รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดแยกและหาโครงสร้าง ขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของมะเม่าหลวง (Antidesma thwaitesianum Müll.Arg.)

โดย ดร. พิชญา ตระการรุ่งโรจน์

มิถุนายน 2547

สัญญาเลขที่ MRG4580021

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การสกัดแยกและหาโครงสร้าง ขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของมะเม่าหลวง (Antidesma thwaitesianum Müll.Arg.)

ดร. พิชญา ตระการรุ่งโรจน์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในฐานะที่เป็นผู้ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยเรื่องการสกัดแยกและหาโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของมะเม่าหลวง (*Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.) นี้ และขอขอบคุณ รศ. ดร. อมร เพชรสม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในฐานะนักวิจัยที่ปรึกษาตลอดโครงการวิจัยนี้

อย่างไรก็ดีงานวิจัยชิ้นนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้ หากไม่ได้รับการสนับสนุนในเรื่องสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่จำเป็นต่างๆ ที่ได้ใช้ในการทดลอง จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นอกจากนี้ ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้ความสะดวก ให้คำแนะนำ และให้ข้อมูลเกี่ยวกับพืชชนิดนี้ ซึ่งได้แก่ อาจารย์วินัย แสงแก้ว แห่งสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร, เจ้าหน้าที่ของกลุ่มพฤกษศาสตร์ป่าไม้ ฝ่ายวนวัฒนวิจัยฯ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, เจ้าหน้าที่ทุกท่านของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาสอยดาว, คุณมณเฑียร สินธุวงษ์ คุณประทีป มุ่งนากลาง คุณสมชัย ชวนชื่น คุณนิพนธ์ วารี คุณชมภา พลศรี คุณชาญชัย ภูมีศรี คุณวิรัช เดชอุทัย คุณสิทธิศักดิ์ นาคเขียว และท่านอื่นๆที่มิได้เอ่ยนามมา ณ ที่นี้

ท้ายที่สุดนี้ ต้องขอขอบคุณเพื่อนร่วมชะตาชีวิตของข้าพเจ้า คุณปราโมทย์ ตระการรุ่งโรจน์ เป็นพิเศษ ที่เป็นผู้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จของงานชิ้นนี้ เป็นผู้ซึ่งจุดประกายแนะแนวคิด และคอยเป็นกำลังใจให้ในยามประสบกับปัญหาต่างๆ อย่างสม่ำเสมอตลอดมา

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4580021

ชื่อโครงการ: การสกัดแยกและหาโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของมะเม่าหลวง (*Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.)

ชื่อนักวิจัย: ดร. พิชญา ตระการรุ่งโรจน์

E-mail Address: pnakkiew@ccs.sut.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2545 - 30 มิถุนายน 2547

ด้วยเห็นความสำคัญของพืชสมุนไพรพื้นบ้านของไทย ที่อาจมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นตัวยา สำหรับโรคร้ายแรงต่างๆ ได้ในอนาคต โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารประกอบที่สามารถแยกได้ จากส่วนสกัดหยาบของมะเม่าหลวง (*Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.) โดยจำกัดขอบเขตการศึกษา ไปที่ส่วนเปลือก ใบ ผล เมล็ด และราก ซึ่งได้จัดหามาเพื่อใช้ในการเตรียมส่วนสกัดหยาบ โดยสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ทั้งนี้โดยอาศัยหลักการของ Bioassay-Guided Approach เฉพาะส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเท่านั้น ที่จะถูกนำไปแยก โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟี ซึ่งสารประกอบที่แยกได้ จะนำมาศึกษา หาโครงสร้างหลักทางเคมี โดยใช้เทคนิค NMR แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งหนึ่ง เพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของพืช

ผลการจากศึกษาพบว่า รากและผลของมะเม่านั้น จะมีสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยส่วนรากนั้น ทั้งส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ได้แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50} เป็น 30.49 และ 14.59 μg/mL ตามลำดับ หลังจากแยกส่วนสกัดหยาบทั้งสองนี้แล้ว ได้พบสารประกอบ Stigmasterol และสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ อีกอย่างน้อย 1 ชนิด ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้ระบุว่า สารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ที่พบนี้ เป็นสารออกฤทธิ์ในส่วนราก สำหรับการศึกษาส่วนผลนั้น สามารถแยกได้สารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ซึ่งเป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลายว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับผลการศึกษาส่วนอื่นๆ ของมะเม่า พบว่าถึงแม้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนเปลือกจะแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) บ้าง แต่สารประกอบที่สามารถแยกมาได้นั้นมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการนำส่วนเปลือกนี้มาใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ ส่วนการศึกษาส่วนใบและเมล็ดนั้น ไม่พบว่าส่วนสกัดหยาบต่างๆ แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญต่อโครงการนี้ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องนำมาแยกเพื่อหาสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

คำหลัก: มะเม่าหลวง ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง แอนโทรไซยานิน ฟลาโวนอยด์ อนุมูลอิสระ

Abstract

Project Code: MRG4580021

Project Title: Isolation and Characterization of Chemical Constituents in *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.

Investigator: Dr. Pichaya Trakanrungroj

E-mail Address: pnakkiew@ccs.sut.ac.th

Project Period: July 1, 2002 - June 30, 2004

In the search for the new promising lead compounds from natural resources to develop the significant therapeutic agents for deadly diseases, A*ntidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (mamao) was proposed to be the target of this study. To investigate the biological active compounds, its barks, leaves, fruits, seeds and roots were collected and prepared separately according to established procedures to yield the crude extracts. By Bioassay-Guided Approach, only the crude extracts that exhibited significant biological activities were selected for isolation by chromatography techniques and characterization by NMR to determine their chemical constituents. Finally, the biological activity testings were performed to identify the active compounds.

The results of this study indicated that the root and fruit of this plant could potentially be the sources of biological active compounds. For the root, both the hexane and ethyl acetate crude extracts showed activity against lung cancer (NCI-H187) with IC_{50} 30.49 and 14.59 μg/mL, respectively. After sequences of chromatographic separation and NMR analysis, Stigmasterol and at least one flavonoid compound were isolated and identified. Recent anticancer testings confirmed that these flavonoids were responsible for the activity. As for the fruit, an anthocyanin compound, which has been widely known to have antioxidant activity was isolated and identified.

For other parts of this plant, the hexane extract of the bark showed somewhat activity against lung cancer (NCI-H187). Although, several attempts were made to isolate the crude extract, only a small quantity of compounds were obtained and that may limit its future use as a source of biological active compounds. For the leave and the seed, their crude extracts did not indicate any significant biological activity results. Therefore, the isolation and identification of biological active compounds steps were disregarded.

Keywords: Antidesma, anticancer, anthocyanin, flavonoid, antioxidant

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อ

Abstract

บทนำ 1

ขอบเขตการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

ระเบียบวิธีวิจัย 4

วิธีการทดลอง 6

1. การจัดเตรียมสถานที่ และเครื่องมือเครื่องใช้ในห้องปฏิบัติการ 6
2. ลักษณะการจัดเก็บ จัดส่งและขนย้าย วัตถุดิบ สารเคมี และสารที่สกัดได้ 6
3. การจัดเตรียมสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 7
4. ขั้นตอนในการทดลอง 7

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช 12

การศึกษาพันธุ์มะเม่า 12

ชนิดของมะเม่าที่นำมาใช้ในการทดลอง 16

มะเม่าที่พบในจังหวัดจันทบุรี 16

มะเม่าที่พบในจังหวัดสกลนคร 19

ความแตกต่างของมะเม่าแต่ละชนิด 20

ข้อจำกัดในการค้นหาพันธุ์ 21

ผลการทดลอง 22

1. การศึกษาส่วนเปลือก 22
2. การศึกษาส่วนใบ 30
3. การศึกษาส่วนผล 32
4. การศึกษาส่วนเมล็ด 34
5. การศึกษาส่วนราก 35

บทวิจารณ์ 39

Output จากโครงการที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว. 44

เอกสารอ้างอิง 45

ภาคผนวก 48

Menuscript #1: Isolation and Characterization of Chemical Constituents in *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. 48

Menuscript #2: Anthocyanin from the Fruit of *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. 52

Menuscript #3: Isolation and Characterization of Chemical Constituents in the Root of *Antidesma bunius* 56

บทความสำหรับการเผยแพร่ 60

สารบัญตาราง

ตาราง T-1300604	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่พบมะเม่าทั้ง 18 ชนิด ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย	15
ตาราง T-2300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ ของส่วนเปลือก	23
ตาราง T-3300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ Candida alibicans ของส่วนเปลือก	23
ตาราง T-4300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1 strain) ของส่วนเปลือก	23
ตาราง T-5300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ COX-2 ของส่วนเปลือก	24
ตาราง T-6300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ ของส่วนใบ	31
ตาราง T-7300604	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ชนิดต่างๆ ของส่วนราก	36

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิ S-1300604	แสดงวิธีการสกัดแบบ A	8
แผนภูมิ S-2300604	แสดงวิธีการสกัดแบบ B	9

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ที่อุดมไปด้วยพันธุ์พืชนานาชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพร ซึ่งมีอยู่หลายร้อยชนิด ที่เติบโตขึ้น อยู่ในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ พืชเหล่านี้ ได้ถูกนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรค มาตั้งแต่สมัยโบราณ โดยใช้ภูมิปัญญาพื้นบ้านของท้องถิ่นนั้นๆ

อย่างไรก็ดี แม้ว่าจะได้มีการศึกษาวิจัยพืชสมุนไพรในประเทศไทย มาเป็นระยะเวลานานพอสมควรแล้ว แต่จำนวนตัวยาที่ได้มีการพัฒนาออกมาให้มีมาตรฐาน เทียบได้กับยาแผนปัจจุบันนั้น ยังมีอยู่น้อยมาก ไม่ทันกับความจำเป็นเร่งด่วนในการรักษาโรคร้ายแรง เช่น มะเร็ง และ โรคหัวใจ ซึ่งถือเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนไทยในยุคปัจจุบัน นับเป็นอันดับหนึ่งและสองตามลำดับ (สำนักงานสถิติกระทรวงสาธารณสุข, 2544)

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ จึงมีเป้าหมายในการศึกษาวิจัย เพื่อหาสารออกฤทธิ์ จากพืชสมุนไพรไทย ที่อาจพัฒนาเป็นตัวยา สำหรับโรคร้ายแรงดังกล่าวได้ในอนาคต โดยมุ่งเป้าไปที่พืชสมุนไพรท้องถิ่นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “มะเม่า” ซึ่งพบอยู่ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

มะเม่าเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล Antidesma (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41) มีบทความบันทึกไว้ว่า ในประเทศไทยมีการค้นพบพืชสกุลเดียวกันนี้ อยู่ประมาณ 18 ชนิด กระจัดกระจายอยู่ในหลายๆภูมิภาคของประเทศไทย (Hoffmann, 2000:139-156) ลักษณะโดยทั่วไปของมะเม่าคือ เป็นไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม โดยอาจมีรูปร่างของใบ สี รูปทรงของช่อดอกและผล แตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของมะเม่า

ในการบำบัดรักษาโรคแบบพื้นบ้านดั้งเดิมนั้น ส่วนต่างๆของมะเม่า ทั้ง ราก ลำต้น ใบ และผล ได้ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคและบำรุงร่างกาย เช่น ช่วยในการขับปัสสาวะ แก้มดลูกอักเสบ แก้ตกขาว รวมทั้งช่วยในการขับโลหิต เป็นต้น ใบสดของมะเม่า ยังสามารถนำมาใช้ต้มรับประทาน เพื่อแก้โลหิตจาง และบำรุงการไหลเวียนของเลือด (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539:38-39) หรือใช้ในการรักษาแผลฝี นอกจากนี้การบริโภคผลมะเม่าสุก ในปริมาณที่พอเหมาะจะมีสรรพคุณเป็นยาระบาย (อร่าม คุ้มกลาง และวินัย แสงแก้ว, 2543:14)

การใช้ส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรในการรักษาโรค ถึงแม้จะเป็นที่นิยมมากในประเทศไทย แต่ข้อเสียคือ ปริมาณของสารออกฤทธิ์จะไม่คงที่ และเสื่อมสภาพได้ง่ายหากเก็บไม่ถูกวิธี นอก จากนั้น ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอาจจะมีสรรพคุณน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เนื่องจากสารผสมมีฤทธิ์ต่อต้านกันเอง

ดังนี้จึงเห็นความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่จะได้มีการศึกษาค้นคว้ากันอย่างจริงจังในส่วนต่างๆ ดังกล่าวของมะเม่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในส่วนของผลสุกซึ่งมีสีม่วงอมดำนั้น ได้มีการบันทึกสรรพคุณเอาไว้ว่า สามารถบำรุงสายตาได้ดี (อร่าม คุ้มกลาง และวินัย แสงแก้ว, 2543:14) และยังอุดมไปด้วยธาตุอาหารที่สำคัญแก่ร่างกาย โดยเฉพาะวิตามินบีหนึ่งและกรด

อะมิโนที่จำเป็นแก่ร่างกายหลายชนิด (กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, 2539:3) เชื่อกันว่าสารสีม่วงแดงที่อยู่ในผลสุกนั้นน่าจะเป็นสารประกอบแอนโทรไซยานิน (anthocyanins) เคยมีรายงานกล่าวไว้ว่าในผลไม้ที่มีสารประกอบชนิดนี้อยู่ โดยทั่วไปจะมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ (Gabrielska et. al., 1999:319-324; Wang et. al., 2001:969-974) เช่นเดียวกับผลไม้ของประเทศนิวซีแลนด์ ที่ชื่อ Blackcurrant (Paganga et. al., 1999:53-62) ซึ่งมีลักษณะและสีคล้ายกับผลของมะเม่าสุกมาก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะทดสอบว่า สารแอนโทร-ไซยานิน ที่ได้จากผลมะเม่านั้น จะมีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ได้มากน้อยเพียงใด รวมถึงโอกาสที่จะค้นพบสารสำคัญอื่นๆ ในส่วนต่างๆ ของมะเม่าเพื่อที่จะได้นำไปศึกษาพัฒนาให้เป็นยารักษาโรคร้ายแรงอื่นๆ ต่อไป

พืชในสกุล Antidesma หลายชนิดได้มีผู้สนใจศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีมาบ้างแล้ว ซึ่งบางชนิดได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ใน *Antidesma pentandrum* Merr. มีการค้นพบสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีน เบต้าแลกโทน (triterpene β-lactone) ที่มีความสามารถในการลดคลอเลสเตอรอลในหนูทดลองได้เป็นอย่างดี (Kikuchi et. al., 1983:603-606) และยังพบสารประกอบแอนติเดสมิน เอ (Antidesmin A) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทแทนนิน สารประกอบคาร์พินูซิน (Carpinusin) และ สารประกอบเจอรานิอิน (Geraniin) จากการสกัดใบแห้งของ *Antidesma pentandrum* var. *barbatum* Merr. (Yoshida et. al., 1992:338-342)

ทั้งนี้ยังได้มีการค้นพบสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอีก 2 ชนิด ใน *Antidesma menasu* ซึ่งได้แสดงฤทธิ์ anti-inflammatory และมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งปัสสาวะ (diuretic activity) ในส่วนของลำต้น ได้แก่ สารประกอบ 3α-hydroxy-3-ketoisomultiflorene และ 3β-hydroxy-16-ketoisomultiflorene (Rizvi et. al., 1980:2409-2410) นอกจากนี้ ใน *Antidesma membranaceum* Müll.Arg ที่พบในป่าเขตร้อนในแอฟริกา ยังพบสารประกอบประเภทเบนโซไพราโนน (benzopyranones) และ อนุพันธุ์ของกรดเฟอร์รูลิก จากการสกัดส่วน ราก เปลือก และ ใบ ด้วยเฮกเซน (Buske et. al., 1997:1385-1388) นอกจากนั้น Bringmann et. al. ยังรายงานการพบสารอัลคาลอยด์ชนิดใหม่คือ สารแอนติเดสโมน (Antidesmone) และในผลงานวิจัยซึ่งตีพิมพ์โดย Buske et. al. เมื่อปี 2001 ยังระบุว่าได้พบสารประกอบประเภทลิกแนนกลูโคไซด์ (lignan glucosides) อีกอย่างหนึ่งด้วย

