

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และการอภิปรายผล

การศึกษาทางพฤกษเคมี

1. รายละเอียดพืช: ชื่อพื้นเมือง กลิ้งกลางดง (ภาคตะวันออกเฉียงใต้) ขอเกอโท เป้าเลือด (ภาคเหนือ) บอระเพ็ดยางแดง (ภาคใต้) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Stephania venosa* (Blume) Spreng. ชื่อวงศ์ MENISPERMACEAE ลักษณะ ไม้เถา มีรากสะสมอาหารขนาดใหญ่ โผล่พ้นผิวดิน น้ำยางสีแดงคล้ายเลือด ใบเดี่ยว เรียงเวียนรอบกิ่ง รูปไข่แกมสามเหลี่ยมกว้าง ดอกช่อ แยกเพศ กลีบดอกสีส้มอมน้ำตาล หัวคล้ายหัวมันแกว แต่ใหญ่กว่ามันแกวมาก ใบเหมือนใบบัวก้านและใบ มีสีอย่างเดียวกัน มี ๒ พันธุ์ คือ พันธุ์ขาว มีก้านและใบเป็นสีขาว หยกหัวดูมียางสีขาวและพันธุ์แดง มีก้านและใบเป็นสีแดง หยกหัวดูจะมียางสีแดง สรรพคุณ หัว บำรุงกำลัง บำรุงกำหนด ช่วยเจริญอาหาร เป็นยาอายุวัฒนะ เถา ขับพยาธิ ใบ รักษาแผลสดและแผลเรื้อรัง **การปลูก** ต้องใช้กระถางใหญ่อย่างปลูกบัว จะปลูกกับพื้นดินยกขอบพื้นที่ได้ ใช้ดินร่วนปนทรายผสมอิฐเผาไฟทุบละเอียดเป็นดินปลูก อย่ากลบดินให้แน่น



รูปที่ 6 แสดงส่วนหัวและใบของกระท่อมเลือด

ที่มา : rikaga.exteen.com

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

1. ตัวอย่างพืช: สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาผู้วิจัยได้นำไปให้หอพรรณไม้ กรมอุทยาน สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบความถูกต้องซึ่งมีหมายเลข BKF (Bangkok Forest) เป็นสิ่งยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ แหล่งที่มาและรายละเอียดอื่นๆดังนี้ สมุนไพรกระท่อมเลือด มีเลข BKF 140583

2. การสกัดสมุนไพร: ผู้วิจัยดำเนินการสกัดการสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน เอทิลแอสีเทต แอสีโทน และ เมทานอล ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

สมุนไพรกระท่อมเลือด นำส่วนหัวมาตากแห้งบดเป็นผง 6.2 กิโลกรัมกรัมแช่ในเฮกเซน 25 ลิตร จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งแต่ละครั้งจะต้องกรองสารสกัดแล้วกำจัดตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนได้สารสกัดชั้นเฮกเซน 58.26 กรัม ทำเช่นเดียวกันโดยใช้เอทิลแอสีเทต (25 ลิตร จำนวน 7 ครั้งๆละ 3 วัน) แอสีโทน (25 ลิตร จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 3 วัน) และเมทานอล (25 ลิตร จำนวน 5 ครั้งๆละ 3 วัน) ได้สารสกัดชั้นตัวทำละลาย เอทิลแอสีเทต 126.00 กรัม ชั้นแอสีโทน 111.06 กรัม และ ชั้นเมทานอล 392.70 กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดทั้ง 4 ชนิดกับเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว U937 และ HL-60 รวมทั้งการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test, MTT assay)

การแยกสมุนไพร

1. สมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเอทิลแอสีเทตจำนวน 126.00 กรัมมาแยกแบบหยาบโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ 650.00 กรัม (Merck No. 7734, Mesh 70-230 ASTM) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ (eluent) จากนั้นค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลแอสีเทตจนกระทั่งใช้ตัวทำละลายเอทิลแอสีเทต 100 % เพื่อให้ตัวชะคอลัมน์มีขั้วมากขึ้นจึงผสมเมทานอลลงไปในตัวทำละลายเอทิลแอสีเทตจนกระทั่งใช้เมทานอลความเข้มข้น 100 % สำหรับการเก็บรับสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อดำเนินการคอลัมน์สิ้นสุดลงผู้วิจัยนำส่วนแยก (fraction) ที่ได้ไปตรวจค่าอัตราการไหลด้วยแผ่น TLC อลูมิเนียม นำส่วนแยกทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ ได้ส่วนแยก 8 ส่วน จากนั้นนำส่วนแยก F6 แยกต่ออีก 2 ครั้งได้สารประกอบ Tetrahydropalmatine (1) 3.13 กรัม นำส่วนแยก F7 43.49 กรัม ไปแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจล 600 กรัม ได้ส่วนแยก D1 D2 และ D3 นำ D3 ไปแยกต่อด้วยเทคนิคเดียวกันได้ H2 ซึ่งต่อมาตกผลึกด้วยเอทานอลได้สาร Crebanine (2) 0.71 กรัม

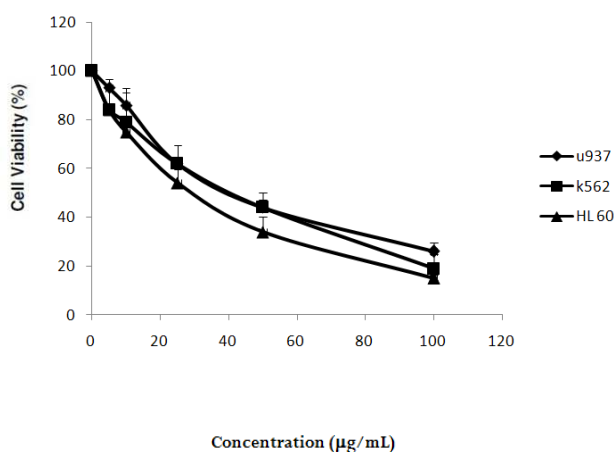
2. สมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นแอสีโทนจำนวน 111.00 กรัมมาแยกแบบหยาบโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกา เจลเป็นตัวดูดซับ 650.00 กรัม (Merck No. 7734, Mesh 70-230 ASTM) โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ (eluent) จากนั้นค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลแอสีเทตจนกระทั่งใช้ตัวทำละลายเอทิลแอสีเทต 100 % เพื่อให้ตัวชะคอลัมน์มีขั้วมากขึ้นจึงผสมเมทานอลลงไปในตัวทำละลายเอทิลแอสีเทตจนกระทั่งใช้เมทานอลความเข้มข้น 100 % สำหรับการเก็บรับสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ครั้งละ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อดำเนินการคอลัมน์สิ้นสุดลงผู้วิจัยนำส่วนแยก (fraction) ที่ได้ไปตรวจค่าอัตราการไหลด้วยแผ่น TLC อลูมิเนียม นำส่วนแยกทั้งหมดไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนและทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งอุณหภูมิต่ำ ได้ส่วนแยก 4 ส่วน นำส่วน F3 25.07 กรัม ไปตกผลึกด้วยเอทานอลได้สารประกอบ O-methylbulbocapnine (3)

1.72 กรัม สำหรับส่วนแยก F4 นำมาตกผลึกเช่นเดียวกันได้สารประกอบ *N*-methyltetrahydropalmatine (4) 0.73 กรัมตามลำดับ

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

1. ความเป็นพิษของสารสกัด hexane , ethylacetate , acetone และ methanol ของกระเทียมเลือดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 ด้วยวิธี MTT assay

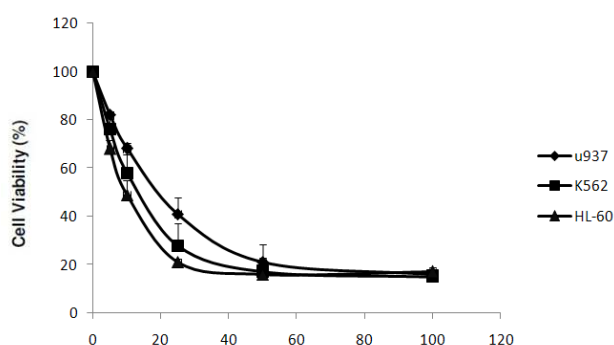
1.1 ผลของสารสกัดสมุนไพรกระเทียมเลือดชั้นเฮกเซนต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562



