

## บทที่ 4

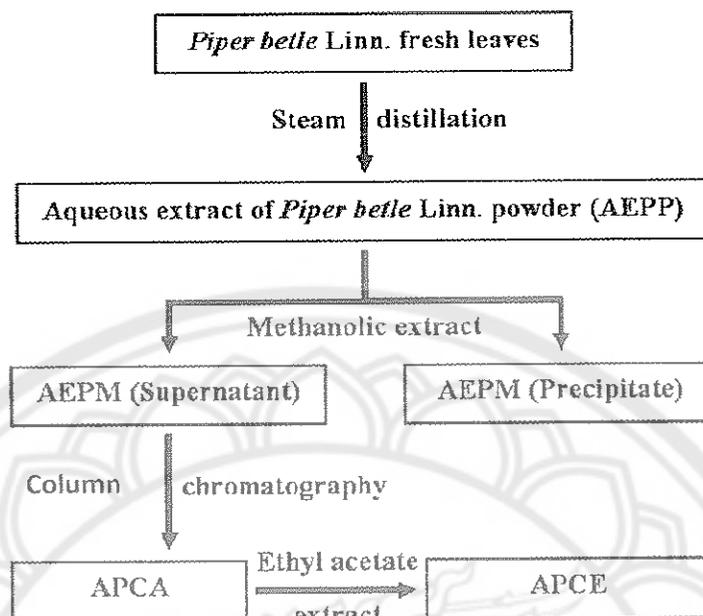
### ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

#### ตอนที่ 1 การสกัดและการแยกองค์ประกอบสารสกัดจากใบพลู

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดสารชั้นน้ำจากใบพลู เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลอง และทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างเพื่อค้นหาว่าสารชนิดใดมีผลทำให้เซลล์ตาย นำไปสู่ข้อสันนิษฐานว่าสารประกอบดังกล่าวอาจมีผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้นผิวหนัง

เป็นที่ทราบกันดีถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากพลู ซึ่งอุดมด้วยกลุ่มสารแคโรทีน (carotenes 80 IU/g fresh wt.) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid 1.94 mg/g fresh wt.) และสารกลุ่มฟีโนลิก คือ ยูจีนอล (eugenol) และอนุพันธ์ อันได้แก่ สารคาวิคอล (chavichol) เควิเบทอล (chevibetol) (Rathee, et al., 2006) และ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล (4-allyl-pyrocatecol) (Bhattacharya, et al., 2007) เป็นต้น ซึ่งคาดว่าสารกลุ่มฟีโนลิกดังกล่าวเป็นสาเหตุของอาการผิวหนังดำและรอยต่างขาวตามรายงานของ Liao Y.L., et al. (Liao, et al., 1999) และฟูกิลิน ตริสุโกศล (ฟูกิลิน ตริสุโกศล, 2544)

การสกัดสารประกอบอินทรีย์ที่มีขั้วสูงสามารถกระทำได้ทั้งกระบวนการสกัดด้วยความร้อนที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายในลักษณะของการต้มหรือสกัดด้วยเอทานอล (Dasgupta, N., and De, B. 2004; Arambewela, et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการสกัดโดยใช้เมทานอล อะซิโตนและเอทิล อะซิเตต เป็นตัวทำละลาย (Maisuthisakul, 2007) ซึ่งมีกระบวนการค่อนข้างยุ่งยากหลายขั้นตอนกว่าจะได้สารฟีโนลิกที่มีความบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว เช่น ต้องสกัดด้วยรีเอเจนต์ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะของก๊าซเฉื่อย เป็นต้น (Uzelac, 2005; Kubola and Siriamornpun, 2008) ดังนั้นเพื่อให้ได้ชนิดของสารสกัดมีความสอดคล้องกับชนิดของสารที่คาดว่าน่าจะพบในใบพลูหนึ่ง ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาส่วนของสารสกัดชั้นน้ำที่ได้จากการนึ่งใบพลู หรือ aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. (APE) เนื่องจากการที่ผู้ป่วยใช้ใบพลูหนึ่งที่ยื่นแล้วประกบบนผิวหนังนั้น ไอความร้อนจากการนึ่งจะเป็นตัวพาให้น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นสารที่ระเหยได้ง่ายแยกออกจากใบพลู ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสีอาจเป็นสารฟีโนลิกที่ไม่ได้เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย หรืออาจเป็นสารเคมีต่างชนิดที่มีคุณสมบัติด้านการละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้วสูงที่อยู่ในใบพลู โดยความร้อนจากการนึ่งไม่มีผลต่อการสลายตัวของสารเหล่านี้ (Boonyim, et al., 2009)



ภาพ 13 ขั้นตอนการสกัดสาร 4 - อัลลิซิน - ไพโรแคทีคอลจากใบพลู

ตาราง 3 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดในแต่ละขั้นของกระบวนการแยกองค์ประกอบ

	ประเภทของการสกัด/แยก	น้ำหนักสารตั้งต้น	ชนิดของสารสกัด	น้ำหนักของสารสกัด	ผลผลิตร้อยละ
FLPB	กลั่นด้วยไอน้ำ	1,000.0 g	AEPP	11.2 g	1.12
AEPP	สกัดด้วยเมทานอล	1,000.0 mg	AEPM	522.4 mg	52.24
AEPM	คอลัมน์โครมาโตกราฟี	522.4 mg	APCA	264.9 mg	50.71
APCA	สกัดด้วยเอทิล อะซิเตต	264.9 mg	APCAE	12.6 mg	4.77

FLPB : Fresh leaves of *Piper betle* Linn.

AEP : Aqueous crude extract of *Piper betle* Linn.

AEPP : Aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder

AEPM : Aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder extracted by methanol

APCA : Aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder purified by column chromatography; alumina 90 neutral pack

APCE : APCA extracted by ethyl acetate

สำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากใบพลู ถูกออกแบบให้มีความใกล้เคียงกับสภาวะการนึ่งใบพลูที่ผู้ป่วยใช้ แตกต่างกันที่ระยะเวลาการสกัดในการทดลองจะใช้เวลานานกว่าการนึ่งปกติเพื่อให้สารที่ต้องการสกัดถูกชะล้างสู่ชั้นน้ำ ภายหลังจากกระบวนการสกัด นำสารสกัดชั้นน้ำไปทำให้เป็นผงแห้งโดยการกลั่นแบบลดความดันเพื่อขจัดน้ำออกและ freeze-dry เพื่อไล่ความชื้นออกจาก crude extract เรียกสารสกัดใน fraction นี้ว่า aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder (AEPP) แสดงผลผลิตร้อยละที่ได้ คือ 1.12 จากน้ำหนักใบพลูสด 1 กิโลกรัม ซึ่งสารสกัดที่ได้้นั้นคาดว่ามีส่วนประกอบของสารอินทรีย์ที่มีขั้วสูง และเป็นไปได้ว่าจะมีสารฟีนอลิกบางชนิดรวมอยู่กับเกลือของสารอนินทรีย์ ซึ่งการแยกสารทั้งสองกลุ่มดังกล่าวออกจากกันสามารถทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติที่ว่าเกลือของสารอนินทรีย์จะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นเมื่อเลือกใช้ตัวทำละลายอินทรีย์สภาพขั้วสูง เช่น เมทานอล ในกระบวนการสกัด จะสังเกตเห็นการแยกของสารทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจน กล่าวคือ สารอินทรีย์ที่มีขั้วสูงจะละลายในตัวทำละลายเมทานอลให้สารสกัดสีเหลือง ส่วนเกลือของสารอนินทรีย์จะมีลักษณะเป็นผงตะกอนสีเขียวเข้ม และจากผลของการสกัดสาร AEPP ด้วยเมทานอลพบว่าสารสกัด aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder extracted by methanol (AEMP) แสดงผลผลิตร้อยละคิดเป็น 52.24 จากน้ำหนักของ AEPP 1 กรัม จากนั้นเมื่อนำสาร AEMP ไปแยกองค์ประกอบสารกลุ่ม carotenoid ออกจากกลุ่มสารที่สนใจด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีที่มี alumina 90 neutral เป็นเฟสอยู่กับที่ (stationally phase) และมีเมทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) พบว่าในการชะสารผ่านคอลัมน์ สารกลุ่ม carotenoids จะถูกดูดซับอยู่ภายในคอลัมน์ (Weeks, et al., 1980) ส่วนของสารที่สนใจจะถูกชะผ่านคอลัมน์ลงสู่ภาชนะเก็บด้านล่างได้เป็นสาร aqueous crude extract of *Piper betle* Linn. powder purified by column chromatography; alumina 90 neutral pack (APCA) คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 50.71 จาก AEMP 522.4 มิลลิกรัม ต่อมาเมื่อนำสาร APCA ไปทำการสกัดครั้งสุดท้ายด้วยเอทิล อะซิเตต ทำให้สามารถแยกสารฟีนอลิกที่มีชื่อว่า 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล (4-allyl-pyrocatechol) ออกมาได้โดยแสดงผลผลิตร้อยละ 1.26 จากน้ำหนักของ AEPP 1 กรัม ผลการสกัดแสดงดังตาราง 3 และผลการทดลองการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีแสดงในตอนที่ 2 เรื่อง การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู

จากวิธีการสกัดในลักษณะของการนึ่ง โดยไม่ให้ใบพลูสดถูกต้มโดยตรงในน้ำร้อน แต่ใช้น้ำร้อนเป็นตัวชะเอาสารบางกลุ่มกลับลงสู่ชั้นน้ำของหม้อต้ม (ภาพ 11) เป็นการคัดแยกสารสกัดอินทรีย์กลุ่มที่มีขั้วสูงออกจากสารอินทรีย์กลุ่มที่มีขั้วต่ำ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดในการทดลองครั้งนี้กับวิธีการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอลหรือเอทานอล

ที่เคยมีมา (Dasgupta, N., and De, B. 2004; Arambewela, et al., 2005; Maisuthisakul, 2007) จะเห็นว่าการสกัดในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อชนิดของสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักสูงกว่า อีกทั้ง ปริมาณของสารสกัดที่ได้มานั้นมีจำนวนที่น้อยหลังจากผ่านการแยกเพียง 3 ขั้นตอน ด้ได้จากผล การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในตอนที่ 2 ซึ่งหลังจากการแยกองค์ประกอบในขั้นตอนที่ 3 แล้วปรากฏสารเพียง 10 ชนิดใน APCA fraction ทั้งนี้เนื่องจากสารอินทรีย์ส่วนใหญ่แสดงควมมีน้ำหนัก ละเอียดได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ แต่ส่วนน้อยที่ละลายได้ในน้ำและการที่สารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักสูง จะสามารถถูกสกัดออกจากพืชได้จะต้องมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เช่น ความร้อนจากการต้ม ที่ส่งผลให้เซลล์แตก ทำให้สารที่มีอินทรีย์ที่มีน้ำหนักสูงถูกสกัดสู่น้ำได้ในที่สุด

## ตอนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู

### 1. High performance liquid chromatography

#### 1.1 การเลือกเฟสอยู่กับที่

เนื่องด้วยคุณสมบัติของสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากใบพลูแสดงควมมีน้ำหนักสูง การเลือกใช้คอลัมน์จึงต้องมีความเหมาะสมกับตัวทำละลายผสมที่ใช้ คือ 0.01% กรดอะซิติกในน้ำ และเมทา-นอล อัตราส่วน 9 ต่อ 1 ดังนั้น reverse phase (bonded phase chromatography) ชนิด C-18 (Bubenchikova and Drozdova, 2004; Li, et al., 2004; Tarnawski, et al., 2006; Markowski and Plochanski, 2006) ซึ่งเฟสอยู่กับที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำจึงมีความเหมาะสม สำหรับแยกสารในงานวิจัยนี้

#### 1.2 การเลือกเฟสเคลื่อนที่

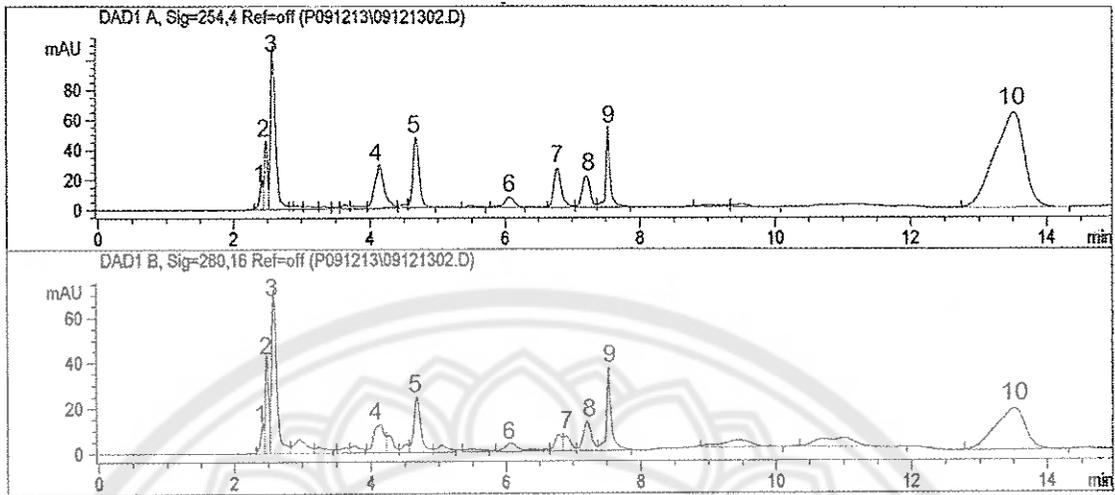
สารประกอบของใบพลูส่วนใหญ่ คือ สารกลุ่มฟีนอลิกและในกระบวนการแยกสาร มีน้ำหนักสูง การเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC นับว่ามีความสำคัญ จากรายงานการวิเคราะห์สารฟีนอลิกที่มีโครงสร้างเป็นอนุพันธ์หรือคล้ายกับอนุพันธ์ของยูจีนอล ในพืชชนิดต่าง ๆ มีการเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ แสดงดังตาราง 4 โดยหลักในการเลือกใช้ตัวทำละลาย ของงานวิจัย จะเลือกใช้ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ น้ำและเมทานอล ซึ่งหาได้ง่าย ราคาไม่แพงและความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง (แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534)

ตาราง 4 ชนิดของระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มฟีนอลิก ด้วยเทคนิค HPLC

Solvent A	Solvent B	Solvent C	Ratio A : B	System	Reference
Acetonitrile	water	Phosphoric acid	400 :600: 5	Isocratic	Bubenchikova and Drozdova, 2004
0.01% acetic acid	Methanol	-	-	gradient	Li, et al., 2004
Acetonitrile	1% formic acid	-	-	gradient	Maisuthisakul, 2007
2%v/v acetic acid	Methanol	-	82 : 18	Isocratic	Tarnawski, et al., 2006
Sodium acetate	Acetonitrile	-	-	gradient	Markowski and Plochanski, 2006

### 1.3 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

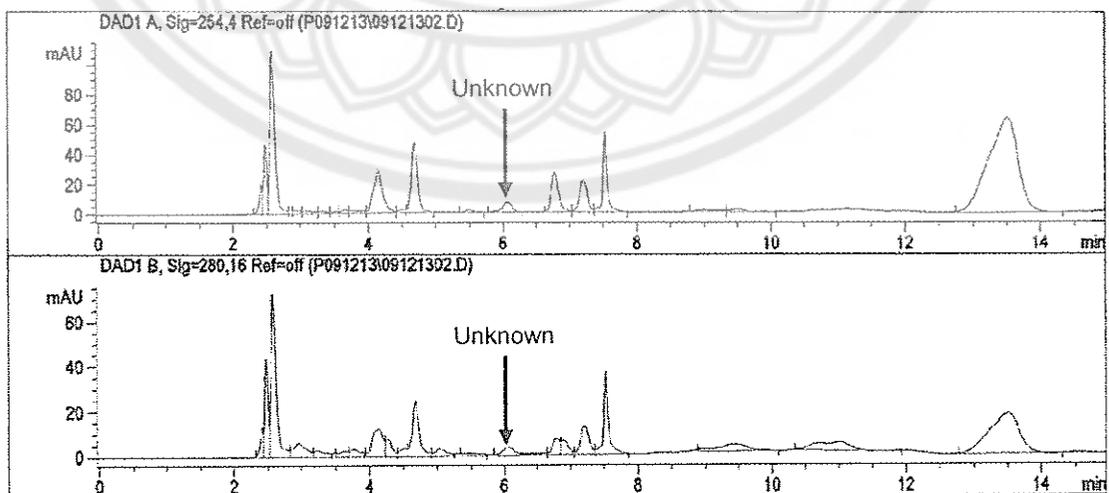
หลังจากผ่านกระบวนการสกัดและแยกองค์ประกอบสาร AEPP จนมีความบริสุทธิ์ในระดับหนึ่งแล้ว เมื่อนำสาร APCA มาทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกและหาจำนวนของสารที่องค์ประกอบหลัก พบว่า ในการเลือกใช้ร้อยละ 0.01 ของกรดอะซิติกในน้ำ (ตัวทำละลายเอ) และเมทานอล (ตัวทำละลายบี) (Li, et al., 2004; Tarnawski, et al., 2006) เป็นเฟสเคลื่อนที่นั้น สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายเอต่อตัวทำละลายบีเป็น 9 ต่อ 1 อัตราการไหล (flow rate) ของเฟสเคลื่อนที่ คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 25 องศาเซลเซียส (Li, et al., 2004) วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Bubenchikova and Drozdova, 2004) และ 280 นาโนเมตร (Tarnawski, et al., 2006) โดยจำนวนของสารที่เป็นองค์ประกอบใน APCA มีจำนวน 10 ชนิด แสดงดังภาพ 14 จากโครมาโตแกรมจะเห็นได้ว่าพีคของการแยกที่เวลา 2 นาที 30 วินาที ยังให้ผลการแยกที่ไม่ดี อาจเนื่องจากสารทั้งสามชนิดอาจแสดงความมีขั้วใกล้เคียงกัน และอาจแสดงคุณสมบัติทางโครงสร้างในลักษณะการเป็นไอโซเมอร์กัน ซึ่งการแยกสารดังกล่าวจะต้องใช้สภาวะที่เหมาะสมเป็นอย่างมาก



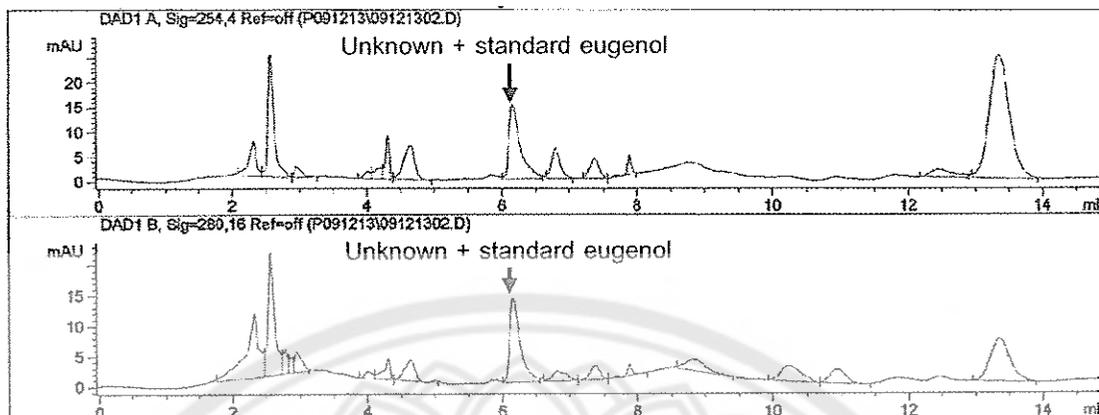
ภาพ 14 HPLC โครมาโตแกรม แสดงการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบจำนวน 10 ชนิด  
ใน APCA

#### 1.4 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยเทคนิค HPLC

ในกระบวนการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิค HPLC เป็นการเปรียบเทียบความสามารถในการถูกชะออกจากคอลัมน์ในระยะเวลาที่แตกต่างกันหรือในระยะเวลาเดียวกันของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน (รวิชัย ศรีวิบูลย์, 2545) ที่คาดว่าจะมีอยู่ในสารตัวอย่าง ซึ่งจากการทดลองฉีดสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐานยูจีนอล พบว่าระยะเวลาที่สารตัวอย่างและสารมาตรฐานยูจีนอลถูกชะออกจากคอลัมน์มีค่าเท่ากัน ณ นาทีที่ 6 อาจเป็นไปได้ว่าสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ ณ นาทีที่ 6 อาจเป็นสารยูจีนอล ดังภาพ 15 และ 16