สำหรับมะเม่าที่ค้นพบในประเทศไทยทั้ง 18 ชนิดนั้น มีเพียงชนิดเดียว ที่มีรายงานวิจัยกล่าวถึง การสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งได้แก่ *Antidesma montana* (มะเม่าขน) ที่มีอยู่มากในเขตจังหวัดภาคใต้ และประเทศมาเลเซีย พบว่ามีสารประกอบ อัลคาลอยด์ 2 ชนิด จากการสกัดของส่วนใบและปลายกิ่งด้วยเมทานอล อัลคาลอยด์ทั้งสองคือ Myrianthine B และ Aralionine B (Arbain et al., 1993) โดยมีโครงสร้างเป็นไซโคลเปปไทด์อัลคาลอยด์ (cyclopeptide alkaloid)

เพราะฉะนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาส่วนต่างๆ เช่น เปลือก ใบ ผลสุก เมล็ด และราก เพื่อสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารประกอบ ที่สามารถแยกได้

จากส่วนสกัดหยาบเหล่านั้น โดยการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ โดยใช้ส่วนต่างๆของมะเม่าหลวง *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41) เป็นหลัก ซึ่งในปัจจุบันมีการให้ชื่อพฤกษศาสตร์ ที่แตกต่างออกไปคือ *Antidesma Puncticulatum* Miq. แทนชื่อเดิม (Hoffmann, 2000:139-156)

ขอบเขตการวิจัย

1. มีจุดมุ่งหมายที่จะจำกัดขอบเขตการศึกษาในส่วนต่างๆ ของมะเม่าหลวง (*Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.) ซึ่งได้แก่ ส่วนเปลือก ใบ ผล เมล็ด และราก เท่านั้น ยกเว้นแต่จะได้ระบุไว้เป็นกรณีๆไป

2. การศึกษาวิจัยนี้จะยึดหลักของ Bioassay-Guided Approach กล่าวคือ จะพิจารณาเฉพาะส่วนสกัดหยาบของพืช ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นเท่านั้น ซึ่งจะเน้นไปที่การออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งเป็นหลัก โดยจะเลือกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว มาทำการศึกษาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อๆไป

3. การศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้ จะเน้นโครงสร้างหลักทางเคมี ในกลุ่มของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีทาง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

4. เนื่องจากแต่ละส่วนของพืช ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ มีองค์ประกอบทางเคมีอยู่เป็นจำนวนมาก การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อระบุสารออกฤทธิ์ จึงสามารถกระทำได้ กับสารประกอบ ที่สามารถแยกออกมาได้เท่านั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยที่ได้จะเป็นการค้นพบข้อมูลใหม่ ที่จะเป็นรากฐานในการศึกษาวิจัยต่อไปในเบื้องลึก ทั้งในแง่ของการศึกษาโครงสร้าง รวมทั้งรูปทรงของโมเลกุล หรือการศึกษาในแง่ของโครงสร้าง ที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยอาจมีการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี เพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางยาให้สูงขึ้น หรือปรับปรุงโครงสร้างให้เหมาะสมต่อการเป็นยารักษาโรค และความเป็นไปได้ต่อการดำเนินการ ยื่นขอจดสิทธิบัตรต่อไปในอนาคต อันจะส่งผลต่อความเจริญก้าวหน้าทางการศึกษา ค้นคว้า และวิจัยพืชสมุนไพรไทย ให้ก้าวไปอีกระดับหนึ่ง และยังเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ให้กับวิทยาการสาขาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมไปถึงศักยภาพที่จะมีการพัฒนาเพื่อการผลิตยารักษาโรคนี้ในเชิงพาณิชย์ ซึ่งจะเป็นวิธีหนึ่งที่จะอนุรักษ์พันธุ์ไม้สมุนไพรไทย อันเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าให้อยู่คู่กับประเทศไทยตลอดไป

ระเบียบวิธีวิจัย

ในการศึกษาวิจัยส่วนต่างๆ ของมะเม่าหลวง (*Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.) โดยการสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารประกอบ ที่สามารถแยกได้จากส่วนสกัดหยาบ ด้วยการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง และ ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ นั้น จะประกอบไปด้วยขั้นตอนในการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช

มะเม่าที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ จะต้องมีลักษณะตรงกับพันธุ์ที่ต้องการ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการเทียบกับ specimen ของพืช ณ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม และโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลในบทความเรื่อง Checklist of the Genus Antidesma (Euphorbiaceae) in Thailand ของ Petra Hoffmann (Hoffmann, 2000:139-156) ในรายงานฉบับดังกล่าว ยังได้มีการกำหนดชื่อขึ้นมาใหม่ โดยให้ชื่อพฤกษศาสตร์ของมะเม่าหลวงว่า *Antidesma Puncticulatum* Miq. ซึ่งเทียบได้กับชื่อเดิมคือ *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41)

เมื่อสามารถสืบหาพันธุ์ที่ถูกต้อง และค้นพบแหล่งที่มีพืชชนิดนี้ได้แล้ว จึงจะดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

2. การจัดเก็บพืชตัวอย่าง

กำหนดให้มีการจัดเก็บส่วนต่างๆ ของมะเม่า ที่จะนำมาใช้ในการทดลอง ได้แก่ เปลือก ใบ ผล เมล็ด และราก ให้มาจากแหล่งเดียวกัน โดยอันดับในการจัดเก็บส่วนต่างๆ นั้น จะได้พิจารณาถึงฤดูกาลในการออกผล และความยากง่าย ในการจัดเก็บส่วนนั้นๆ ของพืช

สำหรับโครงการนี้ จะจัดเก็บส่วนเปลือกและใบ มาทำการศึกษาวิจัยก่อน จากนั้นจึงจะดำเนินการจัดหาส่วนผลและเมล็ด ซึ่งจะตรงกับฤดูกาลออกผลพอดี สำหรับส่วนรากนั้น คาดว่าจะจัดเก็บเป็นส่วนสุดท้าย เนื่องจากเป็นส่วนที่จัดหาได้ยากที่สุด

3. การจัดเตรียมส่วนต่าง ๆของพืช

ส่วนเปลือก ใบ และราก จะจัดเตรียมโดยการนำแต่ละส่วนของพืชไปอบแห้งก่อน แล้วจึงนำไปบดให้เป็นผงละเอียดตามขนาดที่ต้องการ สำหรับส่วนผลและเมล็ดนั้นจะมีการเตรียมโดยการนำผลสุกมาแยกเมล็ดออก ทั้งนี้ผลสุกที่ปราศจากเมล็ดแล้วจะนำไปสกัดทันที ส่วนเมล็ดที่แยกออกมาแล้ว จะนำมาทำความสะอาด จากนั้นจะนำไปอบแห้งแล้วจึงบดให้เป็นผงละเอียด

4. การเตรียมส่วนสกัดหยาบ

สามารถเตรียมได้โดยการนำส่วนต่างๆของมะเม่า ดังที่ได้จัดเตรียมไว้ในข้อ 3. มาสกัดด้วยเมทานอล เพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอล จากนั้น จึงสกัดส่วนสกัดหยาบเมทานอล ที่ได้มานี้ ด้วยเฮกเซน และเอทิลอะซีเตท เพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ตามลำดับ

5. การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

ส่วนสกัดหยาบที่ได้มาจากการสกัดแต่ละส่วนของพืช จะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง หรือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

ทั้งนี้โดยอาศัยหลักการของ Bioassay-Guided Approach ส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพเท่านั้น ที่จะถูกนำไปศึกษาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

6. การแยกส่วนสกัดหยาบ

ส่วนสกัดหยาบจากแต่ละส่วนของพืชที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพตามข้อ 5. จะถูกนำมาแยก เพื่อหาสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นๆ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟีต่างๆ เช่น คอลัมน์โครมาโตรกราฟี และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น

7. การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

สารประกอบที่แยกได้จากส่วนสกัดหยาบในข้อ 6. จะถูกนำมาศึกษาหาโครงสร้างหลักทางเคมี โดยใช้วิธีทางสเปกโตรสโกปี โดยจะเน้นไปที่การใช้ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

8. การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

สารประกอบที่แยกออกมาได้จากส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง เพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชชนิดนี้

วิธีการทดลอง

1. การจัดเตรียมสถานที่ และเครื่องมือเครื่องใช้ในห้องปฏิบัติการ

1.1 สภาพโดยทั่วไปของห้องปฏิบัติการ

สถานที่ซึ่งใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ห้องปฏิบัติการเคมี อาคารเครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ลักษณะของห้องปฏิบัติการ จะเป็นระบบเปิด ไม่มีระบบกรองอากาศ หรือระบบปรับอากาศ โดยที่ด้านหนึ่งเป็นประตูเข้าออก และอีกด้านหนึ่งเป็นหน้าต่าง ซึ่งลมและฝนจากภายนอกสามารถพัดเข้ามาได้ มีการระบาย อากาศโดยใช้พัดลมดูดอากาศ จำนวน 2 ตัว บริเวณหน้าห้องและหลังห้อง แสงแดดสามารถ ส่องถึงได้ในช่วงบ่าย ภายในห้องจะมีพัดลมติดเพดาน โดยทั่วไป อุณหภูมิภายในห้องปฏิบัติการ จะอยู่ระหว่าง 30-35°C ยกเว้นในฤดูร้อน คือเดือน (เมษายน - สิงหาคม) อุณหภูมิอาจสูงขึ้นได้ถึงประมาณ 37 $^{\circ}$C และในฤดูหนาว (ธันวาคม - มกราคม) อุณหภูมิจะ ต่ำกว่า 30 $^{\circ}$C ความดันบรรยากาศปกติจะอยู่ประมาณ 750 mmHg

1.2 การจัดเตรียมอุปกรณ์ภายในห้องปฏิบัติการ

ในห้องปฏิบัติการ จะประกอบไปด้วยอุปกรณ์พื้นฐานคือ ตู้ควัน อ่างและก๊อกน้ำประปา ตู้เย็น 2 ประตู สำหรับอุปกรณ์อื่นๆ ที่จะต้องจัดหาเข้าไปเพิ่มเติม ได้แก่ โครงเหล็กสำหรับตั้งอุปกรณ์ ชุดสกัด Soxhlet Extractor คอลัมน์แก้วสำหรับใช้ในการแยก และเครื่อง Rotary Evaporator สำหรับอุปกรณ์อื่นๆ จะอยู่นอกห้องปฏิบัติการ โดยมีทั้งอยู่บริเวณอาคารเดียวกันแต่อยู่คนละชั้น ได้แก่ เครื่อง HPLC เครื่อง Lyophilizer และ เครื่องทำน้ำแข็ง สำหรับปั๊มส่วนอุปกรณ์ที่ตั้งอยู่ห่างจากอาคารห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่อง NMR เครื่องผลิตน้ำกลั่น และเครื่องบดพืช

2. ลักษณะการจัดเก็บ จัดส่งและขนย้าย วัตถุดิบ สารเคมี และสารที่สกัดได้

พืชตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ จะกระทำโดยทางรถยนต์ ทั้งโดยรถยนต์นั่งส่วนบุคคลและรถโดยสารประจำทาง ระยะเวลาปกติในการขนส่งพืชตัวอย่าง จากแหล่งที่จัดเก็บ จนถึงห้องปฏิบัติการ โดยเฉลี่ยจะใช้เวลาประมาณ 6 ถึง 8 ชั่วโมง โดยอุณหภูมิที่เก็บพืชตัวอย่างในระหว่างการขนส่ง น่าจะสูงกว่า 35°C

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้สั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่ายในกรุงเทพฯ ซึ่งจะใช้เวลาในการส่งสินค้าโดยทั่วไปประมาณ 7-14 วัน ยกเว้นสารเคมีที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จะใช้เวลาในการจัดซื้อจัดหาประมาณ 30-45 วัน การขนส่งจากกรุงเทพฯ โดยทั่วไปจะจัดส่งโดยทางรถยนต์ โดยที่อุณหภูมิระหว่างการขนส่ง จะขึ้นอยู่กับสภาวะอากาศภายนอก

สารทีสกัดได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4°C การเคลื่อนย้ายสารที่สกัดได้เพื่อทดสอบ

ฤทธิ์ทางชีวภาพ ผู้วิจัยได้นำมาส่ง ณ สถานที่ ที่ทำการทดสอบด้วยตนเอง ซึ่งจะเดินทางโดยรถยนต์ปรับอากาศ และใช้เวลาในการเดินทางประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยมิได้มีการควบคุมอุณหภูมิของสารที่สกัดได้

3. การจัดเตรียมสารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1 สารเคมี

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้แก่ เมทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซีเตท (Commercial Grade) ซึ่งจะนำไปกลั่นก่อนใช้ สำหรับสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลองจะใช้ผลิตภัณฑ์จากบริษัท Carlo Erba (Italy) ยกเว้น ซิลิกา เจล 60 ขนาด 0.063-0.200 μM, ซิลิกา เจล 60 ขนาด 0.040-0.060 μM (230-400 mesh) และซิลิกา เจล 60 GF_{254} (สำหรับ Thin layer chromatography) ของบริษัท Merck (Germany), Amberlite XAD-7 ของบริษัท Sigma (U.S.A.), Sephadex LH-20 จากบริษัท Amersham Bioscience (U.S.A.), โพลีเอทิลีนไกลคอล 4000 (PEG 4,000), Diphenylboryloxyethylamine (NP) และ Celite ของบริษัท Fluka (Switzerland), ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับ NMR จะใช้ Chloroform-d ($CDCl_3$), Methanol-d4 (CH_3OD) และ Trifluoroacetic acid จากบริษัท Aldrich (U.S.A.) และ Dimethylsulfoxide-d6 (DMSO-d6) จากบริษัท Fluka (Switzerland)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์หลักที่ใช้ในการเตรียมสารสกัด การแยกสาร และการหาโครงสร้างของสารประกอบ มีดังต่อไปนี้

3.2.1 อุปกรณ์ Soxhlet Extractor ทำจาก Borosilicate Glass

3.2.2 เครื่อง Rotary Evaporator ของบริษัท Büchi (Switzerland) รุ่น R114 และ R200

3.2.3 เครื่อง Lyophilizer ของบริษัท Heto-Holten รุ่น Hetodrywinner DW3

3.2.4 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท Waters Corporation (U.S.A.) ประกอบไปด้วยปั๊มรุ่น Waters 600 และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ UV detector รุ่น Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

3.2.5 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ของบริษัท Varian (U.S.A.) รุ่น Unity ความถี่ 300 MHz สำหรับ Proton และ 75 MHz สำหรับ Carbon-13

4. ขั้นตอนในการทดลอง

4.1 การจัดเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

หลังจากที่ได้ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชที่จัดเก็บมาได้แล้วนั้น เปลือก ใบ เมล็ด และ ราก ได้นำมาอบแห้งในอุณหภูมิตามที่กำหนด จากนั้นจึงนำไปบด โดยใช้เครื่องบดให้เป็น

ผงละเอียดขนาด 0.5-1 μM

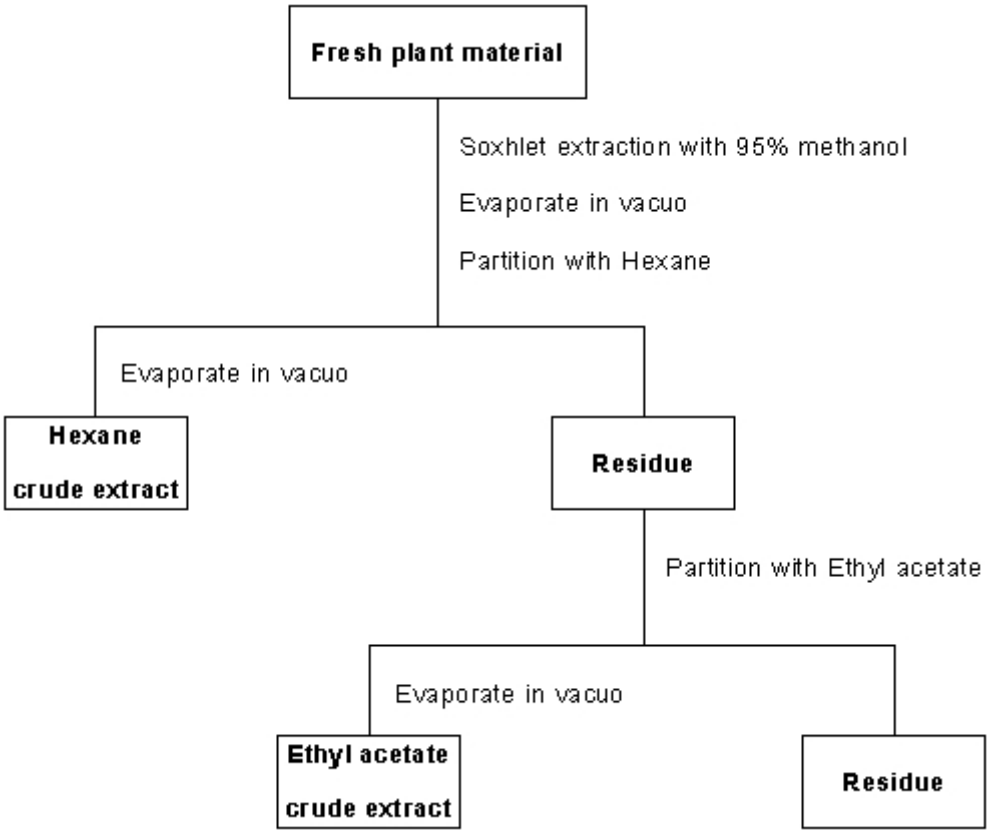
สำหรับส่วนของผลสุก ได้นำมาแยกเมล็ดออก แล้วนำไปสกัดทันที ส่วนเมล็ดที่แยกออกมาแล้วนั้น ได้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วอบแห้ง จากนั้นจึงนำไปบดให้เป็นผงละเอียด