รูปที่ 7 ผลของชั้นเฮกเซนต่อความเป็นพิษของเซลล์ U937, HL-60 และ K562

ผลของสารสกัดสมุนไพรกระเทียมเลือดชั้นเฮกเซนเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 พบว่า ที่ความเข้มข้น 40, 29 และ 40 µg/ml มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 ตามลำดับ ตายคิดเป็น 50% ของทั้งหมด

1.2 ผลของสารสกัดสมุนไพรกระเทียมเลือดชั้นเอทิลแอสีเทตต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562

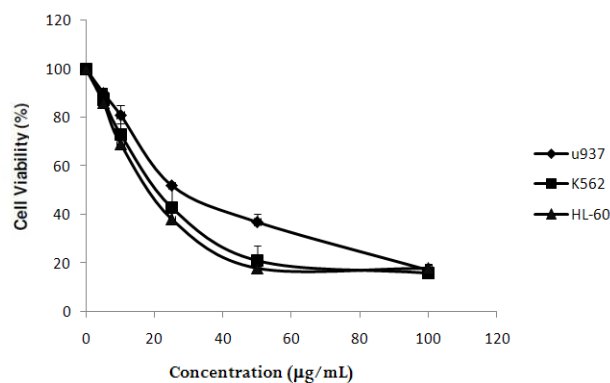


Concentration ($\mu\text{g/mL}$)

รูปที่ 8 ผลของชั้นเอทิลแอสีเทตต่อความเป็นพิษของเซลล์ U937, HL-60 และ K562

ผลของสารสกัดสมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเอทิลแอสีเทตเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 พบว่า ที่ความเข้มข้น 19, 10 และ 14 $\mu\text{g/mL}$ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 ตามลำดับ ตายคิดเป็น 50% ของทั้งหมด

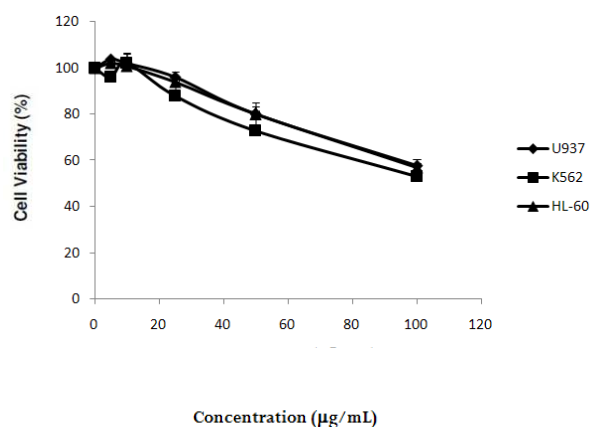
1.3 ผลของสารสกัดสมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเอซีโทนต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562



รูปที่ 9 ผลของชั้นเอซีโทนต่อความเป็นพิษของเซลล์ U937, HL-60 และ K562

ผลของสารสกัดสมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเอซีโทนเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 พบว่า ที่ความเข้มข้น 27, 18 และ 21 $\mu\text{g/mL}$ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 ตามลำดับ ตายคิดเป็น 50% ของทั้งหมด

1.4 ผลของสารสกัดสมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเมทานอลต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937,HL-60 และ K562



รูปที่ 10 ผลของชั้นเมทานอลต่อความเป็นพิษของเซลล์ U937,HL-60 และ K562

ผลของสารสกัดสมุนไพรกระท่อมเลือดชั้นเมทานอลเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงไม่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิดตายได้ถึง 50% ของทั้งหมด

สรุป จากผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้ เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายได้ 50% (IC₅₀) พบว่าสารสกัดกระท่อมเลือดชั้นเอทิลเอซีเทตมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, HL-60 และ K562 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือชั้นแอซีโทน ดังนั้นจึงได้นำสารสกัดจากกระท่อมเลือดชั้นเอทิลเอซีเทตและแอซีโทนไปทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ต่อไป เพื่อหาและศึกษากลไกของสารที่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวได้ดีที่สุด

การพิสูจน์โครงสร้างสารประกอบ

Tetrahydropalmatine (1) เป็นแอลคาลอยด์ปริมาณมากที่แยกได้จากชั้นสกัดเอทิลเอซีเทตมีสูตรโมเลกุลเป็น C₂₁H₂₅NO₄ (355, M⁺) มีลักษณะผลึกเป็นรูปเข็มสีเหลืองจุดหลอมเหลวมีค่า mp 143.8-145.0 °C. สำหรับการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตอยู่ในช่วง 237 และ 272 nm (logε 0.87 และ 0.75,) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ ไอโซควิโนลีน แอลคาลอยด์ (isoquinoline alkaloid) เมื่อพิจารณาการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด (IR spectrum) ทำให้ทราบถึงแถบการดูดกลืนของสารเอโรแมติกที่ 1608, 1512 และ 1458 cm⁻¹ และแสดงแถบดูดกลืนของอีเทอร์ที่ 1280, 1230 cm⁻¹ และยังบ่งชี้ลักษณะการแทนที่บนวงเบนซีนแบบออร์โท (o-disubstitued benzene) ที่ 780cm⁻¹ เมื่อนำสารประกอบนี้ไปตรวจวัดด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีพบว่ามี fragmentation ions หลักที่สำคัญได้แก่ m/z 355 [M⁺], 190, 164, and 149 (base peak) ไอออนที่เกิดขึ้นเหล่านี้ทำให้ทราบว่าเป็นข้อสันนิษฐานสำคัญของ

สารประกอบ **1** และไอออนที่ m/z 190 ซึ่งเป็นของ $C_{11}H_{12}O_2N^+$ และไอออนที่ 164 เป็นของ $C_{10}H_{12}O_2^+$ เกิดจากการแตกตัวแบบ retro Diels-Alder fragmentation ทำให้ยืนยันอย่างมั่นใจว่าเป็นโครงสร้างของอนุพันธ์ tetrahydropprotoberberine แอลคาลอยด์

นอกจากนั้นยังมีการตรวจวัดด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ขนาดกำลังแม่เหล็กไฟฟ้า 400 MHz ซึ่งแสดงค่า 1H NMR และค่า ^{13}C NMR ($CDCl_3$) ดังตารางที่ 2 จากข้อมูลทั้ง 2 ชนิดทำให้ทราบว่าสารประกอบนี้มีโปรตอน 4 โปรตอนที่เกาะอยู่ sp^2 คาร์บอนและมีโปรตอนของหมู่เมทอกซี 4 หมู่ และยังมีหมู่ CH_2 4 หมู่เช่นเดียวกัน ยังพบอีกว่าคู่สัญญาณที่แตกแบบดับเลต (AB pattern), δ 6.79 H-11 และ 6.88 H-12 บนวงแอโรแมติกวางตัวแบบออร์โทกัน (*ortho* proton) นั้นยืนยันได้จากค่าคงที่การคู่ควบ $J = 8.38$ นอกจากนี้ยังมีสัญญาณแบบซิงเกิลต 2 แห่งที่ (δ 6.73, H-1 and 6.62, H-4) วางตัวเป็นแบบพารา (*para* related hydrogens) ซึ่งหลักฐานดังกล่าวแสดงว่าสารประกอบนี้เป็นนิวเคลียสของไอโซควิโนลีน เมื่อพิจารณาโปรตอนที่ตำแหน่งที่ 8 ของโครงสร้างพบว่าเป็นหมู่ เทลิโนซึ่งแสดงสัญญาณคู่แบบดับเลตและเรโซแนนซ์ที่ δ 4.24 และ 3.54 โดยยืนยันด้วยค่าคงที่คู่ควบ ($^1J_{H-H} = 15.63$ Hz) ในการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ยังใช้แบบ 2 มิติร่วมยืนยันโครงสร้างด้วยเช่นการใช้ C-H correlation HMQC เป็นต้น สำหรับหมู่เมทิลีนที่กล่าวมาถือเป็นสะพานเชื่อมวงบนและล่างของสารประกอบจำพวก โปรโตเบอเบออลีน (protoberberine alkaloids) เมื่อพิจารณาข้อมูลจาก ^{13}C NMR พบสัญญาณของหมู่ CH และ CH_2 ที่ δ 59.29 C-13a, 51.48 C-6, 53.96 C-8 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าค่าบอเนลเหล่านี้อยู่ติดกับอะตอมของไนโตรเจนมีสัญญาณโปรตอนของหมู่เมทิลีนที่วางตัวแบบแกน (*axial* proton) δ 2.83 H-13b แตกสัญญาณแบบ *dd* splitting pattern ด้วยค่าคงที่คู่ควบ $^1J_{H-H} = 15.63$ Hz และ $^2J_{H-H} = 11.49$ Hz แสดงให้เห็นว่าโปรตอนนี้วางตัวทำมุมสองหน้า (*dihedral angle*) กับโปรตอนถัดไปเท่ากับ 180° และสำหรับโปรตอนแบบอิกเวทอเรียลซึ่งเกิด เรโซแนนซ์ที่ δ 3.27 มีการแตกสัญญาณแบบ *dd* pattern และมีค่าคงที่คู่ควบ $J_{H-H} = 3.65$ ย่อมแสดงว่ามีการทำมุมสองหน้า 90° หากพิจารณาจากโครงสร้างพบว่ามีหน่วยของ CH_2-CH_2 ซึ่งโปรตอนของหน่วยนี้แสดงด้วยสัญญาณ เรโซแนนซ์ที่ δ 3.13, 2.66 (H-5a, b) และ 3.21, 2.66 (H-6a, b) เป็นแบบมัลติเพิลต์ เพื่อให้การยืนยันโครงสร้างมีความสมบูรณ์มากขึ้นผู้วิจัยจึงใช้เทคนิค 2D NMR HMBC มายืนยันตำแหน่งของหมู่ต่างๆในโครงสร้าง เช่น ที่บริเวณวงไอโซควิโนลีนมีหมู่เมทอกซี 2 หมู่ ก็เนื่องจากสัญญาณโปรตอนของหมู่นี้สัมพันธ์กับ คาร์บอนตำแหน่งที่ C-2, 4a, 13b และ คาร์บอนของวงแอโรแมติกที่ตำแหน่ง C-1, 3, 5, 13b กับโปรตอน H-1 และ H-4 ตามลำดับ นอกจากนั้นหมู่เมทอกซีที่ตำแหน่ง 9 และ 10 ยังใช้เทคนิค HMBC ซึ่งสัมพันธ์กับโปรตอนที่ตำแหน่ง 11 และ 12 ท้ายที่สุดเมื่อเทียบค่าเคมีคลิฟต์กับงานของ Joanne และผู้ร่วมวิจัยคนอื่นพบว่ามีความใกล้เคียงกันมากที่สุด

