

ภาคผนวก 1

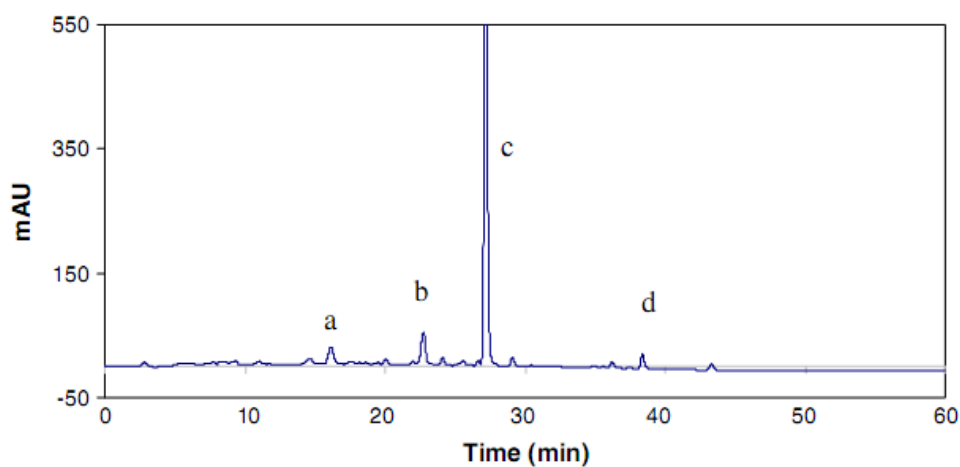
การแยกสารบริสุทธิ์ α -mangostin

สารจากเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ต้านเชื้อรา, ยับยั้งเอนไซม์ viral reverse transcriptase และ HIV protease, ต้านเชื้อมาลาเรีย, แก้ท้องเดิน, ต้าน histamine, ต้าน serotonin, ลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลในทางเดินอาหาร, ยับยั้งเอนไซม์ DNA topoisomerases I และ II, จับกับอนุมูลอิสระ ต้านออกซิเดชัน, ต้านมะเร็ง, เพิ่มความดันโลหิต (สมุนไพรรพพื้นบ้าน, 2542; Moongkarndi et al., 2004) เป็นต้น

