ชื่อเรื่อง	ความเป็นพิษของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่แยกจากใบพลูต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลอง
ผู้วิจัย	พฤฒิ บุญยิ้ม
ประธานที่ปรึกษา	ดร.เนตรนภิส วรรณิสสร
กรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.ประทีป วรรณิสสร ดร.อนุสรณ์ วรสิงห์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2552
คำสำคัญ	ความเป็นพิษ การมีชีวิต สารสกัด ใบพลู

บทคัดย่อ

ในปี ค.ศ. 1999 มีรายงานจากประเทศไต้หวัน เกี่ยวกับอาการผิวดำและรอยด่างขาวหรือ leukomelanosis และในปี ค.ศ. 2001 มีรายงานที่คล้ายคลึงกันเกี่ยวกับผู้ป่วยที่มีอาการผิวดำและรอยด่างขาวจากประเทศไทย ผู้ป่วยใช้ใบพลูนึ่งประคบบนผิวหน้าเพื่อช่วยให้สีผิวขาวขึ้น เป็นไปได้ว่าสาเหตุของความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสีเกิดจากใบพลู โดยสารประกอบกลุ่มฟีโนลิกในใบพลูถูกเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดอาการผิดปกติดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบความเป็นพิษของผงแห้งจากสารสกัดชั้นน้ำใบพลู (aqueous extract of *Piper betle* Linn. powder ; AEPP) ในหลอดทดลอง และทำการแยกองค์ประกอบเพื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีถึงสารสำคัญซึ่งมีผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31

การแยกองค์ประกอบและการพิสูจน์เอกลักษณ์สารฟีโนลิกซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุของอาการผิวดำและรอยด่างขาว ประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 การสกัดด้วยไอน้ำ พบว่าสาร AEPP แสดงผลผลิตร้อยละ 1.12 จากน้ำหนักใบพลูสด 1 กิโลกรัม ขั้นตอนที่ 2 เป็นการสกัดสาร AEPP ด้วยเมทานอล ขั้นตอนที่ 3 นำสารสกัดชั้นเมทานอลไปทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มี Alumina 90 Neutral เป็นเฟสอยู่กับที่ และขั้นตอนสุดท้ายนำสารส่วนที่ชะออกจากคอลัมน์ไปทำการสกัดครั้งสุดท้ายด้วยเอทิล อะซิเตต ซึ่งแสดงผลผลิตร้อยละ 1.26 จากผงแห้งของสารสกัดชั้นน้ำ 1 กรัม การระบุและพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค HPLC, NMR, IR และ GC-MS ช่วยยืนยันโครงสร้างทางเคมีของสาร โดยพบว่าสารหลักที่สกัดได้ คือ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล

ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบพลูต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ด้วยสาร AEPP เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และวัดค่าการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT แสดงผลร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC_{50} (Inhibitory Concentration at 50% growth) ที่ความเข้มข้น 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ไปทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 แสดงค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.0055 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Title	IN VITRO CYTOTOXICITY OF 4-ALLYL-PYROCATECHOL ISOLATED FROM PIPER BETLE LINN. LEAVES ON BALB/3T3 CLONE A31 CELL LINE
Author	Prudthi Boonyim
Advisor	Netnaphis Warnnissorn, Ph.D.
Co-Advisor	Assistant professor Prateep, Warnnissorn Ph.D. Anusorn Vorasingha, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Biochemistry, Naresuan University, 2009
Keywords	cytotoxic, viability, extracts, *Piper betle* Linn.

ABSTRACT

In 1999, there was a report from Taiwan on the abnormal facial whitening or leukomelanosis. In 2001, similar leukomelanosis patients were also reported in Thailand. These patients applied steamed betel leaves as a facial bleaching remedy, probably causing melanocytotoxicity induced by the leaves of *Piper betle* Linn. (Piperaceae). Phenolic compounds in betle leaves were believed that there may be the cause of this disorder. In this work, the *in vitro* test for the cytotoxic effect of aqueous extract of *Piper betle* Linn. powder (AEPP) from steam distillation and then, was investigated the isolation, identification and characterization the chemical structure of the major extract which cytotoxic to BALB/3T3 clone A31 cells was made

Extraction, isolation and characterization the phenolic compounds which was believed that cause leukomelanosis including the first, steam distillation showed the percentage of yield 1.12% from 1 kg of *Piper betle* Linn. fresh leaves. Methanolic extract was applied to the second. The aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder was extracted using methanol and the third, was then purified by Alumina 90 Neutral pack column chromatography. Finally, the eluate from column chromatography was extracted by ethyl acetate again. This showed the percentage of yield 1.26% from 1 mg of AEPP. Identification and characterization by HPLC, NMR, and GC-MS were confirmed the chemical structure. It was found that the major extract was 4-allyl-pyrocatechol.

Aqueous fraction was tested for cytotoxic effect with BALB/3T3 clone A31 cells by MTT assay. Twenty four hours treatment of AEPP showed the Inhibitory Concentration at 50% growth (IC_{50}) was 0.034 mg/ml. 4-allyl-pyrocatechol was treated with BALB/3T3 clone A31 cells, our data demonstrated that 4-allyl-pyrocatechol was toxic to 3T3 mouse fibroblast cells *in vitro* and showed the Inhibitory Concentration at 50% growth (IC_{50}) was 0.0055 mg/ml