Crebanine (**2**) เป็นแอลคาลอยด์ที่แยกมาจากสารสกัดชั้นเอทิลแอสีเตทเดียวกันกับ (**1**) โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ลักษณะผลึกเป็นเข็มสีเหลืองมีจุดหลอมเหลว mp 117.0-117.8 $^\circ C$ และมีมวลโมเลกุล 339, M^+ ซึ่งสอดคล้องกับสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{21}NO_4$ มีค่าการดูดกลืนแสง UV ที่ 225

และ 281 nm (log ϵ 1.33 and 1.32) แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะของ isoquinoline alkaloids เมื่อ นำไปตรวจวัดแถบดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR spectrum) พบว่าสารประกอบ 2 แสดงแถบการยืดของ C=C ที่แตกต่างกัน 4 แถบได้แก่ 1601, 1573, 1496, 1473 cm^{-1} ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีวงแอโรแมติกในโมเลกุล สำหรับแถบดูดกลืนที่ 1284 และ 1234 cm^{-1} ยืนยันว่ามีหน่วย C-O-C ของอีเทอร์ สำหรับหมู่แทนที่บน วงเบนซีนแบบออร์โทพบแถบการงอกระนาบที่ 821 cm^{-1} โครงสร้างของสารนี้เป็นแอลคาลอยด์แบบ aporphine group เพราะยืนยันจากข้อมูลแมสสเปกตรัมที่แตกตัวแบบ retro Diles-Alder fragmentation ให้ไอออนที่ m/z 295 และ 44 ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีหมู่เมทอกซี 2 หมู่และหมู่เมทิลีน 1 หมู่อยู่ที่ วง A, C และ D ในขณะที่ไอออนที่ m/z 44 (methyl imine) ยืนยันว่ามีหมู่เมทิลบนไนโตรเจนของวง B. พีคที่ m/z 324 และ 308 (M-15 และ M-31) เกิดจากการหลุดหมู่เมทิลและหมู่เมทอกซีจากแอโรแมติกวง หนึ่งในโครงสร้างแสดงถึงการเป็น aromatic methylether การมีหมู่เมทิลบนอะตอมของไนโตรเจนอาจ ยืนยันด้วยพีค M-43 เพราะการแตกจะต้องผ่าน methylene imine ที่ก่อตัวเป็นวงสมาชิก 6 อะตอมก่อนการเกิด retro Diles-Alder cycloaddition นอกจากนั้นพีคหลักที่ m/z 149 มาจากการแตก ขอ พีค m/z 295 สำหรับข้อมูลจากนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ชนิด 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3) (ตารางที่ 2) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารประกอบ 2 เป็น aporphine alkaloids crebanine เพราะปรากฏสัญญาณ โปรตอน 3 แห่งบนวงแอโรแมติก ยังพบว่า 2 ใน 3 สัญญาณปรากฏที่สนามแม่เหล็กอ่อน (downfield) แสดงการแตกสัญญาณเป็นแบบดับเลตที่ δ 6.87 ($J = 8.47$) and 7.80 ($J = 8.47$) แสดงว่าเป็น aporphine nucleus ในวง D ดังนั้นสัญญาณทั้ง 2 ก็คือ H-10 และ H-11^[6] นอกจากนั้น ^1H NMR spectrum ยังแสดงสัญญาณเรโซแนนซ์ที่ δ 6.06 และ 5.91 และสัญญาณคาร์บอนที่ δ 100.56 ซึ่งแตก สัญญาณเป็นแบบ AB pattern มีค่าคงที่การคู่ควบ $J = 1.4$ Hz โปรตอนทั้ง 2 แสดงความสัมพันธ์แบบ HMBC กับคาร์บอนที่ δ 142.00 (C-1) และ 146.50 (C-2) ซึ่งเป็นคาร์บอนที่มีหมู่เมทิลีนไฮดรอกซีอยู่ ด้วย จากเทคนิค HMQC experiment ทำให้ทราบถึงว่าโครงสร้างนี้มีหมู่ C-4 - C-5 ethano group แต่ มี C-7 เป็นศูนย์กลาง สัญญาณโปรตอน H-7 ก็เป็นแบบดับเลตของดับเลต (doublet of doublet) ซึ่งมี $J = 14.66, 4.3$ เรโซแนนซ์ที่ δ 3.67 และ 2.29 ในขณะที่คาร์บอน C-7 ปรากฏที่ δ 26.89 นอกจากนั้น จากสเปกตรัมยังชี้ให้เห็นว่าหมู่เมทิลบนไนโตรเจนแสดงสัญญาณเป็นแบบซิงเกิลที่ δ 2.60 ซึ่งยืนยันด้วย เทคนิคความสัมพันธ์แบบ HMBC กับคาร์บอนที่ δ 29.14 (C-4) และ 53.59 (C-5) ยังมีหมู่เมทอกซีที่วง อยู่ที่ตำแหน่ง C-8 (δ 151.98) และ C-9 (δ 145.80) ก็สามารถยืนยันด้วยเทคนิค HMBC correlation กับสัญญาณโปรตอน H-7, 10 และ 11 ท้ายที่สุดพบว่าจากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวสารประกอบ 2 เป็น crebanine ซึ่งเคยแยกมาจากต้นไม้ชื่อ *S. sasakii* และ *S. capitata*

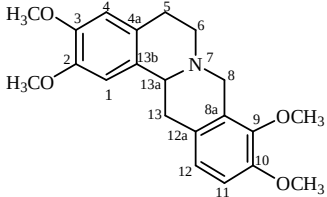
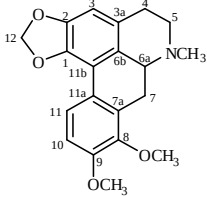
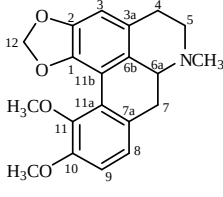
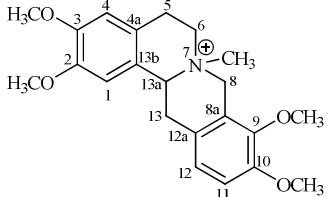
O-methylbulbocapnine (3) แยกมาจากชั้นสกัดเอซีโทนเป็นผลึกรูปเข็มสีน้ำตาลอ่อนมีจุด หลอมเหลว mp 130.1-132.3 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งวิเคราะห์แล้วตรงกับสูตรโมเลกุล $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ โดยใช้การตรวจสอบ แบบ HRAPCIMS measurement มีมวลโมเลกุลที่วัดได้ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion (m/z) 340.1540 และสำหรับที่ คำนวณได้เท่ากับ 340.1543 ซึ่งสอดคล้องกัน สารประกอบนี้เป็นไอโซเมอร์กับสาร 2 จากข้อมูลแมส