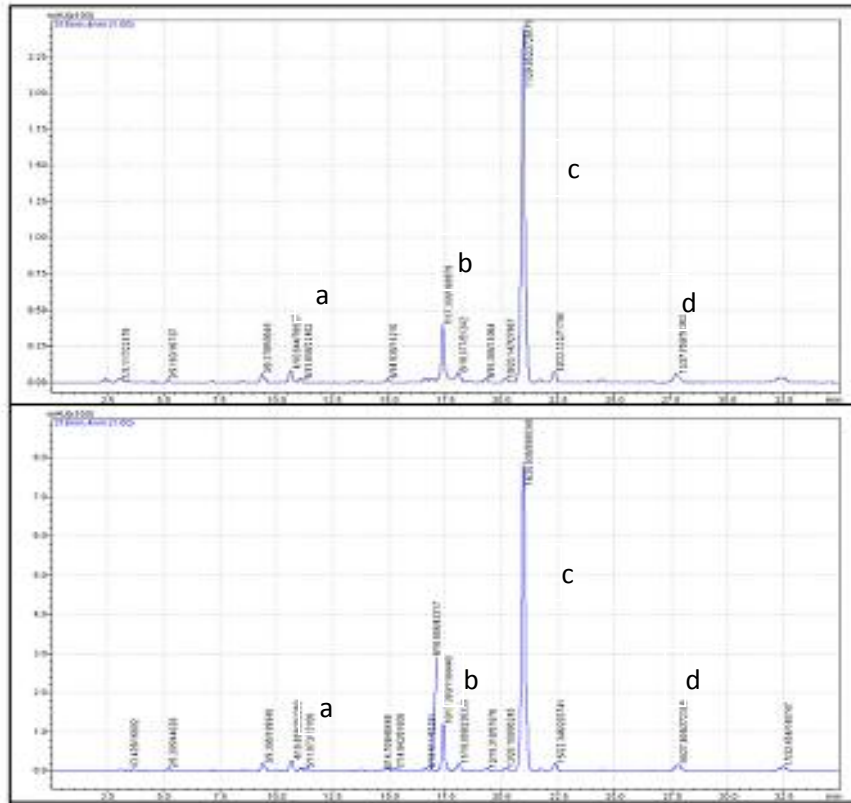
การวิจัยในประเทศไทย พบว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกมังคุดที่สกัดด้วย methanol สามารถการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านม (SKBR3) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) รวมถึงการยับยั้งการเกิด Reactive Oxygen Species (ROS reduction) อีกด้วย (Moongkarndi et al., 2004) พบว่าสาร mangostin เป็นกลุ่มสาร phenolic compounds ตัวหนึ่ง ซึ่งอนุพันธ์ของ xanthone มีชื่อทางเคมี คือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butenyl)-9H-xanthen-9-one หรือ 1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-di(3-methyl-2-butenyl) xanthone (The Merck Index, 1996) และยังแบ่งเป็น α , beta และ gamma-mangostin ขึ้นกับหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง hydroxyl (-OH) เช่น ในด้านของฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่า α -mangostin สามารถเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของ human leukemia HL60 cell line โดยกระตุ้นระบบ caspase-3,9 ในไมโทคอนเดรีย สาร α -mangostin พบปริมาณสูงจากเปลือกมังคุดที่เป็นขยะทิ้ง รวมทั้งมีปริมาณสูงและเป็น major constituent ในส่วนของ crude ethanolic/methanolic extract ที่มีฤทธิ์ต่างๆที่สำคัญที่มีผู้ศึกษาไว้ จะเกิดประโยชน์อย่างยิ่งหากจะนำมาใช้ประโยชน์แยกสารสำคัญมาใช้เป็นยาได้ ตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีผู้ศึกษาหลายกลุ่มรายงานไว้

การแยกสารสำคัญจากเปลือกมังคุดได้สารบริสุทธิ์ คือ α -mangostin โดยต้องทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้ และให้มีปริมาณมากพอ อย่างน้อย 70 กรัม ให้พอเพียงสำหรับการทดลองในทุกโครงการที่นำเสนอ ที่ทำการศึกษาทั้งทางเซลล์ และที่ใช้การทดลองในสัตว์ทดลอง โดยจากแนวทางการวิจัยที่วช. เคยสนับสนุนงบประมาณในโครงการวิจัยของรศ. ดร. พินิติ รตะนานุกูล และคณะ ในโครงการนี้ได้เคยเสนอผลเปรียบเทียบแสดงสารเริ่มต้นที่ใช้ที่มี chromatogram ใกล้เคียงกัน จาก methanol และ ethyl acetate extracts (ภาพที่ 66, 67 และ 68)และต่อมาในโครงการวิจัยนี้หลังการได้รับอนุมัติทุนสนับสนุน ได้

ทำการแยกสาร α -mangostin บริสุทธิ์ได้ตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ในโครงการวิจัย ไม่ต่ำกว่า 70 กรัม โดยแสดงผลการตรวจสอบสาร α -mangostin บริสุทธิ์ดังแสดงข้อมูลไว้ใน ตารางที่ 7 และ 8 และ ภาพที่ 69 และ 70 โดยค่าที่ได้เปรียบเทียบกับผลคำนวณ โดยใช้สารมาตรฐานที่ซื้อมาเป็นตัวเทียบเคียง หาก lot ของสารที่แยกได้ มีผลต่ำกว่า 90% จะไม่ได้ใช้ lot นั้นในการทดลองที่ศึกษา เช่น ใน lot C ไม่ได้ใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการเตรียมในปริมาณที่มาก ในระดับอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้อยู่ในความพอใจ และถ้าเตรียมในระดับปริมาณน้อย จะได้สารที่มีความบริสุทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน และบางครั้งค่าที่ได้สำหรับ บาง lot จะมีความบริสุทธิ์มาก ภาพที่ 71 แสดงสรุปการแยกสารบริสุทธิ์ α -mangostin จากเปลือกมังคุด