4.2 การสกัด

4.2.1 การสกัดส่วนเปลือก ใบ เมล็ด และ ราก

เปลือก ใบ ราก และ เมล็ด ของมะเม่าที่บดเป็นผงละเอียด ได้นำมาสกัดด้วยเมทานอล 95% โดยใช้อุปกรณ์ Soxhlet Extractor เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนของพืชแห้ง ต่อตัวทำละลายจะเป็น 1:10 จากนั้นได้ระเหยตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator โดยส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่ได้ จะถูกสกัดต่อโดยใช้วิธี partition กับเฮกเซน ซึ่งจะทำให้สารที่ละลายในเฮกเซนถูกแยกออกมา ซึ่งเมื่อนำไประเหยเฮกเซนออกแล้ว จะได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ส่วนกากที่เหลืออยู่นั้น จะนำไปสกัดอีกครั้งด้วยเอทิลอะซีเตทโดยใช้วิธีเดียวกันเพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท (ดูแผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัด แบบ A)

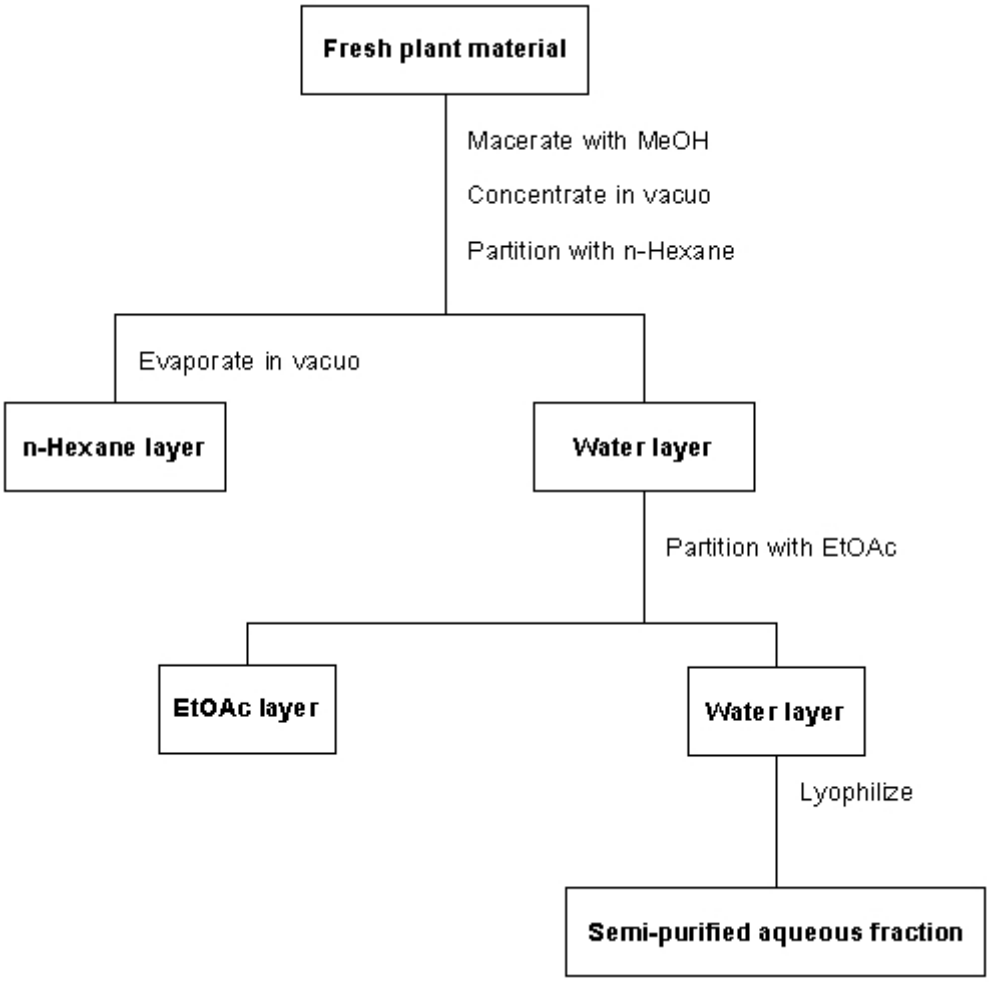
แผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัด แบบ A



4.2.2 การสกัดส่วนผลสุก

ผลสุกที่แยกเมล็ดออกแล้ว จะถูกสกัดด้วยเมทานอลในทันที เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นจึงนำมากรองเอาเปลือกและกากออก ส่วนสารละลายสีม่วงแดงที่ได้นั้นจะนำมาระเหย เพื่อเอาตัวทำละลายออก โดยด้วยการใช้เครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40°C ให้มีปริมาตรเหลืออยู่ประมาณ 1 ใน 3 ของปริมาตรเดิม จากนั้น จึงนำส่วนสกัดหยาบสีแดงอมม่วงที่ได้ ไปสกัดต่อด้วยเฮกเซน ตามด้วย เอทิลอะซีเตท ตามลำดับ จนเมื่อแยกสารประกอบ ที่ละลายในตัวทำละลายทั้งสอง ออกไปได้แล้ว ส่วนสกัดสีแดงอมม่วงที่เหลืออยู่ จะนำไปขจัดตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่อง Lyophilizer และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C จนกระทั่ง พร้อมสำหรับการทดลอง ในขั้นต่อไป (ดูแผนภูมิ S-2300604 ซึ่งแสดงวิธีการสกัดแบบ B)

แผนภูมิ S-2300604 แสดงวิธีการสกัด แบบ B



4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

4.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ ในการต้านเซลล์มะเร็งต่างๆ

ได้นำตัวอย่างไปส่งทดสอบ ที่หน่วยบริการตรวจวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี โดยวิธีการทดสอบ จะอ้างอิงกับบทความของ Plumb et al. และ Skehan et al. ซึ่งการทดสอบฤทธิ์ในการต้านมะเร็งสามชนิด ได้แก่

A. การทดสอบฤทธิ์ในการในการต่อต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยใช้ Ellipticine (IC_{50} : 0.32 $\pm$0.17 μg/mL) และ Doxorubicin (IC_{50} : 0.03 $\pm$0.01 μg/mL) เป็น positive control

B. การทดสอบฤทธิ์ในการในการต่อต้านเซลล์มะเร็งที่ปาก (KB) โดยใช้ Ellipticine (IC_{50} : 0.36 $\pm$0.0 μg/mL) และ Doxorubicin (IC_{50} : 0.12 $\pm$0.04 μg/mL) เป็น positive control

C. การทดสอบฤทธิ์ในการในการต่อต้านเซลล์มะเร็งเต้านม (BC) โดยใช้ Ellipticine (IC_{50} : 0.26 $\pm$0.08 μg/mL) และ Doxorubicin (IC_{50} : 0.11 $\pm$0.02 μg/mL) เป็น positive control

4.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

ได้ส่งไปทดสอบที่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเป็นการทดสอบกับสาร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

4.3.3 สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่นอกเหนือจากนี้ จะได้ระบุเป็นกรณีไป

4.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ จากข้อ 4.3 มาวิเคราะห์เพื่อหา mobile phase ที่เหมาะสมในการแยก โดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) โดยจะตรวจสอบกับกลุ่มของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยใช้ Godin reagent และ Natural Product (NP/PEG) reagent จากนั้นจึงนำส่วนสกัดหยาบมาแยกโดยใช้เทคนิคต่างๆ ของคอลัมน์โครมาโตรกราฟี ซึ่งได้แก่ ได้แก่ Vacuum Liquid Chromatography (VLC), Flash chromatography และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ทั้งนี้ mobile phase ที่ใช้ในการแยกส่วนสกัดหยาบแต่ละชนิด จะได้ระบุเป็นกรณีไป ส่วนซิลิกาเจลที่ใช้สำหรับการแยกแบบ VLC คือ ซิลิกา เจล 60 ขนาด 0.063-0.200 μm และ ซิลิกา เจล 60 GF_{254} (สำหรับ Thin layer chromatography) ของบริษัท Merck (Germany) ส่วนการแยกโดยใช้ Flash chromatography จะใช้ ซิลิกา เจล 60 ขนาด 0.040-0.060 μm (230-400 mesh) ของ บริษัท Merck (Germany) เช่นกัน

4.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

ในการหาโครงสร้างของสารประกอบนั้น ได้ใช้เทคนิคต่างๆ ของ Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เช่น ^{1}H , ^{13}C และ Two-Dimensional NMR ตามความเหมาะสม

ส่วนการวัด NMR สเปกตรัมนั้น ได้นำสารตัวอย่างมาละลายด้วย deuterated solvent ในปริมาตร 0.5 -0.7 mL ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้คือ Chloroform-d ($CDCl_3$) และ Dimethyl-sulfoxide-d6 (DMSO-d6) โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard ซึ่งค่าที่อ่านได้จะเป็นค่า chemical shift (δ) ในหน่วย part per million (ppm)

4.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

สารประกอบที่แยกออกมาได้จากส่วนสกัดหยาบ ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้ง เพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของพืชชนิดนี้

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช

การศึกษาพันธุ์มะเม่า

มะเม่าเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae สกุล Antidesma (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41) จากบทความของ P. Hoffmann เรื่อง Checklist of the Genus Antidesma (Euphorbiaceae) in Thailand ซึ่งได้ตีพิมพ์ใน Thai Forest Bulletin ปี 2000 (Hoffman, 2000:139-156) ได้มีการบันทึกไว้ว่าในประเทศไทยมีการค้นพบพืชสกุลเดียวกันนี้อยู่ประมาณ 18 ชนิด ซึ่งขึ้นกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย ซึ่งสามารถจำแนกออกได้ดังนี้ (ดูตาราง T-1300604 ซึ่งได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่พบมะเม่าทั้ง 18 ชนิด ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย)

ชนิดที่ 1

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma acidum* Retz.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าตาควาย มักเม่า เม่า เม่าสร้อย

ชนิดที่ 2

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma bunius* (L.) Spreng.
พันธุ์ a (Variety)	*bunius*
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	บ่าเม่าฤาษี มะเม่าดง แมงเม่าควาย เม่าช้าง
พันธุ์ b (Variety)	pubescens
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	มะเม่าเภตรา

ชนิดที่ 3

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma forbesii* Pax & K. Hoffm.in Engl.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	มะเม่าฝอบ

ชนิดที่ 4

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma ghaesembilla* Gaertn.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	ขะเม่าผา มาเม่า เม่าไข่ปลา มังเม่า มะเม่าข้าวเบา เม่าทุ่ง กูแจ

ชนิดที่ 5

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma helferi* Hook.f.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-

ชนิดที่ 6

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma japonicum* Siebold & Zucc.
พันธุ์ a (Variety)	japonicum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าแจบ
พันธุ์ b (Variety)	robustius
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าแกร่ง

ชนิดที่ 7

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma laurifolium* Airy Shaw
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	มะเม่า มะเม่าไฟ มะเม่าเขา

ชนิดที่ 8

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma leucocladon* Hook.f.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	ส้มเม่า เม่าเปาโล ผักหวานหลังขาว

ชนิดที่ 9

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma leucopodum* Miq.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าโปโล

ชนิดที่ 10

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma montanum* Blume
พันธุ์ a (Variety)	microphyllum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	ตาไครน้ำ
พันธุ์ b (Variety)	montanum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	มะเม่าขน มะเม่าหิน เม่าโปโล มะเม่า
พันธุ์ c (Variety)	salicinum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-
พันธุ์ d (Variety)	wallichii (Tul.)
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าเหล็ก ส้มเม่าเขา ส้มเม่าโปโล

ชนิดที่ 11

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma neurocarpum* Miq.
พันธุ์ a (Variety)	neurocarpum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	พลองขาว

ชนิดที่ 12

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma orthogyne* (Hook.f.) Airy Shaw
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-

ชนิดที่ 13

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma pendulum* Hook.f.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-

ชนิดที่ 14

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma puncticulatum* Miq. หรือ *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	เม่าหลวง เม่าเสี้ยน มัดเซ

ชนิดที่ 15

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma sootepense* Craib
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	บ่าเม่า มะเม่าสาย มะเม่าดูก เม่าสาย มูกกอง ตะไคร้น้ำ

ชนิดที่ 16

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma tomentosum* Blume
พันธุ์ a (Variety)	tomentosum
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-

ชนิดที่ 17

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma velutinosum* Blume
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	มะเม่าควาย เม่าหิน เม่าเหล็ก ส้มเม่าขน เม่าเขา

ชนิดที่ 18

ชื่อพฤกษศาสตร์	*Antidesma velutinum* Tul.
ชื่อที่เรียกกันโดยทั่วไป	-

ตาราง T-1300604 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่พบมะเม่าทั้ง 18 ชนิด ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

มะเม่า		ภาคเหนือ							ภาคกลาง								ภาคตะวันตก					ภาคตะวันออก					ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ									ภาคใต้																
ชนิดที่	พันธุ์	เชียงราย	เชียงใหม่	แม่ฮ่องสอน	ลำพูน	ลำปาง	แพร่	น่าน	กรุงเทพฯ	กำแพงเพชร	นครสวรรค์	พิษณุโลก	เพชรบูรณ์	สระบุรี	อ่างทอง	อุทัยธานี	กาญจนบุรี	ตาก	ประจวบคีรีขันธ์	เพชรบุรี	ราชบุรี	จันทบุรี	ฉะเชิงเทรา	ชลบุรี	ตราด	ปราจีนบุรี	ขอนแก่น	ชัยภูมิ	นครพนม	นครราชสีมา	บุรีรัมย์	เลย	ชัยภูมิ	ศรีสะเกษ	สุรินทร์	อุบลราชธานี	กระบี่	ชุมพร	ตรัง	นครศรีธรรมราช	นราธิวาส	ปัตตานี	พังงา	พัทลุง	ภูเก็ต	ยะลา	ระนอง	สงขลา	สตูล	สุราษฎร์ธานี
1		x	x	x	x	x	x	x		x		x	x	x		x	x	x			x	x		x					x		x	x	x			x	x	x				x		x								
2																																																				
	a	x	x		x	x											x	x						x	x				x			x																				
	b				x								x																																								
3																																																					
4		x	x	x	x	x			x		x	x	x		x		x	x	x	x	x	x		x			x			x	x	x		x				x		x		x		x								x
5																																					x		x	x			x				x								
6																																																					
	a		x									x							x	x	x	x		x							x											x	x	x		x		x		x			
	b																														x																						
7																						x			x																													
8																						x																x	x	x						x						x
9																	x																												x								
10																																																					
	a																																	x	x																		
	b		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x			x	x				x	x	x	x	x			x	x		x					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	c																						x																				x	x										
	d																																							x	x				x		x						
11																																																					
	a																																				x		x	x	x		x				x		x	x		
12																																										x							x	x		
13																																										x										
14						x						x			x							x		x	x					x							x		x	x			x		x							
15		x	x	x	x	x	x	x				x	x	x			x	x			x	x		x				x				x																				
16																																																					
	a																		x																		x		x	x	x		x	x			x						x
17			x					x									x	x		x																x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x				
18												x					x	x				x			x											x	x		x			x	x	x		x	x		x			