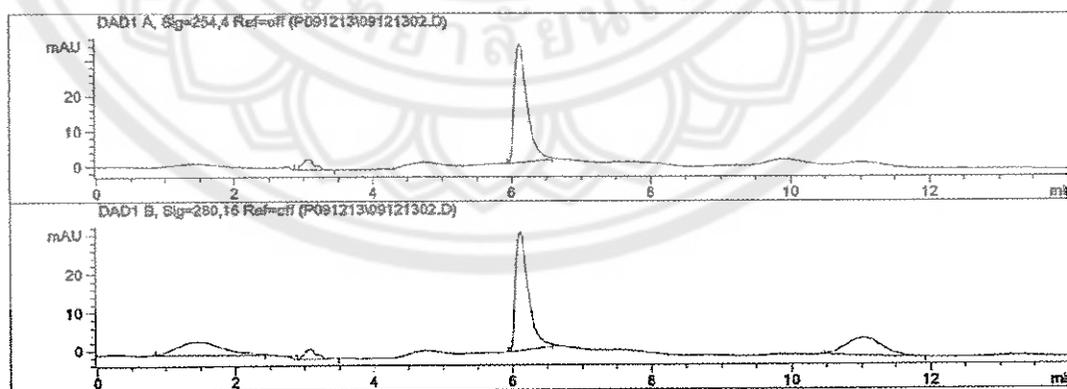


ภาพ 15 HPLC โครมาโตแกรมของสาร APCA

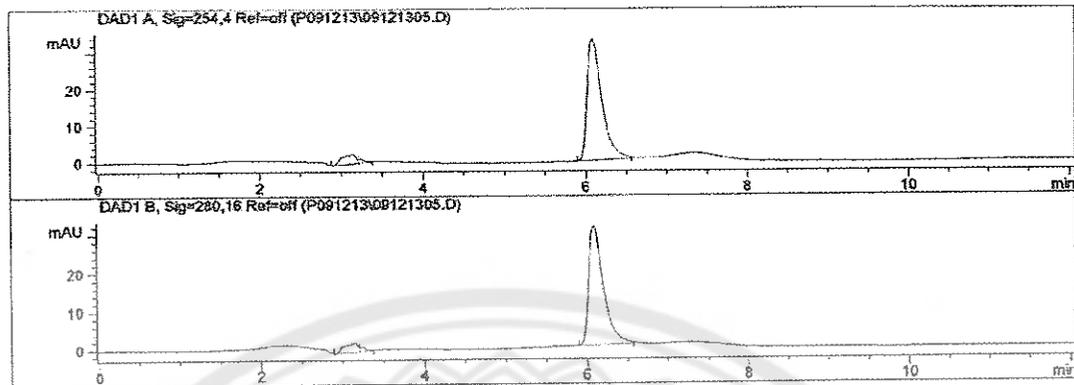


ภาพ 16 HPLC โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง APCA + สารมาตรฐานยูจีนอล

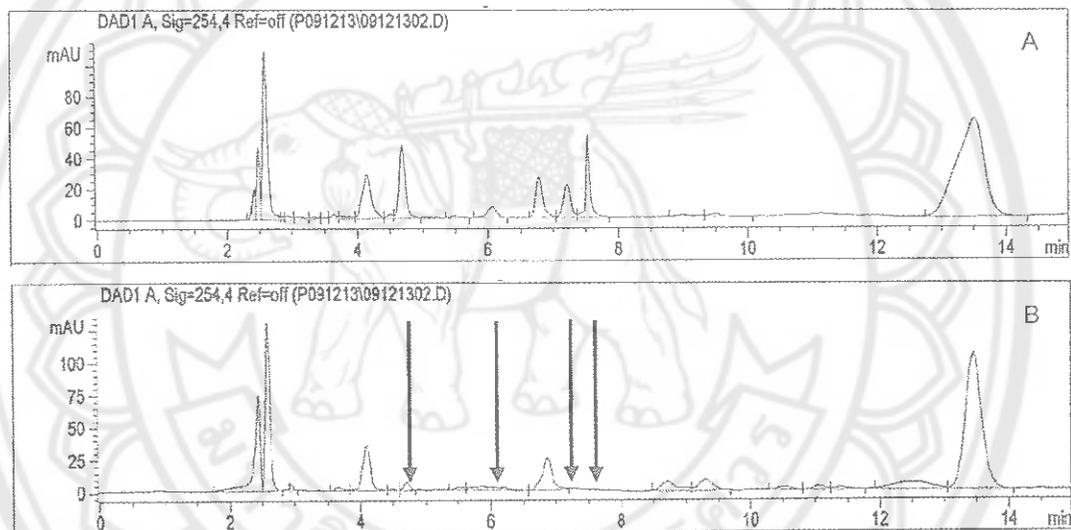
และเมื่อนำสาร APCA ที่ผ่านการสกัดด้วยเอทิล อะซิเตต ในขั้นตอนสุดท้ายมาทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานยูจีนอล ผลการทดลองที่เกิดขึ้นช่วยยืนยันความเป็นไปได้ที่ว่าสาร APCE น่าจะเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐาน ดังภาพ 17 และ 18 แต่เมื่อนำสาร APCA ที่ถูกสกัดด้วยเอทิล อะซิเตต มาทำการวิเคราะห์ทาง HPLC อีกครั้งหนึ่ง พบว่าสารองค์ประกอบใน APCE ไม่ใช่สารเพียงชนิดเดียวที่ถูกสกัดได้ด้วยเอทิล อะซิเตต แต่มีสารถึง 4 ชนิดที่ถูกสกัดออกมา พิจารณาได้จากโครมาโตแกรมที่หายไประยะเวลา 4 นาที 40 วินาที ที่ระยะเวลา 6 นาที ที่ระยะเวลา 7 นาที 15 วินาทีและที่ระยะเวลา 7 นาที 30 วินาที ดังภาพ 19A และ 19B แต่เมื่อพิจารณาจากผล HPLC โครมาโตแกรมของ APCE ที่มีองค์ประกอบหลักเพียงชนิดเดียว คือ สารที่-



ภาพ 17 HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล



ภาพ 18 HPLC โครมาโตแกรมของสาร APCE



ภาพ 19 A โครมาโตแกรมที่ได้จากเทคนิค HPLC ของสาร APCA และ B โครมาโตแกรมที่ได้จากเทคนิค HPLC ของสารสาร APCA ซึ่งแสดงตำแหน่งของสารที่ถูกสกัดออกโดยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตต

ถูกชะออกมา ณ นาทีที่ 6 โดยไม่ปรากฏสารต่างชนิดที่ระยะเวลาที่อื่นเลย ซึ่งอาจอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนั้นน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับหมู่โครโมฟอร์และหมู่ออกซิโครมภายในโครงสร้างของสาร (วิชัย รวีตระกูล และคณะ, 2526) ที่ทำให้สารบางชนิดซึ่งมีปริมาณน้อยสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ดีและมีผลให้สารบางชนิดที่มีปริมาณมากลดการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตและเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารซึ่งคาดว่าเป็นองค์ประกอบหลักและค่อนข้างมีความบริสุทธิ์สูงในส่วน APCE เป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานจริงหรือแตกต่าง สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีได้โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีในการทดลองตอนที่ 2 หัวข้อที่ 2 โดยใช้เทคนิค

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR) และแมสสเปกโทรสโกปี (Mass Spectroscopy) ผ่านกระบวนการวิเคราะห์ทางก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรสโกปี (Gas Chromatography Mass Spectroscopy; GC-MS)

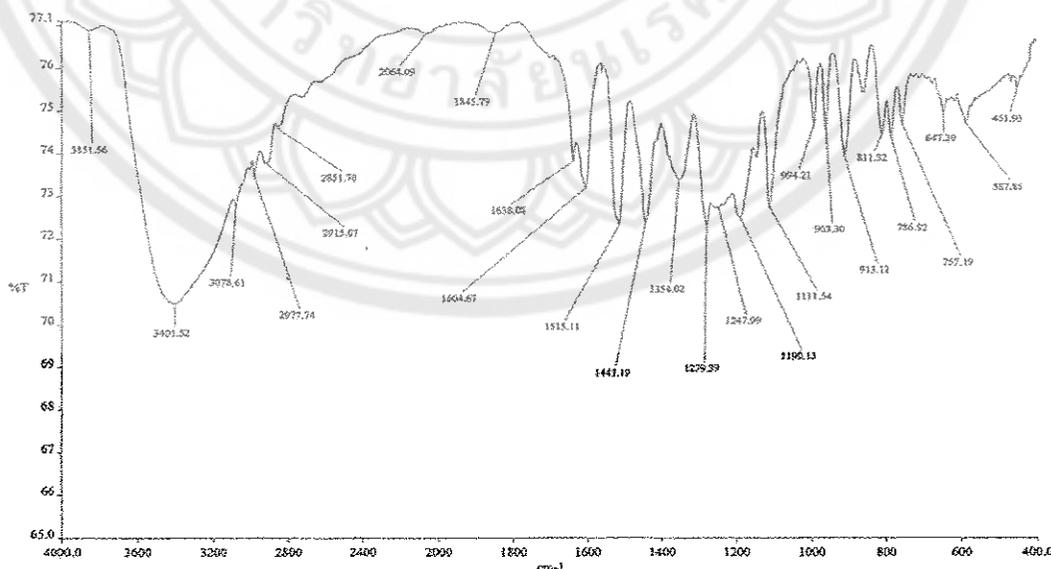
## 2. Spectroscopy technique

### 2.1 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; NMR

จากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC ในการทดลองตอนที่ 2 หัวข้อที่ 1.4 เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารว่าสารซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน APCE เป็นสารชนิดใด สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy,  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ Infrared spectroscopy,  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  สารตัวอย่าง APCE แสดงค่าการดูดกลืนรังสี Infrared และค่า chemical shift ดังต่อไปนี้

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Infrared spectroscopy สามารถที่จะยืนยันหมู่ฟังก์ชันที่พบในสารตัวอย่าง APCE ได้ดังนี้

Infrared spectroscopy (KBr):  $3,401.52\text{ cm}^{-1}$  (H-O stretching band),  $1,604.67\text{ cm}^{-1}$  (-C=C- stretching band of alkene),  $1,515.11\text{ cm}^{-1}$ ,  $1,443.19\text{ cm}^{-1}$  และ  $1,279.39\text{ cm}^{-1}$  (-C-C- stretching of aromatic),  $1,190.13\text{ cm}^{-1}$ ,  $1,111.54\text{ cm}^{-1}$ ,  $963.30\text{ cm}^{-1}$ ,  $811.32\text{ cm}^{-1}$  และ  $786.92\text{ cm}^{-1}$  แสดงดังภาพ 20