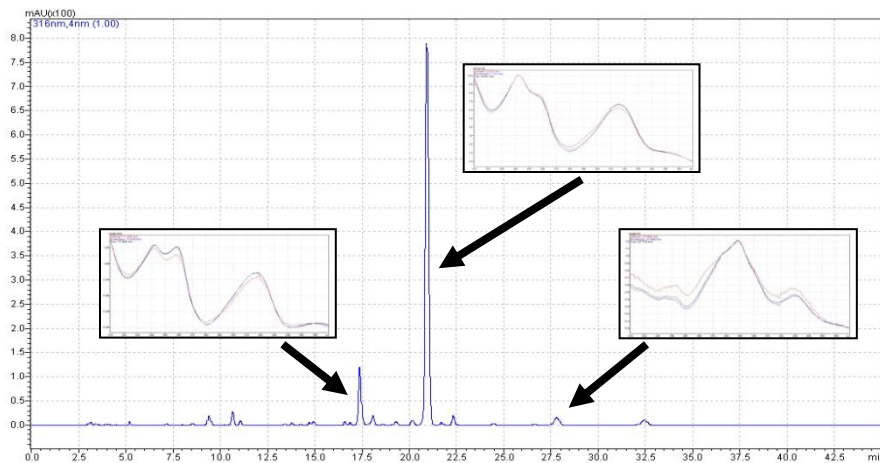
ภาพที่ 66 แสดง chromatogram ของสารสกัดจากมังคุด ที่ได้จากโครงการวิจัยของรศ. ดร. พินิติ รตะนานุกูล และคณะ a=garcinone D, b= gamma mangostin, c= alpha mangostin, and d=beta mangostin



1 = สารสกัด MeOH

2 = สารสกัด Ethyl acetate

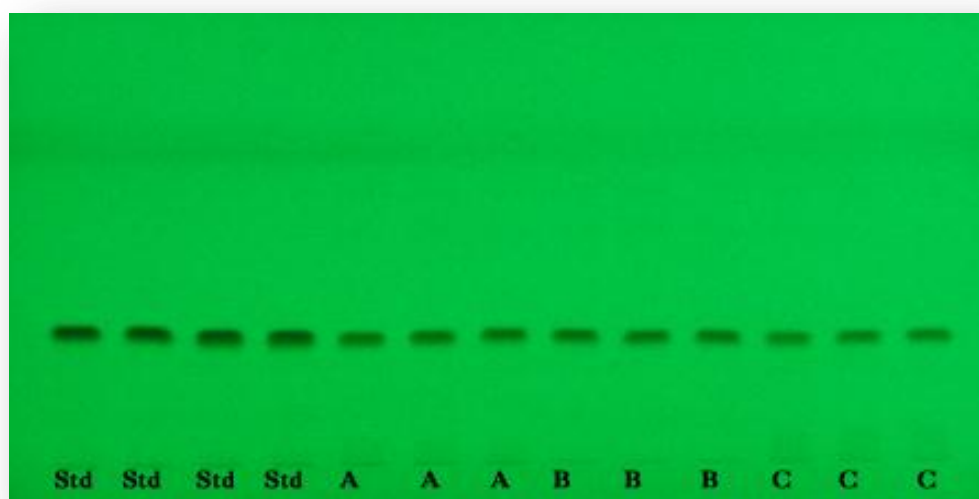
ภาพที่ 67 แสดง HPLC Chromatogram ของสารสกัดต่างๆตามลำดับ 1) ส่วนของสารสกัด MeOH 2) ส่วนของสารสกัด Ethyl acetate จากการวิเคราะห์พบว่า มีสาร α -mangostin ในสารสกัดเปลือกมังคุด ในทุกๆ ส่วนสกัดโดยจะให้พิกของสารเกิดขึ้นที่ retention time เท่ากับ 20.95 นาที ในปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกัน



ภาพที่ 68 แสดง HPLC Chromatogram ของสารสกัด MeOH ของเปลือกมังคุด และ UV Spectrum ของพิกสารต่างๆ 1) UV Spectrum ของพิกสารที่ retention time = 17.38 นาที 2) UV Spectrum ของพิกสารที่ retention time = 20.95 นาที (สาร α -mangostin) 3) UV Spectrum ของพิกสารที่ retention time = 27.78 นาที

ตารางที่ 7 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีคที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารละลาย α -mangostin

ความเข้มข้นของสารบริสุทธิ์ α -mangostin (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค (Mean)(n=3)
10	106740.00
25	272,676.00
50	545,352.00
100	1,097,118.00
250	2,487,852.00
500	5,421,438.00
1,000	11,103,916.00



ภาพที่ 69 แสดงผลของ Thin layer chromatographyของสารบริสุทธิ์ α -mangostin ที่แยกได้เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คู่มือ TLC ที่ UV lamp 256 nm ใช้ solvent system = CH_2Cl_2 : MeOH (96:4)

Std = Standard α -mangostin

A = α -mangostin Lot A

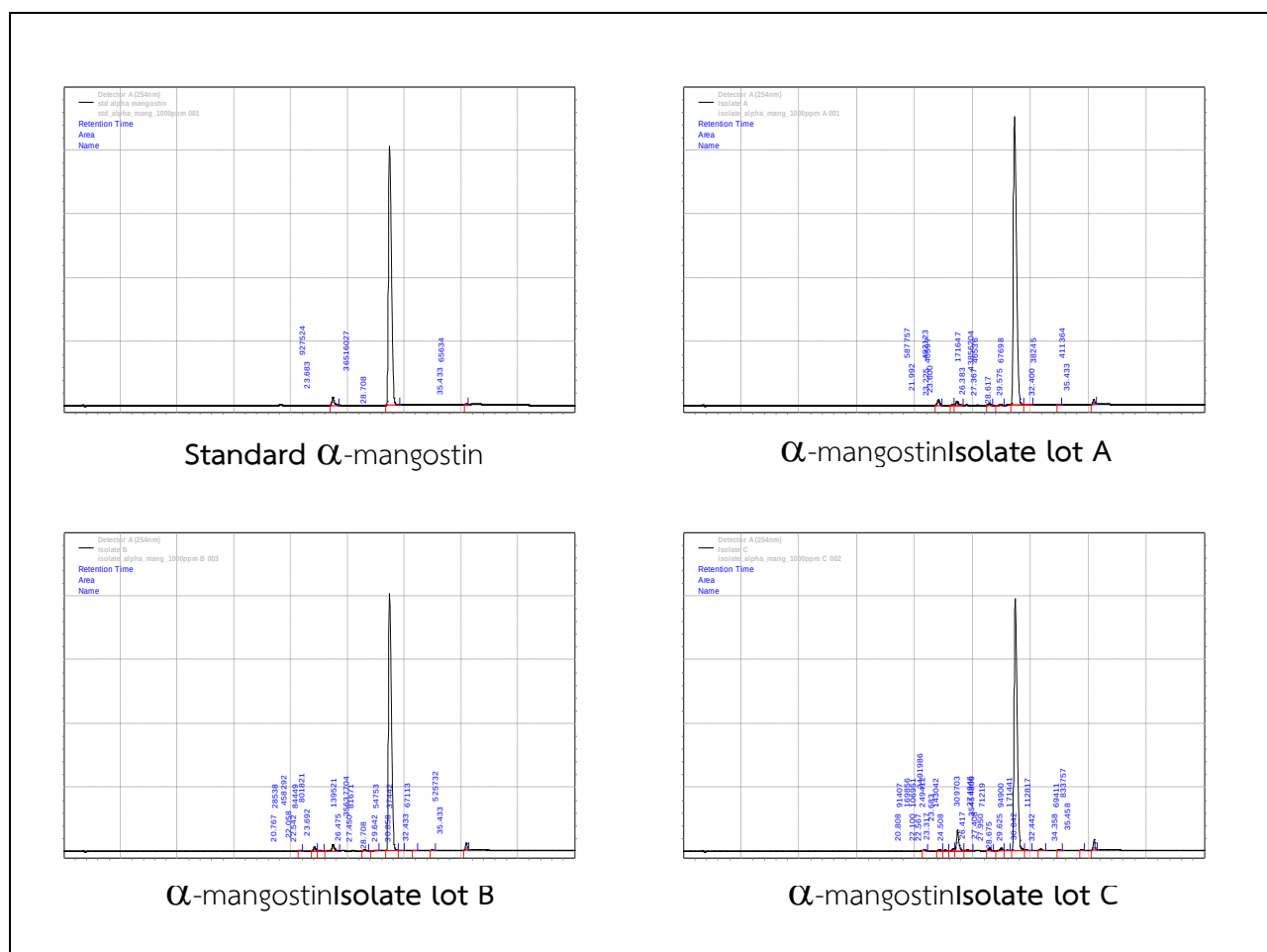
B = α -mangostin Lot B

C = α -mangostin Lot

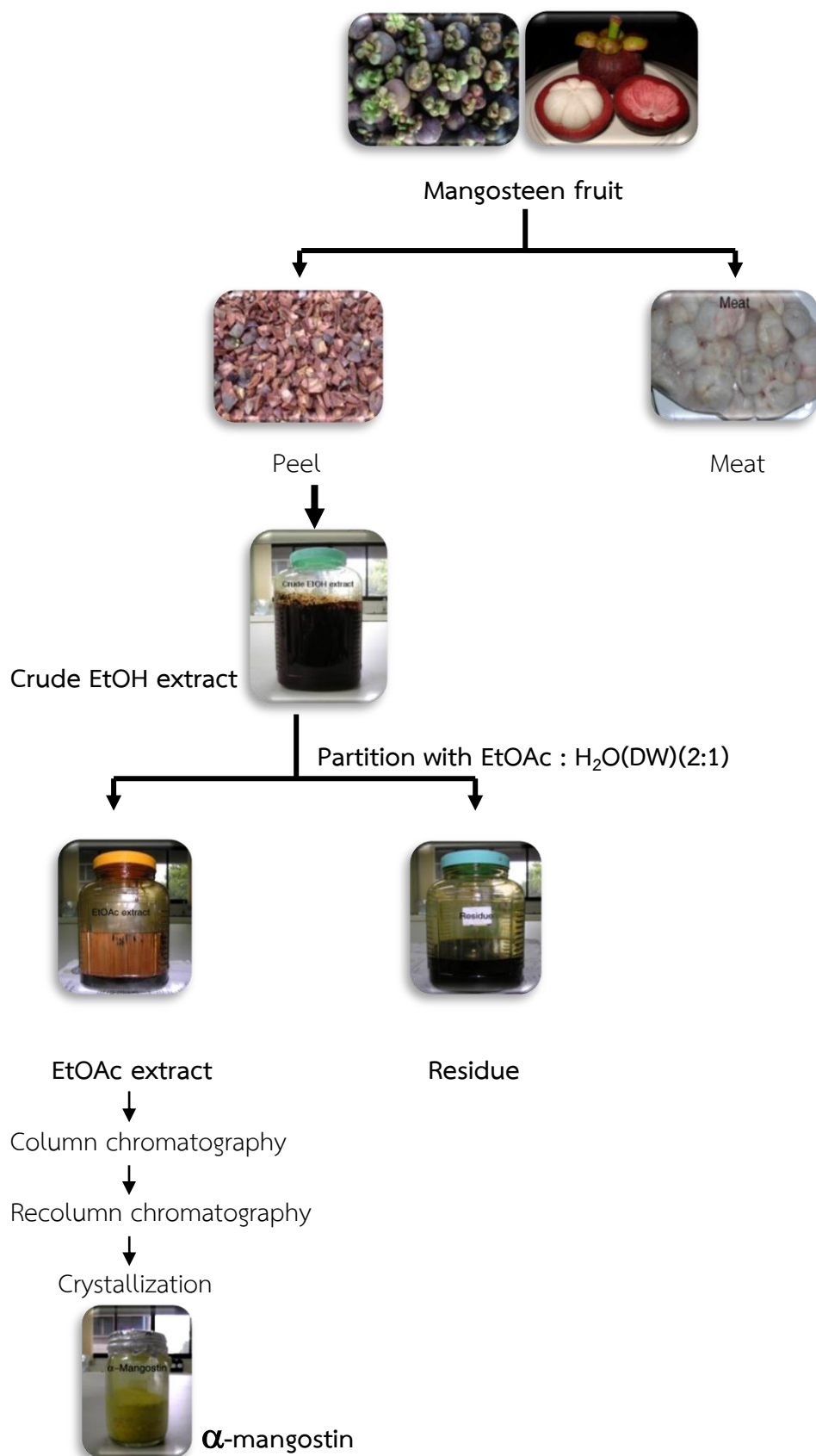
ตารางที่ 8 แสดงผลของการคำนวณ % ความบริสุทธิ์ของสาร α -mangostin ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ซื้อ

