนของการวัดสาร (Detector) และส่วนของการเก็บสาร (Fraction Collector) ดังแสดงในภาพประกอบ 31



ภาพประกอบ 30 คอลัมน์ CPC (A) เครื่อง CPC (B)

ที่มา: (104)



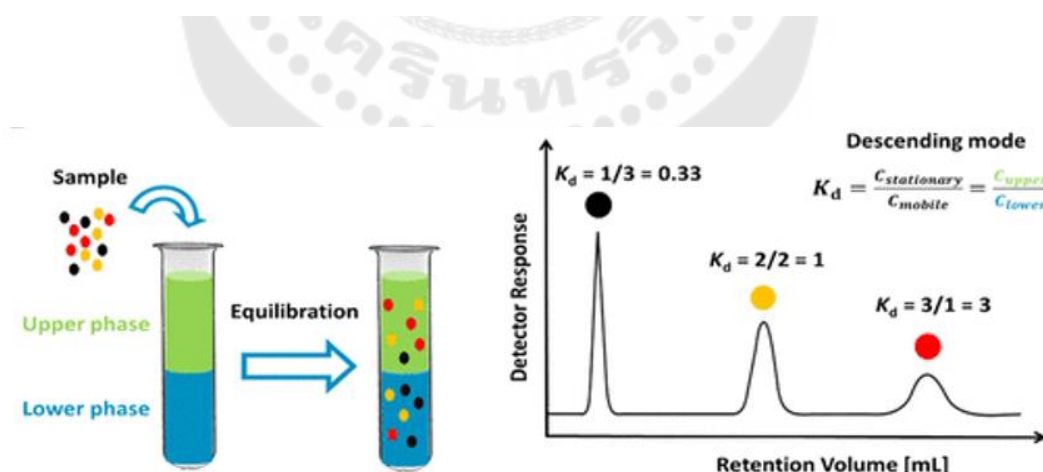
ภาพประกอบ 31 แผนภาพขั้นตอนการทำงานของเครื่อง CPC

ที่มา: (105)

หลักการเลือกกระบวนการแยกสารที่เหมาะสม

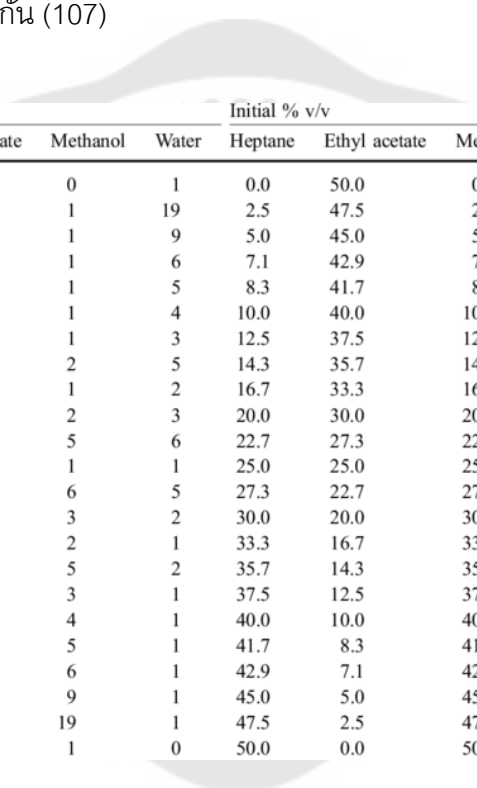
การเลือกตัวทำละลายสำหรับเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการแยกสารให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดระบบสองวัฏภาค (biphasic liquid system, BLS) ต้องใช้ตัวทำละลายอย่างน้อย 2 ชนิดขึ้นไปโดยของเหลวทั้งสองเฟสต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งหลักการแยกสารด้วยเทคนิค CPC เหมือนกับโครมาโตกราฟีทั่วไป แต่แตกต่างจากโครมาโตกราฟี คือเฟสคงที่สำหรับใช้ในการแยกสารเป็นของเหลว ซึ่งทำให้ไม่เกิดปัญหาการอุดตันของคอลัมน์ (Column) นอกจากนี้การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC ยังมีข้อดีกว่า column chromatography แบบดั้งเดิม คือ ลดกระบวนการที่มีความยุ่งยากซับซ้อนในการเตรียมตัวอย่าง สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์สูงโดยใช้เวลาน้อย ได้ผลผลิตสูงเนื่องจากสามารถบรรจุสารตัวอย่างที่ต้องการแยกได้ในปริมาณมากและสารสำคัญไม่ถูกดูดซับในเฟสคงที่เหมือนกับการแยกสารด้วย column chromatography แบบดั้งเดิมที่มีการใช้คอลัมน์โดยมีเฟสคงที่เป็นของแข็งซึ่งสามารถดูดซับสารสำคัญในระหว่างการแยกได้อย่างถาวรทำให้ผลผลิตที่ได้น้อย (35)

ระบบการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC จะใช้ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร (partition coefficient, K_D) เป็นเกณฑ์ในการกำหนดความเหมาะสมของระบบตัวทำละลายที่นำมาใช้เป็นเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ เนื่องจากการกระจายตัวของสารตัวอย่างระหว่างสองเฟสจะส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของสารและเวลาที่ใช้ในการแยก โดยสารตัวอย่างที่ชอบละลายอยู่ในเฟสคงที่จะแยกออกมาได้ช้ากว่าตัวอย่างที่ชอบละลายในเฟสเคลื่อนที่ ดังแสดงในภาพประกอบ 32



ภาพประกอบ 32 แสดงการกระจายตัวของสารตัวอย่างในระบบสองเฟส

ปัจจุบันการเลือกใช้ตัวทำละลายในระบบการแยกสารด้วยเทคนิค CPC ได้มีการพัฒนาระบบตัวทำละลายที่มีช่วงความเข้มข้นที่หลากหลายเพื่อความสะดวกในการเลือกใช้ ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ Arizona (AZ) liquid system ซึ่งระบบของเหลวประกอบไปด้วยสาร 4 ชนิดได้แก่ เฮปเทน/เอทิลอะซิเตต/เมทานอล/น้ำ โดยผสมกันด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกันทั้งหมด 23 รูปแบบ โดยกำกับความเข้มข้นสูงไปจนต่ำด้วยตัวอักษร A ถึง Z ดังแสดงในภาพประกอบ 33 ซึ่งระบบนี้ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถนำมาใช้ในระบบการแยกสารด้วยระบบของเหลวได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัยที่จะใช้สารเฮกเซนแทนเฮปเทนเนื่องจากสารมีความเป็นพิษที่ต่ำกว่า แต่ให้คุณสมบัติที่คล้ายกัน (107)



Letter	v/v/v/v				Initial % v/v				Upper/lower phase ratio	Settling time (s)
	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water	Heptane	Ethyl acetate	Methanol	Water		
A	0	1	0	1	0.0	50.0	0.0	50.0	0.88	36
B	1	19	1	19	2.5	47.5	2.5	47.5	0.92	31
C	1	9	1	9	5.0	45.0	5.0	45.0	0.965	28
D	1	6	1	6	7.1	42.9	7.1	42.9	0.96	29
F	1	5	1	5	8.3	41.7	8.3	41.7	0.95	30
G	1	4	1	4	10.0	40.0	10.0	40.0	0.95	25
H	1	3	1	3	12.5	37.5	12.5	37.5	0.945	25
J	2	5	2	5	14.3	35.7	14.3	35.7	0.91	20
K	1	2	1	2	16.7	33.3	16.7	33.3	0.88	21
L	2	3	2	3	20.0	30.0	20.0	30.0	0.84	18
M	5	6	5	6	22.7	27.3	22.7	27.3	0.80	17
N	1	1	1	1	25.0	25.0	25.0	25.0	0.70	22
P	6	5	6	5	27.3	22.7	27.3	22.7	0.69	21
Q	3	2	3	2	30.0	20.0	30.0	20.0	0.68	20
R	2	1	2	1	33.3	16.7	33.3	16.7	0.68	18
S	5	2	5	2	35.7	14.3	35.7	14.3	0.70	15
T	3	1	3	1	37.5	12.5	37.5	12.5	0.735	14
U	4	1	4	1	40.0	10.0	40.0	10.0	0.76	14
V	5	1	5	1	41.7	8.3	41.7	8.3	0.78	14
W	6	1	6	1	42.9	7.1	42.9	7.1	0.775	13
X	9	1	9	1	45.0	5.0	45.0	5.0	0.77	11
Y	19	1	19	1	47.5	2.5	47.5	2.5	0.71	10
Z	1	0	1	0	50.0	0.0	50.0	0.0	0.45	10

ภาพประกอบ 33 องค์ประกอบของสารในระบบ Arizona 23 รายการ

ที่มา: (107)

นอกจากนี้ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยเทคนิค CPC ต้องมีความหนืดต่ำ ไม่ดูดกลืนแสงรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet (UV)-transparent) เพื่อไม่รบกวนการตรวจวัดสารตัวอย่าง ครอบคลุมช่วงช่วงกว้างและมีแรงดึงดูดระหว่างเฟสที่เป็นน้ำและสารอินทรีย์ อีกทั้งตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ควรมีจุดเดือดต่ำเพื่อให้สามารถระเหยตัวทำละลายได้ง่ายหลังการแยกสาร (108) เพื่อให้การแยกสารเกิดประสิทธิภาพสูงสุดจึงจำเป็นต้องหาค่า KD ในช่วง

ที่เหมาะสม ดังนั้นก่อนการแยกด้วยเทคนิค CPC ต้องหาค่า KD ของสารในเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งค่า KD ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.5–3 หรือค่าที่สามารถเป็นทางเลือกเพิ่มเติมคือ 0.2-5 เนื่องจากค่า KD ที่มากเกินไป จะส่งผลให้ใช้เวลานานในการแยกสารและฟีดกว้าง ซึ่งระยะเวลาในการแยกนานจะทำให้การใช้ตัวทำละลายเพิ่มขึ้นและผลผลิตที่ได้ลดลง (yield) ถ้า KD น้อยเกินไป สารผสมในตัวอย่างอาจเกิดการรวมตัวและไม่แยกออกจากกัน นอกจากนี้หากต้องการแยกสารหลายชนิดต้องพิจารณาค่า KD ของสารที่สนใจแต่ละชนิด โดยค่า KD ของสารแต่ละชนิดต้องแตกต่างกัน หากสาร 2 ชนิดมีค่า KD เท่ากันจะส่งผลให้สารไม่เกิดการแยก (104) ดังนั้นในการหาสถานะของระบบของเหลวที่เหมาะสม จำเป็นต้องพิจารณาค่าการแยกสาร (separation factor (α)) ร่วมด้วย โดยนำค่า KD ของสารแต่ละชนิดมาคำนวณค่าการแยกสาร โดยค่าการแยกสารที่เหมาะสมต้องมีค่า >1.5 (109)

ขั้นตอนการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวและค่าการแยกของสารในเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่โดย Shake-flask method (104)

1. เลือกระบบตัวทำละลายที่ต้องการและผสมตัวทำละลายแต่ละชนิดตามสัดส่วนที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากระบบ Arizona จากนั้นเขย่าให้สารผสมเข้ากัน
2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น ปิดปริมาตรของสารทั้งเฟสบนและล่างใส่ลงในขวดใหม่ในปริมาตรที่เท่ากัน จากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดหยาบลงในภาชนะแล้วเขย่าเพื่อให้ตัวอย่างกระจายในระบบ 2 เฟส ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น
3. วิเคราะห์สารทั้งเฟสบนและเฟสล่างด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น HPLC เป็นต้น จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ไปหาค่า KD และ α โดยระบบของเหลวที่ให้ค่า KD และ α ที่เหมาะสมจะถูกเลือกระบบนั้นไปใช้เป็นเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ในระบบการแยกด้วยเทคนิค CPC

$$KD = \text{ค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสคงที่} / \text{ค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสเคลื่อนที่}$$

$$\alpha = KD_1/KD_2, \text{ โดยค่า } KD_1 > KD_2$$

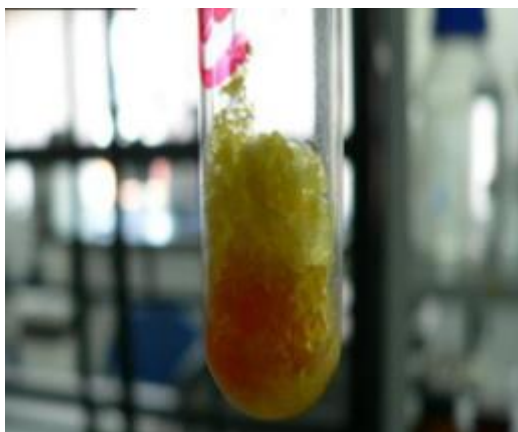
ปัจจุบันยังไม่พบงานวิจัยที่แยกสารฟีนอลโตรบินและแพนดูราตินเอจากกระชายขาวด้วยเทคนิค CPC แต่มีรายงานการวิจัยที่ใช้เทคนิค CPC ในการแยกสารสำคัญจากสมุนไพรและทำให้บริสุทธิ์ (110) ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 8 ตัวอย่างการสกัดสารสำคัญให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค CPC

ระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วน	ส่วนของพืช	สาร/ความบริสุทธิ์ที่ได้	อ้างอิง
Methanol/ n-Hexane/Water	5/5/0.8	รากของเรตวาเลเรียน (Centranthus ruber L.)	valtrate และ 7-homovaltrate/ 97%	(111)
n-Hexane/Ethyl acetate/ Ethanol/Water	8/2/5/5	กัญชา (Cannabis sativa L.)	Acidic cannabinoids/ (>45% recovery/ >95%)	(112)
Heptane/Methanol / Acetonitrile	6/1/2	ดอกไฟรีทัม (Chrysanthemum Cinerariaefolium)	Pyrethrins (99%)	(113)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการแยกสารสำคัญจากกระชายให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบดั้งเดิม

Salama และคณะ(30) ศึกษาการสกัดและแยกสารแพนดูราตินเอจากกระชายให้บริสุทธิ์โดยการแช่ด้วย 95%เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถูกลั่นและทำให้แห้งที่ 40°C ใน incubator เป็นเวลา 3 วัน จะได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้นโดยให้ % Yield = 9.49% (w/w) จากนั้นนำสารสกัดหยาบ 2.67 กรัมละลายด้วยอะซิโตนและนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยใช้ซิลิกาเจล 47 กรัม เป็นเฟสคงที่และใช้ตัวชะเป็นระบบ gradient elution ด้วยตัวทำละลาย Hexane และ Ethyl acetate จากนั้นเก็บแต่ละส่วนของการแยกไประเหยแห้งและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วย HPLC ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าได้ผลึกของสารแพนดูราตินเอ 0.767 กรัม ที่ความบริสุทธิ์ 96.6% ดังแสดงในภาพประกอบ 34 จากงานวิจัยของ Salama และคณะจะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างและการแยกสารให้บริสุทธิ์ต้องใช้ระยะเวลาและหลายขั้นตอน

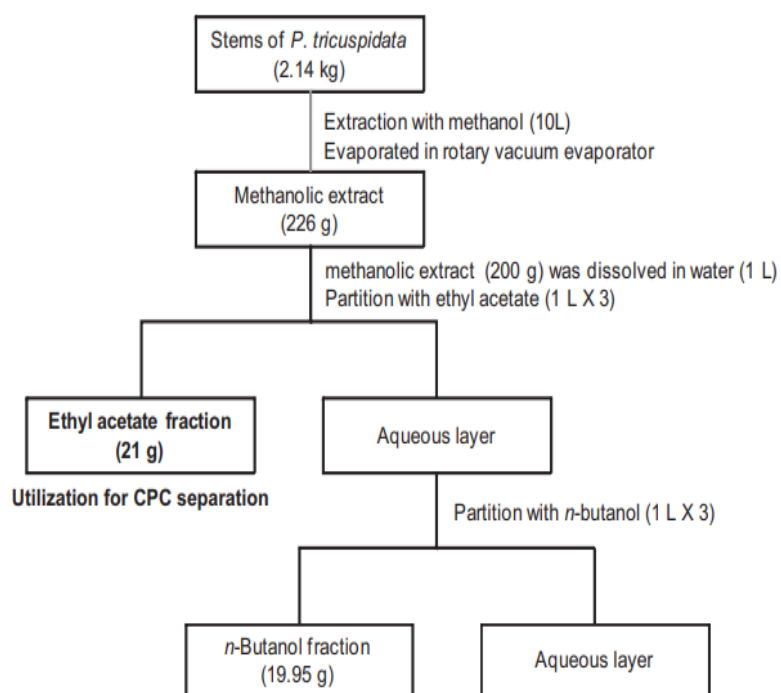


ภาพประกอบ 34 ผลึกของแพนดูราตินเออบริสุทธิ์ที่แยกด้วยเทคนิค silica gel column chromatography

ที่มา:(30)

Jeon และคณะ(114) ได้ศึกษาวิธีการสกัดแยกสารกลุ่ม flavonoids 3 ชนิด และ stilbenoids 2 ชนิด จากต้นบอสตันไอวี่(*Parthenocissus tricuspidata*) ได้แก่ Aromadendrin-3-O- β -D-glucopyranoside, Catechin, Engletin (สารกลุ่ม flavonoids) trans-Piceid, Resveratrol (สารกลุ่ม stilbenoids) ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค CPC ด้วยระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย acetate-acetonitrile-water (3:3:4, v/v) โดยสารกลุ่มที่มีขั้วน้อยใช้ ascending mode ในการแยก ส่วนสารที่มีขั้วมากใช้ descending mode ในการแยก ซึ่งการเตรียมตัวอย่างผ่านกระบวนการสกัดสมุนไพรด้วยเมทานอลโดยการแช่ที่อุณหภูมิห้องเกิน 1 สัปดาห์ จากนั้นนำไประเหยเมทานอลออกและละลายสารสกัดด้วยน้ำและสกัดสารที่ต้องการออกจากเฟสน้ำด้วยเอทิลอะซิเตท และนำส่วนของเอทิลอะซิเตทไปแยกสารสำคัญให้บริสุทธิ์ด้วย CPC

ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์พบว่าได้ % yield (สมุนไพรเริ่มต้น 2.14 kg) ของสาร Aromadendrin-3 -O- β -D-glucopyranoside, trans-Piceid, Catechin, Resveratrol และ Engletin เท่ากับ 46.6mg, 13.5 mg, 42.0 mg, 13.9 mg และ 17.6 mg ตามลำดับ ให้ความบริสุทธิ์ของสารเท่ากับ 95%, 85%, 90%, 90% และ 95% ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Jeon และคณะ จะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างก่อนนำสารสกัดหยาบไปแยกให้บริสุทธิ์ต้องผ่านหลายขั้นตอน โดยแผนภาพการเตรียมตัวอย่างแสดงดังภาพประกอบ 35 นอกจากนี้ความบริสุทธิ์ที่ได้ของการแยกสาร $\leq 95\%$



ภาพประกอบ 35 แสดงขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรก่อนนำไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วย CPC

ที่มา: (114)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- Analytical balance 0.001 g (Mettler Toledo, Switzerland)
- Analytical balance 0.00001 g (Sartorius, Germany)
- Autoclave (Sanyo, Japan)
- Autopipette (Brand, Germany)
- Biohazard laminar flow hood (Labconco, USA)
- Centrifugal partition chromatography (CPC-250)
- Centrifuge (Hettich, Germany)
- CO₂ incubator (Thermo, USA)
- Controller pipette (Gilson, USA)
- Electrophoresis system (Bio-Rad, USA)
- Light microscope (Nikon, Japan)
- LI-COR C-Digit chemiluminescence western blot scanner & Image Studio Lite software (LI-COR, Lincoln, NE, USA)
- LC-MS/MS: Shimadzu Corporation, KYOTO, Japan. The LC-MS/MS comprises with Column Oven: CTO-20A, Autosampler: SIL-20ACXR, Pump: LC-20ADXR, Degasser unit: DGU-20A3R, Valve unit: FCV-20AH2, Detector: LCMS-8040
- LCMS-9030, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
- Microplate reader (Thermo, Finland)
- Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer (JNM-ECZ500R/S1 spectrometer, JEOL Corporation, KYOTO, Japan)
- Stainless kitchen blender (Electrolux, Sweden)
- Temperature control centrifuge (Eppendorf, Germany)
- UHPLC Nexera system (Shimadzu Corporation, KYOTO, Japan)
- Ultrasonic bath (Bandelin/ Bandelin Electronic GMBH&CO KG/Germany)
- Vacuum evaporator (GeneVac, England)

3.2 วัสดุ

- Avantor ACE 5 μ m, C18 (150×4.6 mm) Column (VWR, UK)
- Conical tube (Corning Inc., USA)
- Guard column, C18 (4.0 x 2 mm, 5 μ m) (Phenomenex, USA)
- Nylon syringe filter (Sigma, USA)
- Rectangular cell culture flask (Corning Inc., USA)
- Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck, Germany)
- Phenomenex Luna C18, (100 x 2 mm, 3 μ m) Column (Phenomenex, USA)
- Shim-pack Velox,SP-C18, 1.8 μ m (2.1×100 mm) Column (Shimadzu Corporation, KYOTO, Japan)
- 6 well plate (Corning Inc., USA)
- 96 well plate (Corning Inc., USA)
- Pipette tip (Gilson, USA)

3.3 สารเคมี

- Acetonitril (ACN) (Merck, Germany)
- Ammonium persulfate (Sigma, USA)
- Ascorbic acid (Sigma, USA)
- Cell lines A549 (ATCC CCL-185, Manassas, VA, USA)
- Cell lines H1975 (ATCC CRL-5908, Manassas, VA, USA)
- Cell lines MRC5 (ATCC CCL-171, Manassas, VA, USA).
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) analytical grade (Merck, Thailand)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) molecular grade (Sigma, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA)
- Dichloromethane (DCM) (Merck, Germany)
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA)
- Ethanol (EtOH) (Merck, Germany)
- Ethyl acetate (EA) (Merck, Germany)
- Fetal bovine serum (Gibco, USA) - Glycerol (Sigma, USA)
- Fomic acid (Merck, Germany)

- Gefitinib (Sigma, USA)
- Glycine (Sigma, USA)
- n-Hexane (Merck, Germany)
- Lowry protein assay solution (Bio-RAD, USA)
- Methanol (MeOH) (Merck, Germany)
- β -mercaptoethanol (Sigma, USA)
- Osimertinib (Cayman Chemical, USA)
- Pinostrobin (National Institute of Metrology, Thailand)
- Panduratin A (TLC Pharmaceutical Standards, Canada)
- Penicillin-streptomycin (Gibco, USA)
- Primary antibodies (Cell Signaling, USA)
 - Beta Actin rabbit monoclonal antibody
 - Phospho-AKT rabbit monoclonal antibody
 - Total-AKT rabbit monoclonal antibody
 - Phospho-EGFR rabbit monoclonal antibody
 - Total-EGFR rabbit monoclonal antibody
 - Phospho-STAT3 rabbit monoclonal antibody
 - Total-STAT3 rabbit monoclonal antibody
 - Phospho-AKT rabbit monoclonal antibody
 - Total-AKT rabbit monoclonal antibody
 - Phospho-AMPK rabbit monoclonal antibody
- Protease inhibitors (Sigma, USA)
- Protein assay kit (Bio-Rad, USA)
- RIPA lysis buffer (Thermo scientific, USA)
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (Gibco, USA)
- Secondary antibody (Cell Signaling, USA)
 - Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody
- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS) (EM science, USA)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)

- Tris base (Vivantis, USA) - Triton X-100 (Sigma, USA)
- N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) (Sigma, USA)
- 0.25% Trypsin/EDTA (Gibco, USA)
- Tween 20 (Sigma, USA)
- 0.4% Trypan blue dye (Sigma, USA)
- Western horseradish peroxidase substrate (Merck, Germany)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาวด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย โดยเป้าหมายของการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ ต้องเป็นสภาวะที่สามารถสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอออกจากกระชายขาวได้มากในขณะที่สกัดสารอื่นที่ไม่ต้องการออกมาน้อย โดยปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ขนาดของผงแห้งกระชายขาว ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหนักสมุนไพร เวลาที่ใช้ในการสกัดและจำนวนครั้งในการสกัดซ้ำ โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารที่สกัดได้ด้วยเครื่อง UHPLC ซึ่งวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ผ่านการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ตามมาตรฐาน AOAC guideline แล้ว ซึ่งขั้นตอนการศึกษามีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

3.4.1.1 การเตรียมสมุนไพร

1. นำชิ้นส่วนแห้งกระชายแห้งมาบดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า
2. ร่อนสมุนไพรที่บดละเอียดด้วยกระแกรกร่อนขนาด 40 และ 120 เมช เพื่อให้ขนาดผงมีความละเอียดสม่ำเสมอขนาด 4.76 mm และ 125 μ m ตามลำดับ หลังจากนั้นเก็บในถุงพลาสติกปิดมิดชิด



ภาพประกอบ 36 เหง้ากระชายขาวแห้ง

3.4.1.2 ขั้นตอนการสกัดสมุนไพร

1. การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (ultrasound-assisted extraction) ร่วมกับการแช่สกัด (maceration extraction) โดยชนิดตัวทำละลายที่ศึกษา ได้แก่ MeOH, EtOH, DCM EA และ เฮกเซน

2. ชั่งผงกระชายปริมาณ 1 กรัม ใส่ตัวทำละลายที่ต้องการศึกษาในข้อ 1 โดยอัตราส่วนผงกระชายต่อตัวทำละลายในช่วงที่ศึกษา คือ 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 จากนั้นคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3. นำไปสกัดโดย sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic bath ที่อุณหภูมิในช่วงที่ศึกษา คือ 30-40, 40-50, 50-60 และ 60-70 °C ในช่วงเวลาที่ศึกษา คือ 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารสกัดไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) โดยไม่ใช้อุณหภูมิ นำผงกระชายเดิมมาสกัดซ้ำด้วยวิธีเดิม 2 รอบ

4. นำสารสกัดหยาบซึ่งน้ำหนักเพื่อนำไปคำนวณ % yield และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-8 องศาเซลเซียส

$$\% \text{ yield} = (\text{น้ำหนักของสารสกัด} / \text{น้ำหนักของผงกระชาย}) \times 100$$

3.4.1.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอด้วยเทคนิค UHPLC

1. ละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO และเจือจางด้วย MeOH ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน คือ 0.313-20.000 $\mu\text{g/ml}$ จากนั้นกรองด้วย syring filter ขนาด 0.2 ไมครอนและฉีดเข้าเครื่อง UHPLC

2. สภาวะของการวิเคราะห์สารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอมีรายละเอียด ดัง

ตาราง 9

ตาราง 9 สภาวะของการวิเคราะห์สารด้วยเทคนิค UHPLC

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์	UHPLC		
สารสำคัญ	พิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอ		
ช่วงที่ใช้ในการวิเคราะห์	0.313-20.000 $\mu\text{g/ml}$		
คอลัมน์และการัดคอลัมน์	Avantor ACE 5 μm , C18 (150×4.6 mm) และ Phenomenex C18, (4.0 x 2.0 mm)		
เฟสเคลื่อนที่ (Gradient elution)	0.1% Formic acid in 20 mM ammonium formate / ตัวทำละลายผสมระหว่าง ACN และ MeOH อัตราส่วน, 50:50 v/v) โดยมีอัตราส่วน ดังนี้		
	Time (min)	Command	Value
	0.01	Conc.(pump B)	75
	4.50	Conc.(pump B)	75
	5.00	Conc.(pump B)	90
	8.00	Conc.(pump B)	85
	8.50	Conc.(pump B)	75
	11.00	Controller	Stop
อัตราการไหล	1 ml/นาที		
ตัวตรวจวัด	UV detector ที่ 290 nm		
ปริมาตรในการฉีด	5 μl		
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C		
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	11 นาที		

ที่มา: (23)

3.4.2 การศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดกระชายขาวด้วยเทคนิค CPC

ในการศึกษานี้ต้องการหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ โดยเป้าหมายของการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของระบบการเลือกเฟสคงที่และเฟสเคลื่อนที่ คือ ระบบตัวทำละลายต้องให้ค่า KD ของสารอยู่ในช่วง 0.2-5 และค่า $\alpha > 1.5$ จากนั้นนำระบบตัวทำละลายที่ได้ค่า KD และ α ที่เหมาะสม ไปใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ในระบบการแยกสารด้วยเครื่อง CPC โดยเป้าหมายของการเลือกสภาวะที่เหมาะสม คือ ได้ผลผลิตในปริมาณมากและสารที่แยกได้ต้องให้ค่าความบริสุทธิ์ $> 98\%$ ซึ่งการวิเคราะห์หาค่าความบริสุทธิ์ใช้เทคนิค LC-MS/MS ซึ่งผ่านการทดสอบ method validation ตามมาตรฐาน AOAC guideline แล้ว โดยการศึกษา มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

3.4.2.1 การศึกษาระบบเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ที่เหมาะสมจากการหาค่า Partition Coefficient (K) และค่า separation factor(α)

1. เลือกระบบตัวทำละลายที่ต้องการ ซึ่งได้ศึกษาระบบตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน, MeOH, EA และน้ำ จากนั้นผสมตัวทำละลายแต่ละชนิดตามสัดส่วนที่กำหนดในระบบ Arizona ดังภาพประกอบ 32 โดยศึกษาที่ system S, T, U, V, W และประยุกต์จากระบบ Arizona โดยศึกษาระบบตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน, MeOH และน้ำ ที่อัตราส่วน 5/3.2/1.8, 5/3.3/1.7, 5/3.4/1.6 และ 5/3.5/1.5 v/v จากนั้นเขย่าให้สารผสมเข้ากัน

2. ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น ปิดเปิดปริมาตรของสารทั้งเฟสบนและล่างใส่ลงในขวดใหม่ในปริมาตรอย่างละ 500 μ l จากนั้นเติมตัวอย่างสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 mg ปริมาตร 1 μ l แล้วเขย่าเพื่อให้ตัวอย่างกระจายในระบบ 2 เฟส ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้น

3. ปิดเปิดสารแต่ละเฟสมาวิเคราะห์สารทั้งเฟสบนและเฟสล่างแยกกันด้วย UHPLC ตามสภาวะที่กำหนดในตาราง 9 จากนั้นนำค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสบนและเฟสล่างไปหาค่า KD และ α โดยโหมดในการแยกด้วย CPC ในการศึกษา ใช้ ascending mode ดังนั้นสูตรที่ใช้ในการคำนวณค่า KD และ α คือ

$$KD = \text{ค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสล่าง} / \text{ค่าพื้นที่ใต้พีคของเฟสบน}$$

$$\alpha = KD_1 / KD_2, \text{ โดยค่า } KD_1 > KD_2$$

3.4.2.2 การศึกษาการแยกสารด้วย CPC

1. เมื่อได้ชนิดตัวทำละลายและอัตราส่วนที่เหมาะสมแล้วนำตัวทำละลายต่างๆ มาผสมกันในกรวยแยก (Separatory funnel) ขนาด 2 ลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายแยกออกเป็น 2 ชั้น ใสตัวทำละลายส่วนล่างใส่ขวด duran ขนาด 1 ลิตรเพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ส่วนตัวทำละลายส่วนบนใส่ขวด duran ขนาด 1 ลิตรสำหรับใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่