*ที่มา: อักขรานุกรมภูมิศาสตร์ไทย ของราชบัณฑิตสถาน เล่ม 1 ปี 2525 หน้า 3-18

ชนิดของมะเม่าที่นำมาใช้ในการทดลอง

มะเม่าที่นำมาใช้ในการในโครงการวิจัยนี้คือ “มะเม่าหลวง” ซึ่งมีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41) หรือ *Antidesma puncticulatum* Miq. (Hoffmann, 2000:139-156) ในการจัดหามะเม่าหลวงเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เดินทางไปสำรวจพื้นที่การปลูก ในหลายจังหวัดของประเทศไทย ซึ่งได้พบว่ามีมะเม่าอยู่ 2 ชนิด ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ชนิดแรกคือ มะเม่าที่พบในอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ส่วนอีกชนิดหนึ่ง พบกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่หลายอำเภอ ของจังหวัดสกลนคร และบริเวณจังหวัดใกล้เคียงเช่น กาฬสินธุ์ โดยมะเม่าที่พบแต่ละชนิด จะมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

มะเม่าที่พบในจังหวัดจันทบุรี

จากการสำรวจมะเม่าในบริเวณเดียวกัน พบว่ามะเม่าอาจขึ้นได้ ในลักษณะเดี่ยวๆ หรืออาจขึ้นอยู่ รวมกับต้นไม้อื่นๆก็ได้ (รูปที่ 1 และ 2) ลักษณะของต้นที่ขึ้นอยู่ใกล้กับต้นไม้อื่น จะมีขนาดของลำต้น และใบใหญ่กว่าเล็กน้อย และเนื้อไม้จะมีสีเข้มกว่า

รูปที่ 1

รูปที่ 2

ลักษณะโดยทั่วไปของมะเม่าชนิดนี้คือ

1. **ลักษณะของลำต้น**

   เป็นลักษณะของไม้ยืนต้น สูงประมาณ 10-15 เมตร

2. **ลักษณะของใบ**

   แผ่นใบหนา เรียบ มีรูปร่างเป็นรูปขอบขนาน หรือ รูปไข่ โคนใบจะมน ปลายใบแหลม จนถึงเรียวแหลม เส้นใบละเอียด ก้านใบจะยาวประมาณ 2 เซนติเมตร และมีความหนาประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร โดยจะมีลักษณะบวมที่โคนเล็กน้อย (รูปที่ 3)

3. **ลักษณะของช่อผล และผลมะเม่า**

   ช่อผลจะออกมาจากลำต้น ช่อผลจะมีความยาวไม่เกิน 10 เซนติเมตร ผลจะเป็นทรงรี และเกาะกันอย่างหนาแน่นในช่อผล (รูปที่ 4)

รูปที่ 3

รูปที่ 4

มะเม่าที่พบในจังหวัดสกลนคร

ลักษณะโดยทั่วไปของมะเม่าชนิดนี้คือ

1. **ลักษณะของลำต้น**

   ลักษณะเป็นไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่ม ต้นที่พบสูงตั้งแต่ 2 เมตร จนถึง 30 เมตร

2. **ลักษณะของใบ**

   แผ่นใบ หนา เรียบเป็นรูปขอบขนาน จนถึง รูปรี โคนใบแหลม บางต้นมีโคนใบกลม ปลายใบยาวคล้ายหาง เส้นใบหยาบและใหญ่ ก้านใบยาวประมาณ 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร (รูปที่ 5)

3. **ลักษณะของช่อผลและผลมะเม่า**

   ช่อผลจะออกมาตามง่ามใบหรือง่ามกิ่ง ช่อผลโดยทั่วไปยาวมากกว่า 10 เซนติเมตร ผลเป็นรูปทรงรี (รูปที่ 6)

รูปที่ 5

รูปที่ 6

ความแตกต่างของมะเม่าแต่ละชนิด

โดยทั่วไป ลักษณะของมะเม่าทั้งสองชนิด จะใกล้เคียงกันมาก แต่ลักษณะสำคัญ ที่สามารถใช้ในบอกความแตกต่าง ของมะเม่าทั้งสองชนิดได้คือ ตำแหน่งของช่อผล ซึ่งสำหรับมะเม่าจากจังหวัดจันทบุรีนั้น ช่อผลจะงอกออกมาจากลำต้น และความยาวของก้านใบของมะเม่าที่พบจะยาวประมาณ 2 เซนติเมตร (รูปที่ 7)

รูปที่ 7

ส่วนมะเม่าจากสกลนครนั้น ช่อผลมักจะออกมาตามง่ามใบ และง่ามกิ่ง โดยทั่วไป ก้านใบจะยาวประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 8)

รูปที่ 8

ข้อจำกัดในการค้นหาพันธุ์

ดูบทวิจารณ์ข้อ 1. เรื่องการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช

ผลการทดลอง

ในการศึกษาเพื่อสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารประกอบ ที่สามารถแยกได้ จากส่วนสกัดหยาบ ของส่วนต่างๆ ของมะเม่า ซึ่งได้แก่ ส่วนเปลือก ใบ ผล เมล็ด และ ราก นั้น เมื่อได้ค้นหาพันธุ์ที่ถูกต้อง และพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชแล้ว จึงได้ดำเนินการศึกษาทดลองในแต่ละส่วนของพืช ตามขั้นตอนดังที่กล่าวไว้แล้ว โดยมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. การศึกษาส่วนเปลือก

1.1 การเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

ในการจัดเก็บส่วนเปลือกของมะเม่าหลวง จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรีนั้น ได้เปลือกสดซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม และเมื่อนำมาอบแห้ง ในอุณหภูมิตามที่กำหนด และนำไปบดให้เป็นผงละเอียดแล้ว จะได้ผงเปลือกไม้ หนัก 750 กรัม

1.2 การสกัด

เปลือกไม้แห้งที่ได้บดให้เป็นผงละเอียดหนัก 750 กรัมแล้วนั้น ได้นำมาสกัดด้วยเมทานอล 95% และเมื่อได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลแล้ว ได้นำไปสกัดต่อโดยใช้วิธี partition กับ เฮกเซน และเอทิลอะซีเตท (ดูแผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัด แบบ A) โดยส่วนสกัดหยาบเฮกเซนที่ได้ จะมีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเขียวเข้ม หนัก 4.14 กรัม หรือคิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 0.5% และสำหรับส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทที่ได้นั้น จะมีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลอมแดงหนัก 10.5 กรัม หรือคิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 1.4% ส่วนกากที่เหลือจากการสกัด จะมีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลอมแดง ที่เกาะกันเป็นก้อนแข็ง หนัก 97 กรัม ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 13%

1.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

ได้นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 1.2 ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ ฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย และฤทธิ์ Anti-inflammatory ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ได้ผลการทดสอบมาดังต่อไปนี้

1.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งต่างๆ

ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ในการต้านเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) เซลล์มะเร็งที่ปาก (KB) และเซลล์มะเร็งเต้านม (BC) ดังที่ได้แสดง ในตาราง T-2300604

ตาราง T-2300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของส่วนเปลือก

ส่วนสกัดหยาบ	ค่า IC_{50}: μg/mL*		
	เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)	เซลล์มะเร็งที่ปาก (KB)	เซลล์มะเร็งเต้านม (BC)
เมทานอล	>1000	600	300
เฮกเซน	30	50	50
เอทิลอะซีเตท	200	100	70

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 1000 μg/mL

1.3.2 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์

ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ในการต้านเชื้อยีสต์ *Candida alibicans* ได้ผลการทดสอบ ดังที่แสดงในตาราง T-3300604

ตาราง T-3300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์ *Candida alibicans* ของส่วนเปลือก

ส่วนสกัดหยาบ	ผลการทดสอบ*
เมทานอล	Inactive
เฮกเซน	Inactive
เอทิลอะซีเตท	Inactive

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 50 μg/mL

1.3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ในการต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1 strain) ได้ผลการทดสอบ ดังที่แสดงในตาราง T-4300604

ตาราง T-4300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1 strain) ของส่วนเปลือก

ส่วนสกัดหยาบ	ผลการทดสอบ*
เมทานอล	Inactive
เฮกเซน	Inactive
เอทิลอะซีเตท	Inactive

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 10 μg/mL

1.3.4 การตรวจสอบฤทธิ์ในการเป็น Anti-inflammatory

ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดหยาบเมทานอล ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ในการเป็น Anti-inflammatory โดยทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ COX-2 ได้ผลการทดสอบ ดังที่แสดงในตาราง T-5300604

ตาราง T-5300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ COX-2 ของส่วนเปลือก

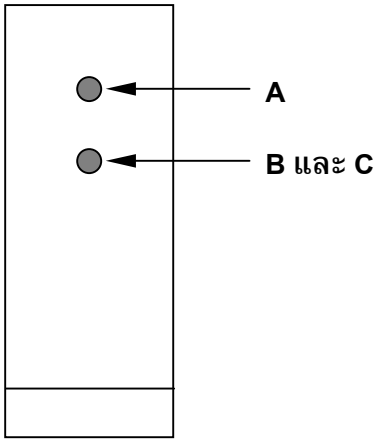
ส่วนสกัดหยาบ	ผลการทดสอบ*
เมทานอล	Inactive
เฮกเซน	Inactive
เอทิลอะซีเตท	Inactive

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 10 μg/mL

1.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

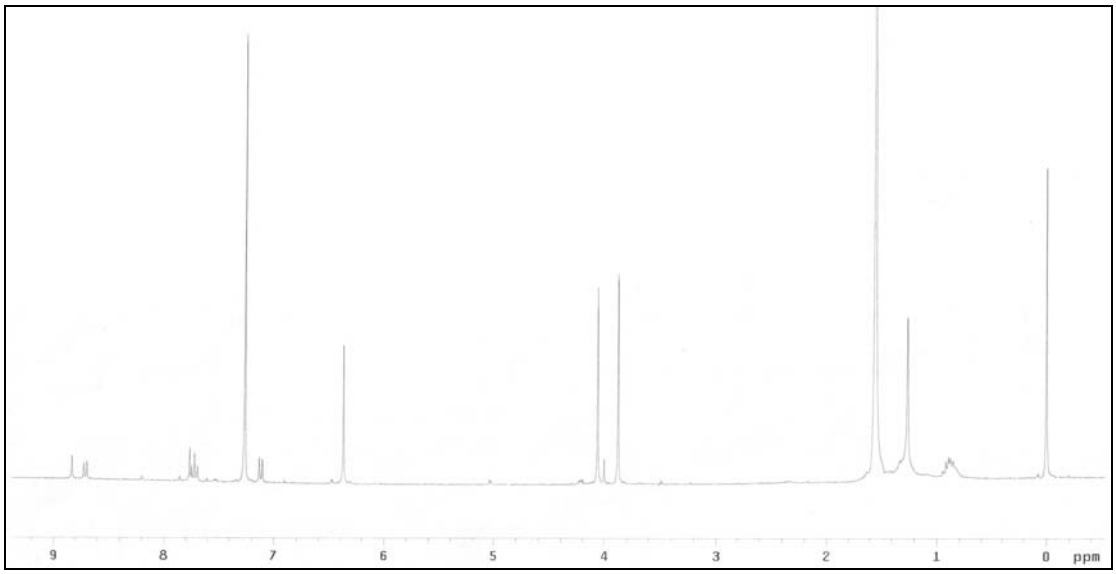
ได้เลือกส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ซึ่งมีค่า IC_{50} 30 μg/mL มาแยก โดยเริ่มจากการวิเคราะห์หา mobile phase ที่เหมาะสมในการแยก และเพื่อให้ทราบถึงจำนวนสารประกอบ ในส่วนสกัดหยาบนี้อย่างคร่าวๆ โดยใช้ TLC และเมื่อได้ข้อมูลดังกล่าวแล้ว จึงนำมาแยกโดยใช้ VLC โดย mobile phase ที่ใช้คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และ เมทานอล ผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ กัน และเมื่อสามารถแยกสาร ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้แล้ว จะนำสารแต่ละกลุ่มมาแยกอีกครั้ง โดยใช้ Flash chromatography ตาม protocol ที่ระบุไว้ในบทความของ Still et al. (Still et al., 1978:2923-2925)

จะพบว่า สามารถแยกสารประกอบ ออกมาได้อย่างน้อย 5 ชนิด ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) 3 ชนิด และสารประกอบประเภทเทอร์พีน (Terpenoids) อีกอย่างน้อย 2 ชนิด โดยสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ ที่แยกได้นั้น เพื่อให้สะดวกแก่ความเข้าใจ จะเรียกว่าสาร **A, B** และ **C** ซึ่งจะแสดงตำแหน่งบนแผ่น TLC ดังที่แสดงในภาพข้างล่างนี้

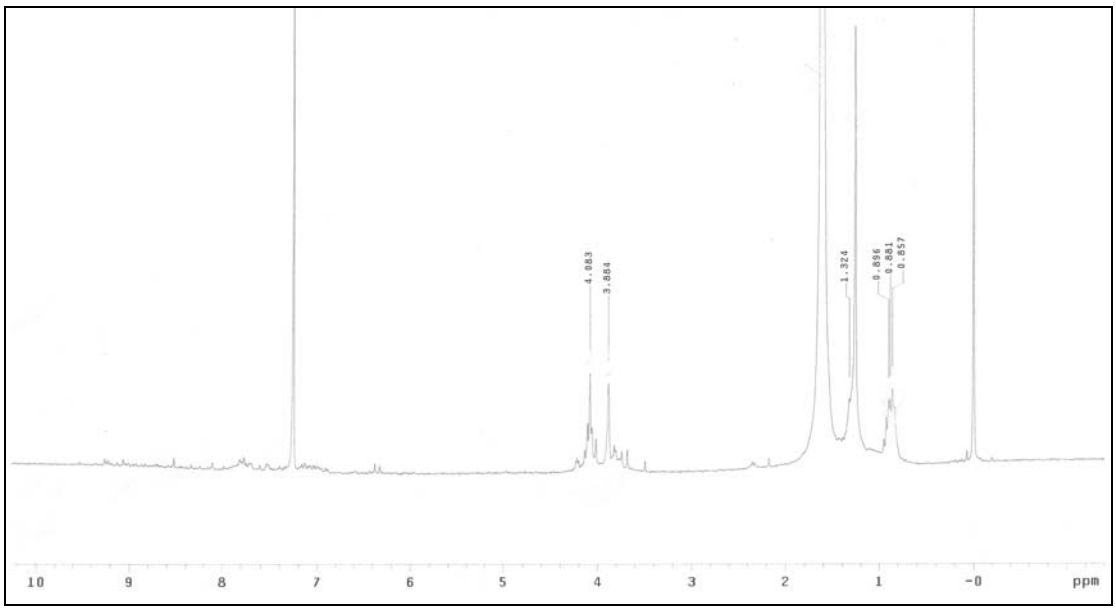


สำหรับสาร **A** นั้น สามารถแยกออกจากสาร **B** และ **C** ได้ โดยใช้ mobile phase ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างเฮกเซน กับ เอทิลอะซีเตท จะได้น้ำหนักของสาร **A** ประมาณ 7 มิลลิกรัม (ดูรูปที่ 9 ซึ่งแสดง ^{1}H NMR, ใน $CDCl_3$) อย่างไรก็ดี ได้พบว่าสาร **A** นี้ เกิดการสลายตัวไปโดยไม่ทราบสาเหตุ ภายในระยะเวลาประมาณ 2 อาทิตย์ หลังจากที่ได้แยกออกมาแล้ว (ตามที่แสดงในรูปที่ 10)

