สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
	วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
	ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
	สมมติฐานของการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	เซลล์สร้างเม็ดสีและเม็ดสีเมลานิน (melanocyte and melanin)	4
	พลู (*Piper betle* Linn.)	6
	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Characteristic botany)	7
	สีผิวดำและรอยด่างขาว (Leukomelanosis) จากการใช้ใบพลู	9
	กระบวนการสกัดและองค์ประกอบทางเคมีของสารจากพลู (Extraction and chemical components from *Piper betle* Linn)	12
	การแยกองค์ประกอบของสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์ (Purification)	23
	การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี	26
	การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture)	28
	เซลล์ไลน์ (Cell lines)	31
	ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)	32
	การวิเคราะห์ความมีชีวิตโดยวิธีเอ็มทีที (MTT assay)	32
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	34
	รูปแบบงานวิจัย	34
	แนวทางการดำเนินการวิจัย	34
	เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	เครื่องมือกลั่นและระเหยตัวทำละลาย	36
	เครื่องมือสกัดสาร	36
	เครื่องมือพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี	36
	สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	36
	สารเคมีสำหรับงานเลี้ยงเซลล์	37
	สารเคมีสำหรับงานทดสอบความเป็นพิษ	37
	ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	38
4	**ผลการทดลองและการอภิปรายผลการทดลอง**	45
	ตอนที่ 1 การสกัดและการแยกองค์ประกอบสารสกัดจากใบพลู	45
	ตอนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู	48
	ตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)	59
5	**สรุปผลการทดลอง**	70
บรรณานุกรม		72
ภาคผนวก		79
ประวัติผู้วิจัย		95

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 สารยูจีนอลและอนุพันธ์ องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู..... 14

2 องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากลำต้นใต้ดินหรือรากของพลู..... 18

3 ผลผลิตร้อยละของสารสกัดในแต่ละขั้นของกระบวนการแยกองค์ประกอบ..... 46

4 ชนิดของระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารกลุ่มฟีโนลิก ด้วยเทคนิค HPLC 49

5 สรุปผลการทดสอบ Bioactivity เกี่ยวกับผลด้านความเป็นพิษของเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)..... 67

6 สรุปความเข้มข้นที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC_{50} (inhibitory concentration at 50% growth) ของสารสกัดในแต่ละขั้น..... 68

7 จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการ subculture ลงสู่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิดต่าง ๆ..... 91

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 พื้นที่แพร่กระจายพันธุ์ของพลู..... 1

2 ความแตกต่างด้านสีผิวของผู้คนต่างเชื้อชาติในแต่ละภูมิภาคของทวีปซึ่งสีผิวแปรผันตามจำนวน ขนาด การรวมกลุ่มและการกระจายตัวของเมลาโนโซมภายในเซลล์ karatinocyte โดยไม่เกี่ยวข้องกับจำนวนเซลล์สร้างเม็ดสี ซึ่งโดยปกติจำนวนเซลล์สร้างเม็ดสีของผู้คนแต่ละเชื้อชาติมีความคล้ายคลึงกัน..... 4

3 การทำหน้าที่ปกป้องการเข้าทำลายสารพันธุกรรม (DNA) ของเม็ดสีเมลานินจากการได้รับแสงอัลตราไวโอเลตชนิดเอและบี..... 5

4 พลู *(Piper betle* Linn.)..... 6

5 ก) อาการผิวดำและรอยด่างขาวในระยะที่ 2 mottle hyperpigmentation พบรอยดำขนาดใหญ่กระจายทั่วใบหน้าทั่วบริเวณที่มีการใช้ใบพลูนึ่งประคบ ข) Hematoxylin-eosin stain ของระยะ mottle hyperpigmentation พบเซลล์เมลา-โนฟาร์จ (melanophage) กระจายตัวอยู่ใน papillary dermis ค) Masson-Fontana stain ของระยะ mottle hyperpigmentation จะเห็นจำนวนของเม็ดสีเมลานินที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น..... 10

6 ก) อาการผิวดำและรอยด่างขาวในระยะที่ 3 confetti-like hypopigmentation พบรอยด่างขาวกระจายอยู่บนรอยดำขนาดใหญ่ ข) Hematoxylin-eosin stain ของระยะ confetti-like hypopigmentation เซลล์สร้างเม็ดสีมีการหายไป ค) Masson-Fontana stain ของระยะ confetti-like hypopigmentation เม็ดสีเมลานินมีการหายไปจากชั้นหนังกำพร้า..... 11