2. เตรียมตัวอย่างสารสกัด Hexane โดยละลายด้วยตัวทำละลาย EA ให้ได้ความเข้มข้น 0.7 g/ml และ 1 g/ml จากนั้นศึกษาปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ คือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ml ลงในหัวเจ็จจางตัวอย่าง ซึ่งได้ศึกษาหัวเจ็จจางตัวอย่าง 2 รูปแบบ ได้แก่ สารผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ อัตราส่วน 3.5 ml/3.5 ml และสารผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่และ MeOH อัตราส่วน 3.5 ml/ 3.5 ml

3. กรองตัวอย่างด้วย syring filter ขนาด 0.45 ไมครอนและฉีดเข้าเครื่อง CPC โดยสภาวะที่ใช้ในการแยกของเครื่อง CPC มีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 10 สภาวะที่ใช้ในการแยกสารของเครื่อง CPC

พารามิเตอร์	สภาวะที่ใช้
เครื่อง	CPC
ตัวอย่าง	สารสกัด Hexane จากกระชายขาว
โหมดการแยก	Ascending mode (normal phase)
เฟสเคลื่อนที่	เฟสบนของระบบตัวทำละลาย
เฟสคง	เฟสล่างของระบบตัวทำละลาย
อัตราการไหล	10 ml/min
อัตราการหมุน	2000 rpm
ตัวตรวจวัด	UV detector ที่ความยาวคลื่น 220, 230, 280, 285 nm และ scan ช่วง 200-600 nm

ที่มา: (111)

4. นำ fraction ของสารที่ได้จากการแยกด้วยเครื่อง CPC ปริมาตรแต่ละ fraction คือ 10 ml ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุนเหวี่ยง (rotary evaporator) โดยไม่ใช้ความร้อน

5. ระบายตัวทำละลายให้เหลือประมาณ 1 ml สารจะเริ่มเกิดผลึก จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้สารเกิดผลึกเต็มที่

6. เมื่อตัวทำละลายระเหยหมด เก็บผลึกและละลายผลึกกลับด้วยเมทานอลเพื่อทำการตกผลึกซ้ำ จากนั้นนำผลึกที่ได้ไปชั่งและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

3.4.2.3 วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอด้วยเทคนิค LC-MS/MS

1. ละลายสารตัวอย่างด้วย MeOH ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน กรองด้วย syring filter ขนาด 0.2 ไมครอนและฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

2. สภาวะของการวิเคราะห์สารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอมีรายละเอียดดังนี้

ตาราง 11 สภาวะของการวิเคราะห์สาร

เทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์	LC-MS/MS					
ช่วงของกราฟมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์	PN=78.13 - 2,500.00 ng/ml PA=15.63- 500.00 ng/ml					
คอลัมน์และการ์ดคอลัมน์	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μ m (3.0×50mm), Phenomenex C18, (4.0 x 2.0 mm)					
เฟสเคลื่อนที่	0.2% Formic acid : ACN อัตราส่วน, 25:75, v/v), พาสารด้วยระบบ isocratic					
อัตราการไหล	0.5 ml/นาที					
MS interface	ESI					
Heat Block temperature	450 °C					
DL temperature	270 °C					
	m/z	Dwell time	Q1	CE	Q3	
MRM	PN	271.20>167.05	100.0	-10.8	-22.1	-18.1
	PA	405.35>166.20	100.0	18.1	27.1	29.7
ปริมาตรในการฉีด	2 μ l					
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C					

3.4.3 การทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

เตรียมสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากกระชายขาว สารสกัดบริสุทธิ์พินอสโตรบินและแพนดูราตินเอเพื่อทดสอบ method validation ซึ่งหัวข้อและเกณฑ์การยอมรับที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อ้างอิงตาม AOAC guidelines (115) ดังนี้

3.4.3.1 เตรียม stock สารละลายมาตรฐาน: ชั่งสารมาตรฐานพินอสโตรบินและแพนดูราตินเออย่างละ 10 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วย Methanol จนครบ 10 ml (Stock 1 mg/ml)

3.4.3.2 เตรียมสารละลายตัวอย่าง

ตัวอย่างสารสกัดหยาบ: ชั่งสารสกัดหยาบและละลายด้วย DMSO 1 ml จากนั้นเจือจางด้วย MeOH ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างสารบริสุทธิ์: ชั่งตัวอย่างสารบริสุทธิ์พินอสโตรบินและแพนดูราตินเอแต่ละชนิดแยกกันและละลายด้วย MeOH ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐาน

3.4.3.3 หัวข้อในการทดสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์มีดังนี้

1) System suitability: วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานซ้ำ 6 ครั้ง พิจารณาค่า N, Resolution, Tailing factor, %RSD ของ retention time, %RSD ของ peak area ของสาร โดยเกณฑ์การยอมรับแสดงในตาราง 16

ตาราง 12 เกณฑ์การยอมรับการทดสอบ System suitability

พารามิเตอร์	เกณฑ์การยอมรับ (Acceptance criteria)
%RSD	≤ 2
Resolution	> 2
Tailing factor	≤ 2
Theoretical plate (N)	> 2000

ที่มา: (115)

2) Specificity: ชั่งสารละลายมาตรฐาน สารตัวอย่างและตัวทำละลายตัวอย่าง จากนั้นเปรียบเทียบค่า retention time ที่ได้

3) Linearity : เตรียมกราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอแต่ละจุด ความเข้มข้นจาก stock ของสารมาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/ml ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้

3.1) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UHPLC ความเข้มข้นของสารพินอสโตบินและแพนดูราดินเอที่เตรียมเท่ากับ 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 µg/ml

3.2) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ความเข้มข้นของสารพินอสโตบินที่เตรียมเท่ากับ 78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250 และ 2500 ng/ml และความเข้มข้นของสารแพนดูราดินเอ เท่ากับ 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 ng/ml

3.3) จากนั้นนำผลที่ได้หาสมการเส้นตรง ซึ่งต้องได้ค่า $R^2 > 0.995$ ทำซ้ำ 3 เส้น

4) Precision: เตรียมตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ โดยทำซ้ำ 3 วัน ซึ่งความเข้มข้นของตัวอย่างที่เตรียมโดย สารสกัดหยาบเตรียมที่ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 25 µg/ml ส่วนสารบริสุทธิ์ของพินอสโตบินให้เตรียมที่ความเข้มข้น 500 ng/ml และสารบริสุทธิ์ของแพนดูราดินเอให้เตรียมที่ความเข้มข้น 250 ng/ml พิจารณาค่า %RSD ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC guideline ดังแสดงในตาราง 13

ตาราง 13 เกณฑ์การยอมรับความแม่นยำในการทำซ้ำตามมาตรฐาน AOAC guideline

ความเข้มข้น	%RSD
100 %	2
10%	3
1%	4
0.1%	6
0.01%	8

ที่มา: (115)

5) Accuracy: ใช้ sample ที่ใช้วิเคราะห์ปกติ ทำการเจือจางตัวอย่างลงเพื่อเติมสารละลายมาตรฐานลงไปให้ได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 0.65, 2.5 และ 10 µg/ml (สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดเฮกเซนด้วย UHPLC) และเท่ากับ 220, 1,120 และ 2,000 ng/ml (สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างพินอสโตรบินบริสุทธิ์ด้วย LC-MS/MS) และเท่ากับ 25, 125 และ 300 µg/ml (สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างแพนดูราดินเอบริสุทธิ์ด้วย LC-MS/MS โดยความเข้มข้นรวมที่เตรียมต้องไม่เกินช่วงของกราฟมาตรฐาน พิจารณาค่า %RSD ต้องผ่านเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC guideline ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 เกณฑ์การยอมรับความถูกต้องของการวิเคราะห์ตามมาตรฐาน AOAC guideline

ความเข้มข้น	%Recovery
100 %	98-101
10%	95-102
1%	92-105
0.1%	90-108
0.01%	85-110

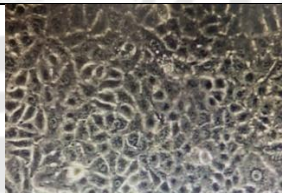
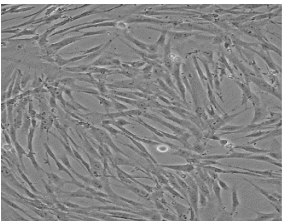
ที่มา: (115)

3.4.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติของสารพินอสโตรบินและแพนคูราทินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยเทคนิค MTT

3.4.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

เซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ที่ใช้ในการทดลองถูกเลี้ยงในตู้ incubator ที่ 37 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ มีรายละเอียด ดังนี้

ตาราง 15 เซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ปกติที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเซลล์	ชนิดเซลล์	รูปร่างเซลล์	อาหารเลี้ยงเซลล์
A549 (doubling time 22 hr)	epithelial cell		RPMI1640 เติมด้วย 10% FBS และ 100 units/mL penicillin และ 100 µl/mL streptomycin
H1975 (doubling time (30.531±1.823hr)	epithelial cell		RPMI1640 เติมด้วย 10% FBS และ 100 units/mL penicillin และ 100 µl/mL streptomycin
MRC-5 (doubling time 42 -46 hr)	fibroblast cells		DMEM เติมด้วย 10% FBS และ 100 units/mL penicillin และ 100 µl/mL streptomycin

ที่มา: (116, 117)

3.4.4.2 ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งปอด A549 และ H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ด้วยวิธี MTT

1) เพาะเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plates ที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 3×10^3 cells/well สำหรับเซลล์ A549 และ 5×10^3 cells/well สำหรับเซลล์ H1975 และ MRC5

2) นำเซลล์ไป incubate ที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) เมื่อครบเวลาเปิดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุมและเติมสารสกัดที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นสูงสุด ทำของ DMSO 0.2 % และความเข้มข้นสุดท้ายของสารฟิโนสโตบินและแพนดูราตินเอเท่ากับ 2.5, 5, 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นนำเซลล์ไป incubate ที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) ปิเปตสารละลาย 5 mg/ml MTT (คือ MTT 5 mg ละลายใน PBS 1 ml) ปริมาตร 10 μl ลงไปในแต่ละหลุม นำไปเลี้ยงต่อที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

5) ดูดสารละลาย MTT ออกให้หมด และละลายผลึกฟอมาซานด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วมาคำนวณหา % cell viability ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ sample} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ control} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank}}$$

7) นำค่า IC_{50} ของ normal cells และ IC_{50} ของ cancer cells มาคำนวณหาค่าดัชนีความจำเพาะมีสูตรดังนี้

$$\text{Selective index (SI)} = \text{IC}_{50} \text{ ของ normal cells} / \text{IC}_{50} \text{ ของ cancer cells}$$

ค่า SI ที่สูงจะแสดงถึงประสิทธิภาพและปลอดภัยของสารทดสอบต่อเซลล์

8) คำนวณหาค่า % cell viability และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า % cell viability กับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบเพื่อหาค่า IC_{50} โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8 และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA)

3.4.5 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ Western blotting

3.4.5.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ A549 และ H1975 ใน 6-well plate ที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2×10^5 cells/well และ 3×10^5 cells/well ตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไป incubate ที่ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.5.2 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทดสอบเซลล์ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$

3.4.5.3 หลังจากทดสอบเซลล์ครบ 24 ชั่วโมงให้ทำการสกัดโปรตีน โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1) ล้างเซลล์ด้วย PBS ที่แช่เย็น 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ml
- 2) เติม RIPA lysis buffer ปริมาตร 200 μl ที่มีสาร protease inhibitor (ป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์)
- 3) นำเซลล์ไป incubate ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
- 4) ทำการแยกเก็บ cell lysates โดย centrifuge ที่ 1,4000 rpm (4°C) เป็นเวลา 15 นาที

5) ดูดสารส่วน supernatant วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry และใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

6) หลังจากนั้นแยกโปรตีนที่สกัดได้ (ความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้เท่ากับ 20 $\mu\text{g/well}$) ออกตามขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า โดยใช้ 10 % gel SDS-PAGE และถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรน PVDF โดยใช้ semi-dry blotter

7) นำ PVDF membranes ไปทำการ blocking เพื่อป้องกันการเกิด non-specific หรือป้องกันไม่ให้โปรตีนอื่นๆเข้ามาจับกับแผ่นเมมเบรน โดยจะทำการ blocking เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงด้วย 5% non-fat dry milk (NFDM) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะจับบนที่ว่างของแผ่นเมมเบรน ยกเว้นบริเวณที่มีโปรตีนจับอยู่แล้ว จากนั้นนำไป incubate กับ antibody ที่มีความจำเพาะ ได้แก่ p-EGFR, t-EGFR, p-Akt, t-Akt, p-STAT3, t-STAT3, p-AMPK หรือ β -actin (1:1000 dilution, cell signaling, USA) ที่ 4°C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

8) เมื่อครบเวลาล้างเมมเบรนด้วย 1X TBS-T และเติม antibody ตัวที่ 2 (1:3000 dilution, Cell signaling, USA) จากนั้น incubate 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาล้างเมมเบรนด้วย 1X TBS-T

9) ตรวจวัดโปรตีนโดยการใช้น้ำสารจับแสงตรงหน้าไปราดบนแผ่นเมมเบรนให้ทั่ว ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที และนำแผ่นเมมเบรนไปวัดความเข้มของแถบโปรตีน (band intensity) ด้วยเครื่อง LI-COR C-Digit chemiluminescence western blot scanner โดยใช้โปรแกรม Image Studio Lite software ในการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกย้อมสีและเรืองแสง Chemiluminescent

10) วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance, ANOVA จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

3.4.6 การตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.6.1 เตรียมและละลายสารฟิโนสโตรบินให้ได้ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml แพนดูราทินเอที่ความเข้มข้น 20,40,60,80,100,120,140 µg/ml และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8,10,12 µg/ml ด้วยเมทานอล

3.4.6.2 เตรียมสาร DPPH ในเมทานอลที่ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ± ความเข้มข้นของสารจากการวัดค่าดูดกลืนแสงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 ในปริมาตร 200 µl / well

3.4.6.3 นำสารละลายที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับ DPPH ในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาตรทั้งหมด 200 µl / well เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเป็น 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml สำหรับฟิโนสโตรบิน 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 µg/ml สำหรับแพนดูราทินเอ และ 1, 2, 3, 4, 5, 6 µg/ml สำหรับกรดแอสคอร์บิก (และบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

ตาราง 16 ปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบในแต่ละตัวอย่าง

	DPPH (µl)	Methanol (µl)	สารที่ทดสอบ (µl)	Ascorbic acid (µl)
Negative control	100	100	-	-
Positive control	100	-	-	100
Sample	100	-	100	-

3.4.6.4 ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยประเมินด้วยสีของสารละลาย DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณดังสมการ

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง} \times 100}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ blank}}$$

3.4.6.5 วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance, ANOVA จากโปรแกรม GraphPad Prism 8

3.4.7 การศึกษา Molecular docking

3.4.7.1 หลังจากได้ผลการวิเคราะห์สารสำคัญและได้ข้อมูลการแสดงออกของโปรตีนแล้ว ให้นำโปรตีนเป้าหมายและลิแกนด์ที่ได้มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างของลิแกนด์กับโปรตีนที่สนใจ เพื่อนำมาใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสำคัญกับโปรตีนเป้าหมายโดยใช้โปรแกรม autodock 4.2.1 และวิเคราะห์ผลการ docking ด้วยโปรแกรม Discovery Studio 2021

3.4.7.2 โปรตีนที่ใช้ในการศึกษามี PDB ID : 5FED (EGFR wild type), EGFR mutant (5HG7), 1BG1 (STAT3), 4GV1 (Akt), 4CFE (AMPK), 6DGT (PI3K) ซึ่งสามารถดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติ ซึ่งโครงสร้างของโปรตีนเป็นแบบ quaternary structures ได้จาก Protein Data Bank เว็บไซต์ www.rcsb.org/pdb โดยใส่ PDB ID ของโปรตีนลงในช่องค้นหา แล้วกด Site Search โดยโครงสร้างจะมี ligand จับอยู่ในโครงสร้างของโปรตีน target จากนั้นทำการ save file จะได้ไฟล์ชื่อ pdb ยังไม่สามารถใช้ในการทำ autodock ได้ ดังนั้นต้องทำการเตรียมไฟล์ใหม่ให้เป็น file แยกระหว่าง ligand และ protein และ save ให้เป็น file pdb

3.4.7.3 เตรียม Grid เพื่อทำการปรับขอบเขตของกล่องให้ครอบคลุมส่วนของ active site และนำ file pdbqt และ gpf เพื่อนำไป run docking

3.4.7.4 เตรียม ligand จนได้ file pdbqt และ dpf เพื่อนำไป run docking

3.4.7.5 ทำการ redocking ระหว่าง protein-ligand ตัวเดิม เข้าไปใหม่เพื่อตรวจสอบว่า ligand ตัวเดิมยังสามารถเข้าไปในตำแหน่งเดิมได้หรือไม่ หากเข้าไปจับได้หรือจับได้ที่ตำแหน่งเดิมแสดงว่า grid box และค่าพารามิเตอร์ที่เรากำหนดมีความถูกต้อง จะทำให้ได้ค่า RMSD ไม่เกิน 2 °A จึงสามารถนำไฟล์ protein target ไปใช้ run docking กับ compound ในที่เราต้องการศึกษาได้

3.4.7.6 ขั้นตอนการเตรียม compound ของสารพินอสโตบินและแพนดูราตินเอ

3.4.7.7 โหลดไฟล์ของ compound จากเว็บไซต์ pubchem จากนั้นเตรียม ligand

3.4.7.8 นำ file ของแต่ละ ligand มาทำการ docking กับ protein target แต่ละตัว ที่ผ่านการ redocking แล้ว

3.4.7.9 ผลจากการ run จะแสดงค่าออกมาเป็น binding energy จากการ run 50 รอบ ซึ่งค่า binding energy ระหว่าง target-ligand น้อย แสดงให้เห็น ligand สามารถจับกับ target ได้โดยใช้ binding energy ต่ำ ยิ่งต่ำมากยิ่งแสดงถึงศักยภาพในการจับของ target-ligand ว่าจับกันได้ดี มีแนวโน้มว่า compound ที่ศึกษาสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนในโรคมะเร็ง ได้

ตาราง 17 พารามิเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารกับโปรตีนเป้าหมาย

พารามิเตอร์	
Number of GA run	50
Population size	300
Maximum number of energy evaluations	2,500,000
Maximum number of generation	27,000
Maximum number of top individuals that automatically survive	1
Rate of gene mutation	0.02
Rate of crossover	0.8
Mean of Cauchy distribution for gene mutation	0.0
Variance of Cauchy distribution for gene mutation	1.0
Number of generation for picking worst individual	10

บทที่ 4

ผลการวิจัย

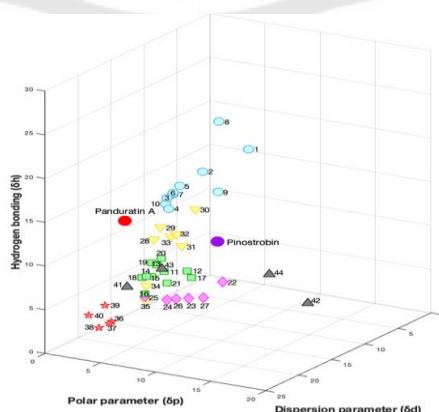
4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิคคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลาย โดยพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอออกจากผงกระชายได้มากในขณะที่ยังคงสารที่ไม่ต้องการได้น้อย ซึ่งปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ขนาดของผงแห้งกระชายขาว ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อน้ำหนักสมุนไพร เวลาที่ใช้ในการสกัดและจำนวนครั้งในการสกัดซ้ำ นอกจากนี้ได้ทำนายความสามารถของชนิดตัวทำละลายและอุณหภูมิในการละลายสารสำคัญออกจากผงกระชายตามทฤษฎีการละลายของเฮนเซนเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลอง ซึ่งผลการทดสอบแสดงรายละเอียด ดังต่อไปนี้

4.1.1 ผลการศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

4.1.1.1 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมตามทฤษฎีของเฮนเซน

จากการนำชนิดของตัวทำละลายที่มีอยู่ในฐานข้อมูลค่าการละลายตามทฤษฎีของเฮนเซนมาคำนวณพารามิเตอร์ค่าการละลายต่อการละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอ สามารถแสดงภาพรวมของค่าการละลายของสารแต่ละชนิดได้ดังภาพประกอบ 37 ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวทำละลายในกลุ่ม Alcohols, Ketones, Ethers, Esters, Hydrocarbon Haloalkane, Nitrile และ Sulphone อยู่ในโซนที่สามารถละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอได้



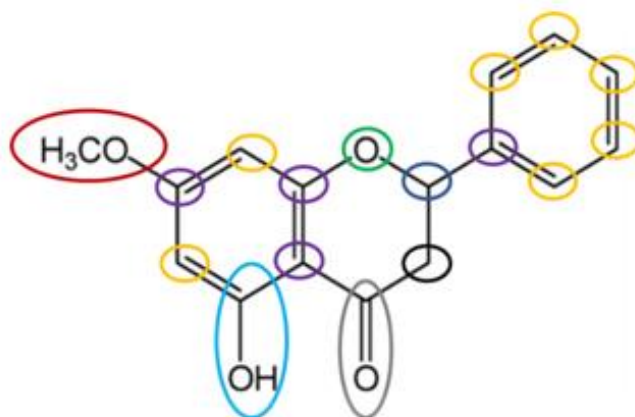
ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงค่าการละลายของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ตามทฤษฎีของเฮนเซน

ตาราง 18 ประเภทของตัวทำละลาย

ประเภทของตัวทำละลาย	
Alcohols  1. Methanol 2. Ethanol 3. 1-Butanol 4. 2-Butanol 5. 1-Propanol 6. 2-Propanol 7. Isobutanol 8. Ethyl glycol 9. Dipropylene Glycol 10. t-Butyl Alcohol	Ketones  22 Acetone 23 Methyl Propyl Ketone 24 Methyl iso-Amyl Ketone 25 Di-isoButyl Ketone 26 Methyl Iso-Butyl Ketone (MIBK) 27 Methyl Ethyl Ketone (MEK)
Esters  11. Ethyl acetate 12. Methyl acetate 13. n-Propyl acetate 14. n-Butyl Acetate 15. t-Butyl Acetate 16. Methyl Oleate 17. Butyl Glycol Acetate 18. n-Amyl Acetate 19. sec-Butyl Acetate 20. Iso-Propyl Acetate 21. n-Butyl Propionate	Ethers  28 Propylene Glycol Phenyl Ether 29 Ethylene Glycol Monobutyl Ether 30 Ethylene Glycol Monomethyl Ether 31 Diethylene Glycol Monobutyl Ether 32 Propylene Glycol Monomethyl Ether 33 Dipropylene Glycol Methyl Ether 34 Diethyl Ether 35 Iso-Propyl Ether
	Hydrocarbon  36. Hexane 37. Heptane 38. Cyclohexane 39. Xylene 40. Benzene
	Others (Haloalkane/Nitrile/Sulphone)  41 Dichloromethane 42 Acetonitrile 43 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 44 N,N-Dimethyl Formamide (DMF)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาตัวทำละลายที่สามารถใช้ในการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดราทินเอได้ดี โดยใช้ค่าพารามิเตอร์การละลายของแฮนเซนทำนายความสามารถในการละลาย แต่เนื่องจากสารฟิโนสโตรบินและแพนดราทินเอไม่สามารถหาค่าการละลายได้โดยตรง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกวิธีหาค่าการละลายจากการคำนวณค่าการละลายของสารอนุพันธ์จากค่าพารามิเตอร์การละลายแบบ 3 มิติ ได้แก่ ค่าการละลายของแรงลอนดอน (δ_d) ซึ่งจะคิดจากแรงลอนดอน หรือ Dispersion Force ซึ่งเป็นแรงภายในโมเลกุลที่พบได้ทั่วไปของสารที่ไม่มีขั้ว หรือโมเลกุลที่อยู่ในรูปทรงสมมาตรมีความแข็งแรงต่ำ ค่าการละลายต่อมา คือ ค่าการละลายของแรงดึงดูดระหว่างขั้ว (δ_p) หรือ Dipolar Intermolecular Force เป็นพลังงานที่คิดจากแรงดึงดูดระหว่างขั้วที่อยู่ภายในโมเลกุลกระทำกันทำให้รูปทรงของโมเลกุลนั้นไม่สมมาตร และสุดท้ายคือค่าการละลายของพันธะไฮโดรเจน (δ_h) หรือ The Energy From Hydrogen Bond เป็นพลังงานของสารที่มีหมู่ฟังก์ชันซึ่งสามารถให้และรับโปรตอน โดยหมู่ที่สามารถให้ไฮโดรเจนได้นั้น ส่วนมากจะเป็นหมู่ที่มีไฮโดรเจนจับอยู่กับอะตอมของฟลูออรีน ออกซิเจนและไนโตรเจน ซึ่งผลการคำนวณเพื่อทำนายความสามารถในการละลายสารฟิโนสโตรบินและแพนดราทินเอ พบว่าตัวทำละลายที่สามารถละลายสารฟิโนสโตรบินได้มากที่สุด คือ Dichloromethane > EtOH > MeOH > Ethyl acetate > Hexane และตัวทำละลายที่สามารถละลายสารแพนดราทินเอได้มากที่สุด คือ Dichloromethane > EtOH > Ethyl acetate > MeOH > Hexane ซึ่งผลการนำอนุพันธ์ในโครงสร้างสารมาคำนวณดังนี้

1) สารฟิโนสโตรบิน

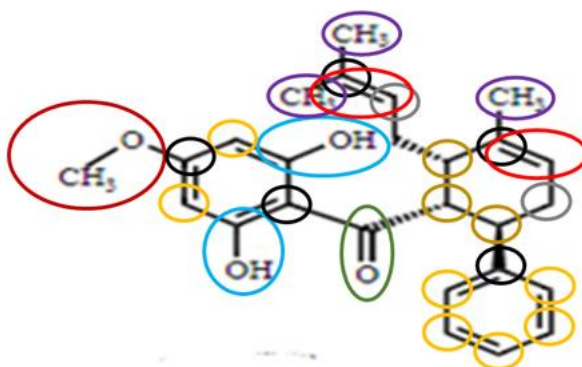


ภาพประกอบ 38 อนุพันธ์ในโครงสร้างของสารฟิโนสโตรบิน

ตาราง 19 ผลการคำนวณค่าการละลายของกลุ่มย่อยประเภท first-order และ second order สำหรับการทำนายค่าการละลายของสารพินอสโตรบิน

อนุพันธ์ใน โครงสร้าง	Ni	Ci			(NiCi)d	(NiCi)p	(NiCi)h
		δ_d	δ_p	δ_h			
First-order contribution							
ACOH	1	0.5228	1.101	6.958	0.5288	1.1010	6.9580
CH ₃ O	1	-	0.1764	0.146	-0.5828	0.1764	0.146
ACH	7	0.1105	-	-0.4305	0.7735	-3.7121	-3.0135
AC	4	0.8446	0.6187	0.0084	3.3784	2.4748	0.0336
O	1	0.0472	3.3432	0.0256	0.0472	3.3432	0.0256
-CH ₂	1	-	-	-0.4119	-0.0269	-0.3045	-0.4119
-CH<	1	0.645	0.6491	-0.2018	0.645	0.6491	-0.2018
>C=O	1	-	0.7905	1.8147	-0.4343	0.7905	1.8147
Second-order contribution							
AC-O-C	1	0.2568	0.8153	0.6092	0.2568	0.8153	0.6092
Ccyclic=O	1	-	0.4497	-0.4794	-0.2981	0.4497	-0.4794
C-O-C=C	1	0.2063	0.608	1.1344	0.2063	0.608	1.1344

2) สารแพนดูราทินเอ



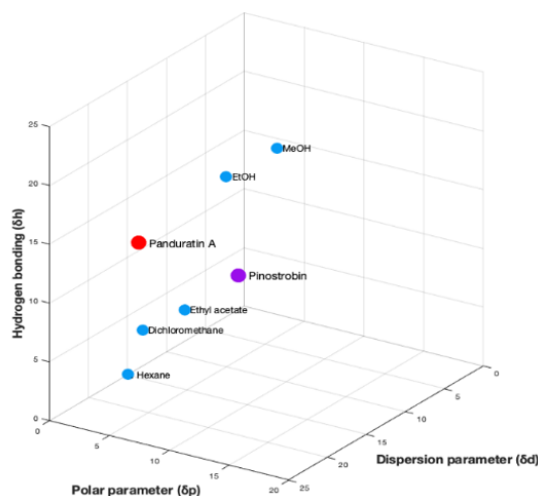
ภาพประกอบ 39 อนุพันธ์ในโครงสร้างของสารแพนดูราทินเอ

ตาราง 20 ผลการคำนวณค่าการละลายของอนุพันธ์กลุ่มย่อยประเภท first-order และ second order สำหรับการทำนายค่าการละลายของสารแพนดูราทินเอ

อนุพันธ์ในโครงสร้าง	Ni	Ci			(NiCi)d	(NiCi)p	(NiCi)h
		δ_d	δ_p	δ_h			
First-order contribution							
ACOH	2	0.5228	1.101	6.958	1.0576	2.2020	13.9160
CH ₃ O	1	-0.5828	0.1764	0.146	-0.5828	0.1764	0.146
ACH	7	0.1105	-0.5303	-0.4305	0.7735	-3.7121	-3.0135
AC	3	0.8446	0.6187	0.0084	2.5338	1.8561	0.0252
-CH ₃	3	-0.9714	-1.6448	-0.7813	-2.9142	-4.9344	-2.3439
-CH ₂	2	-0.0269	-0.3045	-0.4119	-0.0538	-0.6090	-0.8238
-CH<	3	0.645	0.6491	-0.2018	1.9350	1.9473	-0.6054
>C=O	1	-0.4343	0.7905	1.8147	-0.4343	0.7905	1.8147
CH=C<	2	0.5372	-0.9024	-1.8872	1.0744	-1.8048	-3.7744
Second-order contribution							
AC-O-C	1	0.2568	0.8153	0.6092	0.2568	0.8153	0.6092
CH3-C=	2	-0.0785	0.3316	0.3875	-0.157	0.6632	0.775

ตาราง 21 HSP parameters และค่า Ra ของตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่มีต่อสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอ ที่อุณหภูมิ 25 °C

สาร	HSP parameters (MPa ^{1/2})			Pinostrobin	Panduratin A
	δ_d	δ_p	δ_h	R _a (MPa ^{1/2})	R _a (MPa ^{1/2})
EtOH	15.8	8.8	19.4	13.86	11.79
MeOH	14.7	12.3	22.3	16.25	16.25
Dichloromethane	17.8	3.1	5.7	13.80	11.07
Ethyl acetate	15.8	5.3	7.2	16.46	12.53
Hexane	14.9	0	0	24.36	19.46
Pinostrobin	21.8170	13.7462	14.5942		
Panduratin A	20.8121	4.7453	14.7044		



ภาพประกอบ 40 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของเฮนเซนของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอกับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