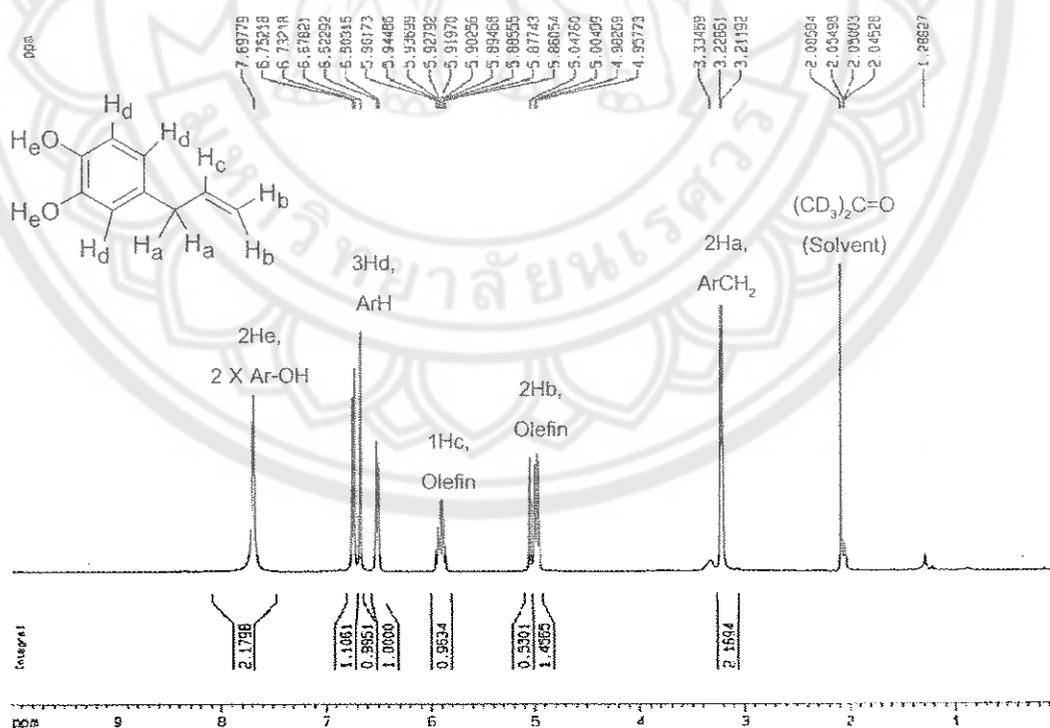


ภาพ 20 Infrared spectrum สารตัวอย่าง APCE

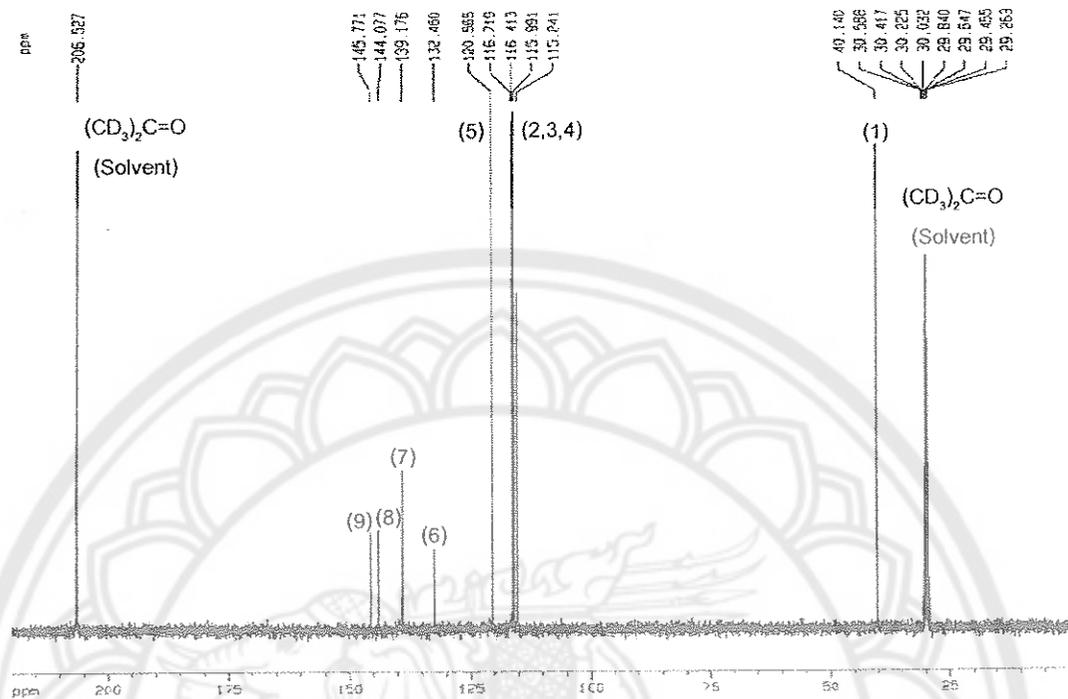
ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H-NMR}$  และ  $^{13}\text{C-NMR}$  สามารถที่จะยืนยันโครงสร้างของสารตัวอย่าง APCE ได้จากค่า chemical shift ( $\delta$ ) ได้ดังนี้

$^1\text{H-NMR}$  (APCE ใน Acetone  $\text{D}_6$ , 400 MHz) ค่า chemical shift ( $\delta$ ) ในช่วง 3.21 ถึง 3.22 ppm แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ doublet ( $J$ ; 6.68 Hz) ของ 2 โปรตอนจาก ethylene group ที่ติดอยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-CH}_2$ -) ส่วนค่า chemical shift ที่ 4.95 ถึง 5.04 ppm แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 2 โปรตอนที่ olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ที่ 5.86 ถึง 5.96 แสดงสเปกตรัมแบบ multiplex จาก 1 โปรตอนของหมู่ olefin ( $-\text{C}=\text{C}-$ ) ที่ช่วง 6.50-6.75 แสดงรูปแบบสเปกตรัมแบบ multiplex ของ 3 โปรตอนจาก aromatic ring ( $\text{Ar-H}$ ) และที่ 7.80 ppm แสดงพีค singlet จาก 2 โปรตอนของ hydroxyl group ที่ติดอยู่กับ aromatic ring ( $\text{Ar-OH}$ ) แสดงดังภาพ 21

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$ ) แสดงค่า chemical shift ( $\delta$ ) ของคาร์บอน 9 ตำแหน่ง ดังต่อไปนี้: 40.14 ppm, 115.24 ppm, 115.99 ppm, 116.41 ppm, 120.56 ppm, 132.46 ppm, 139.17 ppm, 144.07 ppm, 145.77 ppm แสดงดังภาพ 22



ภาพ 21  $^1\text{H-NMR}$  สารตัวอย่าง APCE ใน  $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$  (acetone- $d_6$ )



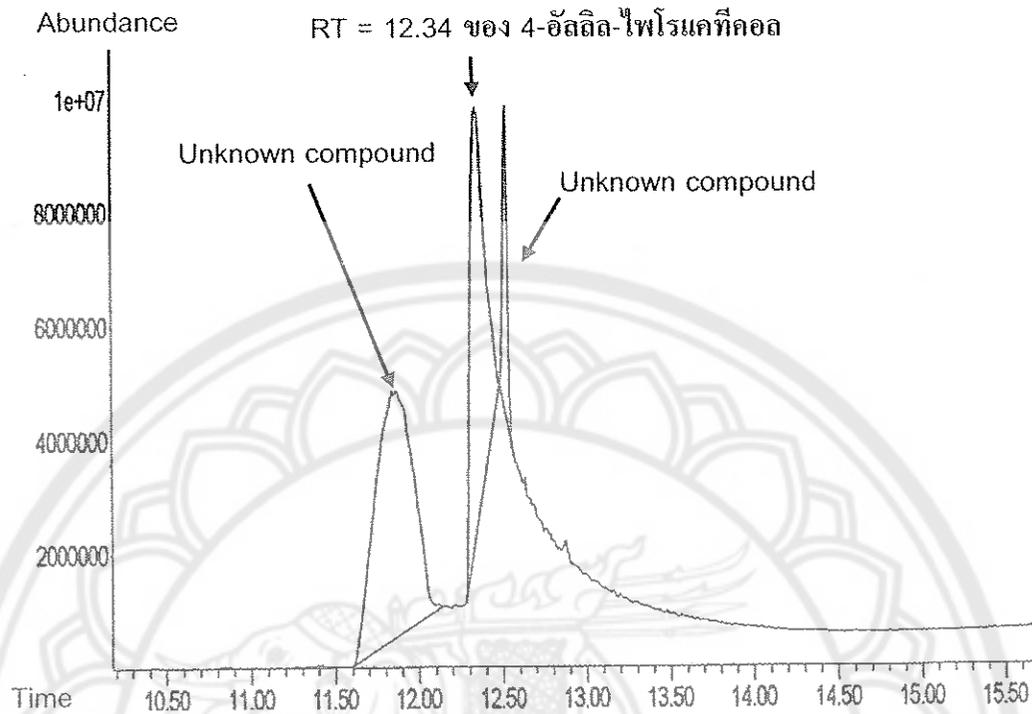
ภาพ 22  $^{13}\text{C}$ -NMR สารตัวอย่าง APCE ใน  $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$  (acetone- $d_6$ ) แสดงจำนวนคาร์บอนภายในโครงสร้างจำนวน 13 คาร์บอน

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้ข้อมูลทั้ง Infrared spectroscopy,  $^1\text{H}$ -NMR และ  $^{13}\text{C}$ -NMR พบว่าผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานการวิเคราะห์ทางโครงสร้างของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่เคยมีมา (Rathee, et al., 2006) ซึ่งข้อแตกต่างทางด้านประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ใช้กระบวนการวิเคราะห์มีส่วนทำให้ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้อาจมีความชัดเจนกว่าในส่วนของ  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum โดยการวิเคราะห์  $^{13}\text{C}$ -NMR ในการทดลองครั้งนี้ใช้ความถี่วิทยุ 100 MHz แต่ในรายงานที่เคยมีมาใช้ความถี่วิทยุ 50 MHz ปัจจุบันดังกล่าวนี้มีผลต่อความชัดเจนของพีคในกรณีนี้ เมื่อพีคสองพีคอยู่ชิดกันมาก ๆ บางครั้งหากความเข้มข้นของสารไม่มากพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์หรือการใช้เครื่อง NMR ชนิดที่มีความถี่วิทยุต่ำ พีคที่ได้ อาจแยกกันไม่ชัดเจนหรืออาจชิดกันมากจนมองเห็นเป็นพีคเดียว ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนพีคของสารตัวอย่าง APCE ที่คาดว่าจะเป็นสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล มีจำนวนของคาร์บอนที่ปรากฏในโครงสร้างตามการแปรผลของพีค  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum จำนวน 9 คาร์บอนแสดงดังภาพ 22 โดยจะสังเกตเห็นได้ว่ามีกลุ่ม  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum กลุ่มหนึ่งที่อยู่ชิดกันมาก หากวิธีการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพไม่ดีพออาจเป็นไปได้ว่า