สเปกตรัมของสาร 3 มีความคล้ายคลึงกับสารประกอบ 2 มาก ยกเว้นหมู่เมทอกซี 2 หมู่จะอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกับสารประกอบ 2 ในการตรวจวิเคราะห์การแตกไอออนด้วยเทคนิคแมสสเปกตรัมพบว่ามีไอออนที่ m/z 339, 295, 280, 265 และ 149 (base peak) ซึ่งสอดคล้องกับสารประกอบ 2 โดยเฉพาะพิกที่ M-15 peak เป็นของ bulbocapnine จากโครงสร้างจะเห็นว่ามีออกซิเจน 4 อะตอมที่วงแอโรแมติกซึ่งเป็นไปได้ว่าจะทำให้วงแอโรแมติกเสถียรได้ สำหรับข้อมูล ^1H NMR spectrum ซึ่งสารประกอบนี้ละลายใน CD_3OD (ตารางที่ 2) แสดงสัญญาณเรโซแนนซ์โปรตอนของแอโรแมติก 3 โปรตอน สำหรับ 2 โปรตอนแบบ down field shift แสดงการแตกสัญญาณเป็นดับเลตที่ δ 7.87 ($J = 8.72$) และ 7.03 ($J = 8.72$) และอีก 1 โปรตอนที่ δ 6.70 จัดเป็นของ aporphine nucleus ที่วง D นอกจากนั้นในการพิสูจน์โปรตอนตำแหน่ง H-8 และ H-9 โดยการใช้ค่าคงที่คู่ควบแล้ว ผู้วิจัยยังสามารถใช้เทคนิค 2D NMR ที่ชื่อ COSY ซึ่งมองเห็นความสัมพันธ์ที่อยู่ติดกันของโปรตอนในหน่วยของอีเทนภายในโครงสร้างได้ สำหรับ H-7b แสดงการแตกสัญญาณแบบมัลติเพล็ตเพราะเกิดการกระทำแบบ long-range coupling กับ H-8, H-7a และ H-6a ตามลำดับ นอกจากนั้นจากการใช้เทคนิค HMBC ทำให้ทราบลำดับการเชื่อมต่อกันของคาร์บอนอะตอมได้ดีโดยความสัมพันธ์ระหว่าง H-8 (δ 7.87) กับ C-7a, C-9, C-7, C-10, C-11, 11b, และระหว่างโปรตอน H-9 (δ 7.03) กับ C-10, C-11, C-11a) นอกจากนี้ยังมีกรณีระหว่าง H-3 (δ 6.70) กับ C-2, C-3a, C-1, C-4 และสำหรับโปรตอน H-4a,b กับคาร์บอน C-3a, C-5, C-3, C-6b, และโปรตอน H-5a (δ 3.80) กับคาร์บอน C-6b ยังมีข้อมูลที่น่าสนใจอีกว่า ^1H NMR ที่เกิดเรโซแนนซ์ δ 6.15 และ 6.00 กับสัญญาณคาร์บอนที่ δ 102.86 คล้ายคลึงกับสารประกอบ 2 ด้วยการแตกสัญญาณแบบ AB pattern และมีค่าคงที่คู่ควบ $J = 0.74$ Hz สำหรับหมู่เมทอกซี 2 หมู่ที่วง D เชื่อว่าอยู่ที่ตำแหน่ง C-10 (δ 153.94) และ C-11 (δ 147.03) ซึ่งยืนยันจากเทคนิค HMBC correlation ของโปรตอน H-8, H-9, 10- OCH_3 และ 11- OCH_3 ตามลำดับ จากข้อมูลที่ได้อธิบายข้างต้นสารประกอบ O-methylbulbocapnine alkaloid ได้เคยมีรายงานว่ายกได้จากต้น *L. megaphylla* Hemsl. (Lauraceae) โดยนักเคมีชื่อ Cheng-Jen Chou และผู้ร่วมวิจัยของเขา

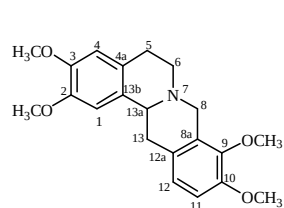
N-methyltetrahydropalmatine (4) จากการตรวจวัดด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรีพบว่า มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{NO}_4$ และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ m/z 371 $[\text{M}+\text{H}]^+$ จะเห็นว่าสารนี้มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารประกอบ 1 ยกเว้นมีหมู่เมทิลบนไนโตรเจน โดยเฉพาะไอออนที่ m/z 371, 206, 164, 151, 149 และ 55 (base peak) มีความคล้ายคลึงหรือเป็นชุดเดียวกันกับสารประกอบ 1 มาก โดยเฉพาะไอออนที่ m/z 55 (1-methyl-1H-azinine) เกิดจากการจัดตัวใหม่ของโครงสร้าง isoquinoline ยังได้สมบัติทางกายภาพของสารประกอบนี้เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ mp 168.8-171.4 °C สารประกอบนี้มีการดูดกลืนอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ 227 (log ϵ 1.2) และ 284 (log ϵ 0.74) การทดสอบหาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค อินฟราเรดพบแถบดูดกลืนที่ 1612, 1519, 1500 และ 1461 cm^{-1} แสดงว่ามีวงแอโรแมติกในโครงสร้าง กรณีแถบดูดกลืนที่ 1272, 1230 cm^{-1} เป็นของอีเทอร์และที่ 786 cm^{-1} แสดงหมู่เกาะ 2 หมู่บนวงเบนซีนแบบออร์โทไอโซเมอร์ จาก

ข้อมูลเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ 400 MHz ^1H NMR spectrum (ตารางที่ 2) ชี้ให้เห็นว่ามีโปรตอนของวงแอโรแมติก 4 โปรตอน และโปรตอนของหมู่เมทอกซี 12 โปรตอน ตลอดจนโปรตอนของหมู่เมทิลีน 8 โปรตอน นอกจากนี้ยังมีเมทิลีนโปรตอน 1 หมู่และโปรตอนของเมทิลบนไนโตรเจน 1 หมู่ด้วยการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลชิฟต์ของสารประกอบนี้กับสาร 1 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันได้แก่ δ 3.82 (H-6a), 3.67 (H-6b), 4.94 (H-8) และ 5.09 (H-13a) หมู่ดังกล่าวอยู่ใกล้กับบริเวณแอมโมเนียมแคตไอออนยังพบอีกว่าการแตกสัญญาณเป็นคู่ดับเลต แบบ AB pattern ที่ δ 6.87 H-11 และ 6.82 H-12 เป็นของวงแอโรแมติกกลางและมีค่าคงที่คู่ควบ $J = 8.35$ Hz, พร้อมกับสัญญาณซิงเกิลต 2 แห่งที่ δ 6.79, H-1 และ 6.69, H-4 เป็นของวงไอโซควิโนลีน เมื่อพิจารณาสัญญาณโปรตอนตำแหน่ง H-8 ซึ่งเกิดเรโซแนนซ์ที่ δ 4.94 ทำให้ระบุได้ว่าคาร์บอนตำแหน่ง 8 (C-8) เป็นสะพานของ protoberberine alkaloids^[12]. จากข้อมูล ^{13}C NMR ของสารประกอบ 4 จะใกล้เคียงกับสารประกอบ 1 มาก แต่ถ้าจะวิเคราะห์โดยใช้ค่าเคมีคัลชิฟต์ของคาร์บอนว่าเป็นกลุ่มสารประเภท protoberberine หรือ palmatine alkaloid นั้นจะเทียบค่าดังกล่าวที่คาร์บอน C-5, C-6, C-8 และ C-13 ซึ่งเท่ากับ δ 23.27, 51.86, 59.83, and 34.0, ตามลำดับ นอกจากนั้นหมู่เมทอกซีทั้ง 4 หมู่เรโซแนนซ์ที่ δ_{H} 3.85, 3.86, 3.84 และ 3.82 ทั้งนี้โปรตอนดังกล่าวสัมพันธ์ (HMBC correlations) กับคาร์บอนของวงเบนซีนทั้ง 4 เช่นเดียวกัน ได้แก่ δ_{C} 149.62 (C-2), 148.64 (C-3), 145.58 (C-9) และ 151.24 (C-10) ตามลำดับ ในการยืนยันคาร์บอนด้วยเทคนิค HMBC spectrum ของ C-2, C-3 ในวง A และ C-9, C-10 ของวง D โดยสัมพันธ์กับโปรตอน H-1, 4 และ H-11, 12 ตามลำดับ มากไปกว่านั้นการใช้เทคนิค HMBC spectrum ยังยืนยันหมู่เมทิลบนไนโตรเจนโดยสัมพันธ์กับโปรตอน H-8 ทำยที่สุดโครงสร้างของสารนี้จัดเป็นสารพวก *N*-methyl stepholidine รายงานโดย Ingkaninan K และผู้ร่วมวิจัยของเขา