รูปที่ 9

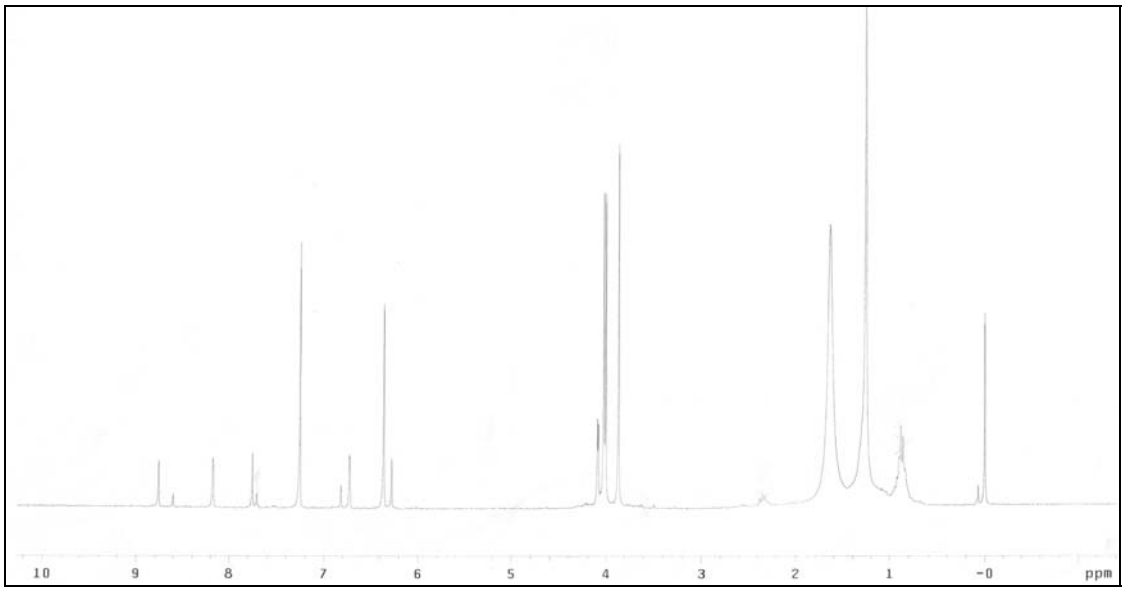


รูปที่ 10

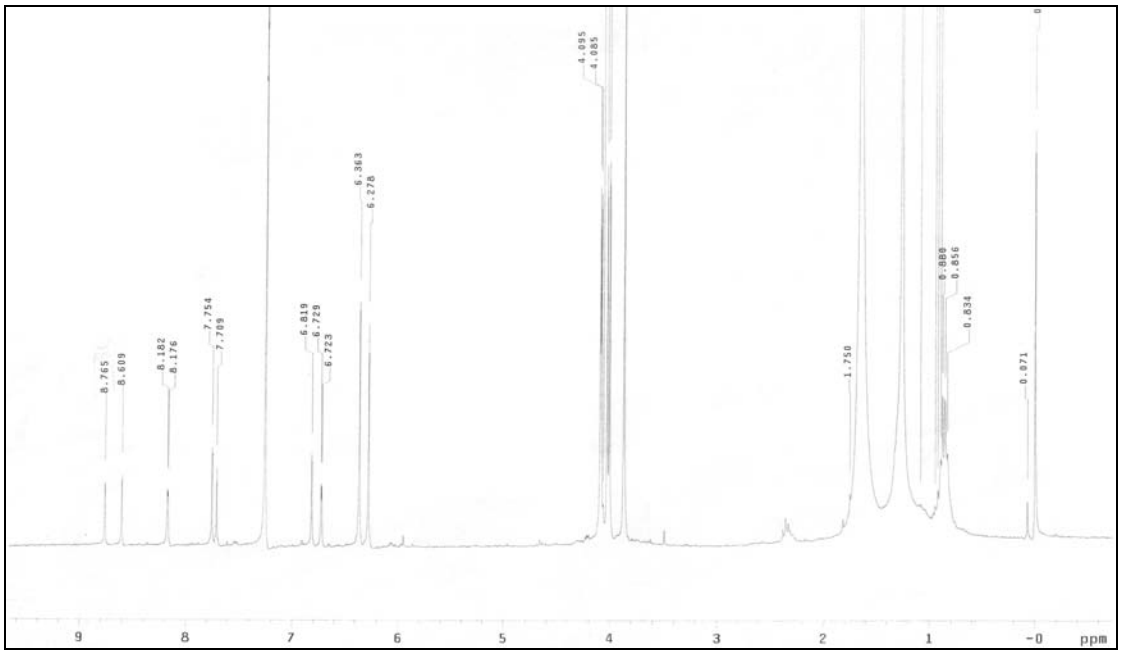


ส่วนสาร **B** และ **C** นั้น ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และยังพบว่า สัดส่วนเดิมของสาร **C** (ดังรูปที่ 11) เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 50% (ดังรูปที่ 12) ในระยะเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ ทั้งนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาถึงสาเหตุและกลไก ในการเปลี่ยนแปลงจากสาร **B** ไปเป็นสาร **C** นั้น โดยน้ำหนักของสาร B และ C ที่แยกออกมาได้นั้นจะหนักรวมกันประมาณ 10 มิลลิกรัม

รูปที่ 11



รูปที่ 12



สำหรับสารประกอบประเภทเทอร์พีนอีกอย่างน้อย 2 ชนิด ที่สามารถแยกออกมาได้นั้น จะกำหนดชื่อเป็นสาร **D** และ **E** ซึ่งจะมีน้ำหนักเท่าๆ กันประมาณ 2 มิลลิกรัม จาก ^{1}H NMR สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของ plasticizer ในปริมาณมาก แม้จะได้พยายามแยกสารประกอบเหล่านี้ ออกจากสิ่งปนเปื้อนดังกล่าว หลายครั้งแล้วก็ตาม ทั้งโดยการใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตรกราฟี และโดยการตกผลึก แต่ก็ไม่สามารถกำจัดสารปนเปื้อนออกไปได้

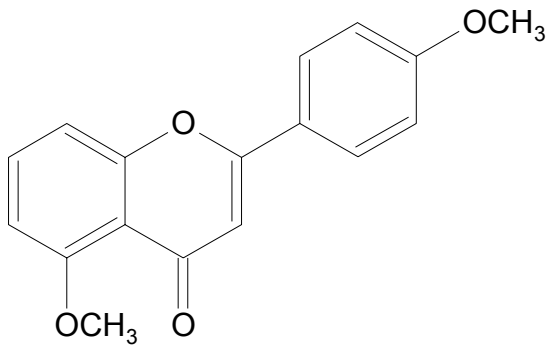
1.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

ในการหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้ โดยใช้เทคนิค NMR ต่างๆ นั้น สามารถอ่านค่า chemical shift (δ) จากความสเปกตรัมที่ได้ รวมทั้งระบุโครงสร้างหลักที่เป็นไปได้ของสารประกอบ **A-E** ดังต่อไปนี้

1.5.1 สารประกอบ **A**

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 8.83 (s, 1H), 8.71 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.77(s, 1H), 7.72 (d,d J = 8.1,8.4 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8 Hz, 1H), 6.37 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.87 (s, 3H) (ดูรูปที่ 9)

โครงสร้างของสารประกอบ **A** ที่เป็นไปได้ คือ 5,4'-Dimethylflavone



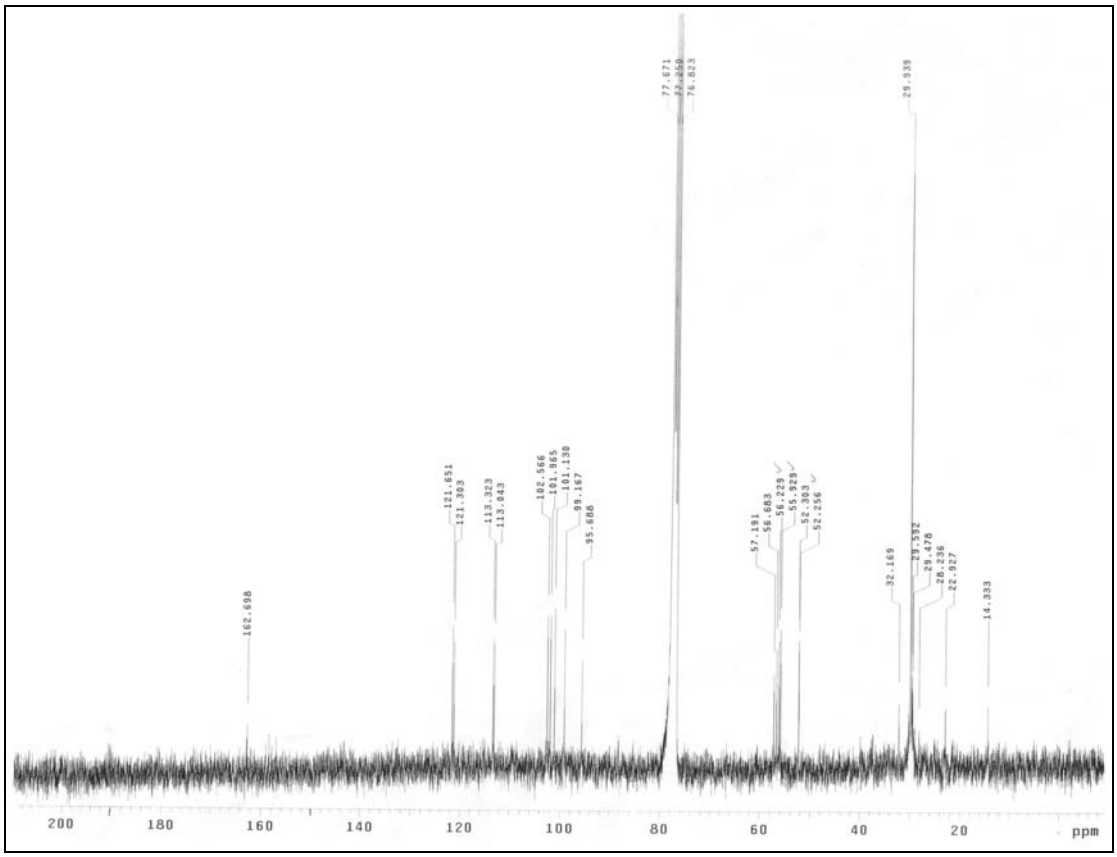
ทั้งนี้ โครงสร้างข้างต้นที่หาได้จาก ^{1}H NMR นี้ เป็นโครงสร้างก่อนที่จะเกิดการสลายตัว (ดูรายละเอียดในข้อ 1.4)

1.5.2 สารประกอบ **B**

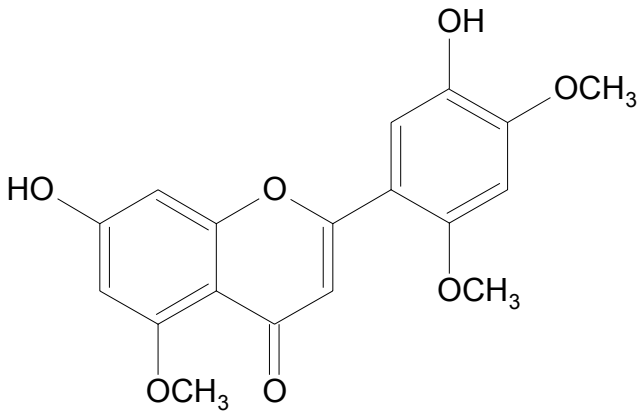
ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 8.77(s, 1H), 8.18 (d, J = 2Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 6.73 (d, J = 2Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.03 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 3.87 (s, 3H) (ดูรูปที่ 11 ถึง 12)

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 162.7, 121.7, 113.3, 102.0,100.8, 99.2, 98.7, 55.9, 56.2, 52.3 (ดูรูปที่ 13)

รูปที่ 13



โครงสร้างของสารประกอบ **B** ที่เป็นไปได้ คือ 7,3'-Dihydroxy- 5,4',6'-trimethylflavone



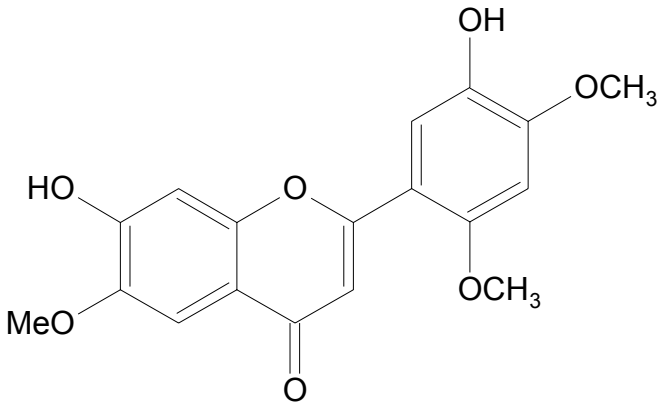
1.5.3 สารประกอบ **C**

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้

δ 8.61 (s, H), 7.71 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.09 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 3.87 (s, 3H) (ดูรูปที่ 11 ถึง 12)

ข้อมูลจาก ^{13}C NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 120.9, 112.7, 95.5, 101.5, 57.2, 56.7, 52.3 (การที่ไม่สามารถตรวจพบ peak ของหมู่คาร์บอนิล อาจเนื่องจาก sensitivity ของเครื่อง NMR มีไม่เพียงพอ) (ดูรูปที่ 13)

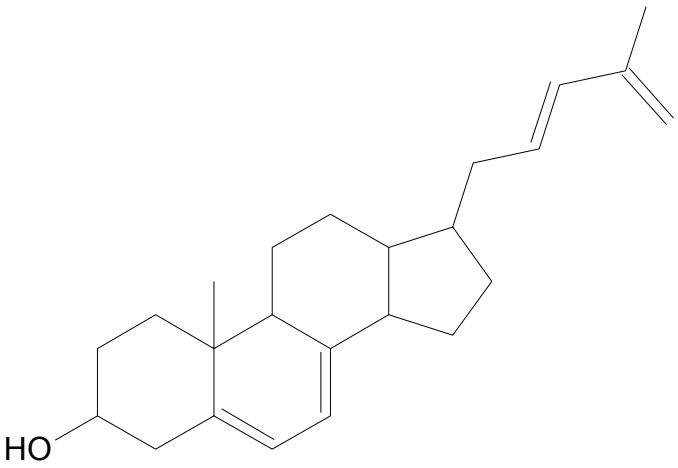
โครงสร้างของสารประกอบ **C** ที่เป็นไปได้ คือ 7,3'-Dihydroxy- 6,4',6'-trimethylflavone



1.5.4 สารประกอบ **D**

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ δ 6.5-6.3 (d, 2H),6.00 (s, 1H), 5.37 (d, J = 5 Hz), 5.00-5.10 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 1.01 (s, 1H), 0.92 (d, J = 7 Hz), 0.83 (d, J = 6 Hz, 1H), 0.87 (d, J = 6 Hz), 0.68 (s, 1H)

โครงสร้างของสารประกอบ **D** ที่เป็นไปได้ คือ สารประกอบประเภทเทอร์พีน ซึ่งน่าจะมีโครงสร้างหลักเป็นประเภท สเตียรอยด์ (steroid) ดังนี้

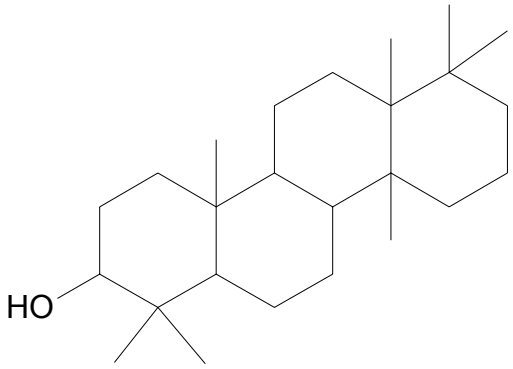


1.5.5 สารประกอบ **E**

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้

δ 3.60 (dd, 1H), 0.65 - 1.20 (8s, 24H)

โครงสร้างของสารประกอบ **E** ที่เป็นไปได้ คือ สารประกอบประเภทไตรเทอร์พีน ซึ่งน่าจะเป็นสารประกอบ 3-Friedelinol



ทั้งนี้โครงสร้างของสารประกอบ **D** และ **E** ควรจะได้มีการตรวจสอบ ในรายละเอียดทางโครงสร้างเพิ่มเติม เนื่องจากสารประกอบที่แยกได้เหล่านี้ จะมีสารปนเปื้อนอยู่ด้วย (ดูข้อ 1.4)

1.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

จากการตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ของสารประกอบประเภทเทอร์พีนที่ได้ ไม่ปรากฏว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง* ในขณะที่สารประกอบ **A, B** และ **C** นั้น ไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากการสลายตัวของสารประกอบ **A** และ การที่สารประกอบ **B** และ **C** นั้น มีการเปลี่ยนแปลงในเชิงโครงสร้าง อันเป็นข้อจำกัดที่ทำให้ไม่สามารถระบุฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบทั้งสองอย่างถูกต้องได้

*หมายเหตุ: ข้อมูลผลการทดสอบจาก รศ.ดร. อมร เพชรสม

2. การศึกษาส่วนใบ

2.1 การเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

ใบของมะเม่าหลวงหนักประมาณ 2 กิโลกรัม ได้จัดเก็บมาจาก อำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเมื่อนำมาอบแห้ง แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียดแล้ว จะได้ผงใบไม้แห้งหนัก 1.3 กิโลกรัม

