

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB ของเอื้องดอกมะขาม

Chemical Constituents of *Dendrobium venustum* and Cytotoxic Activity

Against KB oral cavity cancer cell

ประภาพรพรณ สุขพรณ (Prapapun Sukphan)* บุญชู ศรีตุลารักษ์ (Boonchoo Sritularak)**

กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์ (Kittisak Likhitwitayawud)***

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาเพื่อสกัดแยกสารบริสุทธิ์สิ่งสกัดหยาบในชั้นเมทานอลจากเอื้องดอกมะขาม และทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 3 ชนิด คือ flavanthrinin, gigantol และ batatasin III ซึ่งสารทั้งหมดพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปี (NMR, MS) ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลที่เคยมีรายงานมาก่อน เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB พบว่าสาร flavanthrinin และ batatasin III มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับปานกลาง โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ 50% (IC_{50}) คือ 64.32 และ 81.67 μ M ตามลำดับ ซึ่งมีหาค่าควบคุมเชิงบวกคือ ellipticine และ doxorubicin โดยมีค่า IC_{50} คือ 4.83 และ 1.93 μ M ตามลำดับ

ABSTRACT

The main objective of this study was to isolate active compounds of methanol extract from *Dendrobium venustum* and evaluated for cytotoxic activity against KB-oral cavity cancer cell. This extract led to the isolation of three known compounds which included flavanthrinin, gigantol and batatasin III. Their structures were determined by spectroscopic analysis (NMR, MS) and by comparison with previously reported data. These compounds were evaluated for cytotoxic activity against KB-oral cavity cancer cell. Flavanthrinin and batatasin III showed moderate cytotoxic activity with IC_{50} values of 64.32 and 81.67 μ M, respectively. Ellipticine and doxorubicin were used as positive controls with the IC_{50} values of 4.83 and 1.93 μ M, respectively.

คำสำคัญ: เอื้องดอกมะขาม ฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์

Key Words: *Dendrobium venustum*, Cytotoxic activity

* นิสิต หลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โรคมะเร็ง คือโรคที่เกิดจากเซลล์ของร่างกายมีความผิดปกติที่สารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วมากกว่าปกติ ดังนั้นอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อผิดปกติและในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้นเนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ถ้าเซลล์พวกนี้เกิดอยู่ในอวัยวะใดก็จะเรียกชื่อมะเร็งตามอวัยวะนั้น เช่น มะเร็งช่องปาก มะเร็งปอด สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งยังไม่ทราบแน่ชัดแต่พบว่า มีปัจจัยหลายอย่างส่งเสริมให้เกิดโรคมะเร็ง ดังนี้ 1. เชื้อโรคบางชนิด เช่น เชื้อไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก และมะเร็งโพรงจมูก หรือเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในกระเพาะอาหารซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร 2. พยาธิใบไม้ในตับก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับและทางเดินน้ำดี 3. สารเคมีหลายชนิดก่อให้เกิดมะเร็ง เช่น นิเกิลและโครเมียม 4. ขบวนการเมแทบอลิซึม เช่น ยารักษาโรคมะเร็งบางชนิด 5. การสูบบุหรี่และการดื่มสุราเป็นปัจจัยเสี่ยงหลักของมะเร็งช่องปาก การรักษาโรคมะเร็ง มีหลายวิธี เช่น การผ่าตัด เอาเนื้องอกออกจากร่างกาย การฉายแสงโดยใช้รังสีรักษาเพื่อทำลายเซลล์มะเร็ง การให้เคมีบำบัดหรือยาที่ทำลายเซลล์มะเร็ง การให้ยาเพื่อเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตซึ่งส่วนใหญ่จะใช้รักษามะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก การรักษาอื่นๆ เช่น การให้ interferon เพื่อทำลายเซลล์ (วรชัย, 2541) ในปัจจุบันจึงได้มีการค้นหายาจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเพื่อลดอาการข้างเคียงต่างๆและนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือเป็นแนวทางในการพัฒนายาใหม่จากสมุนไพร เช่น paclitaxel (Taxol®) จากเปลือกของต้นยิวและ vincristine จากแฉ่งพวยฝรั่ง (Georg, et al., 1994)