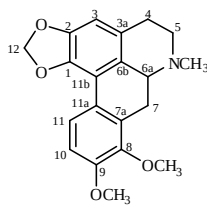
ตารางที่ 2: ^{13}C -NMR, ^1H -NMR data for isolated alkaloids (1-4)

 Tetrahydropalmatine (1)			 Crebanine (2)			 O-methylbulbocapnine (3)			 N-methyltetrahydropalmatine (4)		
Position	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	Position	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	Position	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)	Position	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (DEPT)
1	6.73 (s)	108.59(CH)	1	-	142.00(C)	1	-	144.66(C)	1	6.79 (s)	109.73(CH)
2	-	147.48(C)	2	-	146.50(C)	2	-	150.06(C)	2	-	149.62(C)
3	-	147.42(C)	3	6.52(s)	106.78(CH)	3	6.70(s)	107.81(CH)	3	-	148.64(C)
4	6.62 (s)	111.33(CH)	3a	-	126.50(C)	3a	-	120.73(C)	4	6.69 (s)	111.50(CH)
4a	-	126.76(C)	4	(a)3.13(<i>obsc</i>)	29.14(CH ₂)	4	(a)3.30(<i>obsc</i>)	26.93(CH ₂)	4a	-	119.22(C)
5	(a)3.13(<i>obsc</i>)	29.06(CH ₂)	5	(b)2.62(<i>m</i>)		5	(b)2.96(<i>dd</i> , 17.3		5	(a)3.30(<i>obsc</i>)	23.27(CH ₂)
6	(b)2.66(<i>obsc</i>)		6a	(a)3.05(<i>obsc</i>)	53.59(CH ₂)	6a	9,		6	(b)3.16(<i>dd</i> ,	
6	(a)3.21(<i>obsc</i>)	51.48(CH ₂)	6b	(b)2.51(<i>t,d</i> ,		6b	3.53)	53.94(CH ₂)	6	18.15, 6.86)	
8	(b)2.66(<i>obsc</i>)		7	11.63, 3.69)		7	(a)3.80(<i>obsc</i>)		8	(a)3.82(<i>obsc</i>)	51.86(CH ₂)
8a	(a)4.24(<i>d</i> ,	53.96(CH ₂)	7a	3.05(<i>obsc</i>)	61.85(CH)	7a	(b)3.54(<i>obsc</i>)	69.11(CH)	8	(b)3.67(<i>obsc</i>)	
8a	(b)3.54(<i>d</i> , 15.6	127.70(C)	8	-	126.55(C)	8	4.34(<i>obsc</i>)	125.04(C)	8a	4.94(s)	59.83(CH ₂)
9	3)	145.06(C)	9	(a)3.67(<i>dd</i> ,	26.89(CH ₂)	9	-	25.41(CH ₂)	9	-	119.92(C)
10	-	150.24(C)	10	14.66, 4.3)		10	(a)3.83(<i>obsc</i>)		10	-	145.58(C)
11	-	110.94(CH)	11	(b)2.29(<i>m</i>)		11	(b)2.60(<i>m</i>)	126.77(C)	11	-	151.24(C)
12	-	123.82(CH)	12	-	129.76(C)	12	-	124.81(CH)	12	6.87(<i>d</i> , 8.35)	113.35(CH)
12a	6.79(<i>d</i> , 8.38)	128.61(C)	13	-	151.98(C)	13	7.87(<i>d</i> , 8.72)	112.61(CH)	12	6.82(<i>d</i> , 8.35)	123.32(CH)
13	6.88(<i>d</i> , 8.38)	36.28(CH ₂)	14	-	145.80(C)	14	7.03(<i>d</i> , 8.72)	153.94(C)	12a	-	121.16(C)
13a	-		15	-	110.20(CH)	15	-	147.03(C)	13	(a)3.45(<i>d</i> ,	34.00(CH ₂)
13b	(a)3.27(<i>dd</i> ,		16	-	123.05(CH)	16	-	124.44(C)	13a	2.59)	
2-OCH ₃	15.76, 3.65)		17	-	124.59(C)	17	-	117.60(C)	13b	(b)3.00(<i>dd</i> ,	
3-OCH ₃	(b)2.83(<i>dd</i> ,	59.29(CH)	18	-	116.46(C)	18	-	102.86(CH ₂)	13a	18.35, 10.12)	64.98(CH)
9-OCH ₃	(b)2.83(<i>dd</i> ,	59.29(CH)	19	-	100.56(CH ₂)	19	(a)6.15(<i>d</i> , 0.74)		13b	5.09(<i>obsc</i>)	123.93(C)
10-OCH ₃	15.76, 11.49)	129.66(C)	20	-		20	(b)6.00(<i>d</i> , 0.74)	42.12(CH ₃)	N-CH ₃	-	49.98(CH ₃)
2-OCH ₃	3.54(<i>obsc</i>)	56.05(CH ₃)	21	-		21	NCH ₃		2-OCH ₃	3.40(s)	56.03(CH ₃)
3-OCH ₃	-	55.84(CH ₃)	22	-		22	10-OCH ₃	3.21(s)	3-OCH ₃	3.85(s)	56.18(CH ₃)
9-OCH ₃	3.87(s)	60.14(CH ₃)	23	-		23	11-OCH ₃	3.90(s)	9-OCH ₃	3.86(s)	60.84(CH ₃)
10-OCH ₃	3.89(s)	55.81(CH ₃)	24	-		24	-	3.86(s)	10-OCH ₃	3.84(s)	55.88(CH ₃)
	3.85(s)		25	-		25	-	3.82(s)	OCH ₃		
	3.84(s)		26	-		26	-				

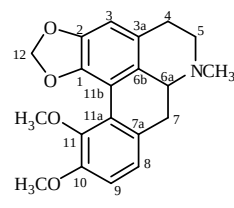
ตารางที่ 3: ^1H - ^{13}C , ^1H - ^1H correlations for isolated alkaloids.



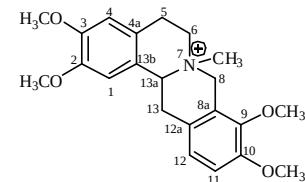
Tetrahydropalmatine (1)



Crebanine (2)



O-methylbulbocarpine (3)



N-methyltetrahydropalmatine (4)