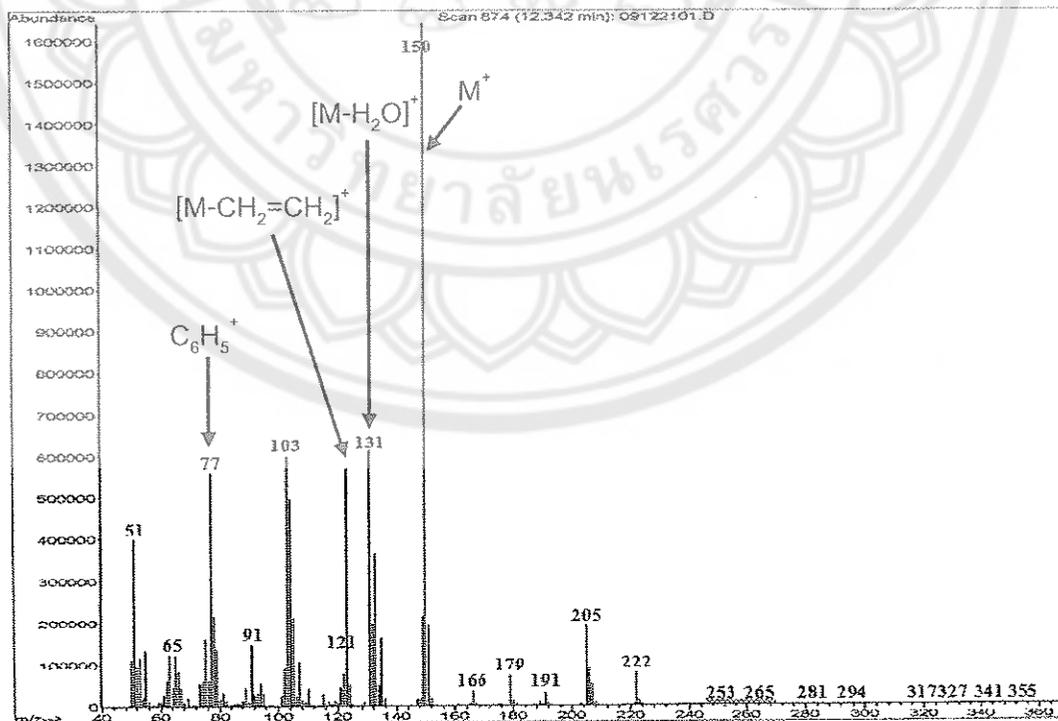
กลุ่มของ  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ดังกล่าวอาจขัดกันจนสังเกตเห็นเป็นพีคเดียว ดังรายงานของ Rathee และคณะในปี ค.ศ.2006 ซึ่งจำนวนของคาร์บอนที่รายงานผ่านค่า chemical shift จากผลการวิเคราะห์  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum มีจำนวนเพียง 8 คาร์บอนเท่านั้น และเพื่อเป็นการยืนยันว่าสารที่ทำการแยกและทำการวิเคราะห์โครงสร้างนั้นเป็นที่สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่มีมวลโมเลกุล 150.07 กรัม/โมล จึงสามารถกระทำได้โดยการวิเคราะห์หามวลโมเลกุล ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรมิเตอร์ ส่วนสาเหตุที่สามารถนำสาร APCE ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรมิเตอร์ได้นั้น เนื่องจากมีรายงานถึงการพบสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ในน้ำมันหอมระเหย (Rawat, et al., 1987) ดังนั้น สาร APCE ที่คาดว่าเป็นจะสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล จึงต้องมีคุณสมบัติระเหยกลายเป็นไอได้ ณ อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นไปตามคุณสมบัติของสารที่จะสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว (ธวัชชัย ศรีวิบูลย์, 2545) โดยผลการวิเคราะห์แสดงไว้ในตอนที่ 2 หัวข้อที่ 2.2 การวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยเทคนิคก๊าซโครมาโตกราฟี แมสสเปกโทรมิเตอร์

## 2.2 Gas Chromatography Mass spectroscopy (GC-MS)

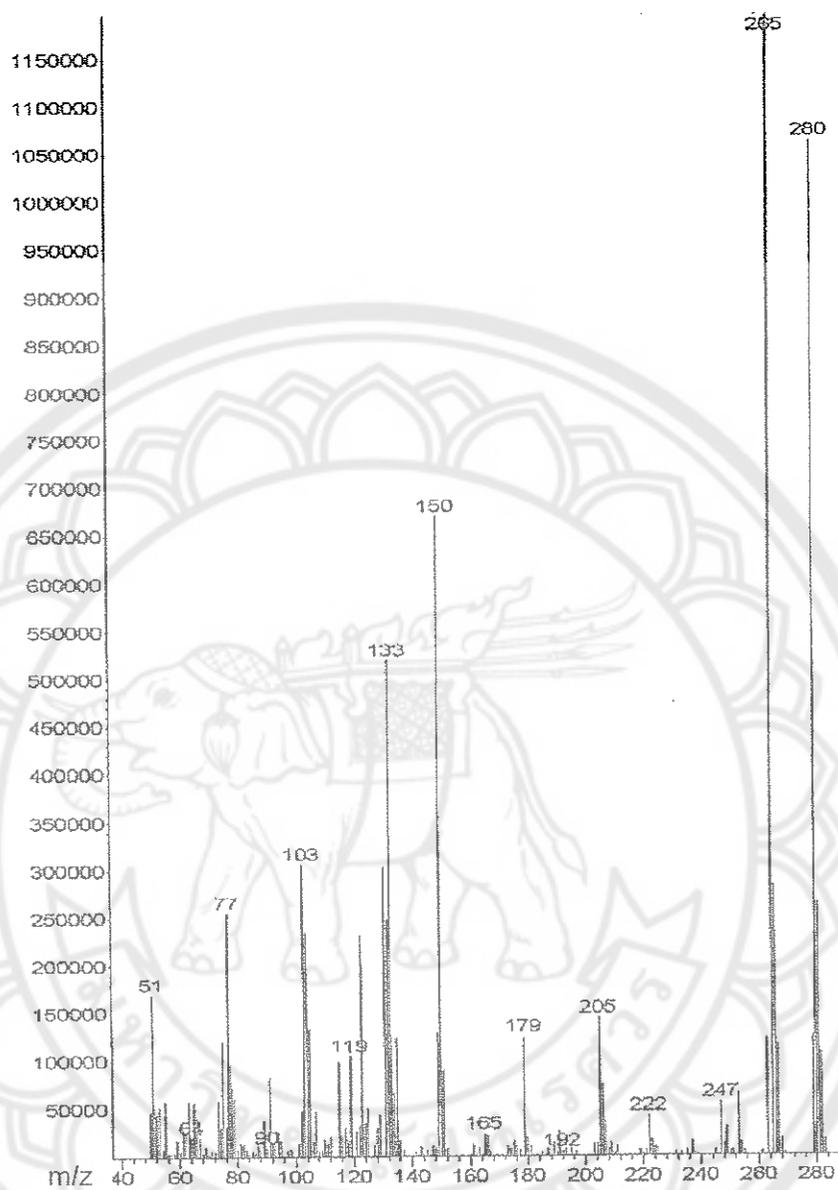
เมื่อวิเคราะห์ผลการแยกองค์ประกอบสาร APCE ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี พบว่า โครมาโตแกรมที่ได้แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบของสาร APCE จำนวน 3 ชนิด ดังภาพ 21 ซึ่งเครื่องมือ GC-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่มีฐานข้อมูลด้านแมสสเปกโทรสโกปี (unknown) ของสารทั้ง 3 ชนิด เกี่ยวกับความเป็นไปได้ว่าจะเป็สารอินทรีย์ชนิดใด ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ด้วยแมสดีเทคเตอร์ (mass detector) พบว่าพีคที่เรเทนชันไทม์ที่ 12.34 แสดงพีคของสารที่มีเบสพีคของแมสสเปกตรัมที่  $m/z = 150$  ดังภาพ 24 ซึ่งเมื่อนำผลการทดลองดังกล่าวไปทำการวิเคราะห์ร่วมกับผลทาง HPLC, IR และ NMR แล้วจะเป็นสิ่งที่ช่วยสนับสนุนว่าสาร APCE มีองค์ประกอบหลัก คือ สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ส่วนสารองค์ประกอบอีก 2 ชนิดที่พบร่วมกับสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ใน GC โครมาโตแกรมนั้นน่าจะเป็นสารที่ถูกสกัดออกมาพร้อมกันในขั้นตอนการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ซึ่งมีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก พิสูจน์ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR ซึ่งพบเพียงพีคของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล โดยปราศจากรูปแบบ NMR ของสารชนิดอื่นในลักษณะของสัญญาณรบกวน (noise) หรืออาจอธิบายได้จากปรากฏการณ์ของโครโมฟอร์และออกโซโครม (วิชัย รวีตระกูล และคณะ, 2526) ที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนที่ 2 หัวข้อที่ 1.4 อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์แมสสเปกตรัมของสาร Unknown compound ที่ค่า retention time 12.52 นาที พบว่าค่าแมสสเปกตรัมที่ได้แสดงเบสพีคที่  $m/z = 265$  ซึ่งมีความเป็นไปได้ถึงการเป็นสารกลุ่มอื่นซึ่งอาจไม่ใช่อนุพันธ์ของสารยูจีนอล ดังภาพ 25



ภาพ 23 GC โครมาโตแกรมของสาร APCAE ซึ่งประกอบด้วยสาร 3 ชนิด ซึ่ง ณ เวลาที่ 12.34 นาที แสดงพีคของสารที่เป็นองค์หลัก คือ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล



ภาพ 24 แมสสเปกตรัมของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล



ภาพ 25 แมสสเปกตรัมของสาร unknown compound ที่ RT 12.52 นาที

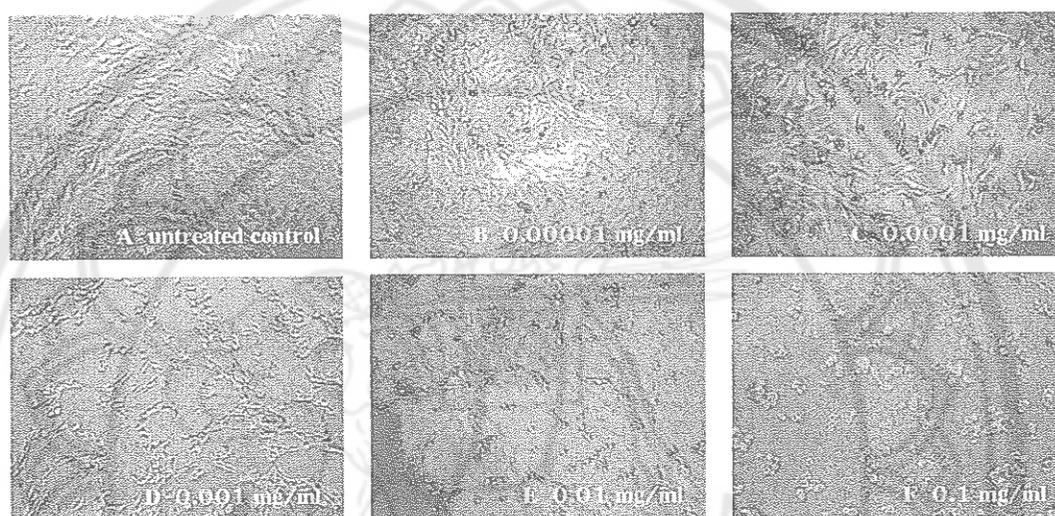
### ตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)