Sample	ปริมาณ α -mangostin (ppm)	% ความบริสุทธิ์ของ α -mangostin
Std* α -mangostin	1000	97.37
A α -mangostinIsolate lot A	1000	95.89
B α -mangostinIsolate lot B	1000	93.98
C α -mangostinIsolate lot C	1000	87.17

*Std, α -mangostin from ChromeDex Part # ASB-00013096-025



ภาพที่ 70 แสดงผลของ HPLC chromatographyของสารบริสุทธิ์ α -mangostin ที่แยกได้จาก 3 lot เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ภาพที่ 71 Summary of the α -mangostin isolation from *Garcinia mangostana* L.

การแยกสาร

- การแยกสารบริสุทธิ์ α -mangostin ได้ดำเนินการเป็นตามแผนงานที่กำหนดทั้งปริมาณของสารที่เตรียมได้คือ 70 กรัม และตามกำหนดเวลาที่ตั้งไว้แผนงาน ผู้ทำวิจัยทุกโครงการได้สารไปดำเนินการทดลองได้ตามแผนที่เสนอไว้กับวช. และสาร α -mangostin ที่แยกได้บริสุทธิ์นี้มีความคงตัวดี การเก็บรักษาในภาชนะที่ปิดฝาสนิทไม่ให้ความชื้น สามารถเก็บได้ในห้องปฏิบัติการ หรือที่ความเย็น 10 °ซ ในระหว่างที่ทำการวิจัยนี้ สารยังคงมีฤทธิ์ต่อเซลล์ได้ค่าใกล้เคียงกับที่ศึกษาเริ่มต้น การตรวจทางจุลชีววิทยาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ เป็นไปตามข้อกำหนดของการตรวจคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยา
- การเตรียมทำในห้องปฏิบัติการวิจัยโดยใช้อุปกรณ์พื้นฐานที่มีในโครงการและของคณะ เป็นงานที่ค่อนข้างหนักสำหรับผู้วิจัยและเจ้าหน้าที่ผู้ช่วย เนื่องจากการศึกษาที่ใช้สัตว์ทดลองจำเป็นต้องใช้สารปริมาณมาก ต่างจากที่เคยเตรียมสารเพื่อใช้ทดสอบในหลอดทดลองและเซลล์ ซึ่งหากจะเป็นการเตรียมปริมาณมากขึ้นด้วยอุปกรณ์ขนาดใหญ่ขึ้น อาจต้องปรับวิธีอีกเล็กน้อยในการดำเนินงาน
- อุปกรณ์จำเป็นบางอย่าง เช่น HPLC ต้องจองการใช้เป็นเวลานานมาก เพราะอุปกรณ์มีไม่มากพอสำหรับนักศึกษาและผู้ทำงานโครงการวิจัย ภาควิชาไม่มีอุปกรณ์นี้ ต้องใช้เครื่องกลาง ซึ่งบางครั้งต้องรอคิวและการซ่อม
- กำลังเตรียมผลงานตีพิมพ์ เปรียบเทียบสารที่ได้จากมังคุด และการทดสอบฤทธิ์ในด้านต่างๆ จะสามารถสรุปงานและส่งเสนอได้ ภายในกลางเดือนกุมภาพันธ์ 2556 นี้ หลังจากการส่งรายงานสมบูรณ์นี้
- งานต่างๆดำเนินการได้ด้วยดี อุปสรรคไม่มาก และคณะผู้วิจัยอื่น ให้ความร่วมมือที่ดีมากสามารถทำงานด้วยกันได้ดี มีความเป็นนักวิจัยที่ดีมาก ผู้ช่วยวิจัยมีความสามารถมาก ตั้งใจทำงาน อดทน รับผิดชอบงานดีมาก ขณะนี้มีประสบการณ์สูง งานวิจัยที่ทำอยู่จากทุนที่ได้นี้จะมาสามารถดูแลผู้ช่วยวิจัยได้ยาวนาน ซึ่งเป็นปัญหาในทุกโครงการที่ไม่มีพนักงานตำแหน่งประจำในหน่วยงาน ทำให้ต้องฝึกงานใหม่ตลอดเวลา และมีผลให้งานล่าช้า ดังนั้นบที่ วช. กำหนดไว้จึงไม่อิงกับความจริงที่เหมาะสมในสถานะเศรษฐกิจปัจจุบัน

