

แบบสรุปผู้บริหาร

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัยแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารออกฤทธิ์ของส่อดฟ้าดง

The study of biological activities of active components of *Clausena harmandiana* Pierre.

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

1.2.1 รศ.ดร. จวี เย็นใจ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น รหัสไปรษณีย์ 40002 หมายเลขโทรศัพท์ 043-202222 โทรสาร 043-202373, e-mail: chayen@kku.ac.th

1.2.2 ดร. จันทนา บุญยรัตน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002. หมายเลขโทรศัพท์ 043-362095 โทรสาร 043-202379 e-mail: chaboo@kku.ac.th

1.2.3 รศ. ดร. จินดา หวังบุญสกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002. หมายเลขโทรศัพท์ 043-362095 โทรสาร 043-202379 e-mail: jinda_wa@kku.ac.th

1.2.4 ผศ.ดร. สุรัตน์ ละภูเขียว สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ต.ท่าสูด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100. หมายเลขโทรศัพท์ 0-5391-6793, 0-5391-6224 โทรสาร 0-5391-6776, E-mail: laphookhieo@yahoo.com

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2554 งบประมาณที่ได้รับ 752,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ ตั้งแต่ พฤศจิกายน 2553 ถึง ตุลาคม 2554

2. สรุปโครงการวิจัย

ส่อดฟ้าดงเป็นสมุนไพรไทยที่มีคาร์บาโซลและคูมารินเป็นสารประกอบหลัก และแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี คูมารินมีฤทธิ์ต้าน lipid peroxidation ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ภาวะความจำเสื่อม มะเร็ง เบาหวาน จึงน่าสนใจที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเป็นระบบ นอกจากนี้เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร จึงมีการวิจัยด้านการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญโดย

ใช้ HPLC finger print ร่วมด้วย และเพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพของสารบริสุทธิ์จากส่่งฟ้าแดง จึงมีการเตรียมอนุพันธ์ของคาร์บาโซล ซึ่งจะเป็นอีกทางหนึ่งที่จะขยายขอบเขตของงานวิจัยให้กว้างขวางยิ่งขึ้น

การแยกสกัดรากส่่งฟ้าแดงพบว่าได้สารบริสุทธิ์จำนวน 20 สาร เป็นสารประเภทคาร์บาโซล กุมาริน จีนนามิลเอสเทอร์ เมื่อนำสาร heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ไปทำการดัดแปลงโครงสร้างได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 19 อนุพันธ์ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ด้านเชื้อมาลาเรีย ด้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง พบว่าสารประเภทออกซิมและอนุพันธ์โบรมีนแสดงฤทธิ์ในการฆ่าเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ที่ดีด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 และ 0.66 μM ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในส่่งฟ้าแดงพบว่าสารคาร์บาโซลและกุมารินมีปริมาณที่ต่างกันตามแหล่งที่เก็บ ปริมาณของ nordenta tin และ dentatin แตกต่างกัน 7-8 เท่า และวิธีการวิเคราะห์โดย gradient elution นั้นมีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีกว่า วิธี isocratic elution นอกจากนี้ส่่งฟ้าแดงและสารสกัดรากสันโศกมีรูปแบบการแยกของสารในคอลัมน์คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าต้นไม้อาจชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ในขณะที่แตกต่างจากต้นมะไฟจีน และเพี้ยพานอย่างชัดเจน

อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยเห็นว่างานวิจัยจะเสร็จสมบูรณ์และสามารถตอบคำถามได้ดีก็ต่อเมื่อได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวาน โดยจะศึกษาความสามารถของสารจากรากส่่งฟ้าแดงต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าเซลล์และกลไกการออกฤทธิ์ และหากได้ศึกษาฤทธิ์ป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทของสารประกอบทางเคมีจากรากส่่งฟ้าแดงและกลไกการควบคุมก็จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์มาก นอกจากนี้ปัญหาเรื่องมะเร็งท่อน้ำดีซึ่งเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดในภาคอีสาน ก็น่าจะลองศึกษาฤทธิ์ยับยั้งมะเร็งท่อน้ำดีจากสารจากรากส่่งฟ้าแดง จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมาก

3. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

การแยกสกัดรากของส่่งฟ้าแดงพบว่าได้สารบริสุทธิ์ทั้งสิ้นจำนวน 20 สาร มีสารประเภทคาร์บาโซล 15 สาร กุมาริน 4 สาร มี 1 สารที่เป็นจีนนามิลเอสเทอร์ เมื่อนำสาร heptaphylline และ 7-methoxyheptaphylline ไปทำการดัดแปลงโครงสร้างได้อนุพันธ์ทั้งสิ้น 19 อนุพันธ์ เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ด้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และด้านเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* พบว่าสารส่วนใหญ่ไม่ค่อยแสดงฤทธิ์ที่ดีนัก ยกเว้นสาร **IIa** แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (IC_{50} = 3.27 mg/ml) เมื่อทดสอบกับเซลล์ NCI-H187 (มะเร็งปอด), MCF-7 (มะเร็งเต้านม), KB (มะเร็งช่องปาก) และเซลล์ปรกติ (Vero cell lines). พบว่าสาร **Ih** และ **IIi** แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์