2.2 การสกัด

ขั้นตอนในการสกัดเพื่อให้ได้ส่วนสกัดหยาบต่างๆ เป็นไปตามแผนภูมิ S-1300604

แสดงวิธีการสกัด แบบ A จะได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนเป็นยางเหนียวสีเขียวหนัก 11.35 กรัม คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 1% สำหรับส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทที่ได้มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลอมเขียวหนัก 23.5 กรัม คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 2% และกากที่เหลืออยู่จะเป็นยางเหนียว ที่เกาะกันเป็นก้อนแข็งสีน้ำตาลอมเขียว หนัก 82 กรัม คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 6 %

2.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

ได้นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 2.2 ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ได้ผลการทดสอบมาดังที่แสดงในตาราง **T-6300604**

ตาราง T-6300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของส่วนใบ

ส่วนสกัดหยาบ	ค่า IC_{50}: μg/mL*		
	เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)	เซลล์มะเร็งที่ปาก (KB)	เซลล์มะเร็งเต้านม (BC)
เมทานอล	1000	1000	300
เฮกเซน	200	600	300
เอทิลอะซีเตท	100	900	300

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 1000 μg/mL

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบของใบเหล่านี้ ไม่ได้แสดงศักยภาพ ในการมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ที่อยู่ในขอบเขตการวิจัยของโครงการนี้ ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อ และไม่มีความจำเป็นต้องศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบทุกชนิดของส่วนใบนี้ ไม่ได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ให้ความสำคัญในโครงการวิจัยนี้ ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจึงไม่มีความจำเป็น อย่างไรก็ดี ได้เลือกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทของส่วนใบ มาทำการทดลองต่อ เนื่องจากส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทนี้ อาจมีโอกาสในการพบสารออกฤทธิ์มากกว่าส่วนสกัดหยาบอื่นๆ ทั้งนี้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบโดย TLC พบว่า นอกจากคลอโรฟิลล์แล้ว ยังพบสารประกอบประเภทเทอร์พีนอีกด้วย ซึ่งสามารถแยกออกมาได้ โดยคอลัมน์โครมาโตรกราฟี ที่ใช้ mobile phase เป็นเฮกเซนผสมกับเอทิลอะซีเตทในอัตราส่วนต่างๆ กัน

นอกจากนั้นได้ทดลองแยกกากที่เหลืออยู่จากการสกัด ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์เซลล์มะเร็งตับอย่างอ่อน แต่ด้วยลักษณะทางกายภาพของส่วนกากที่เป็นยางเหนียวที่เกาะกันเป็นก้อนแข็ง ทำให้การละลายส่วนกากด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นไปได้ยาก จึงได้ทดลองใช้

1-butanol ในการละลาย แล้วนำสารละลายที่ได้นี้ มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโตรกราฟี

จากการทดลองดังกล่าว ได้พบว่าสารส่วนใหญ่ติดอยู่บนซิลิกา เจล ที่ใช้เป็น stationary phase และไม่สามารถใช้ mobile phase พาออกมาได้ ดังนั้นควรจะได้มีการพิจารณา ศึกษา และประเมิน ถึงความคุ้มค่าในแง่การทดลอง ของสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนกากนี้ต่อไป

2.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

แม้ว่าการศึกษาโครงสร้างของสารประกอบ ที่แยกได้จากส่วนใบนี้ ไม่มีความจำเป็นต้องดำเนินการ ตามเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น (ดูรายละเอียดในข้อ 2.3) อย่างไรก็ดี ได้ทำการทดลองวัดสเปกตรัม ^{1}H NMR ของสารประกอบที่แยกได้ในข้อ 2.4 แล้วพบว่า สารประกอบที่แยกได้เหล่านั้น ส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบประเภทเทอร์พีน ซึ่งผลที่ได้จะสอดคล้อง กับผลการวิเคราะห์ TLC

2.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

ไม่มีความจำเป็นต้องดำเนินการในขั้นตอนนี้ (ดูเหตุผลจากข้อ 2.3)

3. การศึกษาส่วนผล

3.1 การจัดเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

ได้เก็บผลสุกของมะเม่าหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ซึ่งมีสีแดงอมม่วง มาจากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี และเมื่อได้แยกเมล็ดออกมาแล้ว จะมีน้ำหนักประมาณ 600 กรัม ซึ่งได้นำไปสกัดในทันที

3.2 การสกัด

ผลสุกที่ได้แยกเมล็ดออกแล้ว หนักประมาณ 600 กรัม ได้นำมาแช่ (macerate) ในเมทานอล เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จากนั้นส่วนสกัดหยาบที่ได้นี้ ได้นำมาสกัดด้วยเฮกเซน ตามด้วยเอทิลอะซีเตท ตามแผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัดแบบ B

3.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

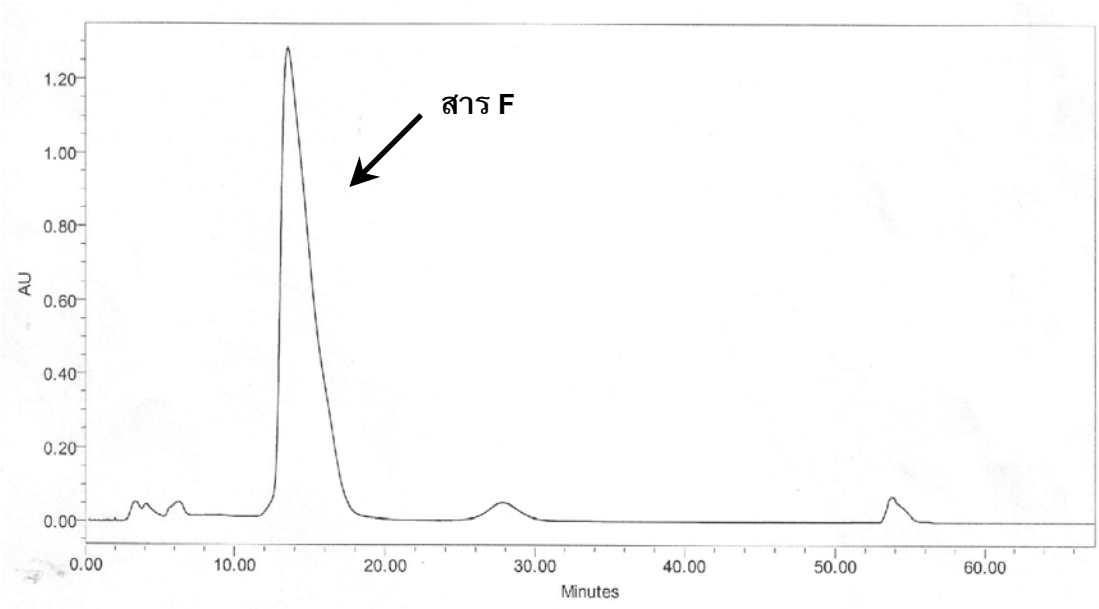
ส่วนสกัดหยาบที่มีสีแดงอมม่วงนี้ ได้ถูกแบ่งมาแยก ด้วยคอลัมน์ที่มีเรซิน Sephadex LH-20 แล้วจึงส่งไปทดสอบฤทธิ์ทางในการต้านอนุมูลอิสระ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการแจ้งผล จาก รศ.ดร. อมร เพชรสม ว่าผลการทดสอบนั้น ได้ค่าที่ไม่สามารถตีความได้ ทั้งนี้ผู้วิจัยคาดว่า อาจเนื่องมาจากในส่วนสกัดหยาบนั้น อาจจะมีน้ำตาล และวิตามินซี ปะปนอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งอาจทำให้บดบังฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Einbond et al., 2004:23-27)

3.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารประกอบสีแดงอมม่วงที่มีอยู่ในส่วนสกัดหยาบของผลมะเม่าสุกนั้น เป็นสารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ซึ่งเป็นที่ทราบกันอย่างแพร่หลาย ถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงได้ทดลองแยกส่วนสกัดหยาบที่มีสารประกอบดังกล่าวอยู่

จากการศึกษาทดลองพบว่า วิธีที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบประเภทแอนโทร-ไซยานิน จะประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญ 3 ขั้นตอน ซึ่งขั้นแรกได้แก่ การนำส่วนสกัดหยาบมาแยกโดยใช้คอลัมน์ที่มีเรซิน Amberlite XAD7 บรรจุอยู่ เพื่อกำจัดน้ำตาลและวิตามินซี และเมื่อเก็บสารละลายสีแดงอมม่วง ที่ออกมาจากคอลัมน์นี้ได้แล้ว จะนำไปแยกอีกครั้งหนึ่ง โดยนำไปผ่านคอลัมน์ที่มีเรซิน Sephadex LH-20 บรรจุอยู่ โดยใช้ mobile phase ที่เป็นน้ำและเมทานอลผสมกัน ในอัตราส่วนต่างๆ เมื่อได้ fraction ที่มีสารที่ต้องการออกมาแล้ว จึงนำไปแยกโดยใช้ Reversed Phase HPLC อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจากการทดลองพบว่า mobile phase ที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบประเภทแอนโทรไซยานินคือ สารละลายของ น้ำ เมทานอล และ กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 76:20:4 ตามลำดับ เมื่อตั้งค่า λ_{max} ที่ 520 nM สารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในผลสุกนี้ (สารประกอบ **F)** จะออกมาที่13.6 นาที (ดูรูปที่ 12) และน้ำหนักของสารที่ได้คือ 0.2 กรัม คิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 0.03%

รูปที่ 12

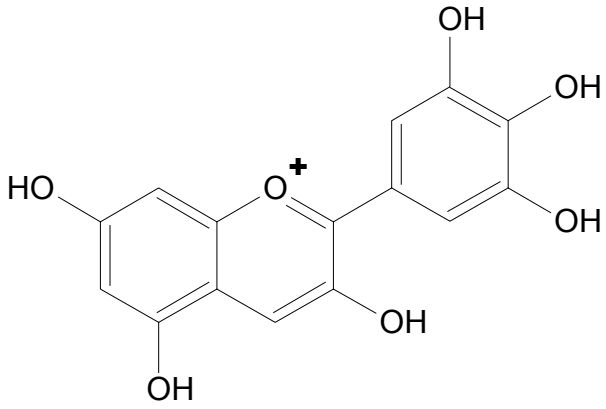


3.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

การศึกษาโครงสร้างโดยการวัด NMR ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้คือ 10% Trifluoroacetic acid (TFA) ใน DMSO-d6 เพื่อให้สารประกอบอยู่ในรูปของ flavylium cationic form

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 8.71 (s, 1H), 7.91 (brs, 1H), 7.69 (brs, 1H), 6.70 (brd, 1H), และ anomeric peaks ของน้ำตาล จะอยู่ในช่วง 3.7-1.6

โครงสร้างที่เป็นไปได้ของสารประกอบ **F** คือ สารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ที่จะมีโครงสร้างหลักเป็น Delphinidin (Dp)



ทั้งนี้การศึกษาเพื่อศึกษาถึงประเภทของน้ำตาล ที่มาเกาะอยู่กับโครงสร้างหลัก รวมถึงตำแหน่งในการเกาะ ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ในตำแหน่งที่ 3 ควรจะต้องมีการศึกษาวิจัยอย่างละเอียดในทางโครงสร้างต่อไป

3.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

สารประกอบแอนโทรไซยานินที่แยกออกมาได้แล้วนั้น ขณะนี้กำลังได้รับการตรวจสอบเพื่อหาค่า IC_{50} ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระอยู่ พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเมื่อได้ผลการทดสอบดังกล่าวแล้ว จะได้จัดส่งไปให้เป็นข้อมูลเพิ่มเติม

4. การศึกษาส่วนเมล็ด

4.1 การจัดเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

ส่วนเมล็ดที่นำใช้ในการทดลองนี้ ได้แยกออกมาจากส่วนผล (ดูข้อ 3.1) ซึ่งเมื่อนำมาอบแห้ง และบดเป็นผงละเอียดแล้ว จะหนักประมาณ 65 กรัม

4.2 การสกัด

เมล็ดที่บดเป็นผงละเอียดหนัก 65 กรัม นั้นได้นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ (ตามแผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัดแบบ A) จะได้ส่วนสกัดเฮกเซน ซึ่งมีลักษณะเป็นยางเหนียว สีน้ำตาลอมเหลืองหนักประมาณ 1 กรัม คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 1.5% และสำหรับส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ที่มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลนั้น จะหนักประมาณ 1.5 กรัม คิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 2%

4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ได้ถูกส่งไปตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพ และวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย* และที่ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ซึ่งผลจากการทดสอบจากทั้งสองแห่งแสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดทั้งสองนั้น ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบต่างๆ ของเมล็ด ไม่ได้แสดงศักยภาพอย่างเพียงพอ ในการแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีก และไม่มีความจำเป็นที่ต้องดำเนินการศึกษาในขั้นต่อไป

*หมายเหตุ: ข้อมูลผลการทดสอบจาก รศ.ดร. อมร เพชรสม

4.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบทุกชนิดของส่วนใบนี้ ไม่ได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่ให้ความสำคัญในโครงการวิจัยนี้ ดังนั้นการศึกษาในขั้นต่อไปจึงไม่มีความจำเป็น (ดูเหตุผลในข้อ 4.3)

4.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

ไม่จำเป็นต้องดำเนินการ (ดูเหตุผลในข้อ 4.3)

4.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

ไม่จำเป็นต้องดำเนินการ (ดูเหตุผลในข้อ 4.3)

5. การศึกษาส่วนราก

5.1 การจัดเตรียมพืชตัวอย่างเพื่อการสกัด

ได้จัดหารากสดหนักประมาณ 2 กิโลกรัม จากอำเภอวาริชภูมิ จังหวัดสกลนคร ซึ่งเมื่อนำมาอบแห้ง และทำให้เป็นผงละเอียดแล้ว จะได้ผงรากไม้สีน้ำตาลหนัก 563 กรัม

5.2 การสกัด

ผงรากไม้ที่บดเป็นผงละเอียดหนัก 563 กรัม ได้นำมาสกัดตามวิธีการที่กำหนด (ดูแผนภูมิ S-1300604 แสดงวิธีการสกัดแบบ A) ซึ่งจะได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ซึ่งมีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาลหนัก 1.73 กรัม คิดเป็นสัดส่วนได้ประมาณ 0.3% และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทหนัก 3.36 กรัม คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 0.6%

5.3 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดหยาบ

ได้นำส่วนสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 5.2 ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ที่หน่วย

ปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ได้ผลการทดสอบมาดังที่แสดงในตาราง **T-7300604**

ตาราง T-7300604 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ของส่วนราก

ส่วนสกัดหยาบ	ค่า IC_{50}: μg/mL		
	เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187)	เซลล์มะเร็งที่ปาก (KB)	เซลล์มะเร็งเต้านม (BC)
เฮกเซน	30.49	108.96	40.3
เอทิลอะซีเตท	14.59	60.94	68.31

*หมายเหตุ: ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 1000 μg/mL

เนื่องจากส่วนสกัดหยาบต่างๆ ของรากได้แสดงศักยภาพอย่างสูง ในการแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ดังนั้นส่วนสกัดหยาบเหล่านี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งในขณะนี้กำลังทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ซึ่งเมื่อได้ผลการทดสอบดังกล่าวแล้ว จะได้รวบรวมและจัดส่งไปให้เป็นข้อมูลเพิ่มเติม

5.4 การแยกส่วนสกัดหยาบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ

จากผลการทดลองในข้อ 5.3 พบว่า ทั้งส่วนสกัดหยาบเฮกเซน และส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตทได้แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50}คือ 30.49 และ 14.59 μg/mL ตามลำดับ จึงได้นำส่วนสกัดทั้งสองนี้ มาแยกโดยเทคนิคทางโครมา-โตรกราฟี ซึ่งจากการวิเคราะห์ในเบื้องต้นโดยใช้ TLC นั้น ได้ตรวจพบ สารประกอบประเภทเทอร์พีนและฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดทั้งสอง โดยจะพบสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์มากในส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ผลจากแยกโดยใช้เทคนิคต่างๆ ของคอลัมน์โครมาโตรกราฟีโดยใช้ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และเมทานอล เป็น mobile phase นั้น สามารถแยกสารประกอบประเภทเทอร์พีน (สารประกอบ **G**) และสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์อย่างน้อย 1 ชนิด (สารประกอบ **H**) ออกมาได้ โดยสารประกอบ **H** ที่ได้มานี้ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกจากเมทานอลผสมกับคลอโรฟอร์ม ซึ่งจะได้เป็นของแข็งสีเหลืองเข้มที่หนักประมาณ 10 mg