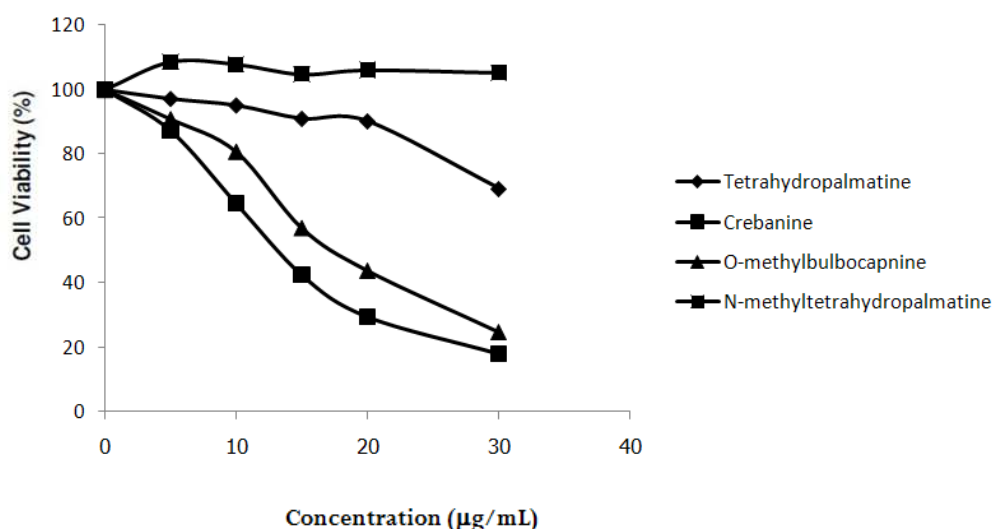
Position	HMBC correlation	COSY correlation	Position	HMBC correlation	COSY correlation	Position	HMBC correlation	COSY correlation	Position	HMBC correlation	COSY correlation
1	C-2, C-4a, C-13b	-	1	-	-	1	-	-	1	C-2, C-3, C-4a, C-13b	-
2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-
3	-	-	3	C-1, C-2, C-3a, C-4, C-11b	-	3	C-1, C-2, C-3a, C-4	-	3	-	-
4	C-1, C-3, C-5, C-13b	-	3a	-	-	3a	-	-	4	C-2, C-3, C-4a, C-5	-
4a	-	-	4	(a)C-3a, C-5, C-6b	H-4b	4	(a)C-5, C-6b	H-4b, H-5a	4a	-	-
5	(a)C-4a	H-6b, H-5b	4	(b)C-3, C-3a, C-6b	H-4a	5	(b)C-3, C-3a, C-6b	H-4a, H-5b	5	(a)C-4a	H-5b, H-6a
	(b)C-4a	H-5a, H-6a	5	(a)C-3a, C-4, C-6a, N-CH ₃	H-5b	5	(a)C-6b	H-4a, H-5b	6	(b)C-4a	H-5a, H-6b
6	(a)C-4a, C-5, C-8	H-6b		(b)C-3a, C-4, C-6a, N-CH ₃	-	6a	(b)-	H-4b, H-5a	6	(a)-	H-5a, H-6b
	(b)C-4a, C-13a	H-6a, H-5a	6a	C-6b, N-CH ₃	-	6b	(a)-	H-7b		(b)-	H-5b, H-6a
8	(a)C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a	H-8b	7	(a)C-6a, C-7a, C-9, C-11a	H-7b	7	(b)C-7a	H-6a, H-7a	8	C-6, C-8a, C-9, C-12a, C-13a, C-13b, N-CH ₃	-
	(b)C-6, C-13a	H-8a	7a	-	-	8	-	-	8a	-	-
8a	-	-	8	-	-	9	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11, C-11b	H-9	9	-	-
9	-	-	9	-	-	10	C-10, C-11, C-11a	H-8	10	-	-
10	-	-	10	C-7a, C-8, C-9, C-11a	H-11	11	-	-	11	C-9, C-10, C-12a, C-8a, C-9, C-10, C-13, C-13a	H-12
11	C-8a, C-9, C-10, C-12	H-12	11b	-	-	12	(a)C-1, C-2	-	12	-	-
12	C-9, C-10, C-12a, C-13	H-11		(b)C-1, C-2	-		(b)C-1, C-2	-	12a	-	-
12a	-	-	11a	-	-	11a	-	-	13	(a)C-12a	H-13b, H-13a
13	(a)C-8a, C-12, C-13a	H-13b	11b	-	-	11b	-	-		(b)C-12a, C-13a	H-13a, H-13a
	(b)C-8a, C-12a, C-13a	H-13a, H-13a	10	C-7a, C-8, C-9, C-11a	H-10	12	(a)C-1, C-2	-	13a	C-13b	H-13b, H-13a
13a	C-6, C-12a	H-13b	11	C-7a, C-8, C-9, C-10, C-11b	-		(b)C-1, C-2	-	13b	-	-
13b	-	-		-	-	NCH ₃	-	-	NCH ₃	C-6, C-8	-
2-OCH ₃	C-2, C-3	-	11a	-	-	10-OCH ₃	C-9, C-10	-	2-OCH ₃	C-2	-
3-OCH ₃	C-2, C-3	-	11b	-	-	11-OCH ₃	C-11	-	3-OCH ₃	C-3	-
9-OCH ₃	C-9	-	12	(a)C-1, C-2	-		-	-	9-OCH ₃	C-9	-
10-OCH ₃	C-10	-		(b)C-1, C-2	-		-	-	10-OCH ₃	C-10	-
			NCH ₃	C-4, C-5	-						
			8-OCH ₃	C-8	-						
			9-OCH ₃	C-9, C-10	-						

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

1. ความเป็นพิษของ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methyl bulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อเซลล์ U937, HL-60 และ K562 ด้วยวิธี MTT assay

หลังจากที่นำ ethyl acetate fraction มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี silica gel column chromatography ทำให้ได้สาร alkaloid ชนิด tetrahydropalmatine และ crebanine นอกจากนั้นเมื่อนำ acetone fraction มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี silica gel column chromatography ทำให้ได้สาร alkaloid ชนิด *O*-methyl bulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ได้จาก ethyl acetate และ acetone fraction นั้นเป็นผลเนื่องมาจากสาร tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methyl bulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine หรือไม่ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาผลของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากกระเทียมเลือดต่อการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวโดยอาศัยวิธี MTT assay

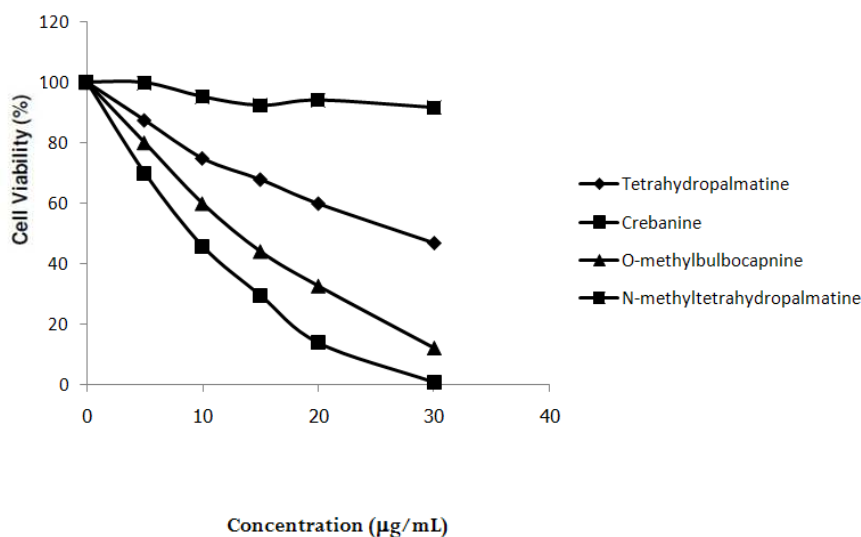
1.1 ผลของสารสกัดบริสุทธิ์ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937



รูปที่ 11 ผลของ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์ U937

ผลของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระเทียมเลือดเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Crebanine และ *O*-methylbulbocapnine ที่ความเข้มข้น 13 และ 17.5 µg/ml ตามลำดับ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ตายคิดเป็น 50% ของทั้งหมด ส่วนผลของสาร Tetrahydropalmatine, *N*-methyltetrahydropalmatine พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงไม่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 ตายได้ถึง 50% ของทั้งหมด

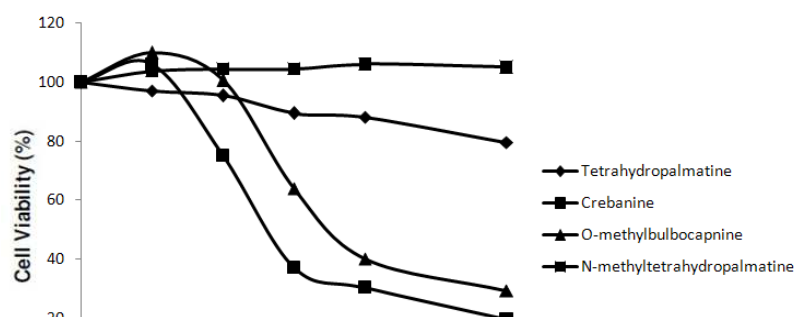
1.2 ผลของสารสกัดบริสุทธิ์ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60



รูปที่ 12 ผลของ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์ HL-60

ผลของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระท่อมเลือดเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ Tetrahydro palmatine ที่ความเข้มข้น 8, 12.5 และ 27.5 µg/ml ตามลำดับ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 ตาย คิดเป็น 50% ของทั้งหมด ส่วนผลของสาร *N*-methyltetrahydropalmatine พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงไม่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 ตายได้ถึง 50% ของทั้งหมด

1.3 ผลของสารสกัดบริสุทธิ์ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562



Concentration ($\mu\text{g/mL}$)