NCI-H187 ที่ดี ($IC_{50} = 0.02$ และ $0.66 \mu M$ ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่า ellipticine ซึ่งเป็นสารมาตรฐานประมาณ 138 และ 4 เท่า นอกจากนี้ออกซิม **Ih** แสดงฤทธิ์ต้านเซลล์ KB ($IC_{50} = 0.17 \mu M$) ซึ่งสูงกว่า ellipticine เท่ากับ 10 เท่า และแสดงความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ ($IC_{50} = 66.01 \mu M$) จะเห็นได้ว่าสารนี้น่าจะสามารถพัฒนาให้เป็นยาต่อไปได้

ในส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณของสารสำคัญด้วยวิธี HPLC จากตัวอย่างที่เก็บจากหลายแหล่ง พบว่า nordentatin และ dentatin ในตัวอย่างพบ สาร nordentatin อยู่ในช่วง 0.464 ถึง 0.056 กรัมต่อ 100 กรัมของรากบดแห้ง และสาร dentatin อยู่ในช่วง 0.367 ถึง 0.050 กรัมต่อ 100 กรัมของรากบดแห้ง จากผลดังกล่าวอาจสรุปได้ว่า ตัวอย่างที่สุ่มมาจาก 4 จังหวัดนั้นมีสารสำคัญคือ nordentatin และ dentatin แตกต่างกัน 7-8 เท่า วิธีการวิเคราะห์โดย gradient elution นั้นมีประสิทธิภาพในการแยกสารได้ดีกว่า วิธี isocratic elution ควรสามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณสาร biomarkers ได้ 8-9 ตัว แต่เนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องที่ใช้ในการวิจัยนี้มีสภาพเก่า คาดว่าส่วน autoinjector มีปัญหา จึงไม่ผ่านเกณฑ์ของ method validation ส่องฟ้าแดง และสารสกัดรากสันโศกมีรูปแบบการแยกของสารในคอลัมน์คล้ายคลึงกัน แสดงให้เห็นว่าต้นไม้สองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เนื่องจากมีสารประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่แตกต่างจากต้นมะไฟจีน และเฟื้อพานอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบในใบของส่องฟ้าแดงที่เก็บมาจาก 4 จังหวัดนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมาก และแตกต่างจากใบของสันโศก มะไฟจีน และเฟื้อพาน

Twenty compounds were isolated from the root of *Clausena harmandiana* including carbazoles, coumarins and cinnamate ester. Heptaphylline (**I**) and 7-methoxyheptaphylline (**II**) were used as the starting material for structural modification and nineteen carbazole alkaloids were synthesized. All isolated compounds were evaluated for their biological activities such as an antifungal against *Candida albicans*, an antiplasmodial against *Plasmodium falciparum*, an antimycobacterial against *Mycobacterium tuberculosis* It was found that all compounds showed moderate to weak activities against all tests except compound **Ia** exhibited strong activity against *Plasmodium falciparum*. Cytotoxicity against NCI-H187 (human lung cancer), MCF-7 (breast cancer), KB (oral human epidermal carcinoma) and Vero cell lines (African green monkey kidney, normal cell) were also evaluated. Among these derivatives, **Ih** and **Iii** showed cytotoxicity against the NCI-H187 cell line with IC_{50} values of 0.02 and $0.66 \mu M$, respectively, which are about 138 and 4 fold stronger than the ellipticine standard. In addition, oxime **Ih** displayed cytotoxicity against KB cells with an IC_{50} value of $0.17 \mu M$ which is about 10 times stronger than the

ellipticine. This compound demonstrated weak cytotoxicity against Vero cells ($IC_{50} = 66.01 \mu M$). The results show convincingly that **1h** may be a promising lead for the development of cytotoxic agents.

In this research study, high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint analysis was developed to investigate and demonstrate the variance of chemical constituents among *Clausena* spp. collected from different parts of Thailand. The amount of nordentatin and dentatin found in 100 grams of dried ground root of the samples of *Clausena harmandiana* were ranged from 0.464 to 0.056 and 0.367 to 0.050 grams, respectively. Therefore, the results showed biodiversity of the contents among the samples, which was approximately up to 7-8 folds different in the content of bioactive compounds. The method using gradient elution technique showed higher separation efficiency than the isocratic elution method. The resolution of 9 biomarkers showed adequately for quantitation purpose, however, the results failed to meet the validation criteria. This may be explained by the error of the instrument at the part of auto-injector. Both of the analytical methods revealed that *Clausena harmandiana* and *Clausena excavata* showed the similar patterns in chromatographic separation. This suggested that these two species might have a very close relationship in terms of chemotaxonomy, whereas they are obviously different from *Clausena lansium* and *Clausena wallichii*. It is also noted that the HPLC fingerprints of the leaves of *Clausena harmandiana* were different among the samples collected from different sites and were also different from the leaves of *Clausena excavata*, *Clausena lansium* and *Clausena wallichii*.

ผลงานตีพิมพ์

1. Thongthoom, T. Promsuwan, P. **Yenjai, C.** Synthesis and cytotoxic activity of the heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline Series. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 3755-3761. Impact factor 3.193
2. Noipha, K. Thongthoom, T. Songsiang, U. Boonyarat, C. **Yenjai, C.** Carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana* stimulate glucose uptake in L6 Myotubes, *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010, 90, e67-e71. Impact factor 2.160.
3. Songsiang, U. Thongthoom, T. Zeekpudsa, P. Kukongviriyapan, V. Boonyarat , C. Wangboonskul, C. **Yenjai, C.** Antioxidant activity and cytotoxicity against cholangiocarcinoma of carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana*, *ScienceAsia*, 2012, 38, 75–81. Impact factor 0.344.