7 ก) mottle hyperpigmentation และ ข) confetti-like hypopigmentation ทั้งสองกลุ่ม เมื่อย้อมสีด้วยวิธี S-100 stain เพื่อตรวจการมีอยู่ของเซลล์สร้างเม็ดสีให้ผลเป็นลบและมีการหายไปของเม็ดสีเมลานินบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณที่พบการหายไปของเม็ดสีเมลานินซึ่งตรวจสอบโดยวิธี Masson-Fontana stai..... 11

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
8	โครงสร้างทางเคมีของสารอินทรีย์ที่สกัดได้จากใบพลู ก) stigmast-4-en-3,6-dione ข) aristolactam A-II และ ค) 4-allyl-resorcinol	21
9	เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 (10X) จาก American Type Culture Collection (ATCC)	31
10	กลไกลการเกิดผลึกสีม่วงของ formazan ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่ผ่านจากกระบวนการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที	33
11	ชุดสกัด Continuous-infusion steam distillation extractor	39
12	แสดงขั้นตอนการทดสอบสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยสารเอ็มทีที.	44
13	ขั้นตอนการสกัดสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอลจากใบพลู	46
14	HPLC โครมาโตแกรม แสดงการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบจำนวน 10 ชนิดใน APCA	50
15	HPLC โครมาโตแกรมของสาร APCA	50
16	HPLC โครมาโตแกรมของสารตัวอย่าง APCA + สารมาตรฐานยูจีนอล	51
17	HPLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานยูจีนอล	51
18	16 HPLC โครมาโตแกรมของสาร APCE	52
19	A โครมาโตแกรมที่ได้จากเทคนิค HPLC ของสาร APCA และ B โครมาโตแกรมที่ได้จากเทคนิค HPLC ของสารสาร APCA ซึ่งแสดงตำแหน่งของสารที่ถูกสกัดออกโดยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตต	52
20	Infrared spectrum สารตัวอย่าง APCE	53
21	^{1}H-NMR สารตัวอย่าง APCE ใน $(CD_3)_2C=O$ (acetone-d_6)	54
22	^{13}C-NMR สารตัวอย่าง APCE ใน $(CD_3)_2C=O$ (acetone-d_6) แสดงจำนวนคาร์บอนภายในโครงสร้างจำนวน 13 คาร์บอน	55
23	GC โครมาโตแกรมของสาร APCAE ซึ่งประกอบด้วยสาร 3 ชนิด ซึ่ง ณ เวลาที่ 12.34 นาที แสดงพีคของสารที่เป็นองค์หลัก คือ 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล	57
24	แมสสเปกตรัมของสาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล	57
25	แมสสเปกตรัมของสาร unknown compound ที่ RT 12.52 นาที	58

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

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.)..... 60

27 ค่าความเข้มข้นของ AEPP ที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC_{50} (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.034 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร..... 62

28 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร AEPPM ที่ 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบเบื้องต้นโดยวิธี MTT กลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วย AEPPM (supernatant) แสดงแนวโน้มความมีชีวิตในระดับต่ำกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยสาร AEPPM (precipitate).... 63

29 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร AEPPM ที่ 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเข้มข้นของ AEPPM ที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC_{50} (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.016 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร..... 64

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)..... 65

31 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการรอดชีวิตกับความเข้มข้นของสาร APCA (eluate) ที่ช่วงความเข้มข้น 0.000001 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญหรือค่า IC_{50} (inhibitory concentration at 50% growth) เท่ากับ 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร..... 65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ **หน้า**

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..... 66

33 สรุปผลการทดสอบด้านความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลู ตั้งแต่เริ่มกระบวนการสกัดด้วยไอน้ำจนกระทั่งแยกองค์ประกอบได้สาร 4-อัลลิล-ไพโรแคทีคอล ซึ่งมีผลด้านต่อ BALB/3T3 โคลน A31..... 69

34 ขั้นตอนการ subculture เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31..... 83

35 ขั้นตอนการ thawing Frozen Cells..... 88

36 ขั้นตอนการ thawing Frozen Cells..... 90

37 ขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์โดยการแช่แข็ง..... 94