4.1.1.2 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมตามการทดลอง

จากผลการสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอจากเหง้ากระชายขาวด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ พบว่าได้สารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นสูงสีน้ำตาล ยกเว้นสารสกัดจากเฮกเซนจะมีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีเหลืองดังภาพประกอบ 41 เมื่อนำสารสกัดหยาบของตัวทำละลายแต่ละชนิดไปวิเคราะห์ปริมาณสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอและคำนวณปริมาณสารสำคัญใน 1 กรัม พบว่าตัวทำละลายที่สามารถละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอได้มากที่สุดที่ขนาดผง 4.76 mm คือ MeOH ซึ่งไม่สอดคล้องตามทฤษฎีของเฮนเซน แต่เมื่อลดขนาดของผงกระชายเป็น 125 μm ตัวทำละลายที่สามารถละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอได้มากที่สุดคือ Dichloromethane ซึ่งสอดคล้องตามทฤษฎีของเฮนเซน จากผลการทดสอบสามารถสรุปผลได้ว่า MeOH มีขนาดโมเลกุลเล็กที่สุดทำให้สามารถแทรกตัวเข้าไปถึงโมเลกุลของสารสำคัญออกจากผงกระชายขนาด 4.76 mm ได้มากที่สุด และเมื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการสกัดสารโดยการลดขนาดของผงกระชายลงเป็น 125 μm ส่งผลให้ตัวทำละลายทุกชนิดสามารถแทรกตัวเข้าไปถึงโมเลกุลของสารสำคัญออกมาได้ดีขึ้นโดยเฉพาะตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำอย่างเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและเอทิลอะซิเตทซึ่งมีค่าความหนืดเท่ากับ 0.310, 0.413 และ 0.428 cP เนื่องจากการใช้เครื่องอัลตราโซนิกในการสกัดสารส่งผลให้น้ำหนักเซลล์ของผงกระชายแตกออกมากขึ้นตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำสามารถสกัดสารออกมาได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการลดขนาดของผงสมุนไพรไม่ส่งผลต่อการสกัดด้วยตัวทำละลาย MeOH เนื่องจากมีโมเลกุลที่มีขนาดเล็กสามารถแทรกเข้า

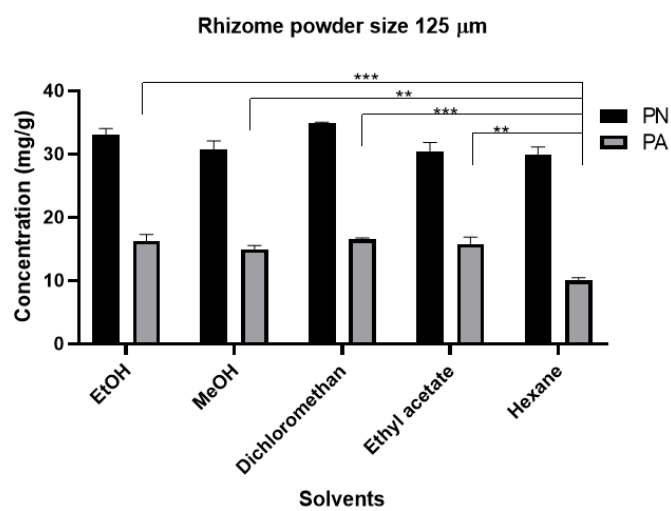
ไปภายในผงกระชายได้ดีทั้งผงขนาด 4.76 mm และ 125 μm และจากผลการวิเคราะห์สารด้วย UHPLC พบว่าตัวทำละลายที่ให้ปริมาณสารสำคัญมากและกำจัดสารอื่นที่ไม่ต้องการออกได้มากที่สุดคือ เฮกเซน ซึ่งแสดงผลโครมาโทแกรมดังภาพประกอบ 43 ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เฮกเซนไปใช้ในการทดลองในหัวข้อถัดไป



ภาพประกอบ 41 สารสกัดหยาบในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล เอทิลอะซิเตท ไดคลอโรมีเทนและเฮกเซน

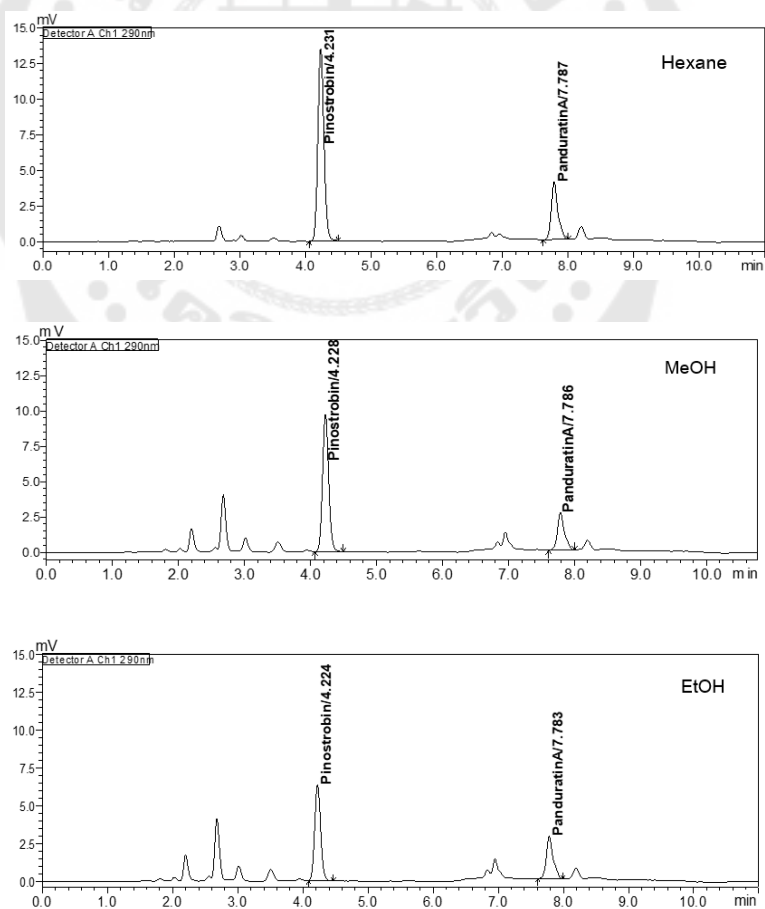
ตาราง 22 ผลการศึกษาชนิดตัวทำละลายที่เหมาะสมตามการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm

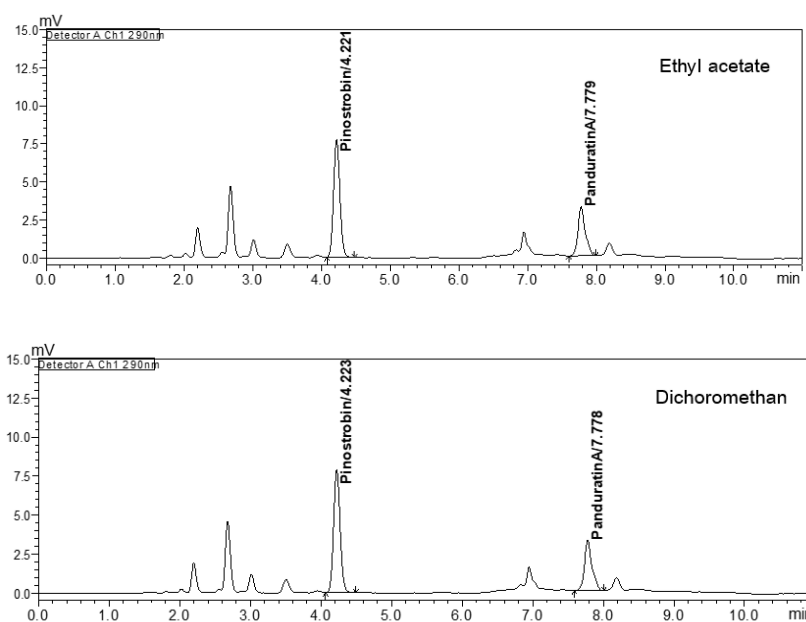
ตัวทำละลาย	น้ำหนักของผง เหง้ากระชาย (g)		% Yield $\pm$ SD		ปริมาณสารในเหง้ากระชาย (mg/g)			
					PN		PA	
	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm
EtOH	1.00 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.02	10.25 $\pm$ 0.30	11.35 $\pm$ 0.25	15.10 $\pm$ 0.66	33.03 $\pm$ 1.79	12.11 $\pm$ 0.10	16.28 $\pm$ 1.79
MeOH	1.00 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.03	11.63 $\pm$ 0.10	12.73 $\pm$ 0.09	25.92 $\pm$ 1.83	30.77 $\pm$ 2.26	13.11 $\pm$ 1.30	14.95 $\pm$ 1.01
Dichloromethane	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.01	8.37 $\pm$ 0.21	10.84 $\pm$ 1.37	14.77 $\pm$ 0.78	34.84 $\pm$ 0.39	10.82 $\pm$ 0.66	16.59 $\pm$ 0.25
Ethyl acetate	1.00 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.01	7.41 $\pm$ 0.22	11.02 $\pm$ 0.36	13.14 $\pm$ 0.28	30.48 $\pm$ 2.4	9.76 $\pm$ 1.34	15.82 $\pm$ 1.8
Hexane	0.98 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.01	2.97 $\pm$ 0.16	5.58 $\pm$ 0.29	11.79 $\pm$ 1.47	29.97 $\pm$ 2.02	4.36 $\pm$ 0.18	10.09 $\pm$ 0.61



ภาพประกอบ 42 ผลการศึกษานิตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารพินอสโตรบินและ

แพนดูราทินจากเหง้ากระชายขาว





ภาพประกอบ 43 โครมาโทแกรมของส่วนประกอบทางเคมีในกระชายขาวที่สกัดด้วยตัวทำละลาย
ชนิดต่างๆ

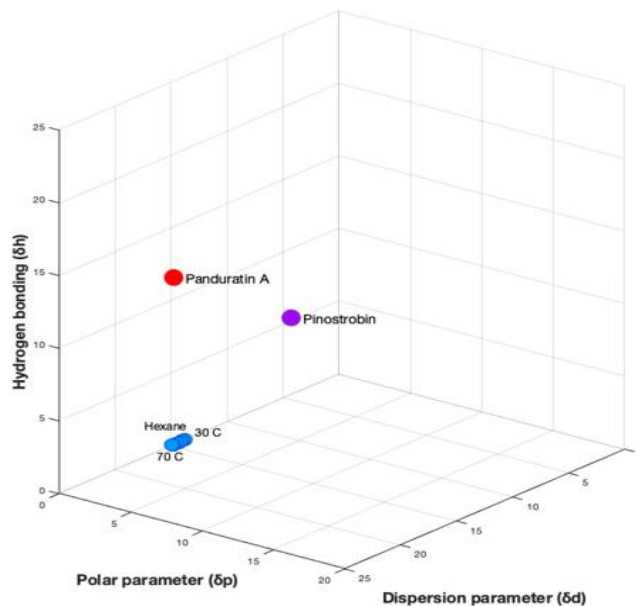
4.1.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เนื่องจากในหลายๆงานวิจัยพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการทำนายผลของการสกัดพิโนสโตบินและแพนดูราตินเอโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนในการสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งจากผลการทดลองสกัดสารสกัดพิโนสโตบินและแพนดูราตินเอที่ผงขนาด 4.76 mm และ 125 μm โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนในการสกัดที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 30-70 $^{\circ}\text{C}$ พบว่าทั้งผงขนาด 4.76 mm และ 125 μm ให้ปริมาณสารสำคัญและ %yield ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 27 ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณค่าการละลายตามทฤษฎีของเฮนเซนในข้อ 4.1.2.2 ซึ่งผลการคำนวณพบว่าที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-80 $^{\circ}\text{C}$ ให้ผลการละลายไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากผลการทำนายและจากการทดลองจริงสรุปได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิไม่มีผลต่อการสกัดสารพิโนสโตบินและแพนดูราตินเอออกจากผงกระชาย ดังแสดงในตาราง 27 และภาพประกอบ 42

4.1.2.1 ผลการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมตามทฤษฎีของเฮนเซน

ตาราง 23 ผลการคำนวณค่าการละลายของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอที่อุณหภูมิต่างๆ ตามทฤษฎีของเฮนเซน

Solvent	Temperature (°C)	Molar volume (mL/mol)	Density (g/mL)	Hansen solubility parameters (MPa ^{1/2})			Ra (MPa ^{1/2})	
				δ_d	δ_p	δ_h	Pinostrobin	Panduratin A
Hexane	25	131.61	0.759	14.9	0	0	24.36	19.46
	30	132.54	0.754	14.77	0	0	24.51	19.61
	40	132.54	0.743	14.51	0	0	24.81	19.94
	50	134.45	0.732	14.24	0	0	25.13	20.28
	60	136.45	0.721	13.97	0	0	25.46	20.64
	70	140.79	0.710	13.70	0	0	25.80	21.01
	80	143.15	0.698	13.41	0	0	26.16	21.39

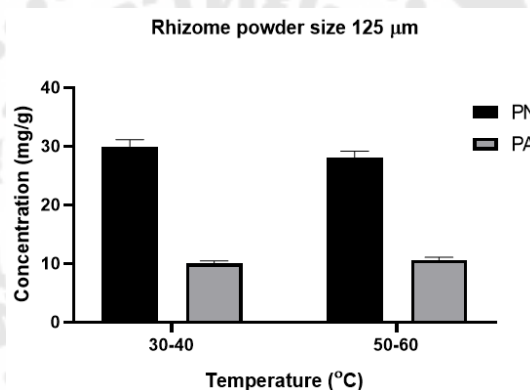


ภาพประกอบ 44 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของเฮนเซนของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอกับเฮกเซนที่อุณหภูมิต่างๆ

4.1.2.2 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมตามการทดลอง

ตาราง 24 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมตามการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm

อุณหภูมิ °C	น้ำหนักของผง เหง้ากระชาย (g)±SD		% Yield ±SD		ปริมาณสารในเหง้ากระชาย (mg/g) ±SD			
					PN		PA	
	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm
30-40	0.98±0.05	1.03±0.01	2.97±0.16	5.58±0.29	11.79±1.47	29.97±2.02	4.36±0.18	10.09±0.61
40-50	1.00±0.00	-	2.80±0.30	—	9.60±1.67	-	4.56±0.72	-
50-60	1.00±0.00	1.00±0.00	2.94±0.27	5.61±0.16	9.20±1.12	28.06±1.96	4.71±0.41	10.61±0.79
60-70	1.00±0.00	1.00±0.00	3.37±0.17	—	9.93±0.49	—	5.38±0.28	-



ภาพประกอบ 45 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสาร

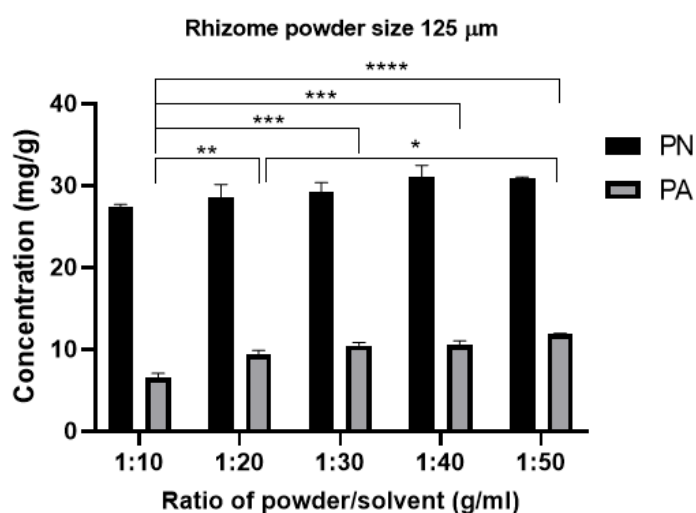
4.1.3 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตบิน และแพนดูราทินเอจากผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm พบว่าที่น้ำหนักผงกระชายขนาด 4.76 mm น้ำหนัก 1 g ปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 10 ml เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาตรของตัวทำละลายมากขึ้นให้ค่า % yield และปริมาณสารสำคัญใน 1 g คงที่ และที่ขนาดผงกระชายขนาด 125 μm พบว่าปริมาตรของตัวทำละลายที่เหมาะสมคือ 30 ml และเมื่อทดสอบเพิ่มปริมาตรตัวทำละลายมากขึ้นให้ค่า % yield และปริมาณสารสำคัญใน 1 g คงที่ ซึ่งสรุปผลได้ว่าขนาดของผงกระชายต่างกันส่งผลให้อัตราส่วนของปริมาตรตัวทำละลายที่เหมาะสมต่างกัน เนื่องจากผงกระชายที่มีขนาดใหญ่ทำให้พื้นที่ผิวในการซึมผ่านของตัวทำละลายน้อยสารสำคัญจึงออกมาได้น้อยทำให้ปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้น้อยตามไปด้วย ในทางกลับกันการลดขนาดผงกระชายทำให้เพิ่มพื้นที่ผิวในการซึมทะลุผ่านของตัวทำละลายได้ดีส่งผลให้ปริมาณสารสำคัญ

ออกมามากขึ้น หากปริมาตรของตัวทำละลายน้อยทำให้ระบบเกิดการอิ่มตัวส่งผลให้การแพร่ของสารสำคัญออกมาได้น้อย ดังนั้นผงกระชายขนาด 125 μm จึงต้องใช้ปริมาตรของตัวทำละลายมากกว่าขนาด 4.76 mm ซึ่งในการทดลองนี้จึงใช้อัตราส่วนของผงกระชายต่อตัวทำละลายเฮกเซนที่ 1 g: 30 ml ไปใช้ในการทดลองถัดไป

ตาราง 25 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm

อัตราส่วน (g/ml)	น้ำหนักของผง เหง้ากระชาย (g) $\pm$ SD		% Yield $\pm$ SD		ปริมาณสารในเหง้ากระชาย (mg/g) $\pm$ SD			
					PN		PA	
	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm
1:2.5	1.00 $\pm$ 0.00	—	1.90 $\pm$ 0.04	-	7.56 $\pm$ 1.24	-	2.54 $\pm$ 0.22	-
1:5	1.00 $\pm$ 0.00	—	2.87 $\pm$ 0.23	-	9.74 $\pm$ 1.46	-	3.70 $\pm$ 0.39	-
1:10	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	3.40 $\pm$ 0.22	4.87 $\pm$ 0.04	11.93 $\pm$ 2.03	27.35 $\pm$ 0.63	4.86 $\pm$ 0.47	6.57 $\pm$ 0.89
1:15	1.00 $\pm$ 0.00	—	3.48 $\pm$ 0.46	-	11.36 $\pm$ 2.63	-	4.79 $\pm$ 0.64	-
1:20	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	3.93 $\pm$ 0.15	5.67 $\pm$ 0.13	11.13 $\pm$ 2.71	28.58 $\pm$ 2.71	4.76 $\pm$ 0.60	9.37 $\pm$ 0.88
1:30	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	—	6.27 $\pm$ 0.05	—	29.27 $\pm$ 1.92	—	10.47 $\pm$ 0.66
1:40	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	—	6.33 $\pm$ 0.13	—	31.03 $\pm$ 2.52	—	10.53 $\pm$ 0.90
1:50	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	—	6.96 $\pm$ 0.13	—	30.83 $\pm$ 0.35	—	11.89 $\pm$ 0.13



ภาพประกอบ 46 ผลการศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร

4.1.4 ผลการศึกษาเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตบินและแพนดูราตินออกจากผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm พบว่าที่ขนาดผงกระชาย 4.76 mm ใช้เวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารเท่ากับ 60 นาทีและเมื่อทดสอบเวลาในการสกัดมากขึ้นให้ค่า % yield และปริมาณสารสำคัญใน 1 g คงที่ ส่วนขนาดผงกระชาย 125 μm ใช้เวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารเท่ากับ 10 นาทีและเมื่อทดสอบเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นให้ค่า % yield และปริมาณสารสำคัญใน 1 g คงที่ ดังนั้นจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าขนาดของผงกระชายต่างกันส่งผลให้เวลาที่ใช้ในการสกัดสารต่างกัน เนื่องจากการลดขนาดสมุนไพรทำให้เพิ่มการซึมทะลุผ่านของตัวทำละลายได้ดีขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้เวลาในการสกัดสารสำคัญออกจากผงกระชายเท่ากับ 10 นาทีไปใช้ในการทดลองถัดไป

ตาราง 26 ผลการศึกษาเวลาในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm

เวลา (นาที)	น้ำหนักของผง เหง้ากระชาย (g)		% Yield $\pm$ SD		ปริมาณสารในเหง้ากระชาย (mg/g)			
					PN		PA	
	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm	4.76 mm	125 μm
10	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.94 $\pm$ 0.27	6.09 $\pm$ 0.03	8.11 $\pm$ 1.15	34.10 $\pm$ 2.42	2.42 $\pm$ 0.42	11.34 $\pm$ 1.94
30	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	2.53 $\pm$ 0.28	6.18 $\pm$ 0.07	10.35 $\pm$ 1.75	34.82 $\pm$ 1.28	4.32 $\pm$ 0.76	11.68 $\pm$ 1.88
60	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	3.03 $\pm$ 0.03	6.12 $\pm$ 0.06	10.32 $\pm$ 1.02	32.48 $\pm$ 1.09	4.48 $\pm$ 0.44	11.61 $\pm$ 0.55
90	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.00	3.02 $\pm$ 0.23	6.20 $\pm$ 0.08	10.16 $\pm$ 0.66	30.71 $\pm$ 1.06	5.19 $\pm$ 0.50	10.99 $\pm$ 1.94
120	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	2.95 $\pm$ 0.21	6.27 $\pm$ 0.02	9.39 $\pm$ 0.53	28.85 $\pm$ 0.83	4.30 $\pm$ 0.21	11.06 $\pm$ 1.70

4.1.5 ผลการศึกษาจำนวนครั้งในการสกัด

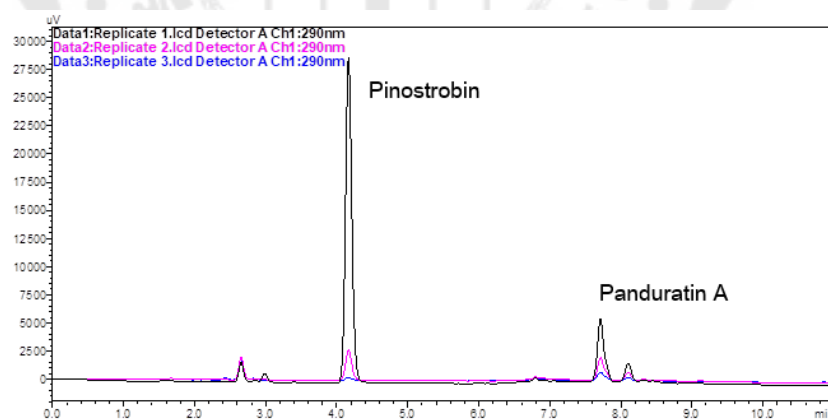
จากผลการศึกษาจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการสกัดสารฟิโนสโตบินและแพนดูราตินออกจากผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μm พบว่าหากใช้ผงกระชายขนาด 125 μm สามารถให้ร้อยละประสิทธิภาพผลของการสกัดสารฟิโนสโตบินและแพนดูราตินเอได้มากกว่า 80 % โดยการสกัดเพียงครั้งเดียว โดยแสดงข้อมูลในตาราง 27-28 และภาพประกอบ 45

ตาราง 27 ผลการศึกษาจำนวนครั้งในการสกัดเมื่อเปรียบเทียบผงกระชายขนาด 4.76 mm และ 125 μ m

ครั้งที่	น้ำหนักของผง เหง้ากระชาย (g)		% Yield $\pm$ SD		ปริมาณสารในเหง้ากระชาย (mg/g)			
					PN		PA	
	4.76 mm	125 μ m	4.76 mm	125 μ m	4.76 mm	125 μ m	4.76 mm	125 μ m
1	1.00	1.00	2.56 $\pm$ 0.19	6.96 $\pm$ 0.07	10.00 $\pm$ 1.18	35.68 $\pm$ 1.11	4.24 $\pm$ 0.54	10.48 $\pm$ 0.34
2	1.00	1.00	0.89 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.03	2.72 $\pm$ 0.10	1.64 $\pm$ 0.21	1.85 $\pm$ 0.09	1.95 $\pm$ 0.25
3	1.00	1.00	0.46 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01	1.16 $\pm$ 0.16	0.11 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.07	0.58 $\pm$ 0.05

ตาราง 28 ร้อยละประสิทธิภาพของการสกัดสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอในผงกระชายขนาด 125 μ m

ครั้งที่	ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency), %	
	PN	PA
1	95.32 $\pm$ 0.56	80.61 $\pm$ 1.66
2	99.70 $\pm$ 0.03	95.56 $\pm$ 0.20
3	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00

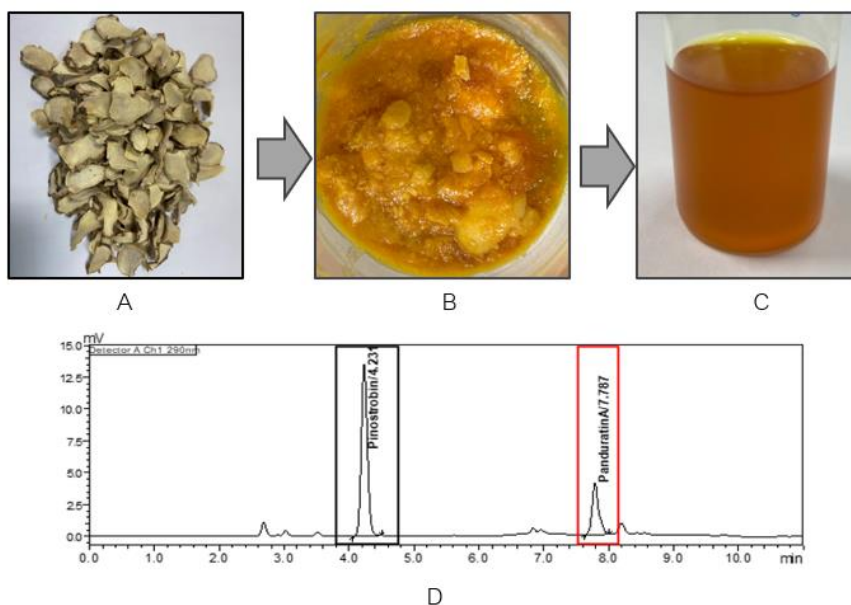


ภาพประกอบ 47 โครมาโทแกรมของฟิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกสกัดซ้ำ 3 ครั้ง

4.1.6 สรุปผลสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพินัสโตรบินและแพนดูราทินเอจากกระชายขาว

ตาราง 29 สรุปผลสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารพินัสโตรบินและแพนดูราทินเอจากเหง้ากระชายขาว

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสม
Ultrasonic	1200w,35 kHz
ขนาดผงเหง้ากระชาย	125 μ m
ชนิดของตัวทำละลาย	เฮกเซน
อุณหภูมิ	30-35 °C
อัตราส่วนผงเหง้ากระชาย : ตัวทำละลาย	1:30 w/v
เวลาที่ใช้ในการสกัด	10 นาที
จำนวนครั้งในการสกัด	1 ครั้ง
%Yield	6.96 $\pm$ 0.07
ปริมาณสารพินัสโตรบินในเหง้ากระชาย (mg/g)	35.68 $\pm$ 1.11
ปริมาณสารแพนดูราทินเอในเหง้ากระชาย (mg/g)	10.48 $\pm$ 0.34



ภาพประกอบ 48 เหง้ากระชายแห้ง (A), สารสกัดเฮกเซนจากเหง้ากระชาย (B) สารสกัดเฮกเซนถูกละลายด้วยเอทิลอะซิเตท (C) และ (D)โครมาโทแกรมของพินัสโตรบินและแพนดูราทินเอในสารสกัดเฮกเซนที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค UHPLC

4.1.7 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสกัดสารพิโนสโตรบิน และแพนดูราทินเอจากกระชายขาวด้วยเทคนิค UHPLC (Method validation)

เนื่องจาก crude extract ที่สกัดได้จากกระชายขาวมีสารผสมหลายชนิดและสารแต่ละชนิดสามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ ดังนั้นก่อนนำวิธีวิเคราะห์มาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง crude extract ต้องผ่านการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์สามารถให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอได้อย่างถูกต้อง ซึ่งหัวข้อและเกณฑ์การยอมรับที่เกี่ยวข้องในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์อ้างอิงตาม AOAC guidelines ซึ่งผลการทดสอบค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์พบว่าทุกหัวข้อผ่านตามเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอในตัวอย่างสารสกัดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งผลการทดสอบมีรายละเอียดดังนี้

4.1.7.1 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพิโนสโตรบิน (PN) และแพนดูราทินเอ (PA) ในเมทานอล

ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอในเมทานอลที่ความเข้มข้น 20 µg ผลการทดสอบพบว่าทุกพารามิเตอร์ให้ค่า %RSD < 2%: ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบการวิเคราะห์มีความพร้อมในการนำไปใช้งานได้อย่างน่าเชื่อถือ

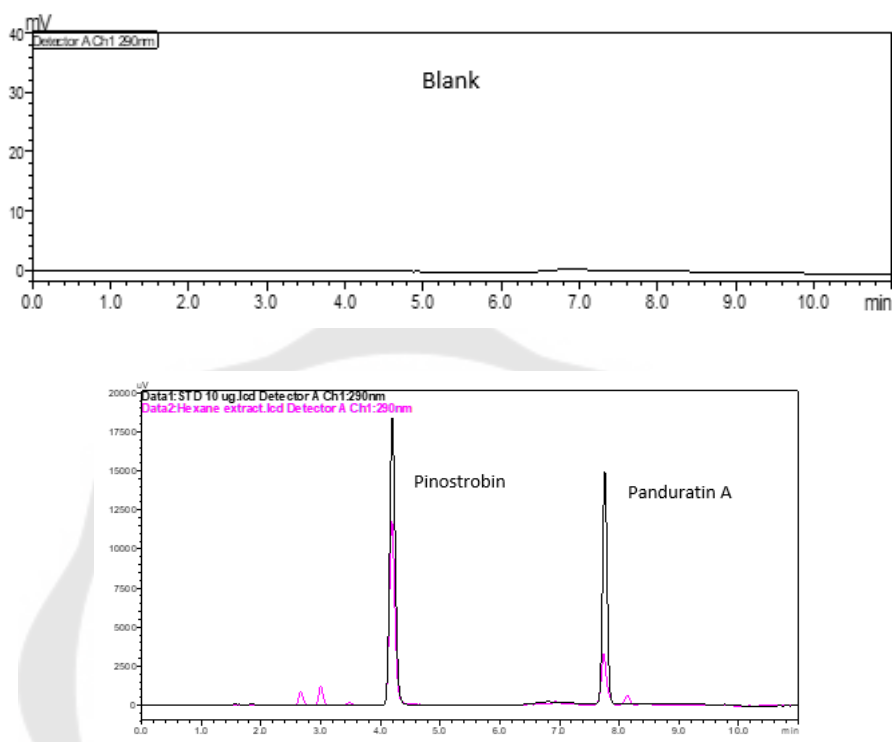
ตาราง 30 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอในเมทานอล

พารามิเตอร์	Retention Time (min)		Peak area		Resolution		Number of theoretical plate		Tailing factor	
	PN	PA	PN	PA	PN	PA	PN	PA	PN	PA
Mean	4.201	7.756	24095	16676	21.017	21.017	8732.167	38317.667	1.099	1.048
SD	0.006	0.009	154.920	62.721	0.118	0.118	89.683	714.488	0.011	0.013
%RSD	0.150	0.113	0.643	0.375	0.563	0.563	1.025	1.865	1.027	1.257

4.1.7.2 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (Specificity / Selectivity)

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโตแกรมในภาพประกอบที่ 19 พบว่าค่า Retention time ของพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอมีค่าประมาณ 4.2 และ 7.7 นาที ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์ตัวทำละลายตัวอย่าง (Blank) ไม่พบพีคที่เวลาเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดเฮกเซนกับโครมาโทแกรมของสาร