จากรายงานเกี่ยวกับอาการผิดปกติของผู้ป่วยที่ใช้ใบพลูหนึ่งประคบบนผิวหนังจนเกิดอาการผิวหนังดำและรอยต่างขาวในปี ค.ศ. 1999 จากประเทศไต้หวันและในปี ค.ศ. 2001 จากประเทศไทย จากการวิเคราะห์ถึงอาการของโรคและแสดงผลการตรวจที่ระดับเนื้อเยื่อด้วยวิธีการย้อมสีขึ้นเนื้อที่เก็บตัวอย่างตรวจจากผิวหนังบริเวณที่มีการใช้ใบพลูหนึ่งประคบบนผิวหนังของผู้ป่วย ผลการตรวจสอบแสดงให้เห็นถึงการหายไปของเซลล์สร้างเม็ดสี (Liao, et al., 1999; พุกกลิ่น ตรีสุโกศล, 2544) มีการอ้างถึงรายงานการพบสารกลุ่มฟีโนลิกในน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการหายไปของเซลล์สร้างเม็ดสีเกิดจากผลด้านความเป็นพิษของสารกลุ่มฟีโนลิกและ อนุพันธ์ของเบนซีน ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีถึงคุณสมบัติของสารในกลุ่มดังกล่าวเกี่ยวกับการทำให้ผิวหนังเกิดการอักเสบและเกิดความผิดปกติ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงชนิดของสารเคมีที่เป็นสาเหตุสำคัญของอาการดังกล่าว (Liao, et al., 1999) มีบางรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารกลุ่มฟีโนลิกจากใบพลู โดยใช้วิธีการสกัดร้อนและใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย การสกัดเย็นด้วยเอทานอลหรือเมทานอล (Ramji, et al., 2009; Wirotesangthong, M. et al., 2008; Row, LC. M. and Ho JC., 2009) ซึ่งสารสกัด (crude extracts) ที่ได้ส่วนมากจะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ (Ramji, et al., 2002; Razak, et al., 2006; Nalina T. and Rahim Z.H.A., 2007; Arambewela, et al., 2005; Gautam, et al., 2007) ฯลฯ โดยไม่มีการพิสูจน์ว่าสารเคมีชนิดใดเป็นสาเหตุของอาการผิวหนังดำและรอยต่างขาว

#### 1. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) โดยใช้สาร AEP

สาร AEP ที่ได้จากการสกัดด้วยไอน้ำในขั้นแรกมีลักษณะใสและมีสีเขียวอ่อน ภายหลังจากทำให้ AEP กลายเป็นผง (ผลผลิตร้อยละ 1.12 จากใบพลูสด 1 กิโลกรัม) นำไปทดสอบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ที่เลือกใช้เป็นตัวแทนของการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นเนื่องจากเป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่าย มีความไวต่อการทดสอบด้านความเป็นพิษที่ดี (Roberta, et al., 2003) และอาหารเลี้ยงเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 มีราคาต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์สร้างเม็ดสี อีกทั้งการที่เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 เป็นเซลล์ไลน์ (cell lines) จึงมีความสามารถในถ่ายเลี้ยงได้ในจำนวนครั้งที่มากกว่าเซลล์สร้างเม็ดสีที่เป็นเซลล์ปฐมภูมิ (Primary cells) ซึ่งสามารถถ่ายเลี้ยงได้ไม่เกิน 4-5 ครั้ง โดยหลังจากเลี้ยงเซลล์ 2-3 วัน จนเซลล์เพิ่มจำนวนเกือบเต็มหลุมจึงทำการทดสอบความเป็นพิษโดยเลือกใช้เวลานานที่สุดในการทดสอบคือ 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการเลียนแบบสภาวะการใช้ใบพลูหนึ่งที่ผู้ป่วยนำมาการประคบบนผิวหนัง

ข้อแตกต่างระหว่างการศึกษาความเป็นพิษในหลอดทดลองกับความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในผู้ป่วย คือ แต่ละเซลล์ที่ทำการเลี้ยงในหลอดทดลอง เมื่อนำมาทดสอบกับสารสกัดจะสัมผัสโดยตรงกับสารสกัดแต่ใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าการที่ผู้ป่วยใช้ใบพลูหนึ่งประคบซึ่งใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมงหรืออาจมีการประคบขณะนอนหลับติดต่อกันเป็นเวลาหลายวัน (Liao, et al., 1999; พุกกลิ่น ตรีสุโกศล, 2544)



ภาพ 26 จำนวนเซลล์ลดลงและไม่แผ่ยึดเกาะเมื่อทดสอบกับ AEP ความเข้มข้นสูง รูป A กลุ่มควบคุมซึ่งปราศจากสาร AEP ซึ่งเซลล์มีการแผ่และแบ่งเซลล์อย่างเป็นปกติ รูป B, C, D, E และ F คือกลุ่มการทดลองที่มีการทดสอบสาร AEP ที่ความเข้มข้น 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (AEP; aqueous extract of *Piper betle* Linn.)

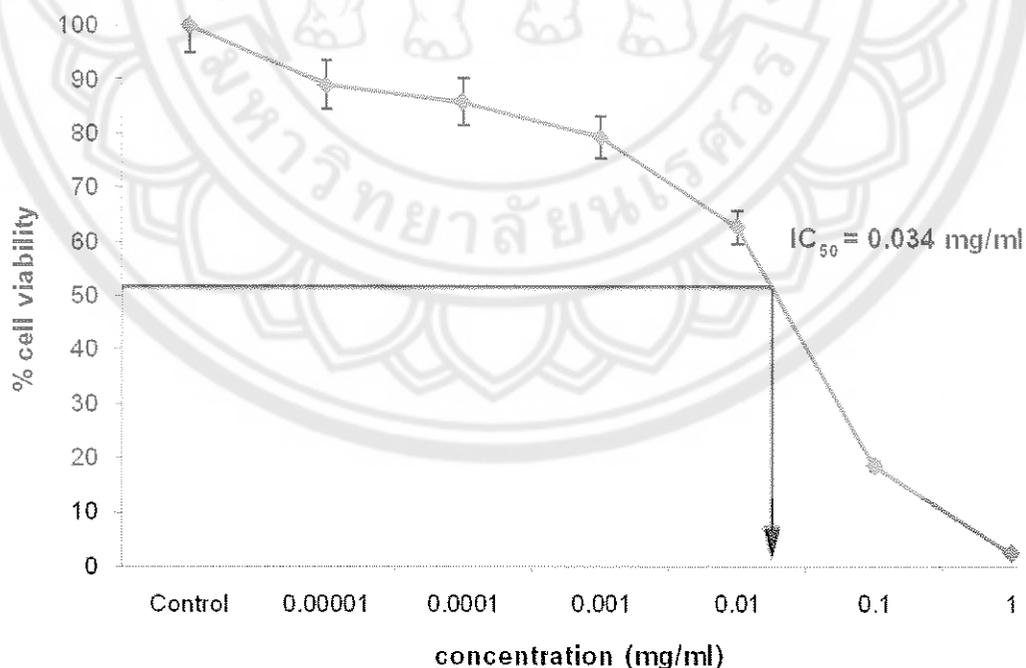
ภายหลังการทดสอบด้านความเป็นพิษของสารสกัด AEP ต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์ที่ผ่านการทดสอบด้วยสาร AEP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของสาร AEP ในระดับต่ำ เซลล์จะเริ่มมีการหดตัวเล็กน้อย ยังคงมีการการเพิ่มจำนวนของเซลล์แต่เมื่อความเข้มข้นของสาร AEP เพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการแผ่ออกของเซลล์เพื่อยึดเกาะจะยิ่งลดลงเซลล์เริ่มมีลักษณะกลม การเจริญ รวมถึงการแบ่งเซลล์ลดลงอย่างต่อเนื่องและที่ความเข้มข้นสูงสุดของสาร AEP เซลล์ส่วนใหญ่จะหดเป็นก้อนกลม ส่วนเซลล์ที่แผ่อกในลักษณะของการยึดเกาะจางเล็กลงเซลล์มีจำนวนน้อยมาก ดูเหมือนว่าการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ถูกยับยั้งโดยสิ้นเชิง แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งปราศจากสารทดสอบ AEPF ที่เซลล์ยังคงมีสภาพของการแผ่อกเพื่อยึดเกาะกับจานเลี้ยงเซลล์อย่างเป็นปกติ มีเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง ภาพ 26

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ แสดงผลร้อยละของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตโดยวิธี MTT ซึ่งเป็นวิธีการวัดค่าความมีชีวิตของเซลล์จากการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตของสาร formazan ที่มีสีม่วง ซึ่งได้จากการ reduce เกล็ดของ tetrazolium ที่มีสีเหลืองภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต (Freshney, R. I., 2005) ดังนั้นหากมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นสีม่วงของ formazan จะไม่ปรากฏ สำหรับการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการละลายผลิตภัณฑ์สีม่วงของ formazan เพื่อการเลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมระหว่าง DMSO (Theiszová, M., et al., 2005) กับ 0.04 โมลาร์ ของ hydrochloric ใน isopropyl alcohol (Weyenberg, W., et al., 2007) พบว่า DMSO สามารถละลาย formazan ให้สารละลายสีม่วงใส ดีกว่าการใช้ 0.04 โมลาร์ ของ hydrochloric ใน isopropyl alcohol ซึ่งให้สารละลายสีม่วงที่มีตะกอนขุ่น ซึ่งอาจมีผลต่อการวัดค่าการดูดกลืนแสงในกระบวนการทดลอง ภายหลังจากการละลายและวัดค่าการดูดกลืนแสง เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของ formazan ที่ได้จากการทดสอบเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างของสารสกัดได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของความมีชีวิต พบว่าเมื่อวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความมีชีวิตในแกน Y กับความเข้มข้นของสารสกัดในแกน X แสดงค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า  $IC_{50}$  (inhibitory concentration at 50% growth) ที่ระดับความเข้มข้น 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากผลการวิจัยในขั้นแรก แสดงให้เห็นว่าสาร AEPF น่าจะมีสารเคมีบางชนิดที่มีผลทำให้เซลล์ตาย ดังภาพ 27

จากผลการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดขึ้นน้ำจากใบพลูที่มีผลทำให้เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลองตาย ผลที่ได้ช่วยยืนยันสมมติฐานที่ว่า ในสารสกัดขึ้นน้ำจากใบพลูมีสารบางชนิดที่เป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสี สอดคล้องกับรายงานของ Liao และคณะที่เคยทำการพิสูจน์ให้เห็นถึงการหายไปของเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้น stratum basale ของผิวหนังชั้น epidermis โดยการนำชิ้นเนื้อของผู้ป่วยโรค leukomelanosis มาทำการตรวจดูโครงสร้างของเซลล์ด้วยวิธี Hematoxylin-eosin stain, Masson-Fontana stain และวิธี S-100 stain เพื่อศึกษาผลของการได้รับสารพิษจากใบพลูหนึ่งเข้าสู่ชั้นผิวหนัง ซึ่งพบว่าจากกระบวนการเกิด