รูปที่ 13 ผลของ tetrahydropalmatine, crebanine, *O*-methylbulbocapnine และ *N*-methyltetrahydropalmatine ต่อความเป็นพิษของเซลล์ K562

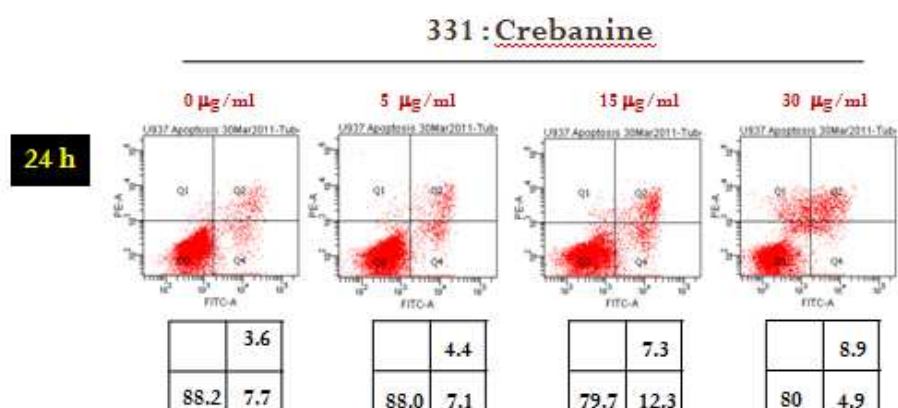
ผลของสารสกัดบริสุทธิ์จากกระท่อมเลือดเมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า Crebanine และ *O*-methylbulbocapnine ที่ความเข้มข้น 13 และ 17.5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ มีผลทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ตายคิดเป็น 50% ของทั้งหมด ส่วนผลของสาร Tetrahydropalmatine และ *N*-methyltetrahydropalmatine พบว่าที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงไม่สามารถทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 ตายได้ถึง 50% ของทั้งหมด

สรุป จากการทดลองพบว่าสาร crebanine ให้ผลค่า IC_{50} ดีที่สุดจึงเลือกนำสารนี้ไปทำการทดสอบหาฤทธิ์ต่อการเกิด apoptosis ด้วยวิธี flow cytometry ต่อไป

2. ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ U937, HL-60 และ K562 โดยวิธี annexin V-FITC/PI staining

เป็นการทดสอบว่า Crebanine ที่สกัดได้จากกระท่อมเลือดสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ apoptosis หรือไม่โดยตรวจสอบด้วยการย้อมเซลล์ด้วยสี annexin V-FITC/PI โดยเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis จะมีการเคลื่อนที่ของ phosphatidyl serine จาก inner membrane มา outer membrane ทำให้สามารถจับกับ annexin V ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิด FITC ทำให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี เครื่อง Flow cytometer

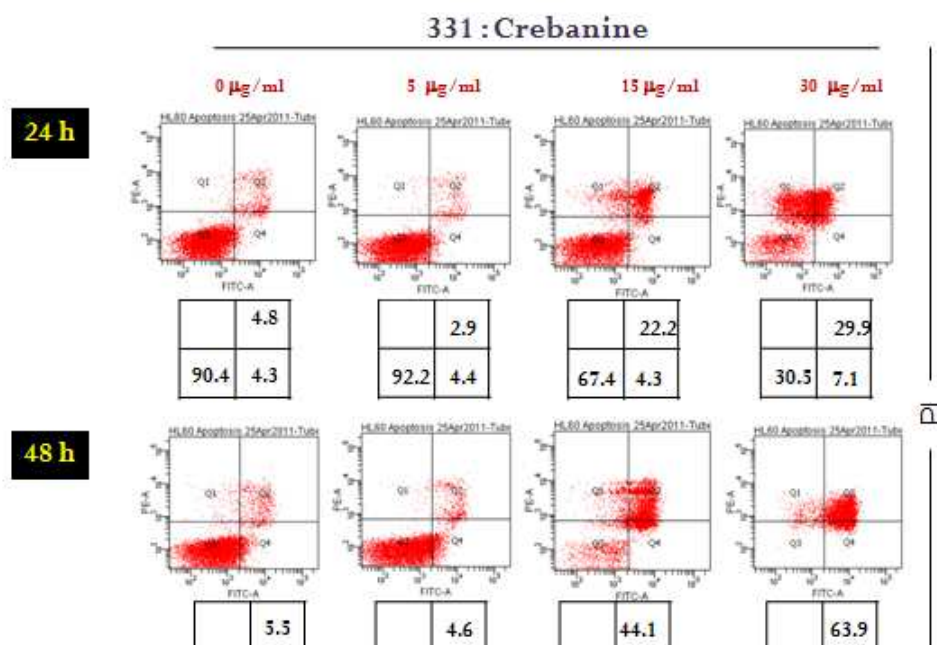
2.1 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ U937



รูปที่ 14 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ U937

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis โดยวิธี flow cytometry โดย Q4, Q2 แสดงการตายแบบ early และ late apoptosis ตามลำดับ พบว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis โดย Crebanine ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ เซลล์จะมีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 ชั่วโมง จะเห็นผลการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis โดยขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น

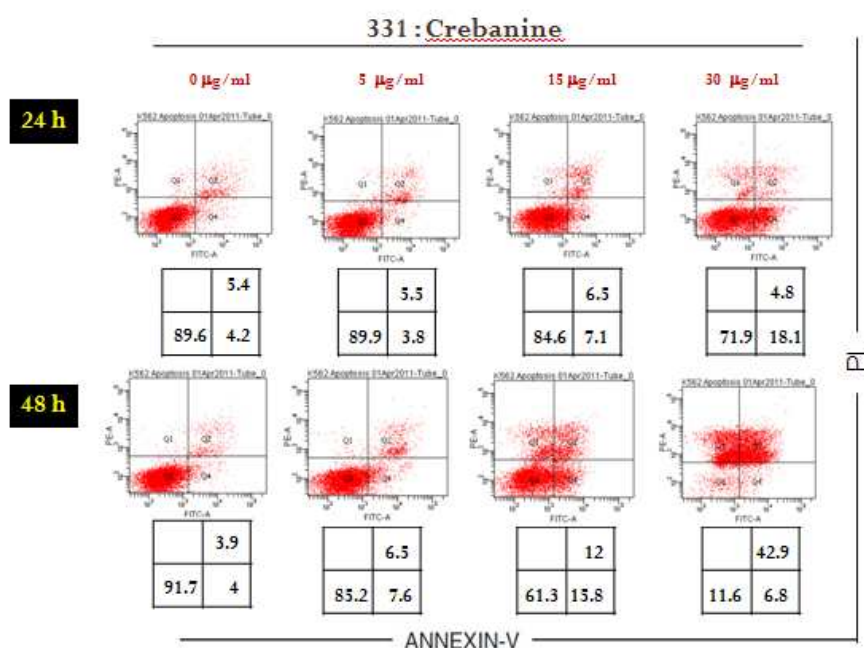
2.2 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ HL-60



รูปที่ 15 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ HL-60

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis โดยวิธี flow cytometry โดย Q4, Q2 แสดงการตายแบบ early และ late apoptosis ตามลำดับ พบว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis โดย Crebanine ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ เซลล์จะมีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 ชั่วโมง จะเห็นผลการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis โดยขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น

2.3 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ K562



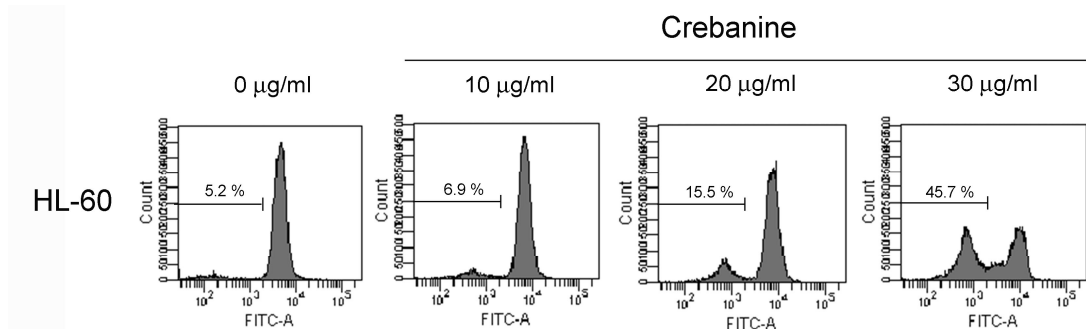
รูปที่ 16 ผลของ Crebanine ต่อการเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในเซลล์ K562