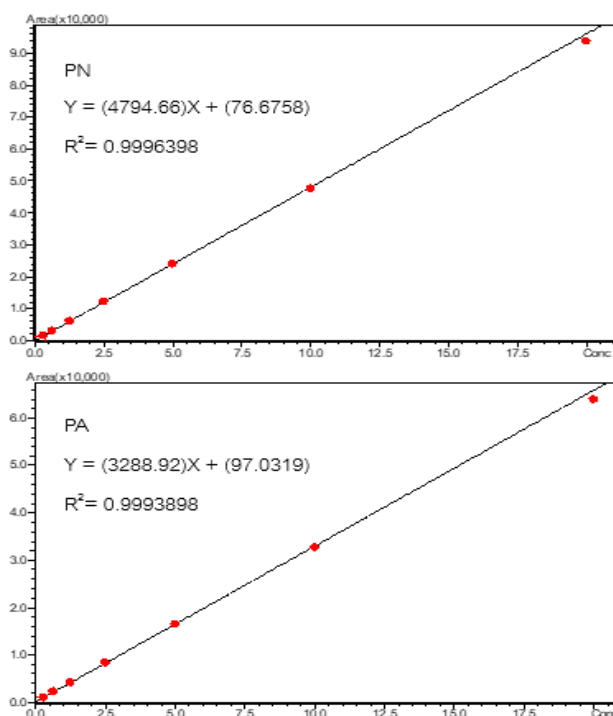
มาตรฐานพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอ พบสารขึ้นที่เวลาเดียวกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสาร ดังแสดงในภาพประกอบ 45



ภาพประกอบ 49 โคโรมาโทแกรมของตัวอย่าง Blank , สารละลายมาตรฐานของสารพินอสโตรบิน และแพนดูราตินเอความเข้มข้น 20 µg/ml (เส้นสีดำ) และสารสกัดเฮกเซน 25 µg/ml (เส้นสีชมพู)

4.1.7.3 ความเป็นเส้นตรง (Linearity)

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอ 3 เส้นพบว่าให้ค่า $R^2 > 0.999$ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 97.610-102.169% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถนำช่วงความเข้มข้นของกราฟมาตรฐานที่ศึกษาไปเทียบหาความเข้มข้นของตัวอย่างได้ ผลการทดสอบแสดงดังตาราง 35 และภาพประกอบ 47



ภาพประกอบ 50 กราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดราทินเอ

ตาราง 31 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้น มาตรฐาน (µg/ml)	PN (n=3)		PA(n=3)	
	ความเข้มข้นที่ วัดได้ ±SD	ร้อยละการ กลับคืน	ความเข้มข้นที่ วัดได้ ±SD	ร้อยละการ กลับคืน
0.313	0.309±0.003	99.028	0.307±0.002	99.484
0.625	0.631±0.013	100.918	0.641±0.009	100.918
1.250	1.266±0.015	101.247	1.268±0.004	100.302
2.500	2.554±0.019	102.169	2.541±0.008	100.143
5.000	4.996±0.043	99.928	5.010±0.042	99.292
10.000	9.910±0.027	99.100	9.890±0.029	99.692
20.000	19.522±0.014	97.610	19.402±0.036	100.150
สมการ	$Y = (4794.66)X + (76.6758)$		$Y = (3288.92)X + (97.0319)$	
R^2	0.9996398		0.9993898	
ค่าเฉลี่ยของ intercept	60.642± 60.642		97.032 ±43.700	
ค่าเฉลี่ยของ slope	4794.660± 58.539		3288.923± 83.468	
LOD	0.042		0.044	
LOQ	0.126		0.133	

4.1.7.4 ผลการทดสอบการทำซ้ำอย่างแม่นยำ (Precision)

ผลการทดสอบการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดเฮกเซนจำนวน 6 ตัวอย่างและวิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน พบว่าให้ค่า %RSD < 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์สามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำได้อย่างแม่นยำ

ตาราง 32 ผลการทดสอบความแม่นยำในการทำซ้ำภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของสารสกัดเฮกเซนที่ความเข้มข้น 25 µg/ml

พารามิเตอร์	ผลการทดสอบความแม่นยำในการทำซ้ำ	
	PN	PA
Precision intra-assay (n=6, 3 replicates)	RSD = 0.497-1.629%	RSD = 0.900-1.942%
Precision inter-assay (n=18, 3 replicates)	RSD = 1.756 %	RSD = 0.601 %

4.1.7.5 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

จากผลการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างสารสกัดพบว่าให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 100.057 -102.949% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดเฮกเซนสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง โดยไม่มีสารอื่นในเมทริกซ์รบกวนการวิเคราะห์ ผลการทดสอบแสดงดังตาราง 33

ตาราง 33 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นที่เติม (µg/ml)	ความเข้มข้นที่ได้รับ (µg/ml)		ร้อยละการกลับคืน	
	PN	PA	PN	PA
0.65	0.664±0.013	0.676±0.012	102.103±1.948	102.949±2.010
2.5	2.655±0.007	2.609±0.031	102.187±0.295	101.373±1.240
10	10.006±0.096	10.108±0.049	100.057±0.961	101.080±0.486

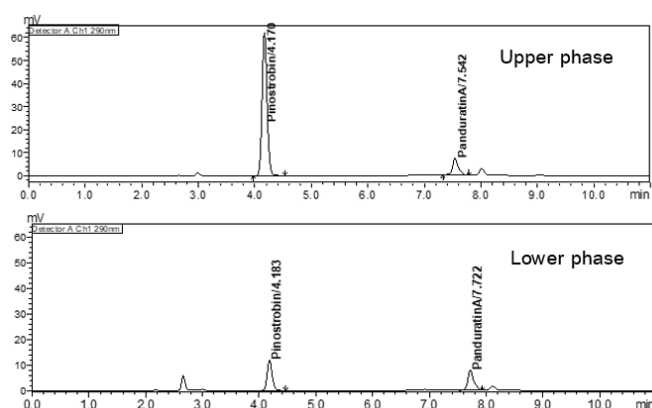
4.2 ผลการศึกษาการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดกระชายขาวด้วยเทคนิค CPC

4.2.1 ผลการศึกษาระบบเฟสเคลื่อนที่และเฟสคงที่ที่เหมาะสมจากค่า Partition Coefficient และค่า separation factor

เลือกใช้ Ascending mode เนื่องจากสารสำคัญมีความมีขั้วต่ำและการใช้ mode ดังกล่าวยังสามารถระเหยตัวทำละลายออกได้ง่ายค่า Partition Coefficient (K) เป็นตัวบ่งชี้สำคัญที่ใช้ในการเลือกเฟสเคลื่อนที่และเฟสอยู่กับที่ สำหรับเทคนิค CPC การเลือกค่าที่เหมาะสมจะช่วยให้การแยกสารมีประสิทธิภาพสูง ซึ่ง separation factor(α) เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการแยกสารสองชนิด

ตาราง 34 ค่า K และ α ในระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วน (v/v)	PN			PA			α
		ตัวทำละลาย		K_1	ตัวทำละลาย		K_2	
		Upper	Lower		Upper	Lower		
n-Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	5/2/5/2	289,234	87,777	0.30	16,486	25,155	1.53	5.028
n-Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	3/1/3/1	269,825	109,882	0.41	14,858	32,860	2.21	5.431
n-Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	4/1/4/1	223,728	146,038	0.65	48,199	46,754	0.97	1.486
n-Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	5/1/5/1	199,269	169,796	0.85	35,155	59,258	1.69	1.978
n-Hex/EtOAc/MeOH/H ₂ O	6/1/6/1	182,366	187,376	1.03	30,003	63,983	2.13	2.076
n-Hex/MeOH/ H ₂ O	5/3.2/1.8	324,352	52,725	0.16	14,469	42,017	2.90	17.864
n-Hex/MeOH/ H ₂ O	5/3.3/1.7	323,672	46,876	0.15	14,942	38,041	2.55	17.579
n-Hex/MeOH/ H ₂ O	5/3.4/1.6	374,084	73,138	0.20	16,140	54,928	3.40	17.407
n-Hex/MeOH/ H ₂ O	5/3.5/1.5	304,702	79,302	0.26	12,067	57,781	4.79	18.398



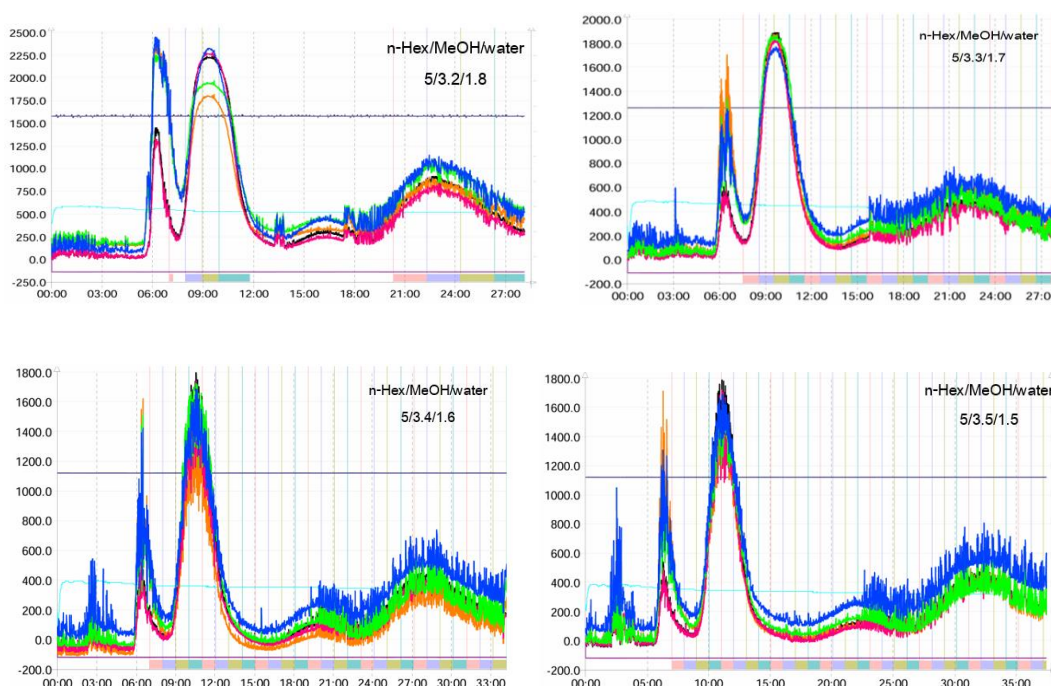
ภาพประกอบ 51 โครมาโทแกรมของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอในตัวทำละลายเฟสบน และเฟสล่างของสารละลายผสม n-Hex/MeOH/H₂O ที่อัตราส่วน 5/3.4/1.6

4.2.2 ผลการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารพิโนสโตรบินกับแพนดูราตินเอให้บริสุทธิ์

จากผลการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารพิโนสโตรบินกับแพนดูราตินเอให้บริสุทธิ์พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในระบบการแยกมากขึ้น ส่งผลให้เฟสคงที่มีความเข้มข้นมากขึ้นทำให้สารเกิดการแยกได้น้อยลง เนื่องจากพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อย และจากผลการศึกษาพบว่าระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งทำให้สารสำคัญมีความบริสุทธิ์มาก โดยที่ใช้ปริมาณตัวทำละลายอินทรีย์น้อย คือ n-Hex/MeOH/water ที่อัตราส่วน 5/3.4/1.6 โดยให้ร้อยละความบริสุทธิ์ของสารทั้งสองชนิดมากกว่า 98% ดังแสดงในตาราง 39 และโครมาโทแกรมการแยกสารแสดงได้ดังภาพประกอบ 49

ตาราง 35 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกแยกได้ด้วยระบบตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

อัตราส่วนของ ตัวทำละลาย	น้ำหนักสารที่ได้ (mg)		ร้อยละความบริสุทธิ์ ของสาร	
	PN	PA	PN	PA
n-Hex/MeOH/water (v/v)				
5/3.2/1.8	1.49	0.23	84.60	79.63
5/3.3/1.7	1.37	0.18	85.93	87.63
5/3.4/1.6	1.26	0.13	99.48	98.73
5/3.5/1.5	1.25	0.15	98.55	98.54



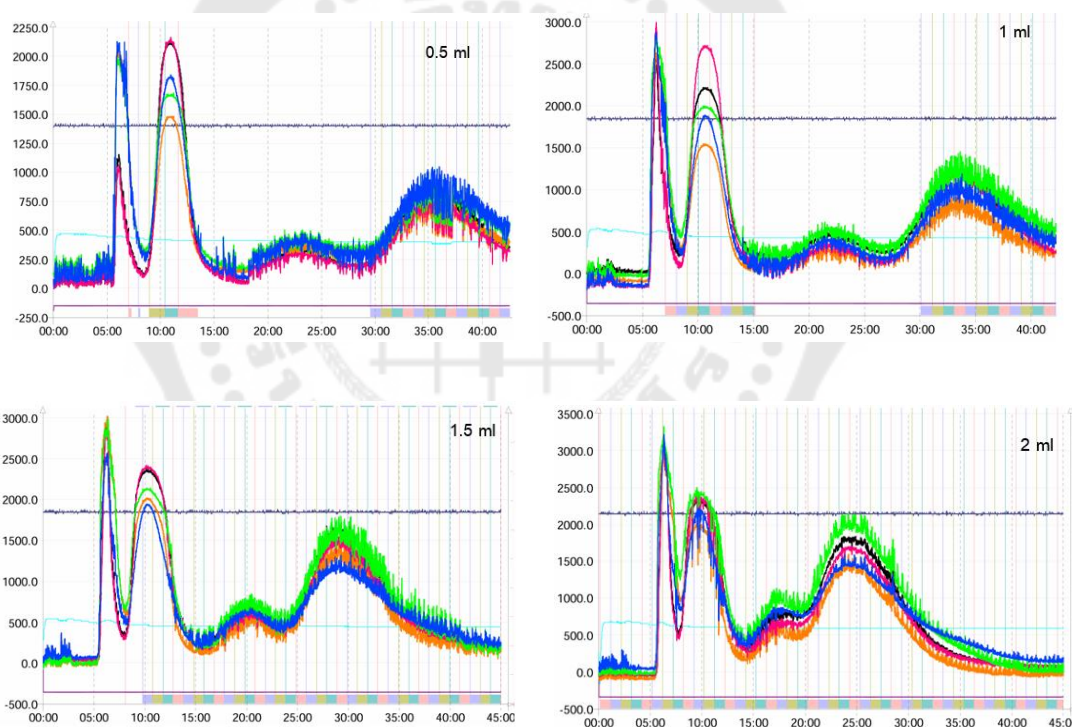
ภาพประกอบ 52 โครมาโทแกรมของการแยกสารฟีนอสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วย CPC โดยใช้ระบบตัวทำละลาย n-Hex/MeOH/water ที่อัตราส่วนต่างๆ

4.2.3 ผลการศึกษาปริมาณของตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารฟีนอสโตรบินกับแพนดูราตินเอให้บริสุทธิ์

จากผลการศึกษาในข้อ 4.2.2 พบว่าผลผลิตที่ได้รับมีปริมาณน้อยจึงต้องการศึกษาการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างมากขึ้นจาก 0.7 g/ml เป็น 1 g/ml จากนั้นปีเปิดสารสกัดความเข้มข้น 1 g/ml ลงในตัวทำละลายตัวอย่างที่มีส่วนผสมของ upper/lower (3.5/3.5, v/v) ในปริมาตรที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1, 1.5, 2 ml ซึ่งทำให้ปริมาตรรวมเท่ากับ 7.5, 8, 8.5 และ 9 ml ตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาตรและความเข้มข้นของตัวอย่างสามารถเพิ่มผลผลิตได้แต่ส่งผลทำให้ความบริสุทธิ์ของสารลดลงดังแสดงในตาราง 40 ดังนั้นจึงเลือกเพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างมากขึ้นแต่ใช้ปริมาตรของตัวอย่าง 0.5 ml เป็นปริมาตรที่เหมาะสม

ตาราง 36 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดราตินเอที่ถูกแยกได้ด้วยการฉีดสารเข้าระบบการแยกในปริมาตรที่แตกต่างกัน

ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)	น้ำหนักสารที่ได้ (mg)		ร้อยละความบริสุทธิ์ของสาร	
	PN	PA	PN	PA
0.5	2.11	0.17	99.25	98.96
1	2.34	0.17	94.62	93.31
1.5	1.89	0.21	89.54	82.10
2	1.94	0.26	87.45	80.93



ภาพประกอบ 53 โครมาโทแกรมของการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดราตินเอด้วย CPC โดยโหลดตัวอย่างที่ปริมาตรแตกต่างกัน

4.2.3 ผลการศึกษาสารพาตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารพิโนสโตรบินกับแพนดราตินเอให้บริสุทธิ์

จากผลการศึกษาในข้อ 4.2.2 พบว่าผลผลิตของสารแพนดราตินเอที่ได้รับมีปริมาณน้อย จึงต้องการศึกษาการเพิ่มผลผลิตของแพนดราตินเอมากขึ้น ดังนั้นจึงปรับระบบการพาสารตัวอย่าง

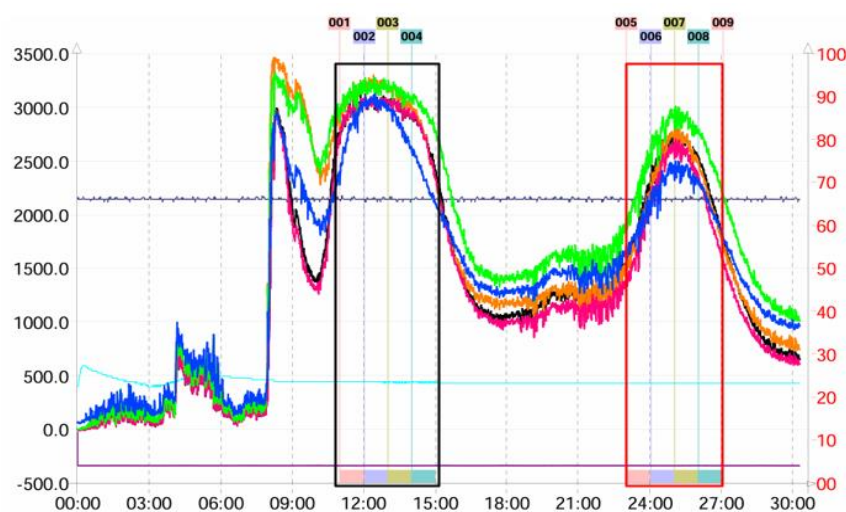
โดยการปรับจากตัวทำละลาย upper/lower ที่อัตราส่วน 3.5/3.5 ml เป็น upper/MeOH ที่อัตราส่วน 3.5/3.5 ml เพื่อให้ MeOH สามารถพาตัวอย่างเข้าไปในเฟสคงที่ได้ดีขึ้น เนื่องจากความมีขี้ของ MeOH เหมือนกับเฟสคงที่ทำให้สารแพนดูราตินเอมี peak sharp ขึ้น ซึ่งส่งผลให้น้ำหนักสารของแพนดูราตินเอที่ได้เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 50 และตาราง 41

ตาราง 37 น้ำหนักและร้อยละความบริสุทธิ์ของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่ถูกแยกได้โดยการเปลี่ยนสารตัวพาตัวอย่าง

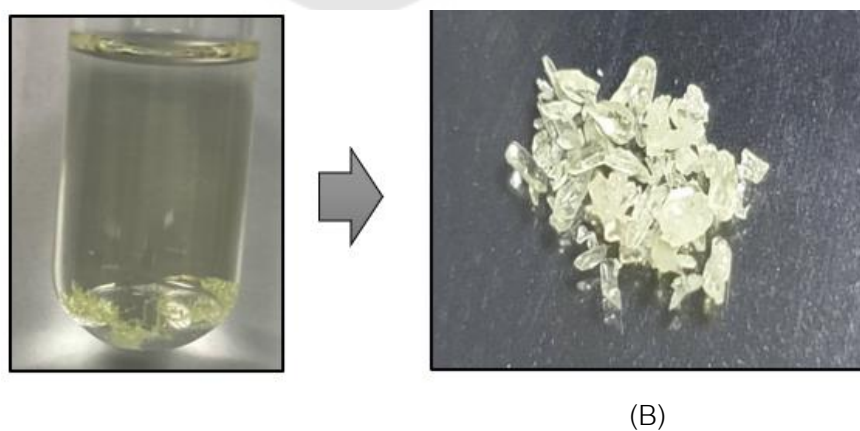
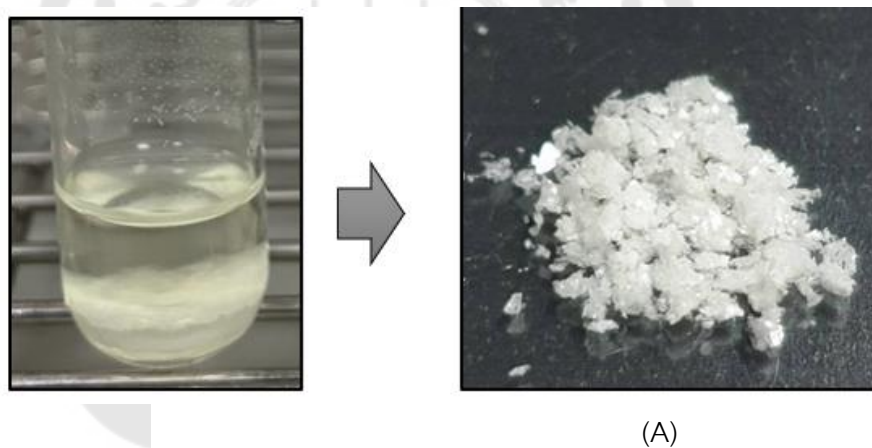
ตัวทำละลายที่ใช้ในการ เจือจางตัวอย่าง	อัตราส่วน (v/v, ml)	น้ำหนักสารที่ได้ (mg)		ร้อยละความบริสุทธิ์ของ สาร	
		PN	PA	PN	PA
สารละลายส่วน Upper : MeOH	3.5 : 3.5	2.16±0.11	0.4±0.02	98.78±4.78	99.69±4.98

ตาราง 38 สรุปผลที่ได้รับจากการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิค CPC ใน 1 รอบ

พารามิเตอร์	สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร ด้วยเทคนิค CPC	%Purity	น้ำหนักสาร ที่ได้ (mg)	%Yield
โหมดการแยกสาร	Ascending			
CPC Model	CPC250			
ชนิด/อัตราส่วนของระบบ	Hexane: MeOH: Water			
ตัวทำละลายที่ใช้	5: 3.4: 1.6			
ปริมาณ crude extract	66.67 mg (มีเนื้อสาร PN~ 2.4mg, PA~ 0.7 mg)			
ตัวทำละลายที่ใช้ในการ เจือจางตัวอย่าง	สารละลายส่วน upper : MeOH อัตราส่วน 3.5 ml : 3.5 ml (v/v)	PN> 98% PA> 99%	PN= 2.16 PA= 0.4	PN= 90 % PA= 57%
เวลาที่ใช้ในการแยก	30 นาที			
อัตราการไหล (elution flowrate)	10 ml/min			
ตัวทำละลายที่ใช้ในการ แยก/1 รอบ	300 ml/inject			
Detector UV (nm)	220, 230, 280, 285, Scan 200-600			



ภาพประกอบ 54 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดราตินเอในสารสกัด



ภาพประกอบ 55 สารพินอสโตรบิน (A) และแพนดราตินเอ (B) บริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค CPC

4.2.6 ผลการตรวจสอบความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์สารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

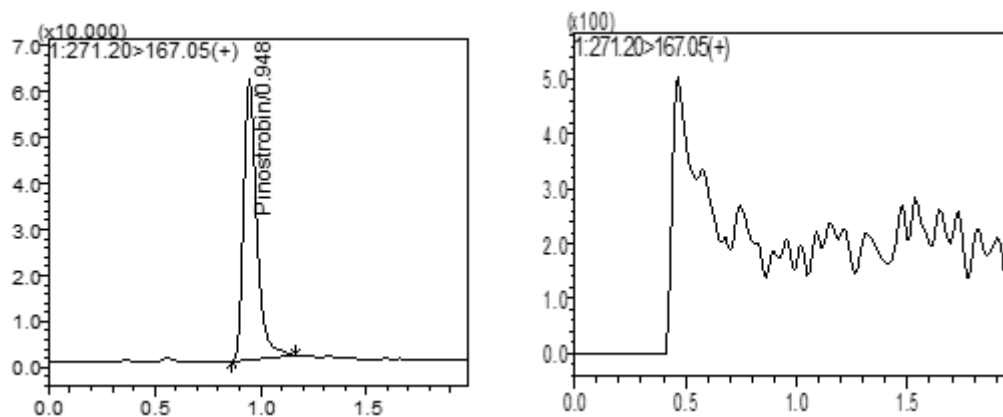
4.2.6.1 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอในเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,250 ng ของพินอสโตรบินและ 500 ng ของสารแพนดูราทินเอ ผลการทดสอบพบว่าทุกพารามิเตอร์ให้ค่า %RSD < 2%: ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระบบการวิเคราะห์มีความพร้อมในการนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างน่าเชื่อถือ

ตาราง 39 ผลการทดสอบ system suitability ของสารละลายสารพินอสโตรบิน 1250 ng และแพนดูราทินเอ 250 ng ในเมทานอล

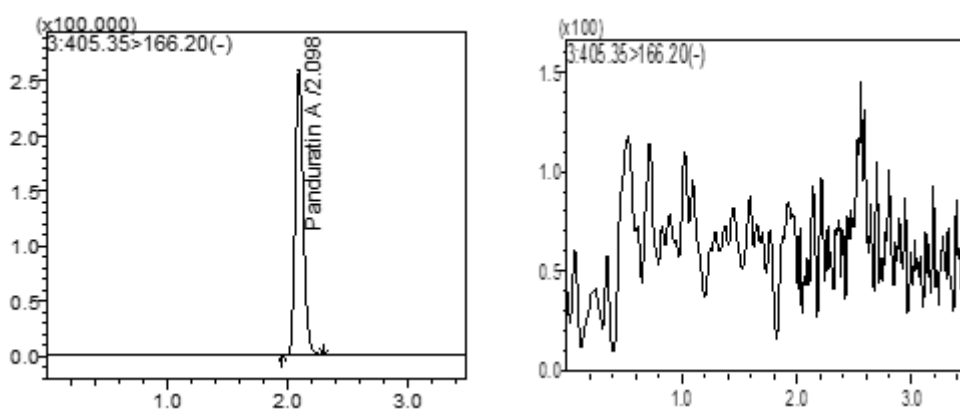
พารามิเตอร์	Retention Time (min)		Peak area		Resolution		Number of theoretical plate		Tailing factor	
	PN	PA	PN	PA	PN	PA	PN	PA	PN	PA
Mean	0.947	2.096	263,879	1,182,219	NA	NA	5,883	30,535	1.395	1.209
SD	0.002	0.003	11,758.257	23,076.561	NA	NA	167.683	337.064	0.054	0.015
%RSD	0.193	0.123	1.456	1.952	NA	NA	1.850	1.104	1.880	1.265

4.2.6.2 ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์แสดงได้จากโครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 53 พบว่าค่า Retention time ของสารตัวอย่างพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอมีค่าประมาณ 0.9 และ 2 นาที ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์ตัวทำละลายตัวอย่างไม่พบพิกที่เวลาเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอที่แยกได้กับสารมาตรฐาน พบสารขึ้นที่เวลาเดียวกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงกับสาร



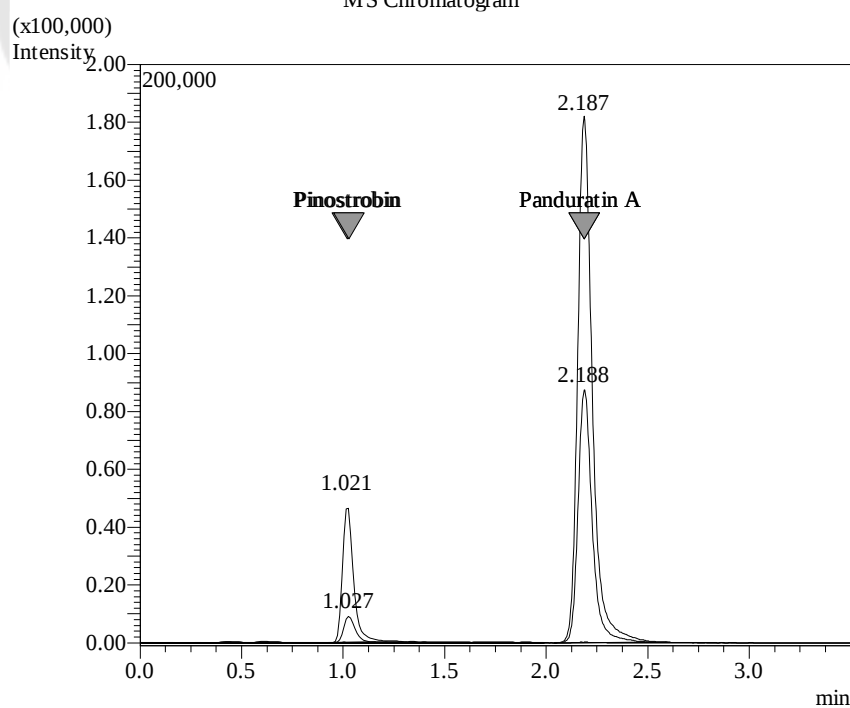
ภาพประกอบ 56 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินที่แยกได้เทียบกับตัวทำละลาย



ภาพประกอบ 57 โครมาโทแกรมของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับตัวทำละลาย



MS Chromatogram



ภาพประกอบ 58 โครมาโทแกรมของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับ

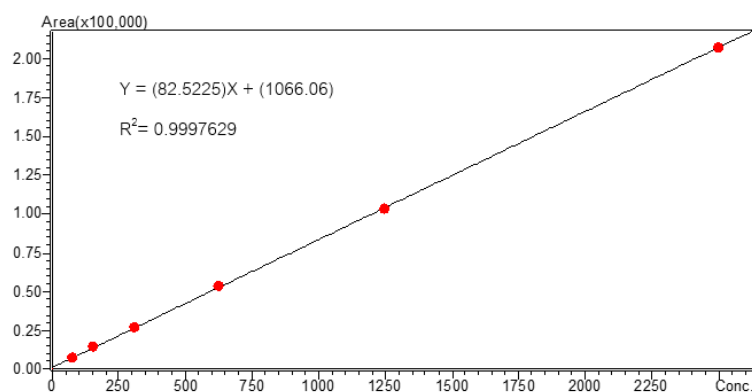
สารมาตรฐาน

4.2.6.3 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและแพนดราตินเอทั้ง 3 เส้นพบว่าให้ค่า $R^2 > 0.995$ และให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 97.037-103.211% ซึ่งผ่านตามเกณฑ์การยอมรับ ผลการทดสอบแสดงดังตาราง 44 และ 45 ภาพประกอบ 56 และ 57