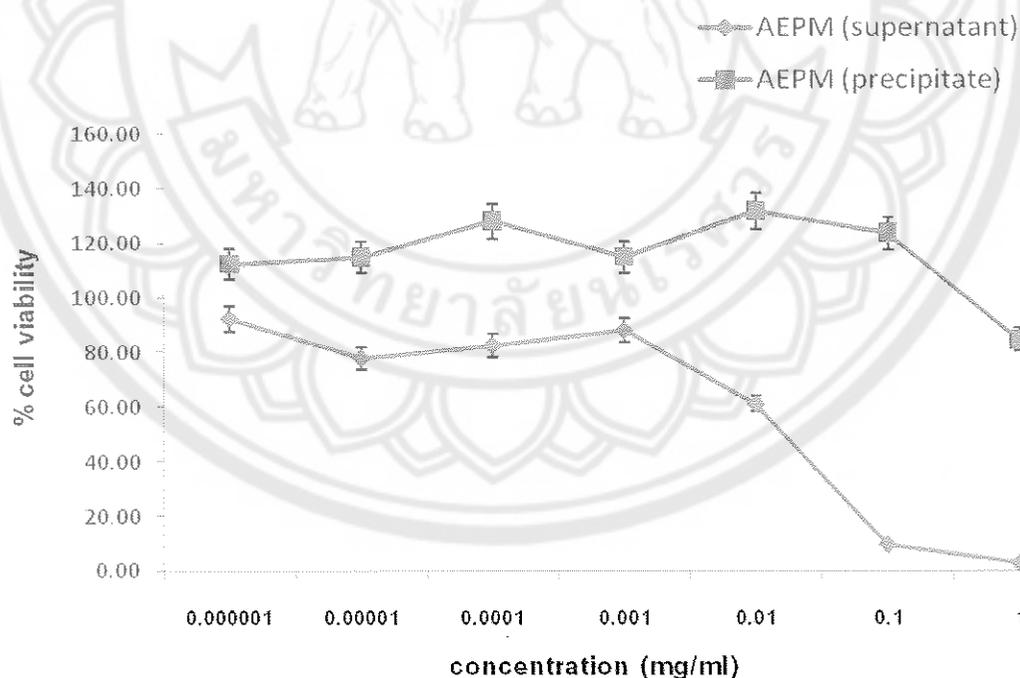
โรค 3 ระยะ ประกอบด้วยระยะที่ 1 การขาวขึ้นของผิวหนัง (bleaching stage) ระยะที่ 2 การเกิดรอยดำ (mottled hyperpigmentation stage) และระยะที่ 3 การเกิดรอยต่างขาวขนาดเล็กกระจายอยู่บนรอยดำขนาดใหญ่ (confetti-link depigmentation) ผลการตรวจแสดงให้เห็นว่าการหายไปของเซลล์สร้างเม็ดสีเกิดขึ้นในระยะที่ 3 ซึ่งจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลองนี้ เป็นการจำลองสถานะการได้รับสารพิษของเซลล์จนกระทั่งเซลล์เกิดการตาย เปรียบเหมือนการหายไปของเซลล์สร้างเม็ดสีในขั้นที่ 3 ของการเกิดโรค อย่างไรก็ตามในกระบวนการทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลอง เซลล์แต่ละเซลล์จะได้รับสารพิษโดยตรง ปราศจากปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อเทียบกับภาวะจริงของการได้รับสารพิษตามธรรมชาติ (*in vivo*) ที่มีเซลล์ข้างเคียง มีผิวหนังชั้นอื่นๆ ขวางกัน รวมถึงระยะเวลาของการดูดซึมสารเข้าสู่ชั้นผิวหนัง เป็นต้น แต่ผลที่ได้้นั้นเป็นที่ยืนยันว่าในสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูมีสารที่คาดว่าจะเป็สาเหตุทำให้เกิดโรค leukomelanosis ซึ่งสามารถแยกองค์ประกอบเพื่อพิสูจน์ได้ว่าเป็นสารชนิดใด



ภาพ 27 ค่าความเข้มข้นของ AEPP ที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า  $IC_{50}$  (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

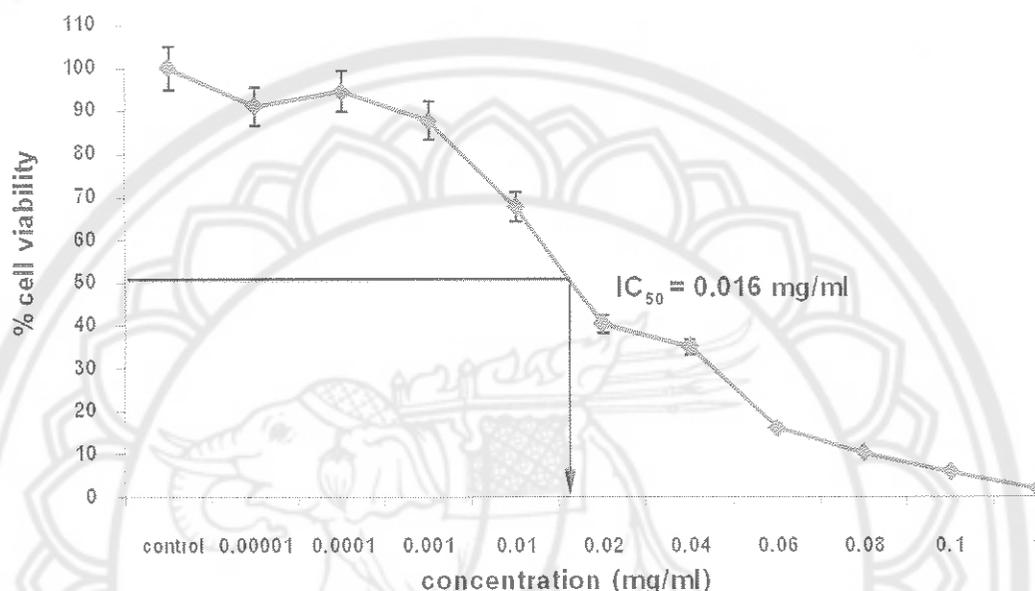
2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) โดยใช้สาร AEPM (Supernatant) และสาร AEPM (Precipitate)

ในขั้นตอนของกระบวนการแยกองค์ประกอบสารเคมี เพื่อพิสูจน์ว่าสารองค์ประกอบชนิดใดให้ผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ จะต้องมีการคัดเลือกสารในแต่ละส่วนที่แยกได้มาทำการทดสอบตามลำดับขั้นตอน โดยภายหลังจากพิสูจน์แล้วว่าสาร AEPM แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 จริง จากนั้นจึงทำการสกัดแยกสาร AEPM ด้วยเมทานอล ให้สารประกอบที่แยกออกจากกันสองส่วน ได้แก่ ส่วนของสารที่ไม่ละลายในเมทานอล คือ AEPM (precipitate) และส่วนของสารที่ละลายในเมทานอล คือ AEPM (supernatant) ซึ่งหลังจากแยกสารสองชนิดนี้ออกจากกันและนำไปทดสอบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ซึ่งจากผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่ากราฟแสดงร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร AEPM (supernatant) แสดงแนวโน้มของความมีชีวิตในระดับต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร AEPM (precipitate) ดังภาพ 28



ภาพ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร AEPM ที่ 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธี MTT กลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วย AEPM (supernatant) แสดงแนวโน้มความมีชีวิตในระดับต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร AEPM (precipitate)

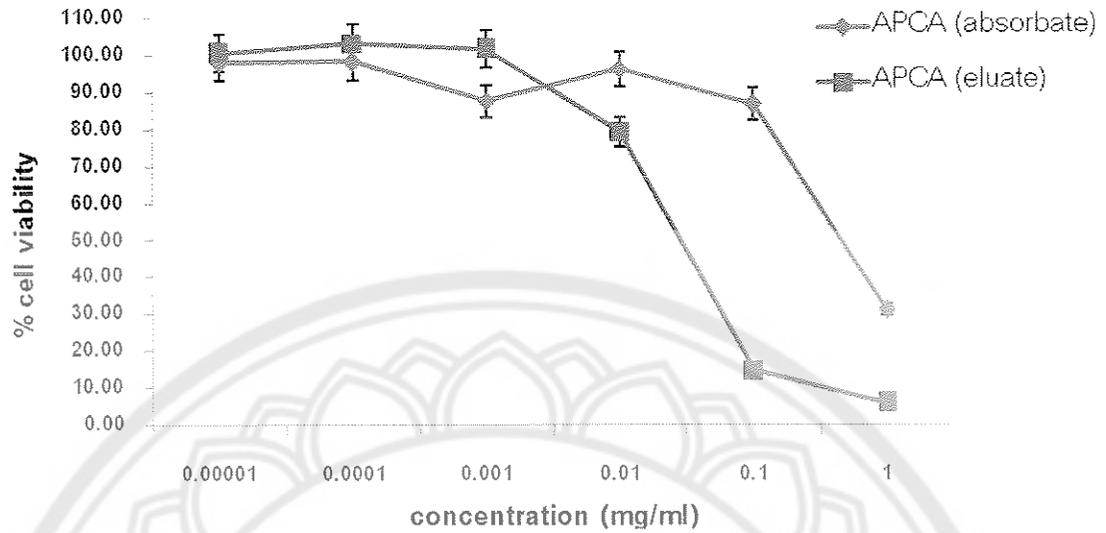
ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าสารเคมีที่สนใจถูกสกัดอยู่ในส่วน AEPM (supernatant) โดยพบว่าสารสกัดในส่วน AEPM (supernatant) แสดงร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญที่ระดับความเข้มข้น 0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพ 29



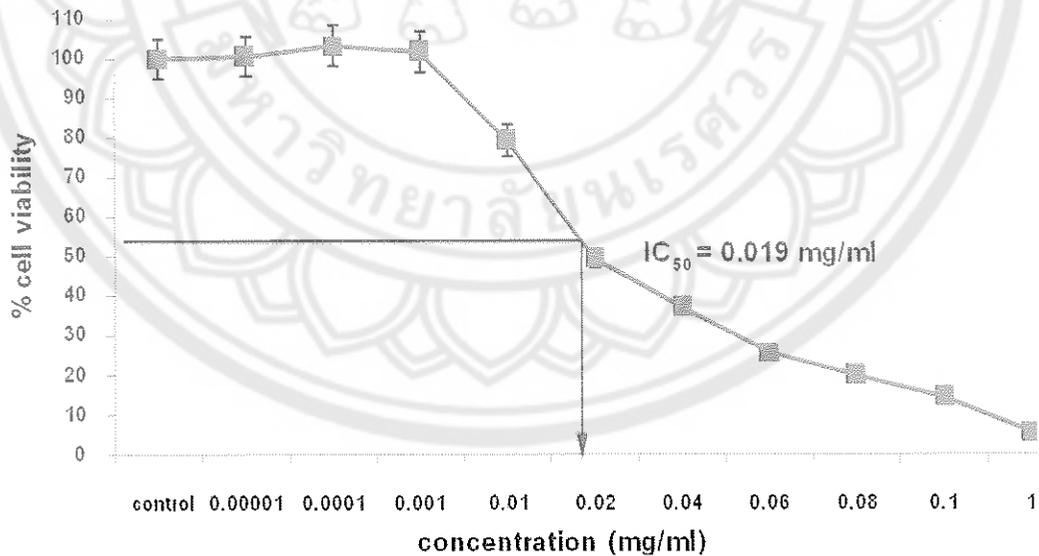
ภาพ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร AEPM ที่ 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มข้นของ AEPM ที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า  $IC_{50}$  (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) โดยใช้สาร APCA (eluate) และ สาร APCA (absorbate)