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis โดยวิธี flow cytometry โดย Q4, Q2 แสดงการตายแบบ early และ late apoptosis ตามลำดับ พบว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการตายแบบ apoptosis โดย Crebanine ที่ความเข้มข้น 15 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ เซลล์จะมีการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 ชั่วโมง จะเห็นผลการเกิด apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis โดยขึ้นกับความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น

สรุป จากการทดลองพบว่าสาร Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937, K562 และ HL-60 เกิดกระบวนการ apoptosis ได้ตามความเข้มข้นและเวลาที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการทดลองในขั้นถัดไปจึงต้องการตรวจดู apoptotic protein รวมถึง anti-apoptotic protein เพื่อให้ทราบถึงกลไกที่ Crebanine ใช้ในการกระตุ้นการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

3. ผลของสาร Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ HL-60, K562 และ U937 โดยการย้อมด้วยสี DiOC₆ เพื่อเป็นการทดสอบว่าสาร Crebanine เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายแบบ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway โดยปกติผนังของไมโทคอนเดรียจะมีค่าความต่างศักย์อยู่ที่เกิดจากการรับส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรียแต่เมื่อเซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway จะส่งผลทำให้ค่าความต่างศักย์ของผนังไมโทคอนเดรียเสียไปโดยสามารถวัดได้ด้วยการย้อมด้วยสี DiOC₆

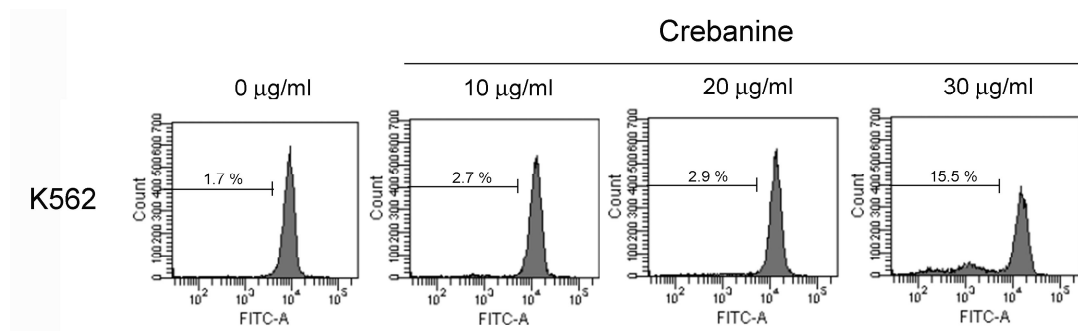
3.1 ผลของสาร Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ HL-60



รูปที่ 17 ผลของ Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลง ความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ HL-60

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis ทางด้าน intrinsic pathway โดยการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential โดยยีส DiOC₆ และวัดผลโดย flow cytometry ผลการทดลองพบว่า Crebanine ที่ความเข้มข้น 20 และ 30 $\mu\text{g/ml}$ มีการ accumulate ของ ยีส DiOC₆ มากขึ้น จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway

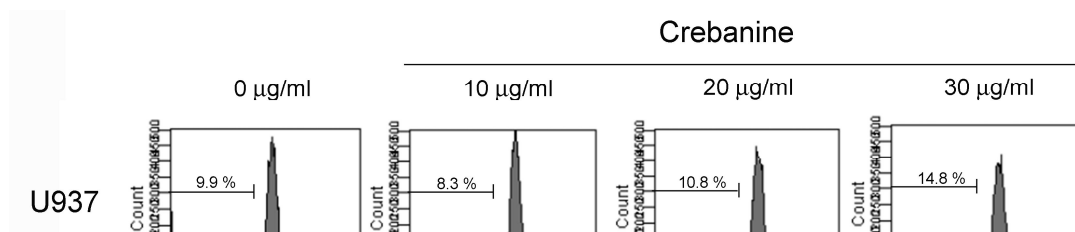
3.2 ผลของสาร Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ K562



รูปที่ 18 ผลของ Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ K562

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด K562 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis ทางด้าน intrinsic pathway โดยการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential โดยยีส DiOC₆ และวัดผลโดย flow cytometry ผลการทดลองพบว่า Crebanine ที่ความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ มีการ accumulate ของ ยีส DiOC₆ มากขึ้น จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway

3.3 ผลของสาร Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria ของเซลล์ U937

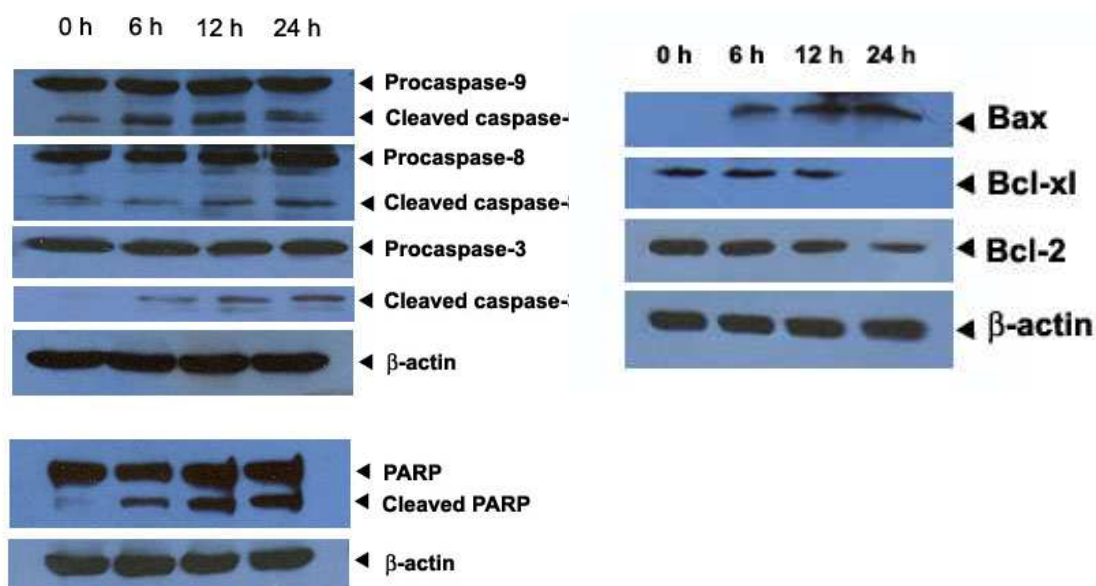


รูปที่ 19 ผลของ Crebanine ต่อการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ของผนัง mitochondria
ของเซลล์ U937

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด U937 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดการตายแบบ apoptosis ทางด้าน intrinsic pathway โดยการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential โดยสี DiOC₆ และวัดผลโดย flow cytometry ผลการทดลองพบว่า Crebanine ที่ความเข้มข้น 30 µg/ml มีการ accumulate ของ สี DiOC₆ มากขึ้น จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway

สรุป จากการทดลอง Mitochondrial membrane potential พบว่า crebanine สามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ในวิธีที่ผ่าน mitochondrial ได้ ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งสามชนิด จากการทดลองที่ผ่านมา ในส่วนของ MTT assay, annexin V-FITC/PI รวมถึง mitochondrial membrane potential จะเห็นได้ว่า เซลล์ที่ตอบสนองด้านการตายต่อ crebanine ได้ไวที่สุด คือ HL-60 เราจึงนำ เซลล์ชนิดนี้ไปทำการทดลองเพื่อดูการแสดงออกของ apoptotic protein ต่างๆ โดยวิธี western blot analysis

4. ผลของสาร Crebanine ต่อการการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis (caspase 8, caspase 9, caspase 3 ,PARP ,bax.bcl-2,bcl-xl) ในเซลล์ชนิด HL-60



รูปที่ 20 ผลของ Crebanine ต่อการการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis (caspase 8, caspase 9, caspase 3 ,PARP ,bax.bcl-2,bcl-xl) ในเซลล์ชนิด HL-60

ผลของสาร Crebanine เมื่อนำมาบ่มกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด HL-60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ ดูการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ apoptotic protein โดยวิธี western blot ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของ caspase 3, 8 ,9 และ PARP รูป active form เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น จากการทดลองสามารถบอกได้ว่า Crebanine สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis ผ่านทาง intrinsic pathway และ extrinsic pathway นอกจากนั้นพบว่า มีการลดการแสดงออกของ anti apoptotic protein bcl-2 ,bcl-xl และ มีการเพิ่มขึ้นของ pro apoptotic protein bax อีกด้วย