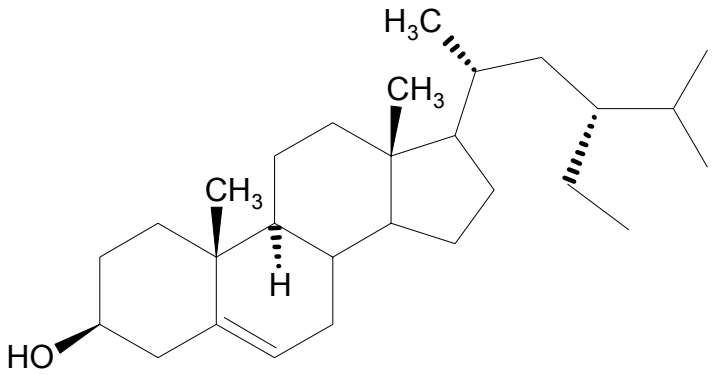
5.5 การหาโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้

เมื่อนำสารประกอบที่แยกได้จากข้อ 5.4 มาแยกโดยใช้เทคนิค NMR ทำให้สามารถระบุโครงสร้างของสารประกอบ **G** และ **H** ได้ดังนี้คือ

5.5.1 สารประกอบ **G**

โดยการเปรียบเทียบ ^{1}H NMR ของสารประกอบ **G** กับภาพสเปกตรัมในเอกสารอ้างอิง

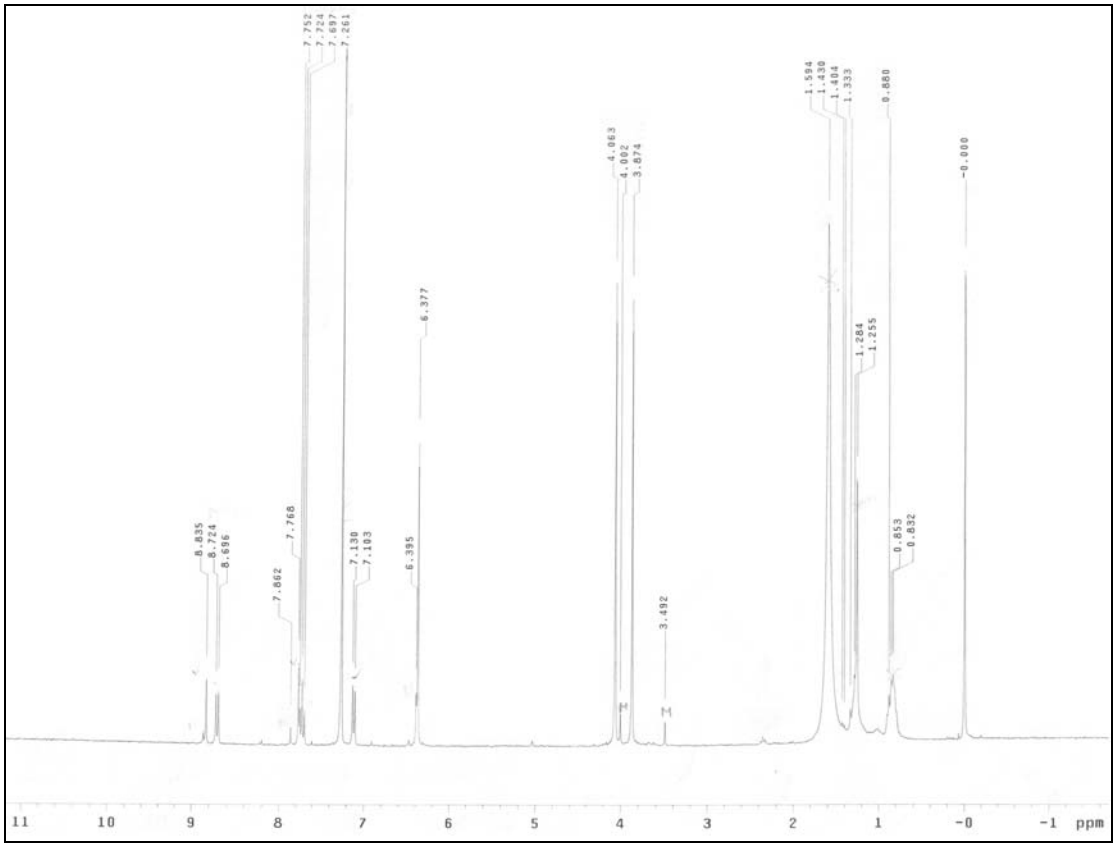
เรื่อง The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FT-NMR Spectra (Pouchert, C. J และ Behnke, J., 1993) แล้ว ปรากฏว่า สเปกตรัมของสารประกอบ **G** นี้จะตรงกับสเปกตรัมของสารประกอบ Stigmasterol ซึ่งมีโครงสร้างดังต่อไปนี้



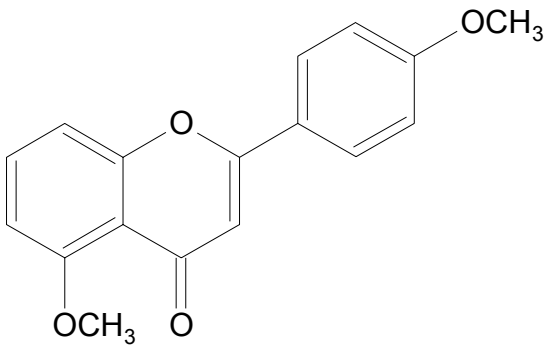
5.5.2 สารประกอบ **H**

ข้อมูลจาก ^{1}H NMR ($CDCl_3$) สามารถอ่านค่า chemical shift ได้ดังต่อไปนี้ คือ δ 8.84 (s, 1H), 8.71 (d, J = 8 Hz), 7.77 (s, 1H), 7.72 (dd, J = 8,8 Hz, 1 H), 7.12 (d, J =8 Hz), 6.38 (s, 2H), 4.06 (s, 3H), 3.87 (s, 3H) (ดูรูปที่ 13)

รูปที่ 13



โครงสร้างของสารประกอบ **H** ที่เป็นไปได้* คือ 5,4'-Dimethylflavone



สารประกอบ 5,4'-Dimethylflavone (**H**) ซึ่งพบในส่วนรากนี้ จะมีโครงสร้างเดียวกันกับสารประกอบ **A** ที่พบในส่วนเปลือก อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าสารประกอบ **H** นี้ เกิดการสลายตัวหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแต่อย่างใด

5.6 การตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบที่แยกได้

เมื่อได้นำสารประกอบ Stigmasterol (**G**) ที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) ที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารประกอบนี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่ใช่สารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดหยาบเหล่านี้

สำหรับสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ 5,4'-Dimethylflavone (**H**) นั้น ได้รับผลการทดสอบ และยืนยันแล้วว่าเป็นสารออกฤทธิ์ ในการต้านเซลล์มะเร็งดังกล่าว

บทวิจารณ์

1. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช

มะเม่าที่จะนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้คือ “มะเม่าหลวง” ซึ่งมีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (เต็ม สมิตินันทน์, 2544:40-41) หรือที่ปัจจุบันมีการให้ชื่อพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างจากเดิม คือ *Antidesma Puncticulatum* Miq. (Hoffmann, 2000:139-156) **จากการที่ได้เข้ามาศึกษา ในโครงการวิจัยนี้ พบว่ายังมีความสับสนในการเรียกชื่อ และ การกำหนดชื่อพฤกษศาสตร์ของพืชชนิดนี้ โดยมะเม่าหลวงที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ดังกล่าวข้างต้นนั้น มีลักษณะที่แตกต่างไปจากมะเม่า ที่พบมากในจังหวัดสกลนคร ซึ่งแต่เดิม เป็นที่เข้าใจกันอย่างแพร่หลายว่าเป็น “มะเม่าหลวง” และ มีการให้ชื่อ พฤกษศาสตร์เป็นชื่อเดียวกันนี้** ทำให้ประสบปัญหาในการค้นคว้า และเสาะหามะเม่าหลวง ชนิดที่มีลักษณะถูกต้องตามอนุกรมวิธานพืช ดังเอกสารเรื่อง Checklist of the Genus Antidesma (Euphorbiaceae) in Thailand ของ P. Hoffmann ผู้ซึ่งเป็นนักอนุกรมวิธานพืช (Plant Taxonomist) และเป็นผู้เชี่ยวชาญด้านการวิเคราะห์พันธุ์ไม้ในสกุลนี้ โดยที่เป็นผู้ศึกษา และรวบรวมข้อมูลของพืชในสกุล Antidesma ให้กับหอพรรณไม้ กรมป่าไม้

เพราะฉะนั้น เพื่อความถูกต้องในการศึกษา และอ้างอิงผลในอนาคต จึงเห็นควรที่จะทำความเข้าใจในเบื้องต้นนี้ก่อนว่า “มะเม่าหลวง” ที่จะนำมาใช้ ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ คือ *Antidesma Puncticulatum* Miq. หรือ *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. นั่นเอง

ดังข้อความที่ได้กล่าวไว้ในหนังสือเรื่อง คู่มือจำแนกพรรณไม้ โดย ดร.ก่องกานดา ชยามฤต ผู้เชี่ยวชาญด้านพรรณไม้ จากกรมป่าไม้ว่า "ผลงานวิจัยใดๆ ที่เกี่ยวกับพืช ถึงแม้ว่าจะมีหลักการและการวางแผนปฏิบัติการดีเพียงใดก็ตาม ถ้าหากเริ่มต้นด้วยชื่อของพืชที่ผิดพลาด หรือไม่ถูกต้องตรงตามชนิดแล้ว ผลงานวิจัยนั้นย่อมไร้คุณค่าโดยสิ้นเชิง" (ก่องกานดา ชยามฤต, 2545:1)

ทั้งนี้ตามที่ได้บรรยายรายละเอียด ในหัวข้อเรื่องการศึกษาพันธุ์มะเม่านั้น มะเม่าที่มีลักษณะถูกต้องตามลักษณะของมะเม่าหลวง *Antidesma Puncticulatum* Miq. หรือ *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (ชนิดที 14) ที่ได้รับการยืนยัน และตรวจสอบเปรียบเทียบพันธุ์ไม้ (ตามเอกสารที่ ทส 0938.2/952 เรื่อง ขอส่งตัวอย่างเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช จากกลุ่มพฤกษศาสตร์ป่าไม้ ฝ่ายวนวัฒนวิจัยฯ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ได้รับการยืนยันว่า การตรวจสอบเปรียบเทียบพันธุ์ไม้นั้นถูกต้องตรงกัน กับพืชตัวอย่างที่พบ) จะเป็นมะเม่าที่พบอยู่ในบริเวณอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ส่วนมะเม่าที่พบมากในบริเวณจังหวัดสกลนคร และจังหวัดใกล้เคียงนั้น น่าจะมีลักษณะตรงกับมะเม่าที่มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Antidesma bunius* (ชนิดที่ 2a)

อย่างไรก็ดี จากการเดินทางไปสำรวจพื้นที่ในหลายจังหวัดของประเทศไทยแล้วนั้น เช่น จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดสกลนคร จังหวัดนครราชสีมา และการสืบหาข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ใน จังหวัดลำปาง จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดอ่างทอง จังหวัดชลบุรี จังหวัดระนอง จังหวัดตรัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นต้น พบว่าต้นมะเม่าที่มีลักษณะถูกต้อง ตรงตามลักษณะของมะเม่าหลวง *Antidesma Puncticulatum* Miq. หรือ *Antidesma thwaitesianum* Müll.Arg. (ชนิดที่ 14) นั้นมีปรากฏอยู่เพียง 2 ต้นนี้เท่านั้น ดังนั้นเพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยต่อไปในโครงการนี้ จึงได้เลือกเก็บเฉพาะส่วนเปลือก ใบ ผล และเมล็ด จากต้นมะเม่า 2 ต้นนี้เท่านั้น

สำหรับส่วนรากนั้นเนื่องจากได้พิจารณาดูแล้วว่าหากต้องนำรากไปใช้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อาจจะทำให้ต้นไม้อ่อนแอลงจนถึงขั้นล้มตายได้ จึงได้เลือกใช้มะเม่าที่สามารถจัดหาได้จากมะเม่าที่พบอยู่ในจังหวัดสกลนครแทน แต่กระนั้นก็ตามผู้วิจัยต้องใช้เวลามากกว่า 3 เดือน ในการสืบเสาะและค้นหา รวมถึงการติดต่อประสานงานเพื่อให้ได้ส่วนรากมาใช้ในการศึกษาวิจัย เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วผู้เป็นเจ้าของต้นมะเม่าเหล่านั้นเกรงว่า การไปขุดเอารากมา อาจจะเป็นอันตรายต่อต้นมะเม่าได้ อย่างไรก็ดีในท้ายที่สุดแล้วก็ได้เสาะหาจนพบต้นมะเม่าที่ผู้ซึ่งเป็นเจ้าของไม่ต้องการแล้ว จึงได้ติดต่อและได้รับส่วนรากดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

ปัญหาที่พบในการทำวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงการขาดหลักการที่ดีและวิธีการจัดเก็บข้อมูลของพันธุ์ไม้อย่างเป็นระบบ ตามหลักวิชาและมาตรฐานสากล ซึ่งทำให้เกิดความบกพร่องของข้อมูลและเกิดความเข้าใจผิดในการศึกษา ค้นคว้า และวิจัย รวมถึงการอนุรักษ์และขยายพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต นับเป็นความสูญเสียอย่างประมาณค่ามิได้ ดังนั้นจึงควรได้มีการจัดทำระบบฐานข้อมูลพันธุ์ไม้ ตามหลักวิชาและมาตรฐานสากล รวมทั้งการจัดให้มีเพียงสถาบันเดียวเป็นผู้ซึ่งรับผิดชอบและทำหน้าที่ ที่เกี่ยวข้องในงานด้านนี้โดยตรง เพื่อมิให้เกิดปัญหาขึ้นอย่างที่เห็นในปัจจุบัน

อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ในการสำรวจหาสารออกฤทธิ์ในมะเม่านั้น น่าจะได้มีการศึกษาต่อไปอีกในมะเม่าอีกพันธุ์หนึ่ง ที่พบมากในจังหวัดสกลนครด้วยเช่นกัน ในโอกาสต่อไป ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า ส่วนของรากมะเม่าพันธุ์ดังกล่าวนั้น มีสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเช่นกัน แสดงได้ถึงศักยภาพที่เพียงพอและความเหมาะสมที่จะเสนอให้เป็นโครงการวิจัยในครั้งต่อๆ ไป สำหรับพันธุ์มะเม่าหลวงนั้น ควรจะได้มีการศึกษากันต่อไป ทั้งในแง่ของการอนุรักษ์ และขยายพันธุ์พืชไปพร้อมๆกันด้วย

2. การสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบในส่วนต่าง ๆ ของมะเม่าหลวง

จากการศึกษาส่วนต่างๆ เช่น เปลือก ใบ ผลสุก เมล็ด และราก ของมะเม่าหลวง เพื่อสำรวจและตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบ ที่สามารถแยกได้จากส่วนสกัดหยาบเหล่านั้น พบว่าส่วนรากและผล มีสารประกอบที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยที่การศึกษาส่วนราก

นั้น เมื่อนำมาสกัดแล้ว ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนและส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซีเตท ได้แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50} คือ 30.49 และ 14.59 μg/mL ตามลำดับนั้น หลังจากส่วนสกัดทั้งสองมาแยกโดย ใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟี และหาโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ได้พบสารประกอบ Stigmasterol และสารประกอบประเภท ฟลาโวนอยด์อีกอย่างน้อย 1 ชนิด ซึ่งได้แก่ สารประกอบ 5,4'-Dimethylflavone (**H**)

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) เพื่อระบุสารออกฤทธิ์ที่มีในส่วนของพืช ได้แสดงให้เห็นว่า สารประกอบ 5,4'-Dimethylflavone (**H**) นั้น เป็นสารออก-ฤทธิ์ เนื่องจากสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์นี้ มีอยู่ในส่วนรากของพืช ในสัดส่วนที่สูงกว่าสารประกอบประเภทอื่นๆ อย่างไรก็ตาม สำหรับสารประกอบ Stigmasterol นั้น ไม่ปรากฏว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งแต่อย่างใด