ตาราง 40 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานพินอสโตรบิน

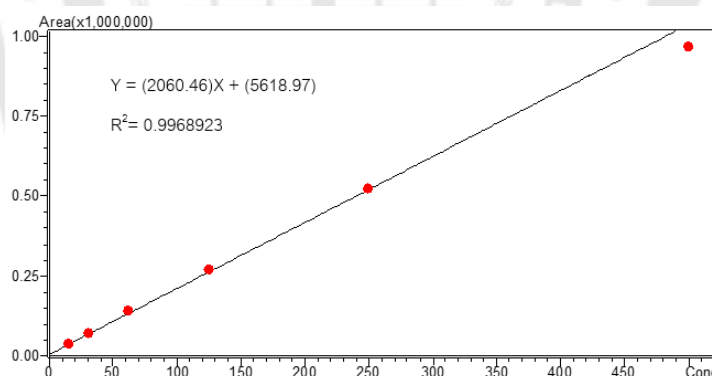
ความเข้มข้นมาตรฐาน (ng/ml)	พินอสโตรบิน (n=3)	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ $\pm$ SD	ร้อยละการกลับคืน
78.125	77.332 $\pm$ 4.072	98.985
156.25	159.277 $\pm$ 20.541	101.937
312.5	313.519 $\pm$ 38.755	100.326
625	628.269 $\pm$ 105.856	100.523
1250	1,232.065 $\pm$ 166.966	98.565
2500	2,491.594 $\pm$ 285.718	99.664
สมการ	$Y = (82.5225)X + (1066.06)$	
R^2	0.9997629	
ค่าเฉลี่ยของ intercept	1066.065 $\pm$ 11.962	
ค่าเฉลี่ยของ slope	82.523 $\pm$ 600.796	
LOD	24.025	
LOQ	72.804	



ภาพประกอบ 59 กราฟมาตรฐานของสารพินอสโตรบินและสมการเส้นตรง

ตาราง 41 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐานฟิโนสโตรบิน

ความเข้มข้นมาตรฐาน (ng/ml)	แพนดูราตินเอ (n=3)	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ $\pm$ SD	ร้อยละการกลับคืน
15.625	15.370 $\pm$ 0.911	98.366
31.25	31.240 $\pm$ 1.699	99.966
62.5	64.507 $\pm$ 2.164	103.211
125	127.534 $\pm$ 1.536	102.027
250	250.481 $\pm$ 12.648	100.192
500	485.186 $\pm$ 21.917	97.037
สมการ	$Y = (2060.46)X + (5618.97)$	
R^2	0.9968923	
ค่าเฉลี่ยของ intercept	5618.973 $\pm$ 396.398	
ค่าเฉลี่ยของ slope	2060.463 $\pm$ 64.207	
LOD	0.635	
LOQ	1.924	



ภาพประกอบ 60 กราฟมาตรฐานของสารแพนดูราตินเอและสมการเส้นตรง

4.2.6.4 ผลการทดสอบการทำซ้ำอย่างแม่นยำ (Precision)

ผลการทดสอบการวิเคราะห์ตัวอย่างสารฟิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้จำนวน 6 ตัวอย่างและวิเคราะห์เป็นเวลา 3 วัน พบว่าให้ค่า %RSD < 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์สามารถนำไปวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำได้อย่างแม่นยำ

ตาราง 42 ผลการทดสอบการทำซ้ำภายในวันเดียวกันและระหว่างวันอย่างแม่นยำ

พารามิเตอร์	ผลการทดสอบความแม่นยำในการทำซ้ำ	
	PN	PA
Precision intra-assay (Repeatability) (n=6 determinations, 3 replicates)	RSD = 1.713-1.928%	RSD = 1.108-1.582%
Precision inter-assay (Repeatability) (n=18 determinations, 3 replicates)	RSD = 1.554%	RSD = 0.825 %

4.2.6.5 ผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

จากผลการเติมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวอย่างที่แยกได้พบว่าให้ค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 99.548-101.436% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างสามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ผลการทดสอบแสดงดังตาราง 47

ตาราง 43 แสดงผลการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (ng/ml)		ความเข้มข้นที่ได้รับ (µg/ml)		ร้อยละการกลับคืน	
PN	PA	PN	PA	PN	PA
220	25	220.091±2.650	25.359±0.763	100.041±1.205	101.436±3.053
1,120	125	1,124.212±43.120	127.535±6.361	100.376±3.850	101.028±5.089
2,000	300	1,990.950±21.598	298.948±3.958	99.548±1.080	99.649±1.317

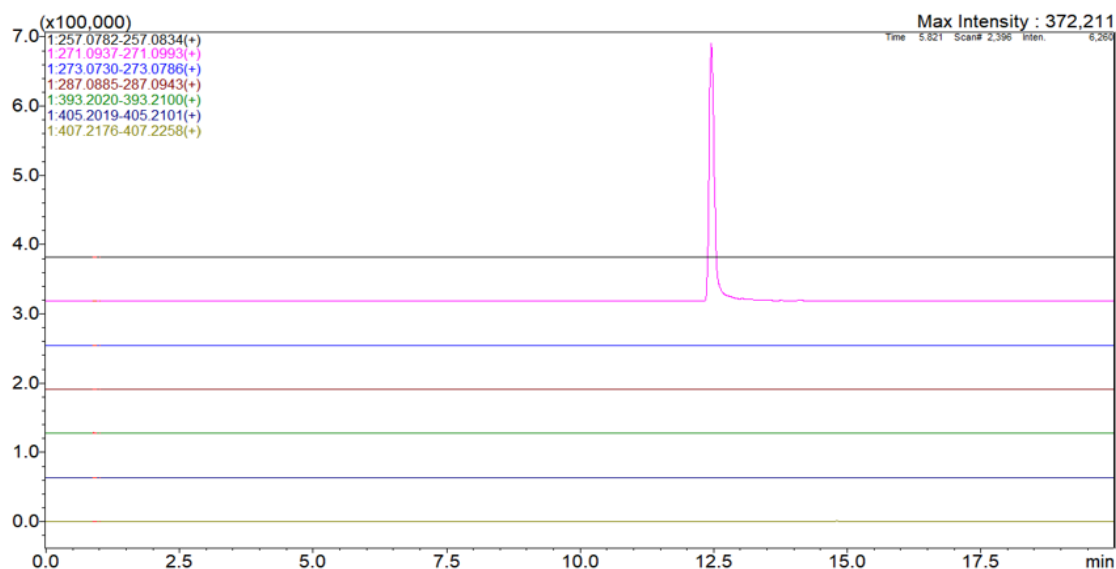
4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์และการปนเปื้อนของสารอื่นในสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายขาวด้วยเทคนิค LC-Q-TOFMS

จากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml ด้วยเทคนิค LC-Q-TOFMS โดยสแกนแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ในช่วง m/z 257-407 ผลการทดสอบไม่พบโครมาโทแกรมของสารอื่นที่คาดว่าจะมีในกระชายขาวตามที่ระบุในตาราง 44 ทั้งในตัวอย่างพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอ แต่พบโครมาโทแกรมที่ m/z = 271.0937-271.0993 ที่ retention time 12.46 นาที และ m/z = 407.2176-407.2258 ที่ retention time 14.8 นาที ดังแสดงในภาพประกอบ 59 และ 61 เมื่อนำรูปแบบการแตกตัว (fragmentation pattern) เป็นไอออนบวกของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับรูปแบบการแตกตัวของสารในฐานข้อมูล PubMed พบว่ารูปแบบการแตกตัวของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราติน

เอที่แยกได้เหมือนกับสูตรโมเลกุลของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอในฐานข้อมูล PubMed ดังแสดงในภาพประกอบ 59 และ 61 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายขาวเป็น สารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอบริสุทธิ์

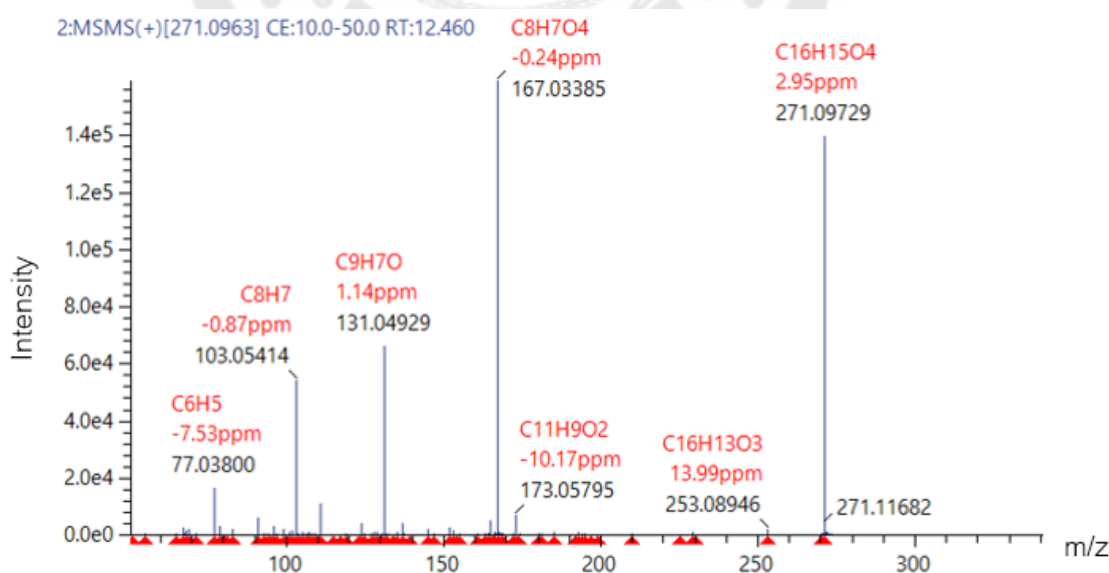
ตาราง 44 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอที่แยกได้ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ด้วยเทคนิค LC-Q-TOFMS

Compound	Formula	[M+H] ⁺
Pinocembrin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.08084
Pinocembrin chalcone	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.08084
Pinostrobin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.0963
Cardamonin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.09649
Pinostrobin chalcone	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.09649
Alpinetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.09649
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.07575
Naringenin 5-methyl ether	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	287.0914
4-Hydroxypanduratin A	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	393.20604
Boesenbergin A	C ₂₆ H ₂₈ O ₄	405.20604
Boesenbergin B	C ₂₆ H ₂₈ O ₄	405.20604
Panduratin A	C ₂₆ H ₃₀ O ₄	407.22169
Isopanduratin A	C ₂₆ H ₃₀ O ₄	407.22169

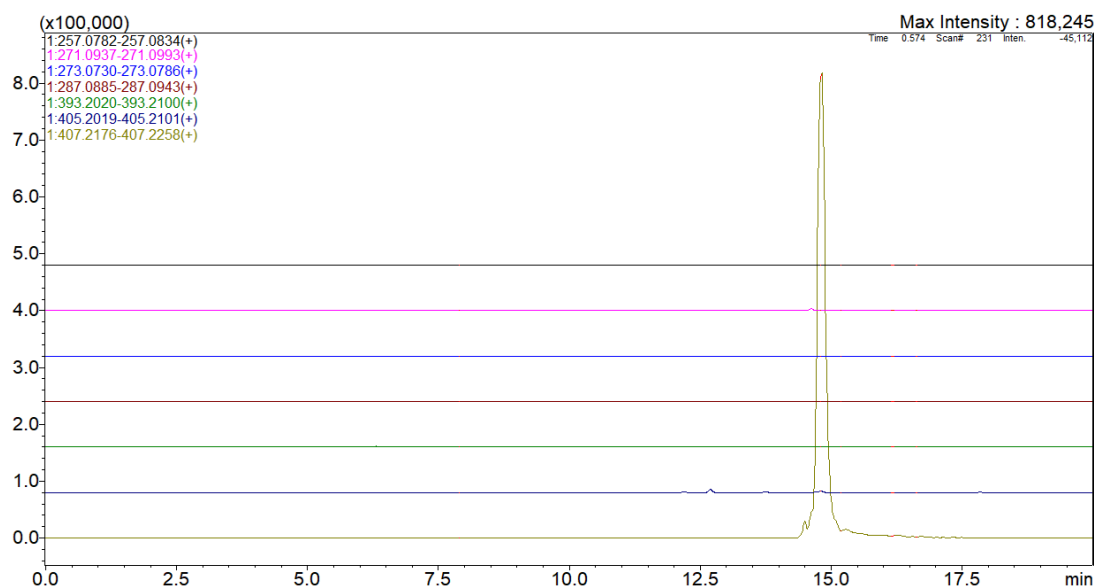


ภาพประกอบ 61 Mass spectrum ของสารพินอสโตรบินที่แยกได้ด้วย LC-Q-TOFMS

สูตรโมเลกุลของสารพินอสโตรบิน คือ $C_{16}H_{14}O_4$ เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง LC-Q-TOFMS พบว่ามีค่า $(M+H)^+$ เท่ากับ 271.09729 ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของสารจึงได้เท่ากับ 270 และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแตกตัวของสารที่แยกได้ พบว่าเหมือนกับสารพินอสโตรบินในฐานข้อมูล PubMed library โดยยืนยันด้วยสูตรโมเลกุลดังภาพที่ 67



ภาพประกอบ 62 รูปแบบการแตกตัวของสารพินอสโตรบินที่แยกได้เทียบกับพินอสโตรบินในฐานข้อมูลของ PubMed



ภาพประกอบ 63 Mass spectrum ของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้ด้วย LC-Q-TOFMS

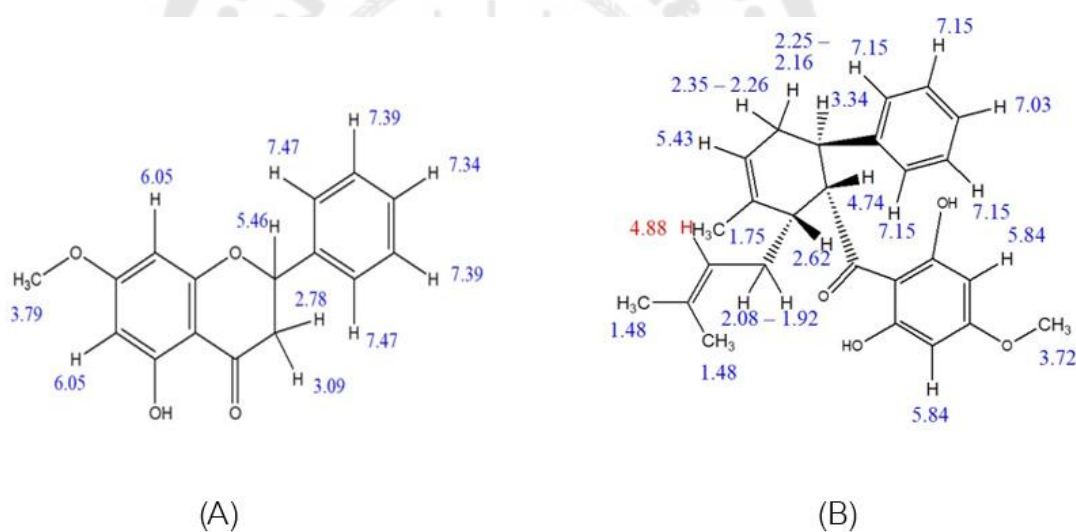
สูตรโมเลกุลของสารแพนดูราตินเอ คือ $C_{26}H_{30}O_4$ เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง LC-Q-TOFMS พบว่ามีค่า $(M+H)^+$ เท่ากับ 407.22367 ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของสารจึงได้เท่ากับ 406 และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแตกตัวของสารที่แยกได้ พบว่าเหมือนกับแพนดูราตินเอในฐานข้อมูล PubMed library โดยยืนยันด้วยสูตรโมเลกุลดังภาพที่ 67



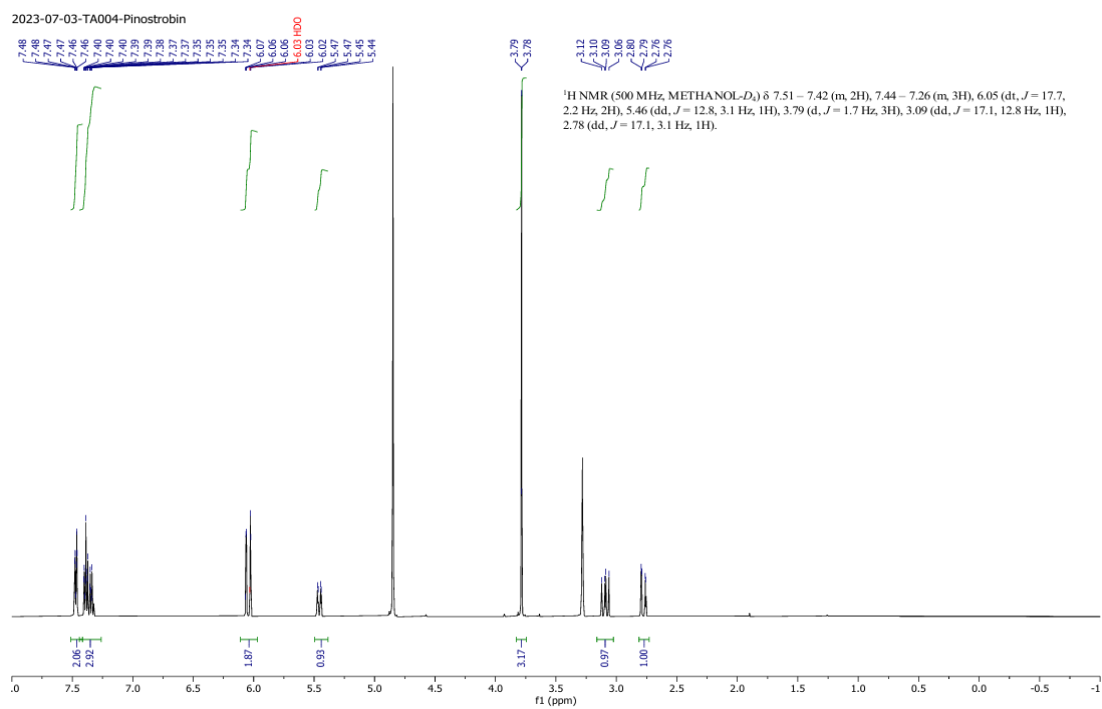
ภาพประกอบ 64 รูปแบบการแตกตัวของสารแพนดูราตินเอที่แยกได้เทียบกับแพนดูราตินเอในฐานข้อมูลของ PubMed

4.4 การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$)

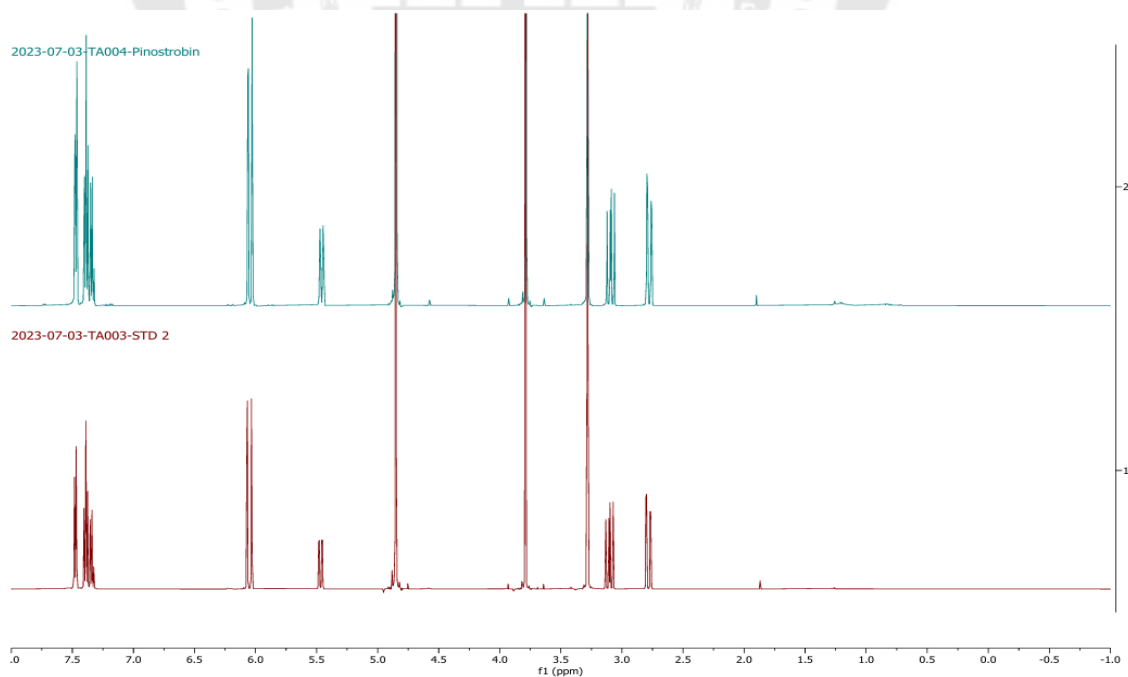
เมื่อนำสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์ที่แยกได้วิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR spectrometer (500MHz) ได้สเปกตรัมชนิด $^1\text{H-NMR}$ ดังภาพประกอบ 66 สำหรับสารพิโนสโตรบินและภาพประกอบ 68 สำหรับสารแพนดูราทินเอและเมื่อนำผลการวิเคราะห์สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เทียบกับสารมาตรฐานดังตาราง 45 และ 46 พบว่าค่าตำแหน่งของสัญญาณ (chemical shift) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เทียบกับสารมาตรฐานมีตำแหน่ง chemical shift ใกล้เคียงกันทุกตำแหน่งซึ่งแสดงดังภาพประกอบ 67 และภาพประกอบ 69 แสดงให้เห็นว่าสารที่แยกได้จากเหง้ากระชายขาวเป็นสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอบริสุทธิ์โดยเมื่อนำข้อมูล chemical shift มาสรุปเป็นโครงสร้างทางเคมีสามารถให้โครงสร้างของสารพิโนสโตรบินและแพนดูราทินเอ ดังแสดงในภาพประกอบ 61



ภาพประกอบ 65 โครงสร้างทางเคมีของสารพิโนสโตรบิน (A) และแพนดูราทินเอ (B) ที่แยกได้จากกระชาย



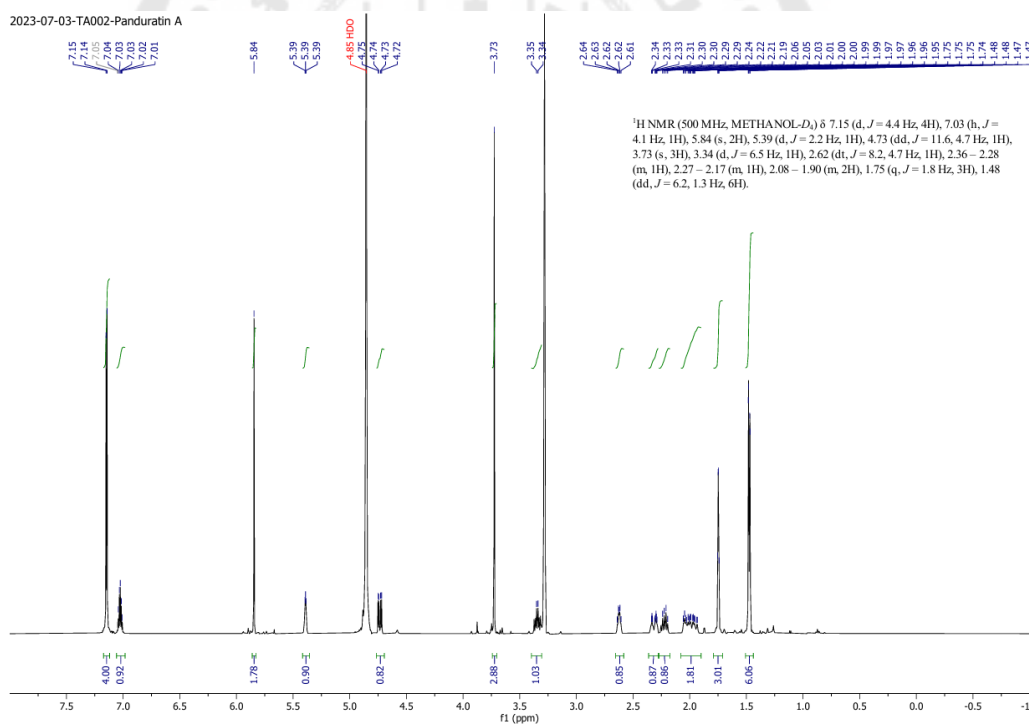
ภาพประกอบ 66 ^1H -NMR spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์พินอสโตรบินที่แยกได้จาก
กระชาย



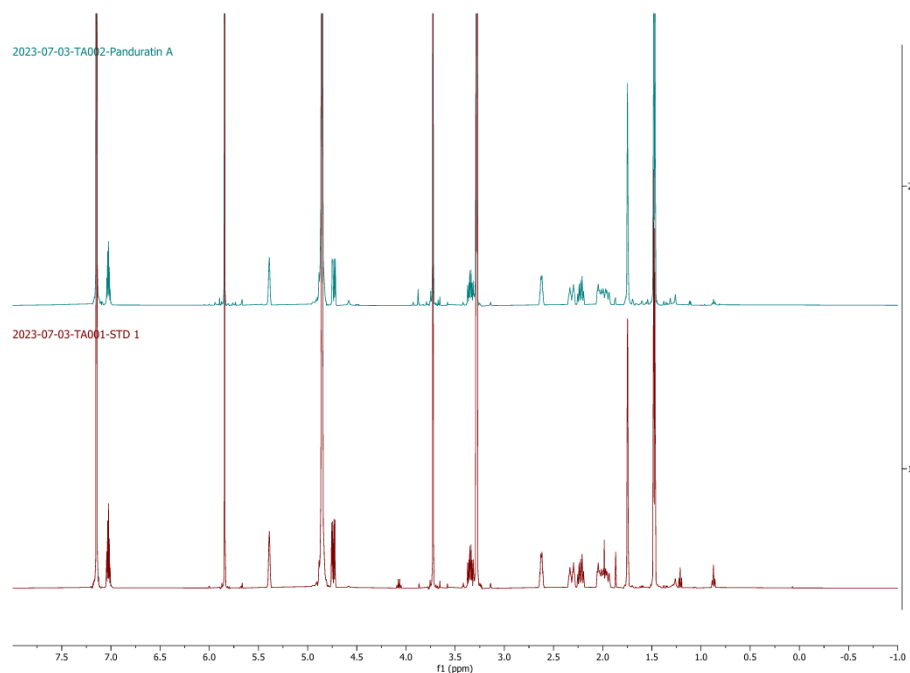
ภาพประกอบ 67 ^1H -NMR spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์พินอสโตรบินที่แยกได้จาก
กระชายเทียบกับสารมาตรฐานพินอสโตรบิน

ตาราง 45 การเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารมาตรฐาน
พินอสโตรบิน

สารบริสุทธิ์พินอสโตรบินที่แยกได้ δ_{H} (multiplicity, J)	สารมาตรฐานพินอสโตรบิน δ_{H} (multiplicity, J)
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- D_4) δ 7.51 – 7.42 (m, 2H), 7.44 – 7.26 (m, 3H), 6.05 (dt, $J = 17.7, 2.2$ Hz, 2H), 5.46 (dd, $J = 12.8, 3.1$ Hz, 1H), 3.79 (d, $J = 1.7$ Hz, 3H), 3.09 (dd, $J = 17.1, 12.8$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 17.1, 3.1$ Hz, 1H)	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- D_4) δ 7.55 – 7.44 (m, 2H), 7.44 – 7.29 (m, 3H), 6.05 (dd, $J = 18.9, 2.3$ Hz, 2H), 5.47 (dd, $J = 12.7, 3.1$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.10 (dd, $J = 17.1, 12.7$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 17.2, 3.1$ Hz, 1H).



ภาพประกอบ 68 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์แพนดูราตินเอที่แยกได้จาก
กระชายขาว



ภาพประกอบ 69 ^1H -NMR spectrum (500MHz) ของสารบริสุทธิ์แพนดูราตินเอที่แยกได้จาก
กระชายขาวเทียบกับสารมาตรฐานแพนดูราตินเอ

ตาราง 46 การเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม ^1H NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารมาตรฐาน
แพนดูราตินเอ

สารบริสุทธิ์แพนดูราตินเอที่แยกได้	สารมาตรฐานแพนดูราตินเอ
δ_{H} (multiplicity, J)	δ_{H} (multiplicity, J)
^1H NMR (500 MHz, METHANOL-D ₄) δ 7.15 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.03 (h, J = 4.1 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 5.39 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.73 (dd, J = 11.6, 4.7 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.34 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 2.62 (dt, J = 8.2, 4.7 Hz, 1H), 2.36 – 2.28 (m, 1H), 2.27 – 2.17 (m, 1H), 2.08 – 1.90 (m, 2H), 1.75 (q, J = 1.8 Hz, 3H), 1.48 (dd, J = 6.2, 1.3 Hz, 6H).	^1H NMR (500 MHz, METHANOL-D ₄) δ 7.15 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.03 (h, J = 4.1 Hz, 1H), 5.84 (s, 2H), 5.43 – 5.33 (m, 1H), 4.74 (dd, J = 11.6, 4.7 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.34 (td, J = 11.1, 6.3 Hz, 1H), 2.62 (dq, J = 8.0, 4.9, 4.4 Hz, 1H), 2.35 – 2.26 (m, 1H), 2.25 2.16 (m, 1H), 2.08 – 1.92 (m, 2H), 1.75 (d, J = 2.0 Hz, 3H), 1.48 (dd, J = 5.9, 1.3 Hz, 6H).