ข้อเสนอแนะ

สารบริสุทธิ์สามารถเตรียมได้ α -mangostin ปริมาณมากจากเปลือกมังคุดที่ทิ้งเปล่า นำมาใช้ประโยชน์ได้ ชาวสวนจะได้ประโยชน์ หากมีผู้สนใจศึกษาทางวิชาการมากขึ้น และผู้ผลิตระดับใหญ่มีข้อมูลที่ดีถูกต้องมีความสนใจดำเนินการจริงจังในอนาคต

- สาร α -mangostin ให้ผลที่ดีมากในการทดลองด้านมะเร็งที่ศึกษาในเซลล์มะเร็ง และการศึกษาด้านการรักษาและภาวะพังผืดในตับ และภาวะตับแข็งในสัตว์ทดลอง สาร α -mangostin มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาใหม่ ซึ่งจำเป็นต้องทำการทดลองลงลึกในด้านต่างๆตามที่นำเสนอไว้ในโครงสร้างต่อไป



บรรณานุกรม (Bibliography)

- Chaivisuthangkura A, Malaikaew Y, Chaovanalikit A, Jaratrungtawee A, Panseeta P, Ratananukul P, Suksamrarn S. Prenylated xanthone composition of *Garcinia mangostana* (Mangosteen) Fruit Hull. *Chromatographia* 2009;69:315-318.
- Farnsworth NR, Bunyapraphatsara N. Thai medicinal plant: recommended for primary health care system. Bangkok: Mahidol University; 1992.
- Gad SC, Chengelis CP. Animal models in toxicology. New York: Marcel Dekker; 1992.
- Gupta M, Mazumder UK, Rath N, Mukhopadhyay DK. Antitumor activity of methanolic extract of *Cassia fistula* L. seed against Ehrlich Ascites Carcinoma. *J Ethnopharmacol* 2000;72:151-6.
- Holland EC. Mouse models of human cancer. New York: Wiley-Liss, 2004.
- Kosem N, Han YH, Moongkarndi P. Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *ScienceAsia* 2007;33:283-292.
- Kosem N. et al. *In vivo* toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med* 2013;67:255-263.
- ^aMoongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004;90:161-6.
- ^bMoongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia* 2004;75:375-7.
- Suksamrarn S, Suwannapoch N, Phakhodee W, Thanuhiranlert J, Ratananukul P, Chimnoi N, et al. Antimycobacterial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem pharm Bull (Tokyo)* 2003;51:857-859.