ทั้งนี้อาจจะยังมีสารประกอบอื่นๆ ในส่วนรากที่สามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เช่นกัน ทั้งนี้เห็นควรว่า น่าจะต้องมีการศึกษาอย่างลงลึกในรายละเอียด ในแง่ส่วนของโครงสร้าง ที่มีผลต่อฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง รวมถึงศึกษาความเป็นได้ ในการนำสารประกอบดังกล่าว มาใช้ประโยชน์ได้จริง ในโครงการวิจัยต่อๆ ไป

สำหรับส่วนผลสุกของมะเม่า ซึ่งมีสีแดงอมม่วงนั้น เมื่อได้นำไปแยกโดยใช้เรซิน Amberlite XAD-7 ตามด้วยการแยกโดยใช้เรซิน Sephadex LH-20 และในขั้นตอนสุดท้ายคือการแยกด้วยHPLC แล้ว สามารถแยกสารประกอบประเภทแอนโทรไซยานินออกมาได้ ซึ่งจากการศึกษาโดยใช้ NMR นั้น ได้เลือกใช้ตัวทำละลายคือ DMSO-d6 ที่ทำให้เป็นกรด โดยการเติม Trifluoroacetic acid ลงไป เพื่อทำให้สารประกอบอยู่ในรูปของ flavylium cation

ผลของการศึกษาดังกล่าว สามารถระบุได้ว่า สารประกอบ **F** ที่แยกออกมาได้นั้น เป็นสารประกอบประเภทแอนโทรไซยานิน ซึ่งมีโครงสร้างเป็น Delphinidin (Dp) สารประกอบนี้ได้รู้จักกันโดยแพร่หลายว่า มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Paganga G et al., 1999 :53-62; Einbond et al., 2004:23-27) ซึ่งสารประกอบที่แยกได้นั้น ก็น่าจะที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน ส่วนจะมากน้อยเพียงใดนั้น ขณะนี้กำลังได้รับการตรวจสอบเพื่อหาค่า IC_{50} ซึ่งเมื่อได้รับผลการทดสอบดังกล่าวแล้ว จะได้จัดส่งไปให้เป็นข้อมูลเพิ่มเติม

สำหรับส่วนเปลือกที่เมื่อนำมาศึกษาแล้ว พบว่าส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของส่วนเปลือกได้แสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง (NCI-H187) โดยมีค่า IC_{50} เป็น 30 μg/mL และเมื่อนำมาแยก โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตรกราฟีแล้ว ยังพบว่า สามารถแยกสารประกอบประเภทฟลา-โวนอยด์ ได้อย่างน้อย 3 ชนิด (สารประกอบ **A, B** และ **C**) และสารประกอบประเภทเทอร์พีนได้อีกอย่างน้อย 2 ชนิด (สารประกอบ **D** และ **E**) โดยการศึกษาด้วย NMR ได้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ **A** นั้น จะมีโครงสร้างเหมือนกับสารประกอบ **H** แต่สาเหตุของสลายตัว หรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ **A** ไปจากเดิมนั้น ขณะนี้ยังไม่สามารถระบุลงไปให้ชัดเจนได้ แต่อย่างไรก็ดี คาดว่าน่าจะเป็นเหตุอันเกี่ยวเนื่องมาจาก การเก็บรักษาสารประกอบนี้ในระหว่าง

ขั้นตอนการหาโครงสร้าง ส่วนการที่สารประกอบ **B** และ **C** ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ โดยที่พบว่า สัดส่วนของสาร C ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 1 อาทิตย์ อาจเนื่องมาจาก สารประกอบ **B** อยู่ในสภาวะสมดุลกับสารประกอบ **C** ทำให้สามารถตรวจพบโครงสร้าง ของสารประกอบทั้งสองได้ หรือ อาจจะเกิดจากปัจจัยภายนอก ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทั้งนี้ควรจะได้มีการศึกษาสาเหตุ และปัจจัยในการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบประเภทเทอร์พีนที่สามารถแยกได้จาก ส่วนเปลือกนั้น ไม่ปรากฏว่าแสดงฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็ง ส่วนสารประกอบประเภทฟลา-โวนอยด์ **A**, **B** และ **C** นั้น ไม่สามารถนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากสารประกอบ **A** ได้สลายตัวไป ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งหากไม่เกิดการสลายตัวดังกล่าว ก็มีความเป็นไปได้สูง ที่จะเป็นสารออกฤทธิ์ในส่วนเปลือกนี้ได้เช่นกัน เนื่องจากได้ตรวจพบว่า สารประกอบ **A** มีโครงสร้างทางเคมีเช่นเดียวกับสารประกอบ **H** ที่ได้จากส่วนราก

สำหรับการเปลี่ยนแปลงในเชิงโครงสร้าง ของสารประกอบ **B** และ **C** เป็นข้อจำกัดที่ ทำให้ ไม่สามารถระบุฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารประกอบทั้งสองได้อย่างถูกต้อง อย่างไรก็ตาม สัดส่วนของสารประกอบที่สามารถแยกออกมาได้ จากส่วนเปลือกนั้น มีเพียงประมาณ 0.0005% เท่านั้น ซึ่งเมื่อได้พิจารณาแล้ว ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ส่วนเปลือกของมะเม่านี้แม้จะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพบ้าง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของสารประกอบที่จะได้รับนั้น อาจจะไม่คุ้มค่ากับเวลา และงบประมาณที่เสียไป ในการแยกสารออกฤทธิ์ เพราะฉะนั้นโอกาสที่จะได้ใช้ประโยชน์จริง เพื่อผลิตตัวยาสำคัญน่าจะไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์

เนื่องจากส่วนของใบ และเมล็ดนั้น ไม่ได้แสดงศักยภาพ ในการมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ซึ่งเป็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ที่อยู่ในขอบเขตการวิจัยของโครงการนี้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยที่ ส่วนของพืชเหล่านี้ อาจจะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่ไม่ได้ทดสอบในคราวนี้ได้เช่นกัน

ข้อที่ควรจะต้องพิจารณา อีกประการหนึ่งในที่นี้ก็คือ ผลการทดสอบที่ได้มานั้น จะเป็นผลที่ตรวจวัดได้ในสภาวะที่ทำการทดสอบเท่านั้น การที่สารไม่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ อาจเป็นไปได้จากหลายปัจจัย เช่น สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ หรือ คุณภาพของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ หรือ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ และสภาวะแวดล้อมของการเก็บรักษาสารประกอบ เป็นต้น และเนื่องจากผู้วิจัย ไม่ได้เป็นผู้ทำการทดสอบด้วยตนเอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่สามารถรับผิดชอบต่อความผิดพลาดที่เกิดขึ้นได้ในระหว่างการทดสอบ อันจะมีผลกระทบกับผลการทดสอบที่ได้ และไม่สามารถรับผิดชอบต่อความเสียหายใดๆ อันเกิดจากการนำผลดังกล่าวไปใช้ หรืออ้างอิงในรูปแบบต่างๆ

สุดท้ายนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมา ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพ ในการนำส่วนรากและผลของมะเม่าไปศึกษาต่อในรายละเอียด โดยอาจจัดให้มีการศึกษาในแนวทางอื่นๆควบคู่กันไป เพื่อให้เกิดการพัฒนาในวงการวิชาการ เช่น อาจมีการศึกษา และวิจัยเพิ่มเติม เพื่อดัดแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม เพื่อให้มะเม่าสามารถผลิตสารที่ต้องการออกมา ในปริมาณที่มากกว่า

ที่มีในธรรมชาติ และเนื่องจากมะเม่านี้เป็นพืชป่า และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จากที่ผู้วิจัยได้พบก็คือ แม้ว่าจะเป็นมะเม่าชนิดเดียวกัน แต่ลักษณะของผล ใบ หรือลักษณะการติดผล และการออกผลก็แตกต่างกัน ซึ่งหากได้มีการศึกษา ถึงปัจจัยที่ควบคุม ความแตกต่างดังกล่าวอย่างละเอียด และลึกลงไปก็อาจจะได้ข้อมูลสำคัญที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และสงวนพันธุ์พืชชนิดนี้ได้

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ได้จัดพิมพ์ menuscript แล้ว พร้อมที่จะส่งไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

2. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

2.1 ในเชิงสาธารณะ

ได้มีการสร้างเครือข่ายงานวิจัย ซึ่งมีการประสานงาน ระหว่างหน่วยงานราชการ ด้านการเกษตร ในระดับสำนักงานเกษตรจังหวัด และเกษตรอำเภอ รวมทั้งหน่วยงานป่าไม้ต่างๆ และได้มีการสร้างความร่วมมือกับสถาบันการศึกษา เช่น สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร และนักวิชาการจากสถาบันการศึกษาอื่น เช่น จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และยังได้มีการสร้างสัมพันธ์ และความร่วมมือกัน กับบรรดาเกษตรกรในพื้นที่โดยตรง

ในระหว่างการศึกษาวิจัยโครงการนี้ ได้มีโอกาสพบปะ แลกเปลี่ยนความคิดเห็นในระหว่างกลุ่มบุคคลต่างๆ ทำให้เกิดกระแสความสนใจในพืชมะเม่านี้ ในกลุ่มนักวิชาการ นักวิชาชีพ กลุ่มเกษตรกร และประชาชนทั่วไป ให้ได้มีโอกาสรู้จักพืชชนิดนี้มากขึ้น และยังทำให้ตระหนักถึง ศักยภาพในการใช้ประโยชน์ของมะเม่า ซึ่งจะทำให้เกิดกระแส ในการสงวนรักษาและขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ ต่อไปได้ในอนาคต

2.2 ในเชิงวิชาการ

ได้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ ที่เป็นประโยชน์ของพืชชนิดนี้ พร้อมทั้งทำให้เกิดความกระจ่าง ขจัดความสับสน ในเรื่องพันธุ์ของมะเม่าหลวง ซึ่งจะทำให้การศึกษาวิจัย และอ้างอิงข้อมูลต่อไปในอนาคต มีมาตรฐาน ถูกต้องตามหลักวิชา และที่ยอมรับกัน ในวงการวิชาการในระดับสากล

3. อื่นๆ

จะจัดให้มีการเข้าร่วมเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการทั้งในประเทศและต่างประเทศในโอกาสต่อๆไป

เอกสารอ้างอิง

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 2539. ผลการวิเคราะห์ผลมะเม่าสด กรมวิทยาศาสตร์บริการ. อ้างถึงใน อร่าม คุ้มกลาง และวินัย แสงแก้ว. 2543. งานประดิษฐ์คิดค้น ผลิตภัณฑ์จากพืชตระกูลมะเม่า (STILAGINACEAE) สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร หน้า 71.

ก่องกานดา ชยามฤต. 2545. คู่มือจำแนกพรรณไม้ ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ หน้า 1-43.

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2539. สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา ภาควิชาเภสัชพฤกษ-ศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ หน้า 38-39.

เต็ม สมิตินันทน์ 2544. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพฯ หน้า 40-41.

สำนักงานสถิติกระทรวงสาธารณสุข 2544 สำนักวิจัยและแผนสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ

อร่าม คุ้มกลาง และวินัย แสงแก้ว. 2543. งานประดิษฐ์คิดค้น ผลิตภัณฑ์จากพืชตระกูลมะเม่า (STILAGINACEAE) สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร สถาบันเทคโนโลยี-ราชมงคล วิทยาเขตสกลนคร หน้า 1-18.

Arbain, D.; Taylor, W. C. Cyclopeptide Alkaloids from *Antidesma Montana*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1263-1266.

Bringmann, G.; Schlauer, J.; Rischer, H.; Wohlfarth, M.; Muhlbacher, J.; Buske, A.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Adam, G. Revised Structure of Antidesmone, an Unusual Alkaloid from Tropical Antidesma Plants (Euphorbiaceae). *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3691-3696.

Buske, A.; Busemann, S.; Muhlbacher, J.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Bringmann, G. Adam, G. Antidesmone, a Novel Type Isoquinoline Alkaloid from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1079-1086.

Burske, A; Schmidt, J.; Porzel, A.; Adam, G. Alkaloidal, Megastigmane and Lignan Glucosides from *Antidesma membranaceum* (Euphorbiaceae). *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *18*, 3537-3543.

Buske, A.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Adam, G. Benzopyranones and Ferulic Acid Derivatives from *Antidesma membranaceum*. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1385-1388.

Dey, P.M.; Harborne, J. B. Methods in Plant Biochemistry **1989**, Vol.1 Academic Press, London

Dey, P.M.; Harborne, J. B. Methods in Plant Biochemistry **1989**, Vol.7 Academic Press, London

Einbnd, L.S.; Reynertson, K. A.; Luo, X.-D.; Basile, M. J.; Kenelly, E. Anthocyanin Antioxidant from Edible Fruits *J. Food Chemistry* **2004**, *84*, 23-28.

Gabrielska, J.; Oszmianski, J.; Komorowska, M.; Langner, M. Anthocyanin Extracts with Antioxidant and Radical Scavenging Effect. *Z Naturforsch C* 1999, *54,* 319-324.

Harborne, J. B. The Flavonoids. **1994**, Chapman&Hall, London

Harvey, A. L. Drugs from natural products pharmaceuticals and agrochemicals. **1993**, Ellis Horwood Limited, England pg. 3.

Hoffmann, P. Checklist of the Genus Antidesma (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thai.For.Bull.* **2000**, *28*, 139-156.

KähnÖnen, M. P.; Hopia, A. I.; Heinonen, M. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity *J. Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 4076-4082.

KähnÖnen, M. P.; Hopia, A. I.; Ollilainen, V.; Heinonen, M. Berry Anthocyanin: Isolation, Identification and Antioxidant Activities *J.Sci Food Agric.* **2003**, *83*, 1403-1411.

Kikuchi, H.; Tensho, A.; Shimizu, I.; Shikowa, H.; Kuno, A.; Yamada, S.; Fujiwara, T.; Tomota, K.-i. Lupeolactone, A New β-Lactone from *Antidesma Pentandrum Merr*. *Chem. Lett.***1983**, 603-606.

Kuskoski, E, M.; Vega, J. M.; Rios, J. J.; Fett, R. Characterization of Anthocyanin from the Fruits of Baguacu (*Eugienia umbelliflora Berg*) *J. Agric Food Chem.* **2003**, *51*, 5450-5454.

Matsumoto, H.; Hanamura, S.; Kawakami, T.; Sato, Y.; Hirayama, M. Preparative Scale Isolation of Four Anthocyanin Components form Black Currant (*Ribe nigrum* L.) fruits *J. Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 1541-1545.

Paganga G.; Miller, N.; Rice-Evans, C. The Polyphenolic Content of Fruit and Vegetables and Their Antioxidant Activities. What does a serving constitute *Free. Radic. Res.* **1999**, *30*, 53-62.

Pietta, P.-G. Flavonoids as Antioxidants *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.

Plumb, J. A.; Milroy, R.; Kaye, S. B. Effext of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-Based Assay *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4435-4440.

Pouchert, C. J.; Behnke, J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FT-NMR Spectra **1993**, 1st Edition Aldrich Chemical Company, Bloomington, Indiana, U.S.A.

Rizvi, S. H.; Shoeb, A.; Kapil, R. S.; Popli, S. P. Two Diuretic Triterpenoids from *Antidesma Menasu*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2409-2410.

Rizvi, S. H.; Shoeb, A.; Kapil, R. S.; Popli, S. P. Antidesmanol - a New Pentayclic Triterpenoid from *Antidesma menasu* Miq. ex. Tul. *Experientia* **1980**, *36*, 146-147.

Skehan P.; Ritsa, S.; Dominic, S. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening *J. Natl. Cancer. Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.

Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.

Stintzing, F. C.; Stintzing,R. C.; Frei, B.; Wrolstad, R. E. Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments *J. Argic. Food. Chem.* **2002**, *50*, 6172-6181.

Wang, H.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M.; Booren, A.; Gray, J. I. Antioxidant Polyphenols from Tart Cherries (*Prunus cerasus*) *J. Argic. Food. Chem.* **1999**, *47*, 840-844.

Wang, S. Y., Stretch, A. W. Antioxidant Capacity in Cranberry Is Influenced by Cultivar and Storage Temperature *J. Agric Food Chem.* **2001**, *49*, 969-74.

Yan, X.; Murphy, B. T.; Hammond, G. B.; Vinson, J. A.; Neto, C. C. Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*) *J. Argic. Food. Chem.* **2002**, *50*, 5844-5849.

Yoshida, T;Namba, O.; Lu, C.-F.; Yang, L.-L.; Okuda, T. Tannins of Euphorbiaceous Plants. X. Antidesmin A, a New Dimeric Hydrolyzable Tannin from *Antidesma pentandrum* var. *barbatum. Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 338.