4.5 ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยเทคนิค MTT

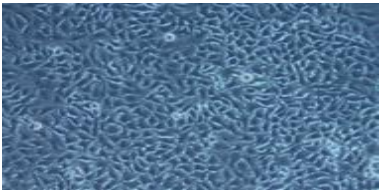
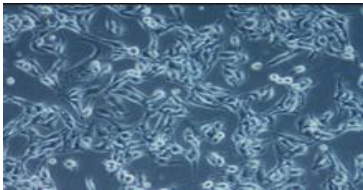
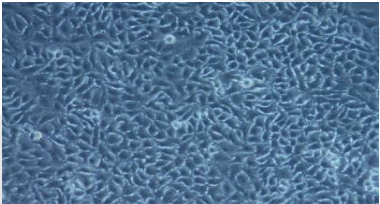
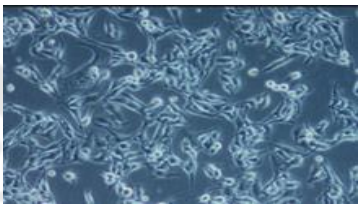
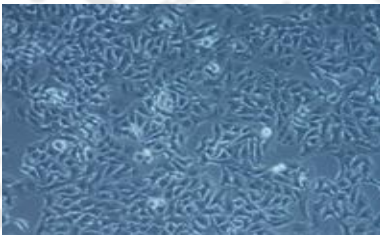
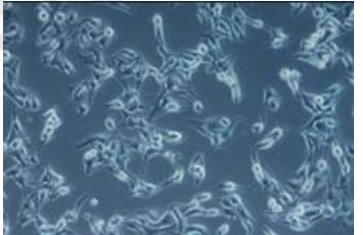
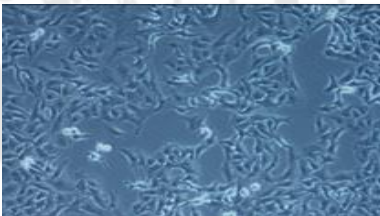
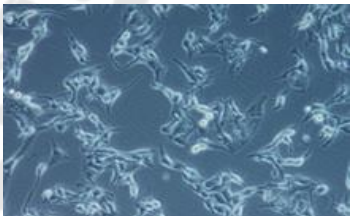
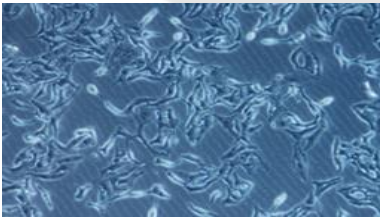
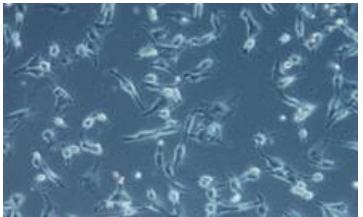
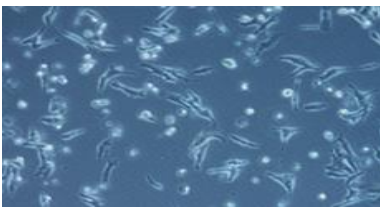
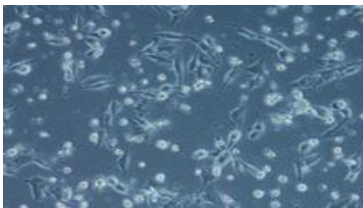
ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 H1975 และเซลล์ปกติ MRC5 ของสารพินอสโตรบินและแพนดูราทินเอที่แยกได้จากเหง้ากระชายขาวพบว่าสารแพนดูราทินเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975 โดยสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ A549 และเซลล์ H1975 ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.03 ± 0.21 และ 5.58 ± 0.15 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแพนดูราทินเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ โดยให้ค่า IC_{50} ในเซลล์ปกติเท่ากับ 12.96 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$ และเมื่อพิจารณาถึงค่าความปลอดภัย (selectivity index) พบว่ามีค่ามากกว่า 2 ทั้งในเซลล์ A549 และ H1975 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งปอดมากกว่าเซลล์ปกติ (ตาราง 47-51 และภาพประกอบ 70) ดังนั้นสามารถนำแพนดูราทินเอไปพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งปอดได้ (118) ซึ่งมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ดีกว่ายาต้าน EGFR-TKI คือ ยาเจฟิทินิบให้ค่า $IC_{50} > 40$ $\mu\text{g/ml}$ ทั้งสองเซลล์ (ตาราง 52-53 และภาพประกอบ 71) และโอซิเมอร์ตินิบให้ค่า $IC_{50} = 6.98 \pm 0.18$ และ 10.01 ± 2.73 $\mu\text{g/ml}$ ในเซลล์ A549 และ H1975 ตามลำดับ (ตาราง 54-55 และภาพประกอบ 72)

ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดของสารพินอสโตรบินพบว่าไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้เนื่องจากในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 50 -200 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสารพินอสโตรบินไม่สามารถละลายและเกิดผลึกในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังแสดงในตาราง 51 และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 และ H1975 ในช่วงความเข้มข้นต่ำที่สารสามารถละลายและไม่เกิดผลึกคือ 6.25-25 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าช่วงความเข้มข้นของพินอสโตรบิน 6.25-25 $\mu\text{g/ml}$ ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ผลการทดลองแสดงดังตาราง 56-58 และภาพประกอบ 73

ตาราง 47 ค่า IC_{50} ของเซลล์ชนิด A549, H1975, MRC5 และค่า selectivity index

สาร	ค่า IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ที่ 24 ชั่วโมง			ค่า selectivity index	
	A549	H1975	MRC5	A549	H1975
แพนดูราทินเอ	6.03 ± 0.21	5.58 ± 0.15	12.96 ± 0.36	2.15	2.32
พินอสโตรบิน	ไม่สามารถหาค่าได้เนื่องจากสารไม่ละลายใน RPMI				
เจฟิทินิบ	>40	>40	—	—	—
โอซิเมอร์ตินิบ	6.98 ± 0.18	10.01 ± 2.73	—	—	—

ตาราง 48 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ NSCLC ในเซลล์ A549 และ H1975 ที่ถูกทดสอบด้วยแพนดูราตินเอที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	แพนดูราตินเอ	
	A549	H1975
Control		
DMSO		
1.25		
2.5		
5		
10		

ตาราง 49 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารแพนดราตินเอ

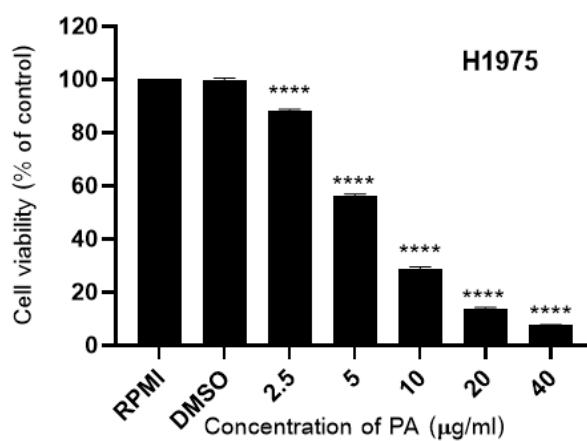
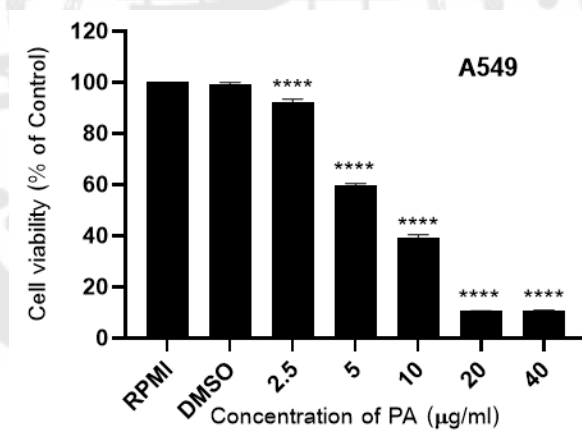
ความเข้มข้นของ สารแพนดราตินเอ (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์			ค่าเฉลี่ย	SD
	A549				
	ครั้งที่1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	97.42	100.31	99.64	99.13	1.51
2.5	93.32	89.38	93.67	92.12	2.38
5	58.35	59.44	61.11	59.63	1.39
10	40.07	37.56	40.62	39.42	1.63
20	10.19	10.80	10.39	10.46	0.31
40	10.55	10.76	10.87	10.73	0.17

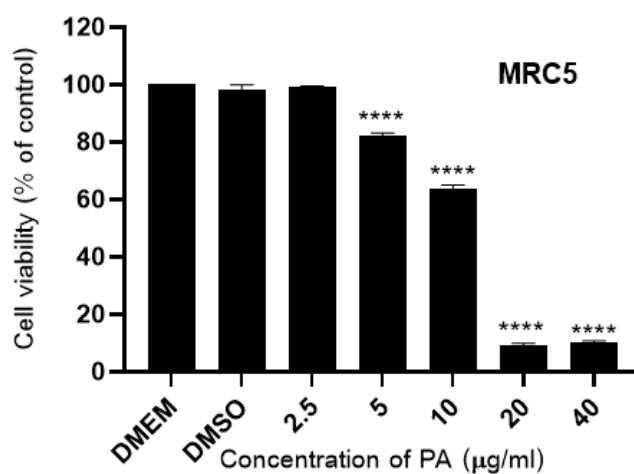
ตาราง 50 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารแพนดราตินเอ

ความเข้มข้นของ สารแพนดราตินเอ (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์			ค่าเฉลี่ย	SD
	H1975				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	97.50	100.17	100.85	99.51	1.77
2.5	86.85	89.11	88.61	88.19	1.19
5	56.58	54.89	57.26	56.24	1.22
10	29.30	27.19	29.72	28.74	1.36
20	13.12	13.93	14.56	13.87	0.72
40	7.06	7.86	7.66	7.53	0.42

ตาราง 51 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ MRC5 เมื่อได้รับสารแพนดูราตินเอ

ความเข้มข้นของ สารแพนดูราตินเอ ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ MRC5			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	95.09	98.56	101.10	98.25	3.02
2.5	98.89	99.77	99.32	99.32	0.44
5	82.30	80.12	83.74	82.06	1.82
10	64.48	60.70	65.55	63.58	2.55
20	8.21	9.04	10.44	9.23	1.13
40	9.12	10.15	11.22	10.16	1.05





ภาพประกอบ 70 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 H1975 และ MRC5 ของ

สารแพนดราทีนเอ

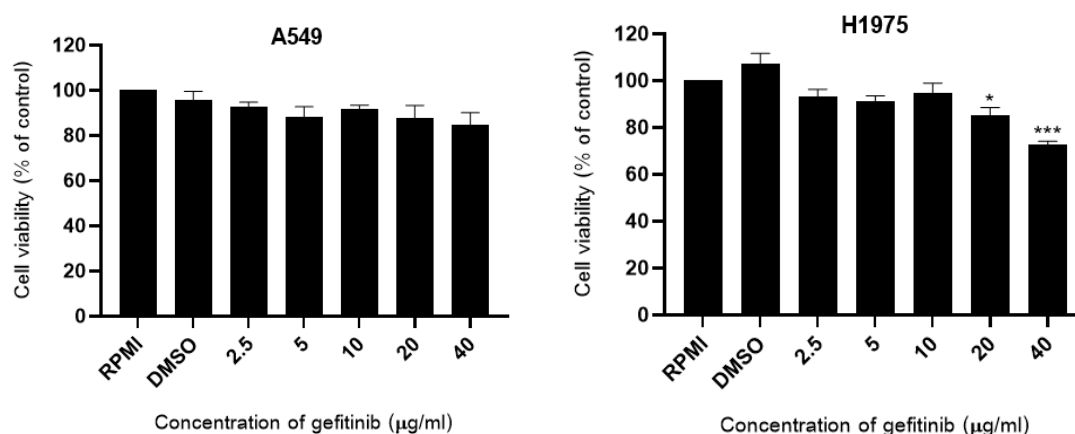
เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารแพนดราทีนเอที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 40 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตของเซลล์ถูกทดสอบด้วยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=3), ****P<0.0001 เทียบกับ Control (RPMI หรือ DMEM)

ตาราง 52 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารเจฟิทีนิบ

ความเข้มข้นของ สารเจฟิทีนิบ (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	88.06	97.93	100.93	95.64	6.73
2.5	94.28	88.92	95.24	92.81	3.41
5	86.45	81.30	96.85	88.20	7.92
10	95.03	88.59	91.17	91.60	3.24
20	84.09	98.68	80.66	87.81	9.57
40	95.57	78.62	79.80	84.66	9.46

ตาราง 53 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารเจฟิทิบิน

ความเข้มข้นของ สารเจฟิทิบิน (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์			ค่าเฉลี่ย	SD
	H1975				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	114.73	107.64	99.45	107.27	7.65
2.5	99.02	88.99	92.07	93.36	5.14
5	94.08	86.37	93.01	91.15	4.18
10	103.25	89.27	91.14	94.55	7.59
20	90.74	79.48	85.60	85.27	5.64
40	74.59	69.76	73.55	72.63	2.54



ภาพประกอบ 71 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975
ของสารเจฟิทิบิน

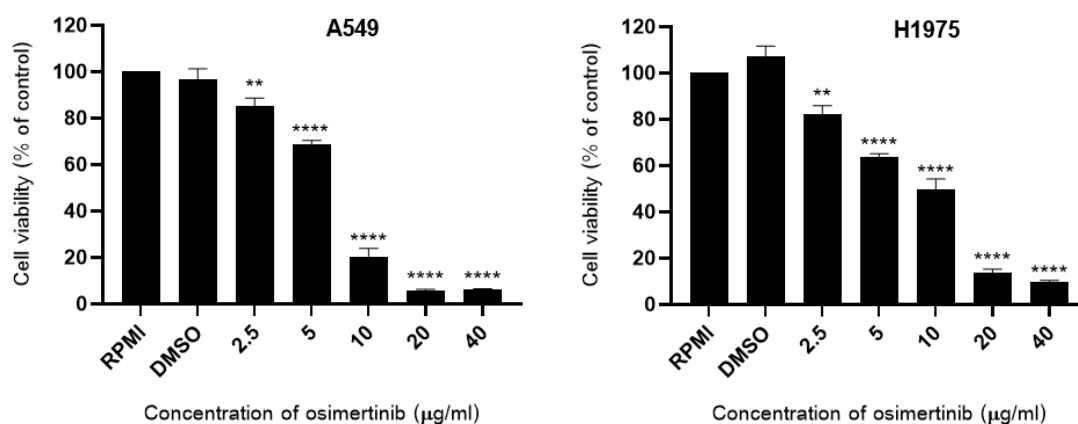
เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารเจฟิทิบินที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 40 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตรอดของเซลล์ถูกทดสอบด้วยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=3), *P<0.05, ***P<0.001 เทียบกับ Control (RPMI)

ตาราง 54 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารไอซิมอร์ตินิบ

ความเข้มข้นของ สารไอซิมอร์ตินิบ ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	95.64	105.23	89.37	96.75	7.99
2.5	85.49	90.96	79.61	85.35	5.68
5	66.46	71.61	68.71	68.93	2.58
10	25.96	14.14	21.32	20.47	5.95
20	6.51	5.27	5.87	5.88	0.62
40	6.90	5.43	6.05	6.13	0.74

ตาราง 55 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารไอซิมอร์ตินิบ

ความเข้มข้นของ สารไอซิมอร์ตินิบ ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
DMSO	114.73	107.64	99.45	107.27	7.65
2.5	88.03	76.22	83.13	82.46	5.93
5	66.53	62.63	62.41	63.86	2.32
10	57.68	49.24	43.04	49.99	7.35
20	12.86	11.36	16.77	13.66	2.79
40	9.61	8.58	10.83	9.67	1.13



ภาพประกอบ 72 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975 ของ
สารโอซิเมอร์ตินิบ

เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารโอซิเมอร์ตินิบที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 40 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตรอดของเซลล์ถูกทดสอบด้วยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=3), **P<0.01, ****P<0.0001 เทียบกับ Control (RPMI)

ตาราง 56 การเกิดผลึกของสารฟิโนสโตรบินในอาหารเลี้ยงเซลล์

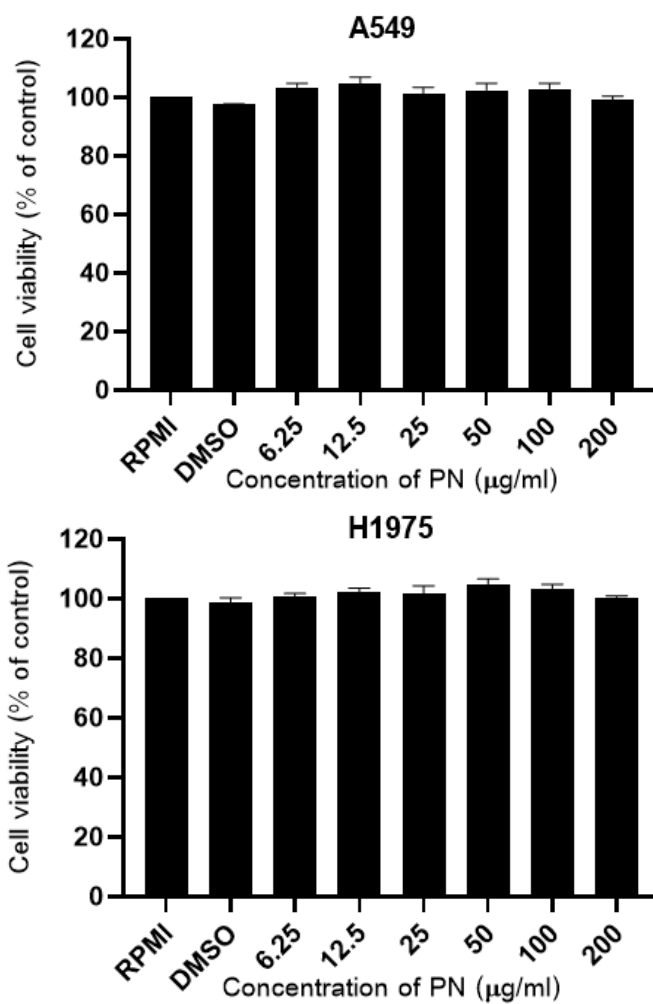
ความเข้มข้น (µg/ml)	ลักษณะของฟิโนสโตรบินใน RPMI media
200	
100	
50	

ตาราง 57 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549 เมื่อได้รับสารพินอสโตรบิน

ความเข้มข้นของ สารพินอสโตรบิน ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ A549			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
0.5% DMSO	97.05	97.64	97.88	97.52	0.43
6.25	102.95	101.39	106.07	103.47	2.38
12.5	101.45	103.57	109.00	104.67	3.89
25	102.23	97.50	104.43	101.39	3.54
50	103.50	97.82	106.83	102.72	4.56
100	100.54	101.11	106.83	102.83	3.48
200	99.52	97.03	101.21	99.26	2.10

ตาราง 58 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975 เมื่อได้รับสารพินอสโตรบิน

ความเข้มข้นของ สารพินอสโตรบิน ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ H1975			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
RPMI	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
0.5% DMSO	101.96	97.45	96.89	98.77	2.78
6.25	102.91	99.34	99.71	100.66	1.96
12.5	104.87	100.33	101.43	102.21	2.37
25	106.02	97.08	102.25	101.79	4.49
50	101.61	107.64	105.52	104.92	3.06
100	106.44	101.68	101.55	103.23	2.79
200	100.61	99.55	100.08	100.08	0.53



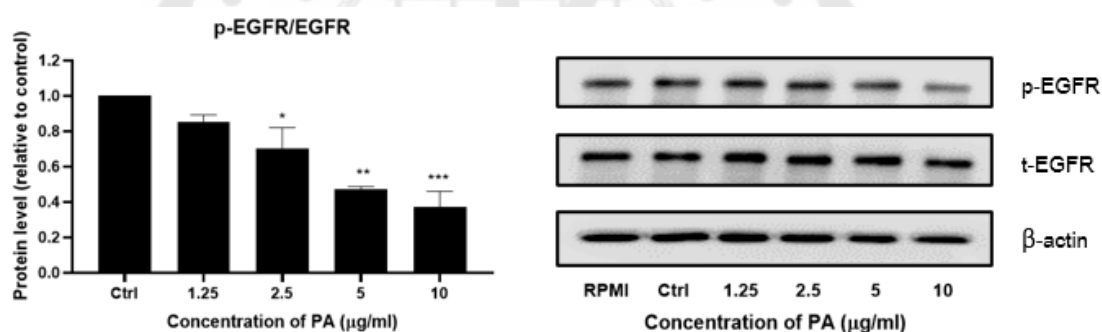
ภาพประกอบ 73 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975
ของสารพินอสโตรบิน

เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารพินอสโตรบินที่ความเข้มข้น 6.25-200 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตรอดของเซลล์ถูกทดสอบด้วยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=3)

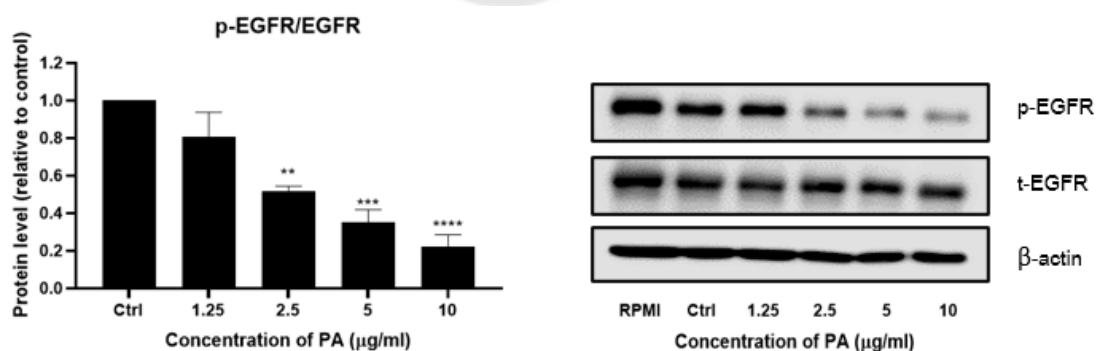
4.6 ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน EGFR, Akt, STAT3 และ AMPK ในเซลล์ A549 และ H1975 หลังการทดสอบด้วยสารแพนดูราตินเอที่แยกได้จากกระชายขาวด้วยวิธี western blotting

เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารแพนดูราตินเอที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 40 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตรอดของเซลล์ถูกทดสอบด้วยวิธี MTT ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ($n=3$) และคำนวณค่าความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติด้วย One-way ANOVA และแปลผลดังนี้ * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ เทียบกับ Control (DMSO 0.05%)

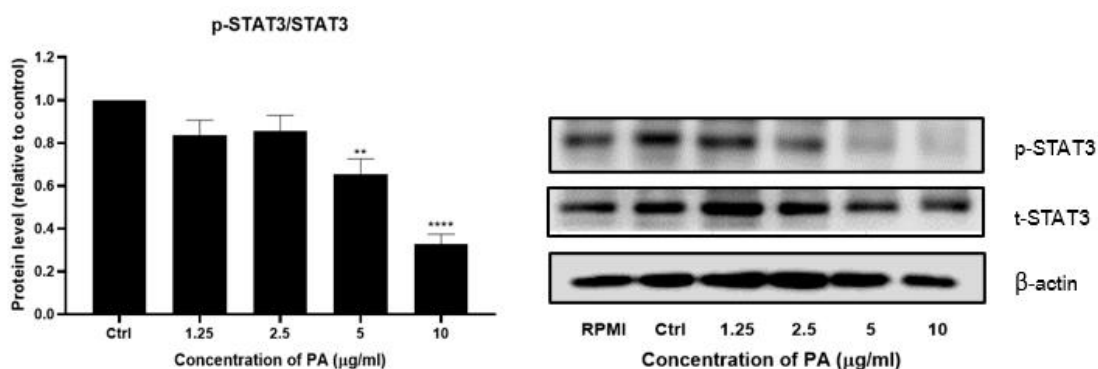
ผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน EGFR, Akt, STAT3 และ AMPK ในเซลล์ A549 และ H1975 หลังการทดสอบด้วยสารแพนดูราตินเอที่แยกได้จากเหง้ากระชายขาวพบว่าสารแพนดูราตินเอลดการแสดงออกของ p-EGFR, p-Akt, p-STAT3 ได้ทั้งเซลล์ A549 และ H1975 และกระตุ้นการแสดงออกของ p-AMPK ในเซลล์ H1975 แต่ลดการแสดงออกของ p-AMPK ในเซลล์ A549 ดังแสดงในภาพประกอบ 74-81



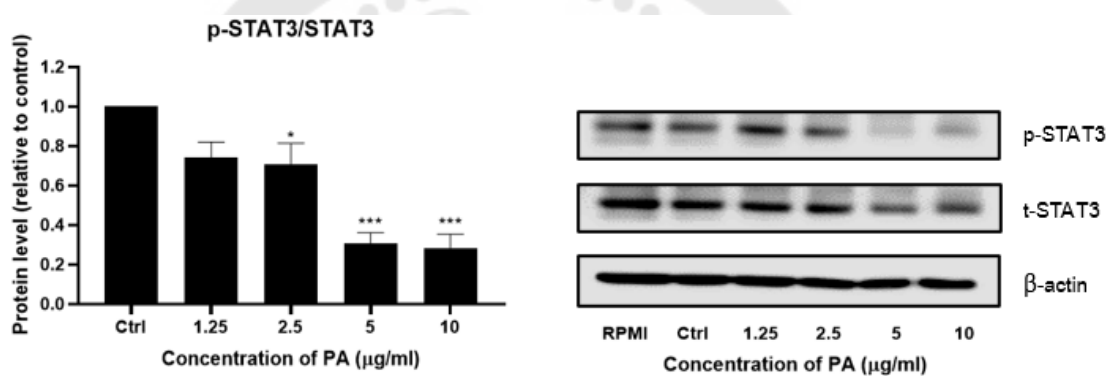
ภาพประกอบ 74 ผลของสารแพนดูราตินเอต่อ EGFR phosphorylation ในเซลล์ A549



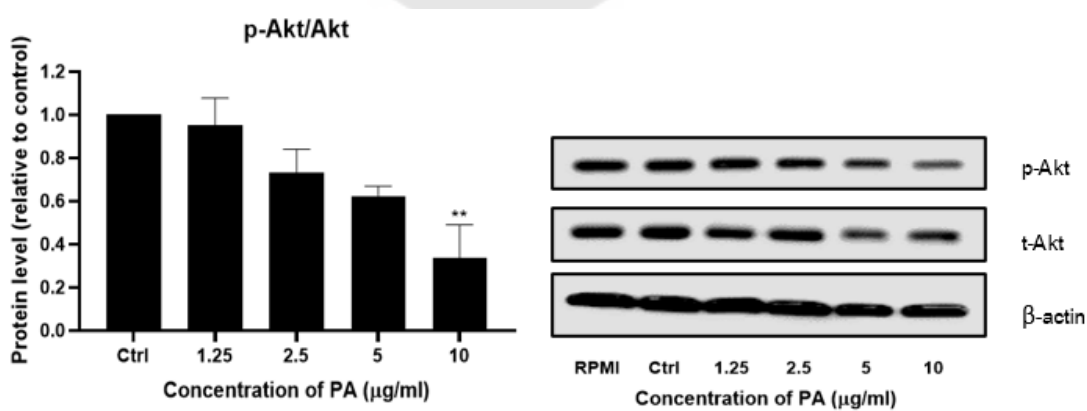
ภาพประกอบ 75 ผลของสารแพนดูราตินเอต่อ EGFR phosphorylation ในเซลล์ H1975



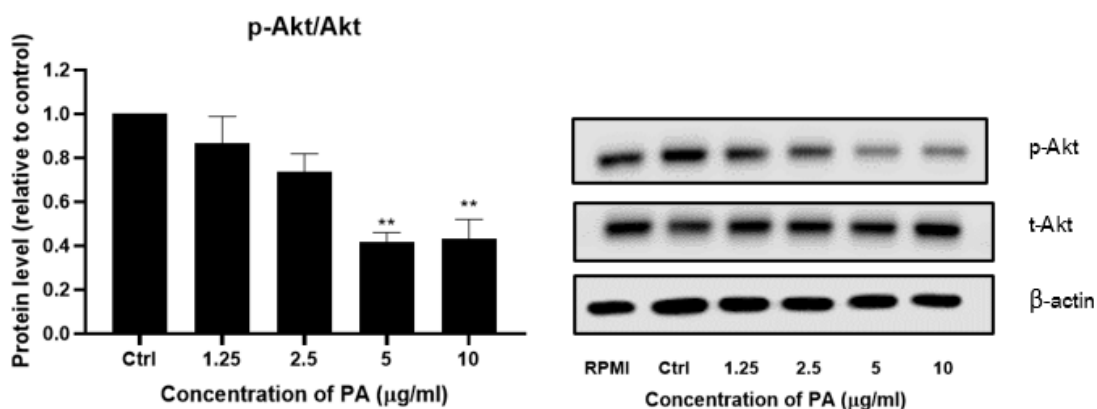
ภาพประกอบ 76 ผลของสารแพนดูราทินเอตต่อ STAT3 phosphorylation ในเซลล์ A549



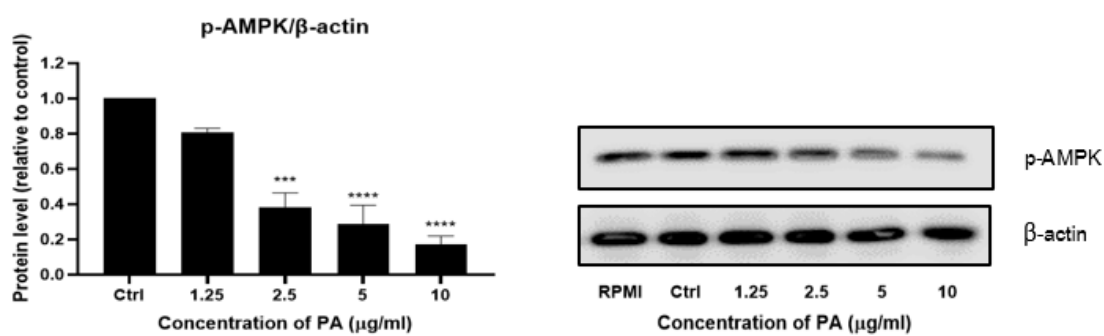
ภาพประกอบ 77 ผลของสารแพนดูราทินเอตต่อ STAT3 phosphorylation ในเซลล์ H1975



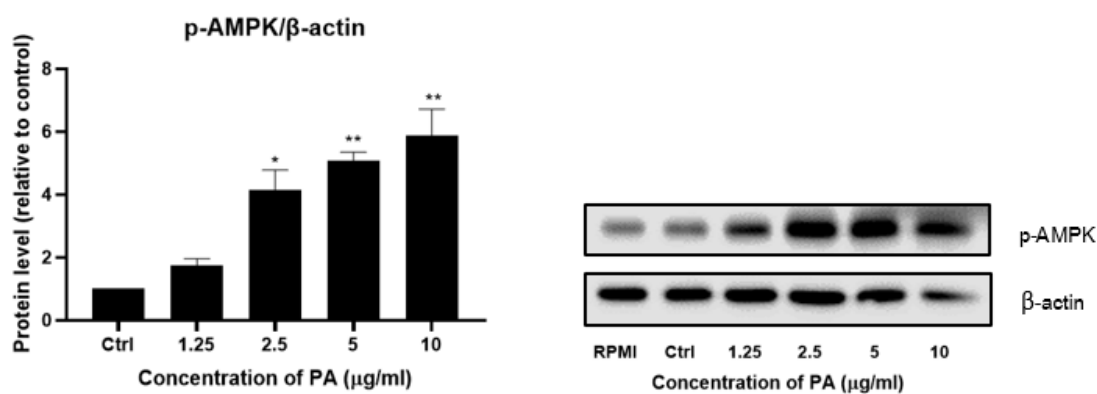
ภาพประกอบ 78 ผลของสารแพนดูราทินเอตต่อ Akt phosphorylation ในเซลล์ A549



ภาพประกอบ 79 ผลของสารแพนดราทินเอตต่อ Akt phosphorylation ในเซลล์ H1975



ภาพประกอบ 80 ผลของสารแพนดราทินเอตต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ A549



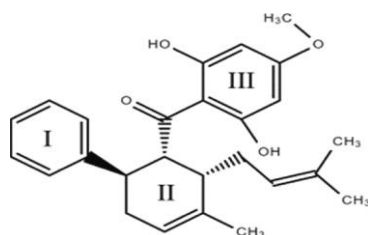
ภาพประกอบ 81 ผลของสารแพนดราทินเอตต่อ AMPK phosphorylation ในเซลล์ H1975

4.7 ผลการศึกษาโมเลกุลาร์ต็อกกิงของแพนดูราตินเอในการยับยั้งการกระตุ้นโปรตีนที่ทำให้เกิดมะเร็งปอด

ผลการศึกษาการศึกษาโมเลกุลาร์ต็อกกิงของสารแพนดูราตินเอในการจับกับโปรตีนเป้าหมายเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสนับสนุนผลการทดสอบ western blot ในการอธิบายการยับยั้งหรือการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารแพนดูราตินเอสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนเป้าหมายได้แก่ 5FED (EGFR wild type), 5HG7 (EGFR mutant), 1BG1 (STAT3), 4GV1 (Akt), 4CFE (AMPK) โดยแพนดูราตินเอสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดโดยใช้ค่าพลังงานการยึดจับ (Binding energy) ใกล้เคียงกันทุกโปรตีน ซึ่งโปรตีน EGFR mutant ใช้พลังงานในการจับน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าพลังงานที่แพนดูราตินเอใช้ในการจับกับโปรตีนเป้าหมายมีค่าพลังงานใกล้เคียงกับยาด้าน EGFR ซึ่งพันธะหลักที่มีผลต่ออันตรกิริยาโดยรวม คือ การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างลิแกนด์กับกรดอะมิโนซึ่งแสดงในตาราง 58 และภาพประกอบ 83 ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าสารแพนดูราตินเอสามารถจับกับโปรตีนเป้าหมายได้โดยให้ค่าพลังงานการจับและค่าคงที่การยับยั้ง K_i น้อยดังแสดงรายละเอียดดังนี้