เมื่อนำสาร AEPM (supernatant) มาทำการแยกองค์ประกอบโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่มีอะลูมินา 90 นิวทรัล เป็นเฟสอยู่กับที่ (Weeks, et al., 1980) พบว่าสาร APCA (eluate) ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์แสดงแนวโน้มของความมีชีวิตในระดับที่ต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร APCA (absorbate) ที่ถูกยึดเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์ ดังภาพ 30 และเมื่อนำสารส่วน APCA (eluate) ไปทำการหาค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ พบว่าแสดงค่า  $IC_{50}$  ที่ความเข้มข้น 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังภาพ 31 ดังนั้น สาร APCA (eluate) จึงถูกเลือกใช้ในการสกัดขั้นสุดท้ายด้วยเอทิล อะซิเตต จนได้สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล



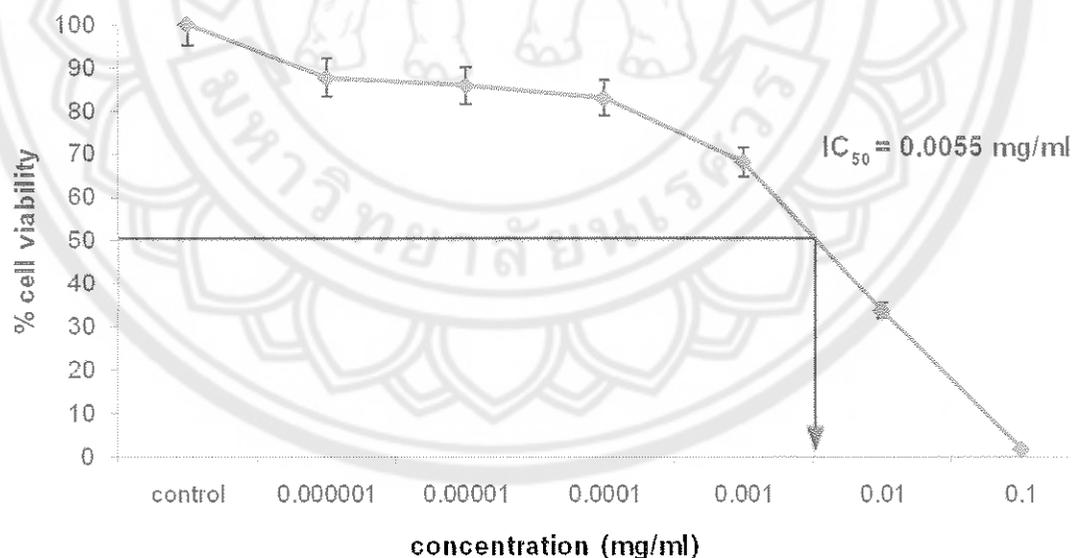
ภาพ 30 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร APCA ที่ 0.00001, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธี MTT โดยกลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วย APCA (eluate) แสดงแนวโน้มความมีชีวิตในระดับต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร APCA (absorbate)



ภาพ 31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร APCA (eluate) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT) โดยใช้สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอลที่สกัดได้จากใบพลู

จากผลการทดสอบด้านความเป็นพิษของสารซึ่งผ่านการสกัดในแต่ละชั้น จะเห็นได้ว่าเมื่อสารสกัดเริ่มมีความบริสุทธิ์มาก จะยิ่งแสดงคุณสมบัติด้านความเป็นพิษมากขึ้น พิจารณาจากค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญที่ลดลงเปรียบเทียบกับค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญของสาร AEPP ในขั้นต้น ดังภาพ 27, 29 และ 31 ตามลำดับ สำหรับในขั้นตอนสุดท้ายที่สกัดสาร APCA (eluate) ด้วยเอทิล อะซิเตต จนได้สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล พบว่าเมื่อนำสารดังกล่าวไปทำการทดสอบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 แสดงค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้น 0.0055 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญในระดับที่ต่ำกว่าสารสกัดที่ยังไม่มีความบริสุทธิ์ในส่วนอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ในหน่วยไมโครกรัมแล้วพบว่าสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล จะแสดงค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ที่ถูกยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้น 5.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังภาพ 32



ภาพ 32 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่ช่วงความเข้มข้น 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า  $IC_{50}$  (Inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.0055 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรายงานที่เคยมีมา ได้กล่าวถึงสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่สกัดได้จากใบพลู โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (Ramji, et al., 2002; Maisuthisakul, 2007) สารดังกล่าวแสดงคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียและต่อต้านอนุมูลอิสระ สำหรับรายงานด้านความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลูที่คาดว่าจะน่าจะเป็นสาเหตุของโรค leukomelanosis นั้น ในรายงานของพู่กลิ่น ตริสุโกศล ได้กล่าวถึงสารสองชนิดที่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสี คือ สารแควิเบทอล (chevibetol) และสารคาวิคอล (chavichol) โดยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารสกัดบริสุทธิ์ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่แยกได้จากสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูซึ่งแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์

จากผลของความรู้ที่ได้จากการศึกษาเรื่องความเป็นพิษของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ที่แยกจากใบพลูต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลอง นอกจากจะช่วยเป็นข้อพิสูจน์ถึงแนวคิดที่ว่าสารฟีนอลิกในใบพลูส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้นผิวหนังแล้ว ความรู้ที่ได้ยังสามารถเผยแพร่เป็นความรู้ ให้แก่ผู้ที่มีความเชื่อผิดเกี่ยวกับการใช้ใบพลูหนึ่งประคบบนผิวหนังจะทำให้ขาวขึ้นได้ ว่าการทำให้หน้าขาวด้วยวิธีดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดโรค leukomelanosis

ตาราง 5 สรุปผลการทดสอบ Bioactivity เกี่ยวกับผลด้านความเป็นพิษของเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)

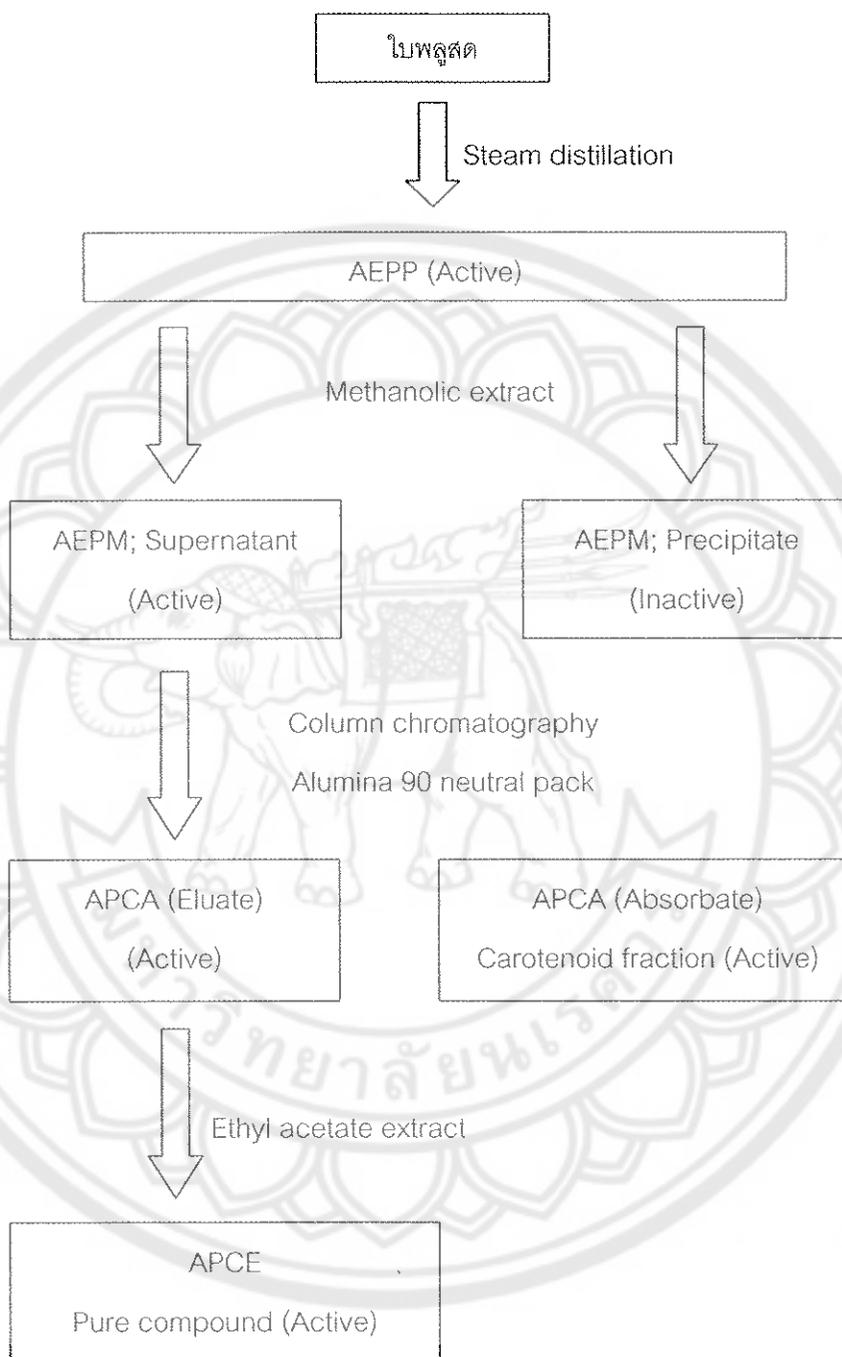
ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความมีชีวิต ทดสอบโดยวิธีเอ็มทีที (mean±SD)			
	AEPP	AEPM (Supernatant)	APCA (Eluate)	APCE
untreated control	100.00	100.00	100.00	100.00
0.00001	90.04±18.94	91.10±12.96	100.53±12.34	85.84±18.95
0.0001	86.55±16.12	94.57±11.82	103.27±9.58	82.84±22.31
0.001	80.00±12.60	87.82±11.72	101.70±4.07	86.14±19.72
0.01	63.33±14.38	67.68±13.94	79.26±6.56	33.63±15.19
0.02	-	40.37±10.57	49.64±22.05	-

ตาราง 5 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ร้อยละความมีชีวิต ทดสอบโดยวิธีเอ็มพีที (mean±SD)			
	AEPP	AEPM (Supernatant)	APCA (Eluate)	APCE
0.04	-	35.01±8.06	37.00±21.95	-
0.06	-	16.27±6.68	25.64±31.86	-
0.08	-	10.39±6.11	20.03±39.17	-
0.1	18.70±3.21	6.05±6.22	14.56±0.31	1.77±0.55
1.0	2.41±1.10	1.91±1.35	5.68±2.36	-

ตาราง 6 สรุปความเข้มข้นที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC<sub>50</sub>  
(inhibitory concentration at 50% growth) ของสารสกัดในแต่ละชั้น

สารสกัด (fraction)	IC <sub>50</sub> (ความเข้มข้น; mg/ml)
AEPP	0.034
AEPM (supernatant)	0.016
APCA (eluate)	0.019
APCAE	0.0055



ภาพ 33 สรุปผลการทดสอบด้านความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลู ตั้งแต่เริ่มกระบวนการสกัดด้วยไอน้ำจนกระทั่งแยกองค์ประกอบได้สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ซึ่งมีผลด้านต่อ BALB/3T3 โคลน A31