ตาราง 59 แสดงค่าพลังงานการจับระหว่างแพนดูราตินเอและโปรตีนเป้าหมาย

โปรตีนเป้าหมาย	ลิแกนด์	พารามิเตอร์		
		RMSD	K_i (uM)	Binding energy (kcal/mol)
5FED	PA	1.545	2.83	-7.57
	N-[7-methyl-1-[(3R)-1-propanoylazepan-3-yl]benzimidazol-2-yl]-3-(trifluoromethyl)benzamide		1.58	-7.91
5HG7	PA	1.791	0.719	-8.38
	PF-06459988 (EGFR Inhibitor)		5.17	-7.21
1BG1	PA	-	3.97	-7.37
	N-[7-methyl-1-[(3R)-1-propanoylazepan-3-yl]benzimidazol-2-yl]-3-(trifluoromethyl)benzamide		3.63	-7.42
4GV1	PA	1.339	1.23	-8.06
	Capivasertib		0.2	-9.14
4CFE	PA	1.494	0.828	-8.30
	Benzimidazole derivative (991)		0.004	-11.52

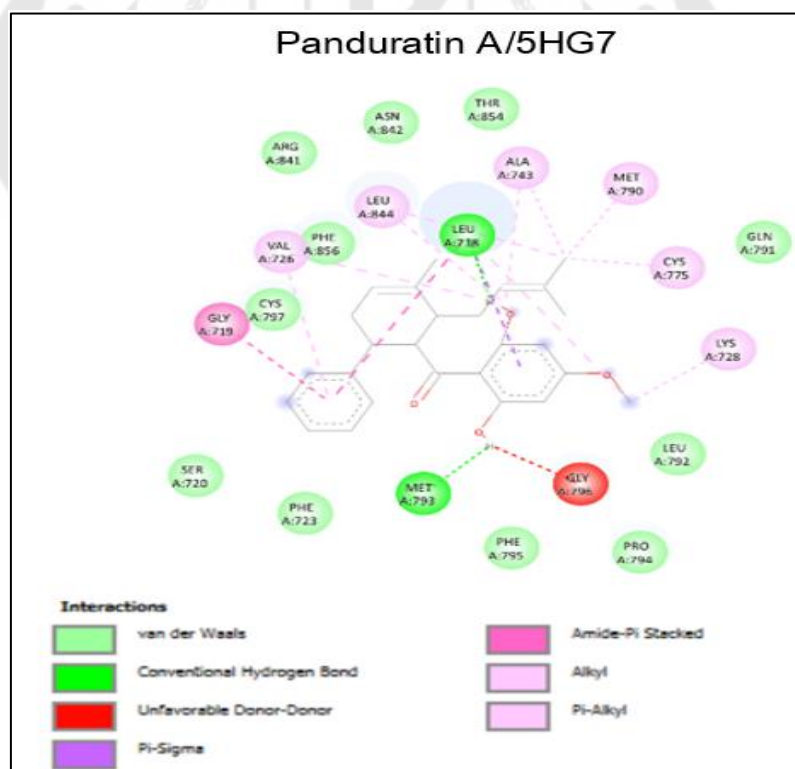
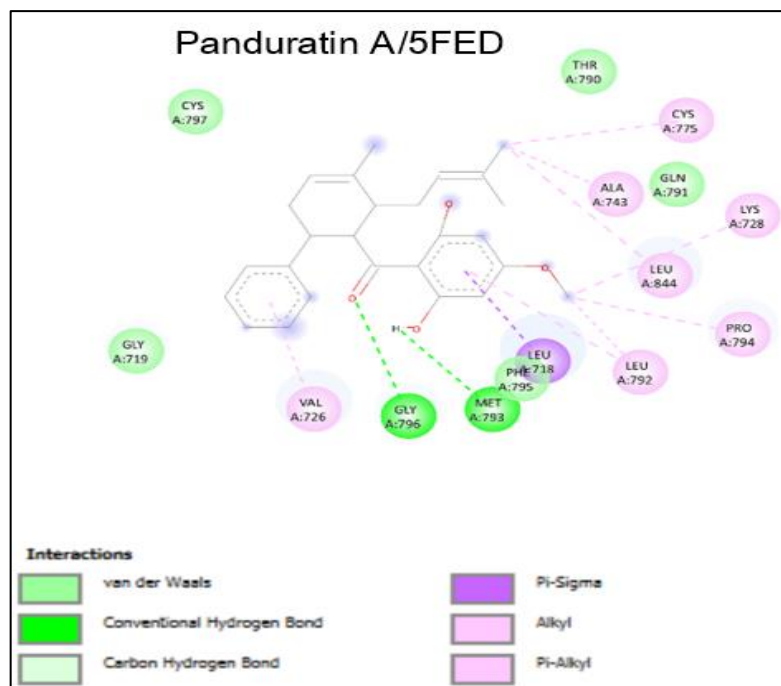


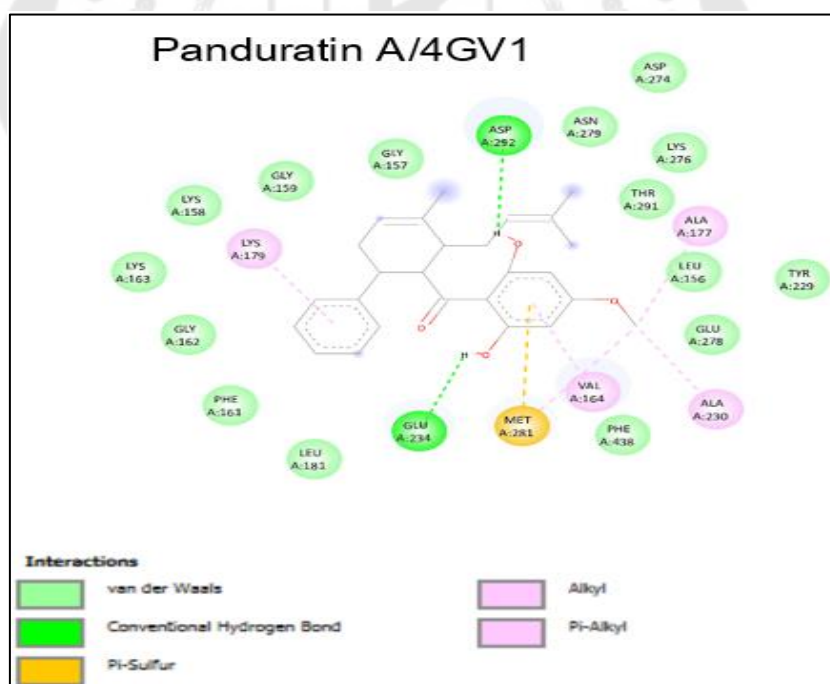
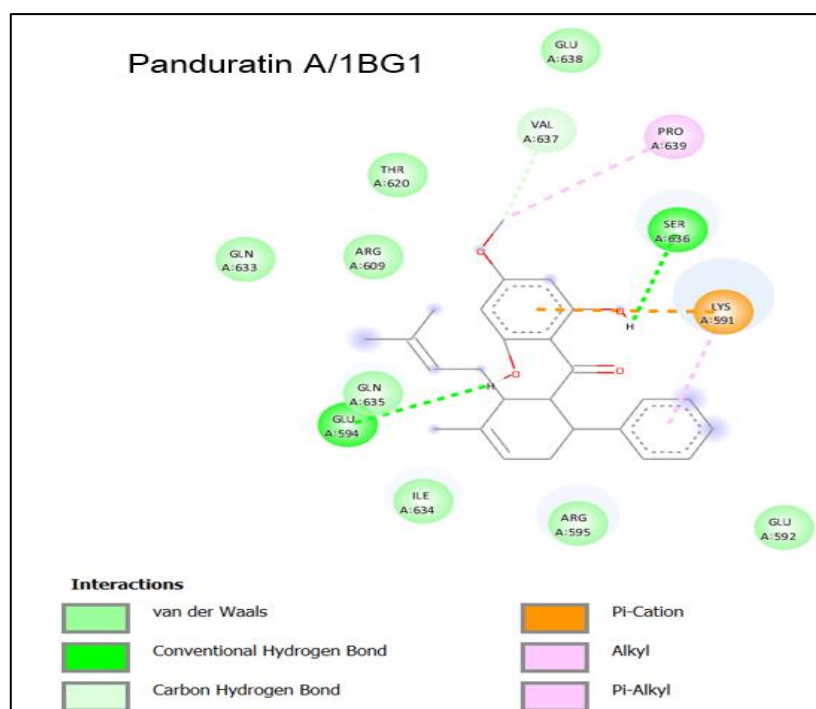
ภาพประกอบ 82 แผนดูราตินเอที่ถูกระบุลำดับวงแหวน

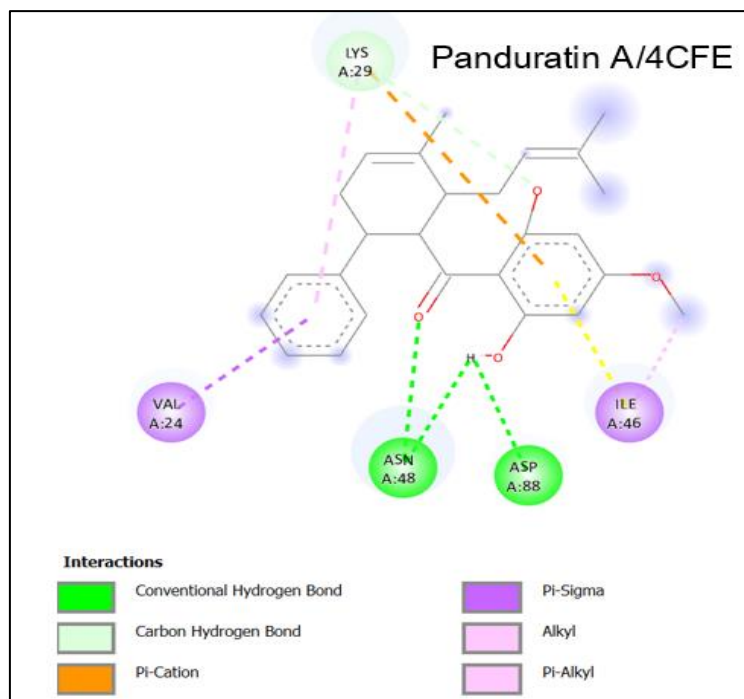
ที่มา: (119)

ตาราง 60 ประเภทของ hydrogen bonds และ hydrophobic contacts ระหว่างหมู่ฟังก์ชันของ
แผนดูราตินเอและกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมาย

Functional groups	กรดอะมิโนในโปรตีนเป้าหมายที่เกิดอันตรกิริยากับลิแกนด์				
	5FED	5HG7	1BG1	4GV1	4CFE
Aromatic (Ring I)	VAL726	GLY719 VAL726 LEU718	LYS591	LYS179	VAL24 LYS29
Methyl cyclohexane (Ring II)	—	—	—	—	—
2-methyl-2-butene	CYS775 ALA743 LEU844	LEU844 ALA743 MET790 CYS775	—	—	—
Carbonyl	GLY796	—	—	—	ASN48
Aromatic (Ring III)	LUE792 LUE718	LEU718	LYS591	MET281 VAL164	ILE46 LYS29
Methoxyl (Ring III)	LYS728 PRO794 LEU792	LYS728 LEU718	VAL637 PRO639	ALA230	ILE46
Hydroxyl (Ring III)	MET793	GLY295 MET793 LEU844 VAL726 ALA763	GLU594 SER636	ASP292 GLU234	ASN48 ASP88 LYS29







ภาพประกอบ 83 แสดงอันตรกิริยาระหว่างกรดอะมิโนของโปรตีนเป้าหมายกับแพนดูราตินเอ

4.8 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายขาว

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายขาวพบว่าสารแพนดูราตินเอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลางโดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 31.13 ± 2.33 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อเทียบกับวิตามินซีที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.06 ± 0.22 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแพนดูราตินเอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าวิตามินซีประมาณ 10 เท่า เนื่องจากภายในโครงสร้างของแพนดูราตินเอมีหมู่ที่ให้อิเล็กตรอนกับ DPPH ได้เพียง 1 หมู่เท่านั้น ส่วนสารฟิโนสโตรบินไม่สามารถหาค่า IC_{50} ด้วยเทคนิค DPPH เนื่องจากโครงสร้างของฟิโนสโตรบินไม่สามารถให้อิเล็กตรอนกับ DPPH ได้ ดังนั้นควรต้องทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของฟิโนสโตรบินด้วยเทคนิคอื่น

ตาราง 61 แสดงค่า IC_{50} ของแพนดูราตินเอ ฟิโนสโตรบินและวิตามินซีในการต้านอนุมูลอิสระ

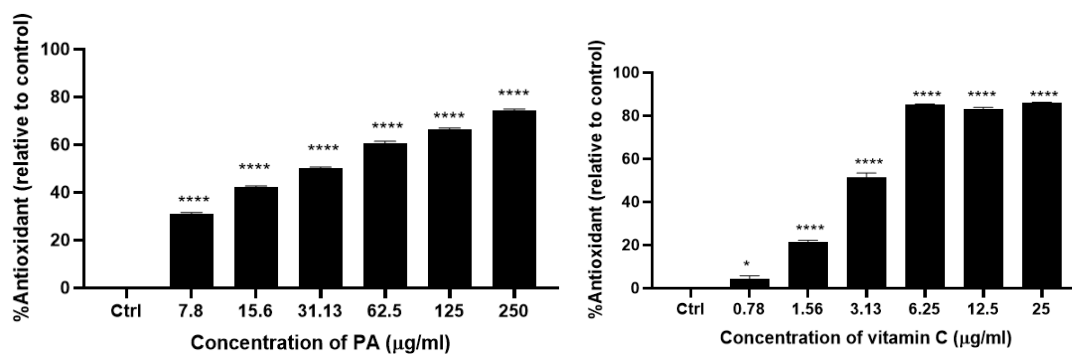
สาร	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
แพนดูราตินเอ	30.25	33.76	29.36	31.13	2.33
ฟิโนสโตรบิน	ไม่สามารถหาค่าได้ด้วยเทคนิค DPPH				
วิตามินซี	2.93	3.31	2.94	3.06	0.22

ตาราง 62 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารแพนดูราตินเอ

ความเข้มข้นของ สารแพนดูราตินเอ ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7.8	30.40	30.40	32.22	31.00	1.05
15.6	41.03	42.55	42.86	42.15	0.98
31.13	50.46	49.24	50.76	50.15	0.80
62.5	62.01	59.27	60.79	60.69	1.37
125	67.48	65.65	66.26	66.46	0.93
250	75.38	73.56	74.47	74.47	0.91

ตาราง 63 เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซี

ความเข้มข้นของ วิตามินซี ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย	SD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.78	1.82	4.56	6.69	4.36	2.44
1.56	20.06	22.80	21.28	21.38	1.37
3.13	53.50	47.72	53.50	51.57	3.33
6.25	84.80	85.11	85.71	85.21	0.46
12.5	82.68	82.37	84.50	83.18	1.15
25	86.02	86.32	86.32	86.22	0.18



ภาพประกอบ 84 ผลของสารแพนดูราทินเอและวิตามินซีต่อการต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบการต้านอนุมูลอิสระของสารแพนดูราทินเอที่ความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.13, 62.5, 125 และ 250 µg/ml ด้วยวิธี DPPH ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (n=3), *P<0.05, ****P<0.0001 เทียบกับ Control

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินออกจากเหง้ากระชายขาว โดยใช้เทคนิคอัลตราโซนิคร่วมกับตัวทำละลายอินทรีย์ โดยได้ศึกษาขนาดของสมุนไพรร ชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ อัตราส่วนของตัวทำละลาย เวลาที่ใช้ในการสกัด จำนวนการสกัดซ้ำ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาคือ ใช้ขนาดสมุนไพรรขนาด 125 μm ในตัวทำละลายเฮกเซน ที่อัตราส่วนผงเหง้ากระชายขาวต่อปริมาตรเฮกเซน 1 g ต่อ 30 ml ที่อุณหภูมิ 30-35 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าที่สภาวะดังกล่าวสามารถให้ผลผลิตของสารสกัดเฮกเซน เท่ากับ 6.96 % โดยที่ 1 mg มีปริมาณสารพิโนสโตรบินเท่ากับ 35.68 ± 1.11 g และแพนดูราตินเท่ากับ 10.48 ± 0.34 g ซึ่งการสกัดเพียงครั้งเดียวสามารถให้ร้อยละประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดมากกว่า 80 % ในขณะที่สกัดสารตัวอื่นที่ไม่สนใจออกมาได้น้อย ซึ่งจากการศึกษาพฤติกรรมการละลายของเฮกเซนเทียบกับการทดลองพบว่าเฮกเซนเป็นสารที่ให้ความสามารถในการละลายสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอออกมาได้น้อยที่สุด แต่เมื่อลดขนาดของผงกระชายให้เล็กลงส่งผลให้เฮกเซนสามารถสกัดสารสำคัญออกมาได้มากขึ้นประมาณ 50% ดังนั้นปัจจัยหลักที่ทำให้สามารถสกัดสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอจากผงเหง้ากระชายออกมาได้มากที่สุดสำหรับงานวิจัยนี้ คือ ขนาดของผงสมุนไพรร เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวของผงกระชายส่งผลให้ตัวทำละลายทุกชนิดสามารถแทรกตัวเข้าไปถึงโมเลกุลของสารสำคัญออกมาได้ดีขึ้นโดยเฉพาะตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำอย่างเฮกเซน และจากการใช้เครื่องอัลตราโซนิคในการสกัดสารยังส่งผลให้ผนังเซลล์ของผงกระชายแตกออกมากขึ้นตัวทำละลายที่มีความหนืดต่ำสามารถสกัดสารออกมาได้ดีขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sanjaya และคณะ (98)

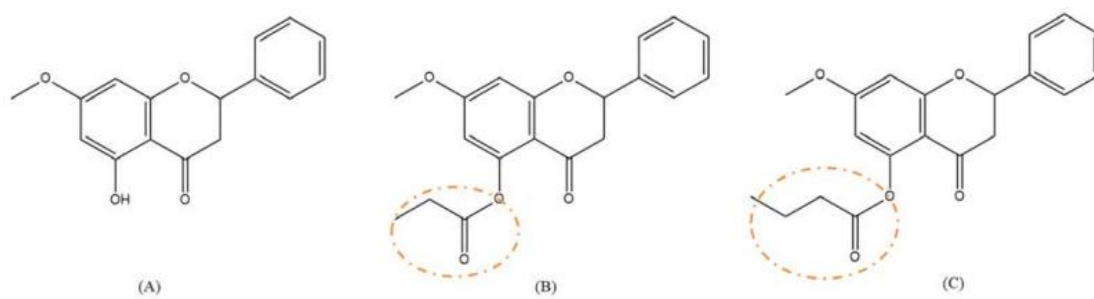
จากผลการศึกษาการแยกสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอจากสารสกัดเฮกเซนด้วยเทคนิค CPC และวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วย LC-MS/MS พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร คือ ใช้โหมดการแยกเป็น ascending mode เนื่องจากสารพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอเป็นสารค่อนข้างมีขั้วต่ำจึงจำเป็นต้องใช้ตัวพาที่มีขั้วต่ำ โดยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกคือสารละลายผสมของเฮกเซน:เมทานอล:น้ำ อัตราส่วน 5:3.4:1.6 (v/v) โดยปริมาตรของสารสกัดเฮกเซนความเข้มข้นเท่ากับ 1 g/ml ปริมาตร 0.5 ml (66.67 mg) ในตัวพา คือสารละลายในส่วน upper ของระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกผสมกับเมทานอลที่อัตราส่วน 3.5/3.5 ml เป็นสภาวะที่สามารถให้ผลผลิตของพิโนสโตรบินและแพนดูราตินเอบริสุทธิ์

เท่ากับ 2.16 และ 0.4 mg ตามลำดับ และให้ความบริสุทธิ์ของสารทั้งสองชนิดได้มากกว่า 98 % ซึ่งเป็นการแยกสารให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียวโดยใช้เวลาเพียงครั้งละ 30 นาที หลังจากแยกสารสกัดบริสุทธิ์พินอสโตรบินและแพนดูราตินเอได้แล้วนำสารทั้ง 2 ชนิดไปพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS QTOF และพิสูจน์โครงสร้างโมเลกุลของสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิค ^1H NMR ซึ่งพบว่าสารบริสุทธิ์ทั้งสองเป็นสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอโดยไม่มีสารอื่นจากกระชายหลงเหลือปนเปื้อนมาในตัวอย่างสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าขั้นตอนการแยกสารพินอสโตรบินและแพนดูราตินเอด้วยเทคนิค CPC ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกสารให้มีความบริสุทธิ์สูงด้วยขั้นตอนเดียว ทำให้ใช้เวลาดำเนินการสั้น ลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายที่เป็นพิษ ทำให้ต้นทุนต่ำ ได้ผลผลิตในปริมาณสูง อีกทั้งยังเป็นขั้นตอนที่ง่ายสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดจากการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากหลายขั้นตอน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการศึกษาก่อนหน้านี้ในการสกัดสารแพนดูราตินเอจากเหง้ากระชายโดย Salama และคณะ(30) ได้สกัดและแยกสารแพนดูราตินเอจากกระชายให้บริสุทธิ์ด้วย silica gel column chromatography พบว่าใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการแยกเป็นเวลา 10 วัน โดยให้ความบริสุทธิ์ของสารอยู่ที่ 96.6% และจากการทบทวนงานวิจัยของการแยกสารพินอสโตรบินจากกระชายของ Liana และคณะ(120) โดยใช้ระบบของเหลว (Liquid/Liquid extraction) ที่ปราศจากการแยกด้วย column chromatography โดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลายเฮกเซนโดยใช้เวลาในการสกัด 30 นาที และแช่หมักไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำสารสกัดเฮกเซนไปแยกด้วย Liquid/Liquid extraction ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เฮกเซน/เอทิลอะซิเตต (3.0:0.2 v/v) ทำให้เกิดการตกตะกอนของผลึกสีขาวนวลซึ่งให้ % yield = 1.12% ซึ่งเทคนิคการแยกด้วย Liquid/Liquid extraction ของ Liana และคณะสอดคล้องกับงานวิจัยฉบับนี้ แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังคงให้ผลผลิตและความบริสุทธิ์ต่ำเมื่อเทียบกับเทคนิค CPC ที่พัฒนาขึ้น

เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารบริสุทธิ์แล้วจึงนำสารทั้ง 2 ชนิดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิดปฐมภูมิ A549 และทุดิยภูมิ H1975 รวมทั้งเซลล์ปกติ MRC5 พบว่าสารแพนดูราตินเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์ A549 และ H1975 โดยสามารถยับยั้งการรอดชีวิตของเซลล์ A549 และ H1975 ในลักษณะแปรผันตามความเข้มข้น มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.03 ± 0.21 และ 5.58 ± 0.15 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแพนดูราตินเอมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ โดยให้ค่า IC_{50} ในเซลล์ปกติเท่ากับ 12.96 ± 0.36 และเมื่อพิจารณาถึงค่าความปลอดภัย (selectivity index) พบว่ามีค่ามากกว่า 2 ทั้งในเซลล์ A549 และ H1975 ซึ่ง

แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งมากกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นสามารถนำแพนคูราตินเอไปพัฒนาเป็นสารต้านมะเร็งปอดได้ (118) โดยมีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งชนิด EGFR wild type และ EGFR mutant แต่ผลการทดสอบสารพินอสโตรบินพบว่าไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้ เนื่องจากไม่สามารถละลายและเกิดผลึกในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งโครงสร้างของพินอสโตรบินเกิดการสร้างพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลโดยมีหมู่ไฮดรอกซิล (OH) สร้างพันธะกับหมู่ carbonyl (C=O) ที่อยู่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะกับน้ำได้น้อยลง ส่งผลให้พินอสโตรบินละลายน้ำได้น้อยซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Widiandani และคณะ (118) ที่ปรับปรุงโครงสร้างของพินอสโตรบินเพื่อเพิ่มฤทธิ์ในการต้านมะเร็งโดยเติม acyl compounds ที่มีหมู่ OH ดังแสดงในภาพประกอบ ส่งผลให้สารสามารถละลายได้ดีขึ้น



ภาพประกอบ 85 โครงสร้างของ (A) pinostrobin, (B) pinostrobin propionate และ (C)

pinostrobin butyrate

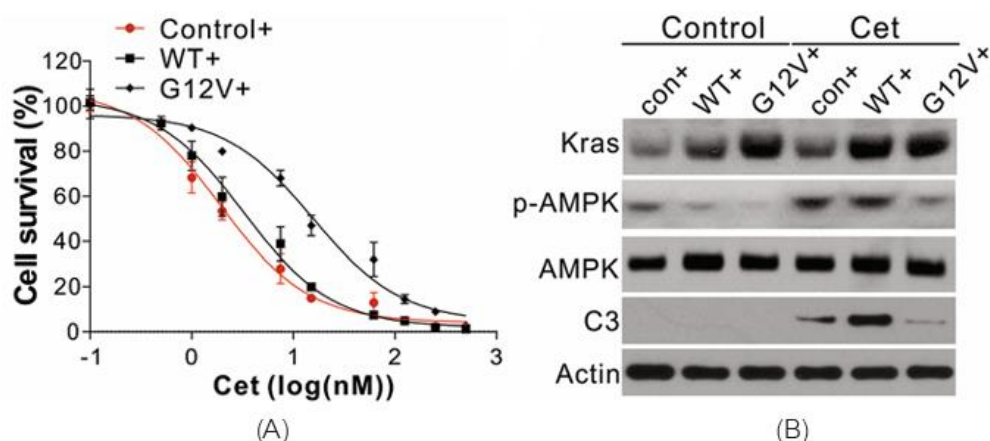
ที่มา: (118)

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสาเหตุในการเกิดมะเร็งปอดชนิด NSCLC มักเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน EGFR มากที่สุด ส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณกระตุ้นภายในเซลล์มากเกินไปนำไปสู่การเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งจนไม่สามารถควบคุมได้และเกิดภาวะการดื้อยาต้าน EGFR ดังนั้น EGFR จึงเป็น biomarker หลักที่เป็นเป้าหมายในการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC (67) และโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ EGFR ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายและเป็นเป้าหมายในการศึกษากลไกภายในเซลล์ของการเกิดโรคมะเร็งปอด NSCLC ที่สำคัญ 3 วิถีสัญญาณ ได้แก่ Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT และ STAT3 (121-123) ซึ่งจากการศึกษากลไกการรักษามะเร็งปอด NSCLC ทั้งแบบ EGFR wild-type และ EGFR mutant ของยาต้าน EGFR-TKI เช่น gefitinib ซึ่งเป็นยาต้าน EGFR wild-type (EGFR del19 หรือ L858R)(124) และ osimertinib ซึ่งเป็นยาต้าน EGFR mutant (L858R/T790M)(125) พบว่าใช้กลไกในการรักษามะเร็งปอดโดยยับยั้งการเกิดฟอสโฟรีเลชันของ EGFR ภายในเซลล์ (intracellular

phosphorylation) ดังนั้นในงานวิจัยนี้โปรตีน EGFR จึงเป็นเป้าหมายหลักในการค้นคว้าหาสารที่ใช้สำหรับต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด NSCLC ผ่านการยับยั้งกระบวนการเกิดฟอสโฟริเลชันภายในเซลล์ส่งผลให้ลดการกระตุ้นการส่งสัญญาณไปยังวิถีสัญญาณที่สำคัญ คือ PI3K/AKT และ STAT3 ซึ่งจากผลการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot หลังจากทดสอบด้วยสารแพนดูราตินเอนเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในเซลล์ A549 และ H1975 พบว่าสารแพนดูราตินเอนมีผลยับยั้งการเกิดฟอสโฟริเลชันของโปรตีน EGFR, Akt, STAT3 ทั้งในเซลล์ A549 และเซลล์ H1975 จากการทบทวนงานวิจัยก่อนหน้านี้ในการศึกษาของ Sun และคณะ(92) พบว่าแพนดูราตินเอนเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับอ่อนของมนุษย์ PANC-1 โดยสามารถยับยั้งการแพร่กระจายและเพิ่มจำนวนของเซลล์ผ่านวิธีการส่งสัญญาณ PI3K / Akt / mTOR ในสภาวะอดอาหารส่งผลให้กระตุ้นการเกิด autophagy ทำให้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง และจากการศึกษาสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสารแพนดูราตินเอน คือสารประเภทชาโคโนพบว่า Chen และคณะ(94) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุพันธ์ของไอโซบาวาชาโคโนและประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ของไอโซบาวาชาโคโนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ H1975 และ A549 โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 4.35 และ 14.21 μM ตามลำดับ โดยลดการเกิด p-Akt ส่งผลให้กระตุ้นการตายของเซลล์ผ่าน apoptosis นอกจากนี้พบว่าการลดลงของ p-STAT3 ในการศึกษาแล้วยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuzniak และคณะ(91) ซึ่งได้ศึกษาสารกลุ่มชาโคโนสามารถยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของ STAT3 ได้โดยยับยั้งกระบวนการฟอสโฟริเลชันของ JAK2/Src-STAT3

จากผลการทดลองยังพบว่าแพนดูราตินเอนมีผลกระตุ้น AMPK ในเซลล์ H1975 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lai และคณะ (89) ได้รายงานว่แพนดูราตินเอนเป็นสารกระตุ้น AMPK ทำให้เกิดฤทธิ์และกลไกการต้านมะเร็งผิวหนังในเซลล์ A375 โดยการยับยั้งวิธีการส่งสัญญาณของ mTOR และกระตุ้น AMPK ส่งเสริมให้เพิ่มการตายของเซลล์แบบ autophagy อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแพนดูราตินเอนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสร่วมด้วย แต่ในทางกลับกันจากผลการทดลองพบว่าแพนดูราตินเอนมีผลยับยั้งการกระตุ้นโปรตีน AMPK ในเซลล์ A549 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน KRAS แสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์ A549 อาจไม่ผ่าน p-AMPK ซึ่งผลการแสดงออกของโปรตีนสอดคล้องกับจากการศึกษาของ Montagna และคณะ (64) พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน KRAS เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ AMPK ลดลงและสอดคล้องกับการศึกษาของ Ye และคณะ (126) พบว่าเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีการกลายพันธุ์

ของยีน KRAS สามารถยับยั้งการกระตุ้นโปรตีน AMPK และส่งผลให้เกิดการดื้อยาต้าน EGFR (cetuximab) ดังแสดงในภาพประกอบ 84 (A) และ (B)

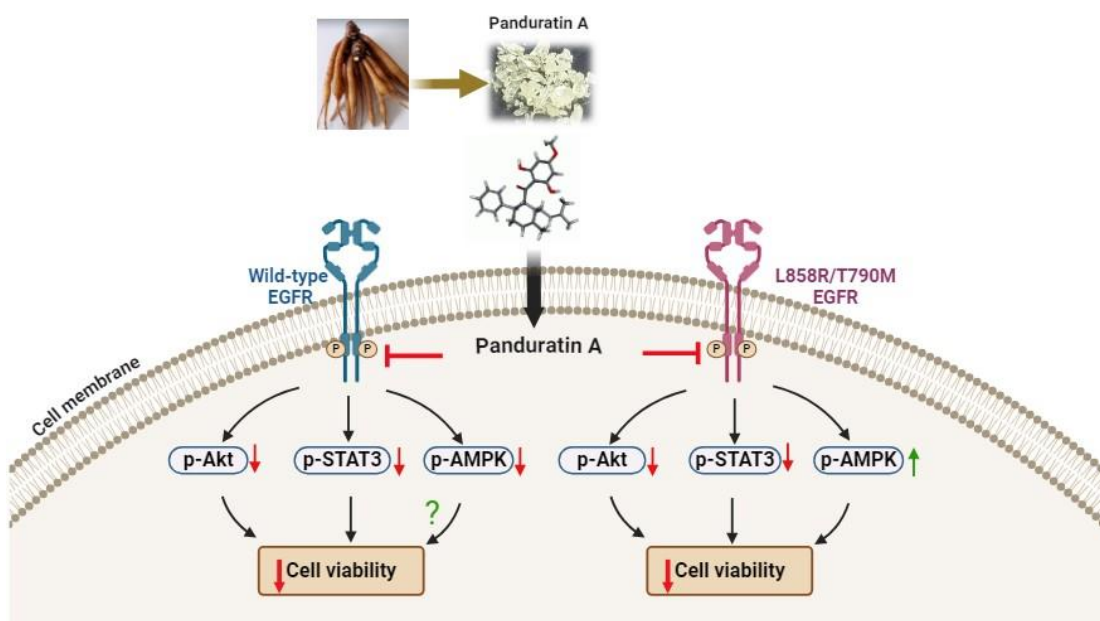


ภาพประกอบ 86 ผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ชนิด DLD1, Kras WT และ Kras mutant (G12V) เมื่อได้รับยาต้าน cetuximab ที่ความเข้มข้นต่างๆ (A) และ ผลการแสดงออกของโปรตีน AMPK ในเซลล์ที่ได้รับการทดสอบด้วยยาต้าน cetuximab ที่ความเข้มข้น 5 nM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ที่มา: (126)

งานวิจัยนี้สรุปได้ว่าสารแพนดูราตินเอที่แยกได้จากเหง้ากระชายขาวมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยสามารถลดการรอดชีวิตของเซลล์ผ่านการยับยั้งการเกิด p-EGFR ภายในเซลล์และส่งผลให้ลด p-Akt และ p-STAT3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ EGFR ทั้งในเซลล์ A549 และเซลล์ H1975 นอกจากนี้สารแพนดูราตินเอยังสามารถกระตุ้นการเกิด p-AMPK ในเซลล์ H1975 โดยยืนยันผลการศึกษาก่อนการเกิดฟอสโฟริเลชันด้วยโมเลกุลาร์ดอกกิงซึ่งพบว่าแพนดูราตินเอสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนเป้าหมายคือ EGFR mutant ได้ดีโดยใช้ค่าพลังงานในการยับยั้งกับโปรตีน EGFR mutant (5HG7) ด้วยพลังงานและค่า K_i เท่ากับ -8.38 และ 0.719 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าต่ำกว่าพลังงานที่ใช้ในการจับกับลิแกนด์ของยาต้าน EGFR TKI (พลังงานและค่า K_i เท่ากับ -7.21 และ 5.17 ตามลำดับ) ดังนั้นเป็นการยืนยันว่าสารแพนดูราตินเอสามารถจับกับโปรตีน EGFR mutant ซึ่งเป็นเป้าหมายในการรักษามะเร็งปอดชนิด NSCLC ได้ดีเทียบเท่ากับยาต้าน EGFR TKI โดยกลไกการยับยั้งฟอสโฟริเลชันที่ส่งผลให้ลดความมีชีวิตรอดของเซลล์แสดงดังภาพประกอบ 87 จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสารแพนดูราตินเอสามารถทำให้เซลล์มะเร็ง

ตายได้ทั้งแบบกระตุ้นให้เกิดอะพอพโทซิสหรือเกิดอโตฟาจี หรือเกิดได้ทั้งสองแบบ ซึ่งต้องมีการศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ผ่านวิธีการส่งสัญญาณเส้นทางนี้ต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น



ภาพประกอบ 87 กลไกการยับยั้งฟอสโฟริเลชันของ EGFR, Akt, STAT3 และกระตุ้น AMPK ของสารแพนดูราตินเอต่อการลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ EGFR wild-type และ EGFR mutant

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารแพนดูราตินเอมีศักยภาพเป็นสารต้านมะเร็งปอดชนิด NSCLC แบบไม่จำเพาะเจาะจงต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์ทั้งมะเร็งปอดที่มี EGFR wild-type และ EGFR mutant สามารถนำไปพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาคาต้าน EGFR TKIs ที่ต้องมีการใช้ยาหลายรุ่นได้ นอกจากนี้แพนดูราตินเอซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติยังมีความปลอดภัย ($SI > 2$) ให้ความเป็นพิษที่จำเพาะกับเซลล์มะเร็งปอดมากกว่าเซลล์ปกติอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังไม่ได้ศึกษากลไกการตายของเซลล์จึงควรศึกษารูปแบบการตายของเซลล์ผ่านวิธีการส่งสัญญาณเส้นทางนี้ต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น



บรรณานุกรม

1. World Health Organization W. Cancer incidence and mortality statistics worldwide and by region 2020 [Available from: Retrieved from <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2022;72(1):7-33.
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229-63.
4. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1(1):15009.
5. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):288-300.
6. Mehta A, Vasudevan S, Sharma SK, Panigrahi M, Suryavanshi M, Saifi M, et al. Biomarker testing for advanced lung cancer by next-generation sequencing; a valid method to achieve a comprehensive glimpse at mutational landscape. *Applied Cancer Research*. 2020;40(1):4.
7. Hsu WH, Yang JC, Mok TS, Loong HH. Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC. *Ann Oncol*. 2018;29(suppl_1):i3-i9.
8. Chen X, Xu B, Li Q, Xu X, Li X, You X, et al. Genetic profile of non-small cell lung cancer (NSCLC): A hospital-based survey in Jinhua. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8(9):e1398.
9. Leduc C, Merlio JP, Besse B, Blons H, Debievre D, Bringuier PP, et al. Clinical and molecular characteristics of non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring EGFR mutation: results of the nationwide French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) program. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2715-24.
10. Dutta P, Sabri N, Li J, Li WX. Role of STAT3 in lung cancer. *Jakstat*. 2014;3(4):e999503.
11. Targeted Oncology. Diagnosis, Staging, and Testing for Nonsquamous NSCLC 2017 [Available from: Retrieved from <https://www.targetedonc.com/view/diagnosis-staging-and-testing-for-nonsquamous-nsclc>.
12. Philip A, Samuel BA. Chapter 9 - Advanced drug delivery systems in lung cancer. In: Dua K, Mehta M, de Jesus Andreoli Pinto T, Pont LG, Williams KA, Rathbone MJ, editors. *Advanced*

Drug Delivery Systems in the Management of Cancer: Academic Press; 2021. p. 101-6.

13. ณิชา ซึ่งสนธิพร. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนเอพิเดอร์มอลโกรทแฟกเตอร์รีเซปเตอร์ชนิดทิวติงกูมิแบบ T790M ในผู้ป่วยโรคมะเร็งปอดชนิดเซลล์ที่ขนาดเล็กที่มีการกลายพันธุ์ของยีนอีจีเอฟอาร์ภายหลังที่ได้รับยาต้านอีจีเอฟอาร์ไทโรซีนไคเนส [ปริญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต อายุรศาสตร์]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2563.
14. Ng WW, Lin CC, Cheng CY, Jiang JS, Kao SJ, Yeh DY. Real-world outcomes of first- and second-generation tyrosine kinase inhibitors first-line in patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small cell lung cancer: A retrospective observational cohort study. PLoS One. 2021;16(6):e0253335.
15. Isa NM, Abdelwahab SI, Mohan S, Abdul AB, Sukari MA, Taha MM, et al. In vitro anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of boesenbergin A, a chalcone isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) (fingerroot). Braz J Med Biol Res. 2012;45(6):524-30.
16. Saah S, Siriwan D, Trisonthi P. Biological activities of *Boesenbergia rotunda* parts and extracting solvents in promoting osteogenic differentiation of pre-osteoblasts. Food Bioscience. 2021;41:101011.
17. Sri A, Sri H, Anna R. Potential Bioactive Compounds Isolated from *Boesenbergia rotunda* as Antioxidant and Antimicrobial Agents. Pharmacognosy Journal. 2018;10(3).
18. Uaraksakul P, Chanprapai P. In Vitro Antifungal Activity of *Boesenbergia rotunda* Linn. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. and Perry Extracts against *Aspergillus flavus*. Medical Sciences Forum [Internet]. 2022; 12(1).
19. Han C, Raksat A, Atanu MS, Chang L, Wall M, Chang L. Investigation of Antimicrobial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities of *Boesenbergia rotunda* rhizome extract. Journal of Current Science and Technology. 2023;14.
20. Bailly C. Toward the use of *Boesenbergia rotunda* extracts and the chalcone panduratin A to treat periodontitis. Journal of Oral Biosciences. 2022;64(2):183-92.
21. Widyananda MH, Wicaksono ST, Rahmawati K, Puspitarini S, Ulfa SM, Jatmiko YD, et al. A Potential Anticancer Mechanism of Finger Root (*Boesenbergia rotunda*) Extracts against a Breast Cancer Cell Line. Scientifica (Cairo). 2022;2022:9130252.
22. Break MKB, Chiang M, Wiart C, Chin C-F, Khoo ASB, Khoo T-J. Cytotoxic Activity of *Boesenbergia rotunda* Extracts against Nasopharyngeal Carcinoma Cells (HK1). Cardamonin, a *Boesenbergia rotunda* Constituent, Inhibits Growth and Migration of HK1 Cells by Inducing Caspase-Dependent Apoptosis and G2/M–Phase Arrest. Nutrition and Cancer. 2021;73(3):473-83.

23. Adhikari D, Gong D-S, Oh SH, Sung EH, Lee SO, Kim D-W, et al. Vasorelaxant Effect of *Boesenbergia rotunda* and Its Active Ingredients on an Isolated Coronary Artery. *Plants* [Internet]. 2020; 9(12).
24. Yusuf N, Suffian M, Annuar MS, Khalid N. Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Kulturpfl. Australian Journal of Crop Science*. 2013;7:730-4.
25. Chong T, Yean-Kee L, Chee CF, Heh CH, Sher-Ming W, Thio C, et al. *Boesenbergia rotunda*: From Ethnomedicine to Drug Discovery. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2012;2012:473637.
26. Hop NQ, The Son N. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.: A Review of Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics. *Current Organic Chemistry*. 2023;27(21):1842-56.
27. Cheah S-C, Appleton DR, Lee S-T, Lam M-L, Hadi AHA, Mustafa MR. Panduratin A Inhibits the Growth of A549 Cells through Induction of Apoptosis and Inhibition of NF-KappaB Translocation. *Molecules* [Internet]. 2011; 16(3):[2583-98 pp.].
28. Tiwari RK, Ahmad A, Khan MS, Shahanawaz SD, Ahmad S, Ansari IA. Pinostrobin suppresses the proliferation of lung carcinoma cells by abrogating the cell cycle progression through the inhibition of Notch signaling pathway. *South African Journal of Botany*. 2022;151:614-22.
29. Onodera K, Sakurada A, Notsuda H, Watanabe T, Matsuda Y, Noda M, et al. Growth inhibition of KRAS- and EGFR-mutant lung adenocarcinoma by cosuppression of STAT3 and the SRC/ARHGAP35 axis. *Oncol Rep*. 2018;40(3):1761-8.
30. Salama SM, AlRashdi AS, Abdulla MA, Hassandarvish P, Bilgen M. Protective activity of Panduratin A against Thioacetamide-induced oxidative damage: demonstration with in vitro experiments using WRL-68 liver cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2013;13(1):279.
31. Potipiranun T, Adisakwattana S, Worawalai W, Ramadhan R, Phuwapraisirisan P. Identification of Pinocembrin as an Anti-Glycation Agent and α -Glucosidase Inhibitor from Fingerroot (*Boesenbergia rotunda*): The Tentative Structure–Activity Relationship towards MG-Trapping Activity. *Molecules* [Internet]. 2018; 23(12).
32. Mottaghipisheh J, Iriti M. Sephadex[®] LH-20, Isolation, and Purification of Flavonoids from Plant Species: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2020;25(18).
33. Kirana C, Jones G, Record I, McIntosh G. Anticancer properties of panduratin A isolated

from *Boesenbergia pandurata* (Zingiberaceae). *Journal of Natural Medicines*. 2007;61:131-7.

34. N. Fakhrudin OPaWS. A simple, fast, and inexpensive nonchromatographic method for the isolation of pinostrobin from *Boesenbergia rotunda* rhizome. *Rasāyan Journal of Chemistry*. 2021;14:735-40.

35. Kim H-H, Kim H-S, Ko J-Y, Kim C-Y, Lee J-H, Jeon Y-J. A single-step isolation of useful antioxidant compounds from *Ishige okamurae* by using centrifugal partition chromatography. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 2016;19(1):22.

36. National cancer institute. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment 2022 [Available from: Retrieved from https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq#_4.

37. Sankar V, Kothai R, Vanisr N. Lung Cancer - A Review. *International Journal of Health Sciences and Research*. 2023;13:307-15.

38. ปาริชาติ นิยมทอง. โรคมะเร็งปอดรู้เท่าทันป้องกันได้. *Journal of the Phrae Hospital*. 2561(21 พฤษภาคม 2565):61-80.

39. Malapelle U, Gravara LD, Battiloro C, Avellino A, Rocco D. Personalized genomic medicine: non-small-cell lung cancer and anaplastic lymphoma kinase. *Journal of Translational Genetics and Genomics*. 2019;3:3.

40. Alam S, Mohammad T, Padder RA, Hassan MI, Husain M. Thymoquinone and quercetin induce enhanced apoptosis in non-small cell lung cancer in combination through the Bax/Bcl2 cascade. *J Cell Biochem*. 2022;123(2):259-74.

41. Mollberg N, Surati M, Demchuk C, Fathi R, Salama A, Husain A, et al. Mind-Mapping for Lung Cancer: Towards a Personalized Therapeutics Approach. *Advances in therapy*. 2011;28:173-94.

42. Villalobos P, Wistuba, II. Lung Cancer Biomarkers. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2017;31(1):13-29.

43. ธีรรัตน์ เรืองเวทย์วัฒนา. การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และการค้นหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเชิงเมตาบอลิซึมของโรคมะเร็งปอดในคนไทย (ปีที่ 3). สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข 2563.

44. ศรสวรรค์ แก้วประเสริฐศรี. ผลของการแสดงออกของ Progesterone receptor ในการส่งสัญญาณของ Epidermal growth factor ในเซลล์มะเร็งปอดชนิดไม่ใช้เซลล์เล็ก [ปริญาวิทยาสาตรมหาบัณฑิต ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2558.

45. รัตนาวดี เตียวเจริญ. อุปัติการณ์และปัจจัยที่ส่งผลต่อการกระจายของมะเร็งปอดชนิดเซลล์ไม่เล็กไปสมองในคนไข้ที่มีการ

กลายพันธุ์ของอีจีเอฟอาร์ [ปริญญวทยาสาตรมหาบัณฑิต อายุรศาสตร์]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2562.

46. Wu K, House L, Liu W, Cho W. Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13:11471-96.

47. Ségaliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann MF, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J Bone Oncol*. 2015;4(1):1-12.

48. Minnelli C, Laudadio E, Mobbili G, Galeazzi R. Conformational Insight on WT- and Mutated-EGFR Receptor Activation and Inhibition by Epigallocatechin-3-Gallate: Over a Rational Basis for the Design of Selective Non-Small-Cell Lung Anticancer Agents. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(5):1721.

49. Suda K, Onozato R, Yatabe Y, Mitsudomi T. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol*. 2009;4(1):1-4.

50. Xie B, Sun L, Cheng Y, Zhou J, Zheng J, Zhang W. Epidermal growth factor receptor gene mutations in non-small-cell lung cancer cells are associated with increased radiosensitivity in vitro. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3551-60.

51. Lababede O, Meziane MA. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *Oncologist*. 2018;23(7):844-8.

52. ศิริินภา คลังแสง, ลัดดาวลย์ เส็งกันไพโร. ไทโรซีนไคเนส: โมเลกุลเป้าหมายที่มีศักยภาพสำหรับการรักษามะเร็ง. *ศรินครินทร์เวชสาร*. 2560;32(1):86-95.

53. Huang L, Fu L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(5):390-401.

54. Yothaisong S, Loilome W. PI3K/Akt Signaling Pathway in Normal and Malignant Cells. *Srinagarind Medical Journal*. 2013;27(1):66-76.

55. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127-50.

56. Harada D, Takigawa N, Kiura K. The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2014;6(2):708-22.

57. Qin J-J, Yan L, Zhang J, Zhang W-D. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019;38(1):195.

58. Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and

c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells. *Biochem J.* 2005;392(Pt 2):335-44.

59. Lee H, Jeong AJ, Ye SK. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. *BMB Rep.* 2019;52(7):415-23.

60. Zheng Q, Dong H, Mo J, Zhang Y, Huang J, Ouyang S, et al. A novel STAT3 inhibitor W2014-S regresses human non-small cell lung cancer xenografts and sensitizes EGFR-TKI acquired resistance. *Theranostics.* 2021;11(2):824-40.

61. Liu Z, Ma L, Sun Y, Yu W, Wang X. Targeting STAT3 signaling overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Death Dis.* 2021;12(6):561.

62. Yuan W, Fang W, Zhang R, Lyu H, Xiao S, Guo D, et al. Therapeutic strategies targeting AMPK-dependent autophagy in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2023;1870(7):119537.

63. Li Y, Chen Y. AMPK and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:85-108.

64. La Montagna M, Shi L, Magee P, Sahoo S, Fassan M, Garofalo M. AMPK α loss promotes KRAS-mediated lung tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2021;28(9):2673-89.

65. Seebacher NA, Stacy AE, Porter GM, Merlot AM. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2019;38(1):156.

66. Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(1):67-81.

67. Khaddour K, Jonna S, Deneka A, Patel JD, Abazeed ME, Golemis E, et al. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in EGFR-Mutated Lung Cancer: Current and Emerging Therapies. *Cancers [Internet].* 2021; 13(13).

68. Lin Y, Wang X, Jin H. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *Am J Cancer Res.* 2014;4(5):411-35.

69. Westover D, Zugazagoitia J, Cho BC, Lovly CM, Paz-Ares L. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2018;29(suppl_1):i10-i9.

70. Tan BC, Tan SK, Wong SM, Ata N, Rahman NA, Khalid N. Distribution of Flavonoids and Cyclohexenyl Chalcone Derivatives in Conventional Propagated and In Vitro-Derived Field-Grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:451870.

71. Chulita Mamak JD, Thanyasiri Phayakkhawisai, , Benyathip Trakoolsilp KJ, Panisara

Sukcharoen, , Phiyaon Seeloomok PA, Natchagorn Lumlerdkij. Evaluation of Evidence Related to Medical Uses and Health Claims of Fingerroot. *Siriraj Medical Bulletin*. 2021;14(2): 61-72.

72. Bahadur Gurung A, Ajmal Ali M, Al-Hemaid F, El-Zaidy M, Lee J. In silico analyses of major active constituents of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) unveils inhibitory activities against SARS-CoV-2 main protease enzyme. *Saudi J Biol Sci*. 2022;29(1):65-74.

73. Wang Z, Zhao J, Chen Y, Liu G, Chang Y, Yang J, et al. Research Progress on the Pharmacological Effects and Molecular Mechanisms of Pinostrobin. *Natural Product Communications*. 2023;18(11):1934578X231215934.

74. San HT, Khine HE, Sritularak B, Prompetchara E, Chaotham C, Che C-T, et al. Pinostrobin: An Adipogenic Suppressor from Fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) and Its Possible Mechanisms. *Foods [Internet]*. 2022; 11(19).

75. Zhao L-L, Jayeoye TJ, Ashaolu TJ, Olatunji OJ. Pinostrobin, a dietary bioflavonoid exerts antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic protective effects against methotrexate-induced ovarian toxicity in rats. *Tissue and Cell*. 2023;85:102254.

76. Widiandani T, Tandian T, Zufar BD, Suryadi A, Purwanto BT, Hardjono S, et al. In vitro study of pinostrobin propionate and pinostrobin butyrate: Cytotoxic activity against breast cancer cell T47D and its selectivity index. *J Public Health Afr*. 2023;14(Suppl 1):2516.

77. Kicuntod J, Khuntawee W, Wolschann P, Pongsawasdi P, Chavasiri W, Kungwan N, et al. Inclusion complexation of pinostrobin with various cyclodextrin derivatives. *J Mol Graph Model*. 2016;63:91-8.

78. San HT, Khine HEE, Sritularak B, Prompetchara E, Chaotham C, Che CT, et al. Pinostrobin: An Adipogenic Suppressor from Fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) and Its Possible Mechanisms. *Foods*. 2022;11(19).

79. Cheenpracha S, Karalai C, Ponglimanont C, Subhadhirasakul S, Tewtrakul S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(6):1710-4.

80. Jamornwan S, Chokpanuwat T, Uppakara K, Soodvilai S, Saengsawang W. Anti-Inflammatory Activity of Panduratin A against LPS-Induced Microglial Activation. *Biomedicines*. 2022;10(10).

81. Bailly C. Toward the use of *Boesenbergia rotunda* extracts and the chalcone panduratin A to treat periodontitis. *J Oral Biosci*. 2022;64(2):183-92.

82. Shindo K, Kato M, Kinoshita A, Kobayashi A, Koike Y. Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. Rhizome. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2006;70(9):2281-4.

83. Ghosh D, Parida P. MULTIPOTENTIAL THERAPEUTIC BIOACTIVE COMPOUND : PANDURATIN A. 2020.
84. Michalkova R, Kello M, Cizmarikova M, Bardelcikova A, Mirossay L, Mojzis J. Chalcones and Gastrointestinal Cancers: Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023; 24(6).
85. Cheah SC, Appleton DR, Lee ST, Lam ML, Hadi AH, Mustafa MR. Panduratin A inhibits the growth of A549 cells through induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB translocation. *Molecules*. 2011;16(3):2583-98.
86. Cheah SC, Lai SL, Lee ST, Hadi AH, Mustafa MR. Panduratin A, a possible inhibitor in metastasized A549 cells through inhibition of NF-kappa B translocation and chemoinvasion. *Molecules*. 2013;18(8):8764-78.
87. Liu Q, Cao Y, Zhou P, Gui S, Wu X, Xia Y, et al. Panduratin A Inhibits Cell Proliferation by Inducing G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(3):328-34.
88. Yun JM, Kwon H, Mukhtar H, Hwang JK. Induction of apoptosis by Panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in human colon cancer HT-29 cells. *Planta Med*. 2005;71(6):501-7.
89. Lai SL, Mustafa MR, Wong PF. Panduratin A induces protective autophagy in melanoma via the AMPK and mTOR pathway. *Phytomedicine*. 2018;42:144-51.
90. Lai SL, Cheah SC, Wong PF, Noor SM, Mustafa MR. In vitro and in vivo anti-angiogenic activities of Panduratin A. *PLoS One*. 2012;7(5):e38103.
91. Krajka-Kuźniak V, Belka M, Papierska K. Targeting STAT3 and NF-κB Signaling Pathways in Cancer Prevention and Treatment: The Role of Chalcones. *Cancers* [Internet]. 2024; 16(6).
92. Sun S, Kim MJ, Omar AM, Phan ND, Awale S. (+)-Panduratin A induces PANC-1 human pancreatic cancer cell death preferentially under nutrient starvation by inhibiting PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling pathway. *Phytomedicine Plus*. 2021;1(4):100101.
93. Michalkova R, Mirossay L, Kello M, Mojzisova G, Baloghova J, Podracka A, et al. Anticancer Potential of Natural Chalcones: In Vitro and In Vivo Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023; 24(12).
94. Chen J, Zhao L, Xu M-F, Huang D, Sun X-L, Zhang Y-X, et al. Novel isobavachalcone derivatives induce apoptosis and necroptosis in human non-small cell lung cancer H1975 cells.

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2024;39(1):2292006.

95. Bahadur Gurung A, Ajmal Ali M, Al-Hemaid F, El-Zaidy M, Lee J. In silico analyses of major active constituents of fingerroot (*Boesenbergia rotunda*) unveils inhibitory activities against SARS-CoV-2 main protease enzyme. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022;29(1):65-74.
96. Fadilah F, Cristie Edina B, Rahmawanti R, Wiyono L, Erlina L, Paramita RI, et al. Molecular dynamic of pinostrobin and pinocembrin from *Kaempferia pandurata* Roxb. towards estrogen receptor positive (ESR) and estrogen receptor negative (VEGFR) of breast cancer. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018;12:S1473-S80.
97. วิภาวรรณ นิละพงษ์ บพ, วันแข็ง สิทธิกิจโยธิน,. การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรไทย:แบบผงแห้งและแบบสกัด. วารสารวิชาพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 2562;29:157-66.
98. Sanjaya Y, Tola P, Rahmawati R. Ultrasound-assisted Extraction as a Potential Method to Enhanced Extraction of Bioactive Compound2022.
99. Sirawich Ditthapornset NL, Surat Areerat. Solvent Selection for Mitragynine Extraction by Hansen Solubility Parameter *Ladkrabang Engineering Journal*,. 2023;40:72-84.
100. Hansen CM. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition (2nd ed.). 2nd Edition ed2007 15 June 2007.
101. Stefanis E, Panayiotou C. Prediction of Hansen Solubility Parameters with a New Group-Contribution Method. *International Journal of Thermophysics*. 2008;29:568-85.
102. Williams L, Rubin J, Edwards H. Calculation of Hansen Solubility Parameter Values for a Range of Pressure and Temperature Conditions, Including the Supercritical Fluid Region. *Industrial & Engineering Chemistry Research - IND ENG CHEM RES*. 2004;43.
103. Örkényi R, Eles J, Faigl F, Vincze P, Prechl A, Szakacs Z, et al. Continuous Synthesis and Purification by Coupling a Multistep Flow Reaction with Centrifugal Partition Chromatography. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2017;56.
104. Gilson Company I. Natural Product Purification by Centrifugal Partition . 2024 [Available from: <https://www.gilson.com/default/learninghub/post/natural-product-purification-by-centrifugal-partition-chromatography.html>.
105. Kedzierski B, Kukuła-Koch W, Głowniak K. Application of CPC and related methods for the isolation of natural substances--a review. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(2):223-7.
106. Lorántfy L, Rutterschmid D, Örkényi R, Bakonyi D, Faragó J, Dargó G, et al. Continuous Industrial-Scale Centrifugal Partition Chromatography with Automatic Solvent System Handling: Concept and Instrumentation. *Organic Process Research & Development*.

2020;24(11):2676-88.

107. Berthod A, Hassoun M, Ruiz-Angel MJ. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2005;383(2):327-40.
108. Könczöl Á. Exploring How Centrifugal Partition Chromatography Progresses Green Chemistry Practices 2023 [updated 9 May 2023. Available from: <https://www.biopharminternational.com/view/exploring-how-centrifugal-partition-chromatography-progresses-green-chemistry-practices>.
109. Nam B, Paudel SB, Kim JB, Jin CH, Lee D, Nam JW, et al. Preparative Separation of Three Monoterpenes from *Perilla frutescens* var. *crispa* Using Centrifugal Partition Chromatography. *Int J Anal Chem.* 2019;2019:8751345.
110. Spinu S, Ortan A, Ionescu D, Moraru I. CENTRIFUGAL PARTITION CHROMATOGRAPHY (CPC) – A NOVEL METHOD OF SEPARATION AND PURIFICATION OF NATURAL PRODUCTS - A SHORT REVIEW. *Current Trends in Natural Sciences.* 2020;9:06-11.
111. Clément Chami M, Bouju E, Lequemener C, de Vaumas R, Hadji-Minaglou F, Fernandez X, et al. Purification of two valepotriates from *Centranthus ruber* by centrifugal partition chromatography: From analytical to preparative scale. *J Chromatogr A.* 2018;1580:126-33.
112. Popp JR, Petrakis EA, Angelis A, Halabalaki M, Bonn GK, Stuppner H, et al. Rapid isolation of acidic cannabinoids from *Cannabis sativa* L. using pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *J Chromatogr A.* 2019;1599:196-202.
113. Wong A GJ. Efficient, Baseline Separation of Pyrethrins by Centrifugal Partition Chromatography. *J Chromatogr Sep Tech.* 2017;8:362.
114. Jeon J-S, Kim CY. Preparative separation and purification of flavonoids and stilbenoids from *Parthenocissus tricuspidata* stems by dual-mode centrifugal partition chromatography. *Separation and Purification Technology.* 2013;105:1-7.
115. AOAC. GUIDELINES FOR DIETARY SUPPLEMENTS AND BOTANICALS AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2013) Appendix K. 2013:2-32.
116. ATCC. MRC5/ATCC 2022 [Available from: Retrieved from file:///C:/Users/acer/Downloads/CCL-171%20Product%20Sheet%20-%20MRC-5.pdf.
117. Zhao BX, Wang J, Song B, Wei H, Lv WP, Tian LM, et al. Establishment and biological characteristics of acquired gefitinib resistance in cell line NCI-H1975/gefitinib-resistant with epidermal growth factor receptor T790M mutation. *Mol Med Rep.* 2015;11(4):2767-74.
118. Widiandani T, Tandian T, Zufar B, Suryadi A, Tri Purwanto B, Hardjono S, et al. In vitro

study of pinostrobin propionate and pinostrobin butyrate: Cytotoxic activity against breast cancer cell T47D and its selectivity index. *Journal of Public Health in Africa*. 2023;14.

119. Boonserm P, Khunrae P, Sutthibutpong T. A computational study on the molecular mechanisms of panduratin A as a potential inhibitor on SARS-CoV-2 protein targets. *Heliyon*. 2023;9(1):e12780.

120. Liana D, Eurtivong C, Phanumartwiwath A. Boesenbergia rotunda and Its Pinostrobin for Atopic Dermatitis: Dual 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase-2 Inhibitor and Its Mechanistic Study through Steady-State Kinetics and Molecular Modeling. *Antioxidants (Basel)*. 2024;13(1).

121. Alam M, Hasan GM, Eldin SM, Adnan M, Riaz MB, Islam A, et al. Investigating regulated signaling pathways in therapeutic targeting of non-small cell lung carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;161:114452.

122. Karimi N, Moghaddam SJ. KRAS-Mutant Lung Cancer: Targeting Molecular and Immunologic Pathways, Therapeutic Advantages and Restrictions. *Cells [Internet]*. 2023; 12(5).

123. Abourehab MAS, Alqahtani AM, Youssif BGM, Gouda AM. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism. *Molecules*. 2021;26(21).

124. Araki T, Yashima H, Shimizu K, Aomori T, Hashita T, Kaira K, et al. Review of the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with Gefitinib. *Clinical Medicine Insights Oncology*. 2012;6:407-21.

125. Santarpia M, Liguori A, Karachaliou N, Cao M, Daffinà M, D'Aveni A, et al. Osimertinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: Design, development and place in therapy. *Lung Cancer: Targets and Therapy*. 2017;Volume 8:109-25.

126. Ye H, Liu Y, Wu K, Luo H, Cui L. AMPK activation overcomes anti-EGFR antibody resistance induced by KRAS mutation in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):115.

ประวัติผู้เขียน