Dendrobium venustum เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae มีชื่อไทยคือ เอื้องดอกมะขาม (แพร่), เอื้องข้าวเหนียวลิง (กลาง), เอื้องดอกขาม (แพร่, เหนือ)

มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ ลำต้นมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหรือเป็นลำรูปไข่แกมรูปรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ยาว 7-10 ซม. ใบเป็นรูปหอก แผ่นใบบาง กว้าง 1.5 ซม. ยาว 7-9 ซม. จำนวน 3-5 ใบ ดอกออกเป็นช่อใกล้ปลายยอด จำนวน 10-20 ดอก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีขาวแกมเหลือง กลีบปากสีเหลือง และมีขีดสีน้ำตาล (เต็ม, 2544; นันทิยา, 2555)

เมื่อนำสิ่งสกัดในชั้นเมทาโนลของเอื้องดอกมะขามที่มีฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB มาแยกต่อโดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีได้เป็น 8 ส่วน คือ A-H พบว่า ส่วน F มีฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งประมาณ 90% ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยพบว่ายังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับสารสำคัญและการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชต้นนี้มาก่อน จึงมีความสนใจที่จะสกัดแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งของเอื้องดอกมะขาม หากสารดังกล่าวมีฤทธิ์ดีอาจนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และยังเป็นที่สนใจต่อการศึกษาคีโมแทกซ์โนมี (chemotaxonomy) ของพืชสกุล *Dendrobium* ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. สกัดแยกสารบริสุทธิ์จากต้นเอื้องดอกมะขาม (*Dendrobium venustum*)
2. พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้
3. ทดสอบฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ของสารที่แยกได้

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช ชื่อเอื้องดอกมะขามจากสวนจตุจักร กรุงเทพมหานคร พิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชแห้งของกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช
2. การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ (ดูในรูปที่ 1)

3. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคสเปกโตรสโกปี ได้แก่ Mass spectrometry (MS) โดยเครื่องมือ ESI Mass Spectrometer ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy โดยเครื่องมือ INOVA-500 ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลประกอบกันระหว่าง $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy ก็จะทำให้ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

4. การทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์ ผู้วิจัยนำสารสกัดของพืชตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ด้านมะเร็งที่ห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Bioassay Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) จากนั้นแยกสารสกัดออกเป็น fraction และนำแต่ละ fraction ไปตรวจหาฤทธิ์ด้านมะเร็งอีกครั้ง นำ fraction ที่มีฤทธิ์คิมาแยกจนได้สารบริสุทธิ์ หลังจากพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีเรียบร้อยแล้วก็นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปตรวจสอบหาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์อีกครั้งโดยผลการทดลองที่ได้จะแสดงออกมาในรูปค่า IC_{50}

หลักการทดสอบการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยใช้วิธีทดสอบคือ Resazurin microplate assay (REMA) มีสารควบคุมผลบวกคือ ellipticine และ doxorubicin และ สารควบคุมผลลบคือ 0.5% DMSO โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

เซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็น cell lines ของเซลล์มะเร็งในมนุษย์ คือ KB cell line (epidermoid carcinoma of oral cavity, ATCC CCL-17) วิธีการทดสอบจะใช้วิธีการที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (O'Brien *et al.*, 2000) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. นำเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตในระยะ logarithm มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการคือต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB-oral cavity cancer) เข้มข้น 7×10^4 cell/mL ในอาหารใหม่

2. นำตัวอย่างปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ละลายใน 5% DMSO และนำเซลล์ปริมาตร 45 ไมโครลิตร เติมนลงในหลุมทดลองขนาด 384 หลุมต่อ plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C มี CO_2 เข้มข้น 5%

3. หลังจากบ่มเพาะเป็นเวลา 3 วัน จะมีการเติมสาร resazurin ความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมและนำ plate ไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชม.

4. วัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) สามารถคำนวณได้ตามสมการ

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [1 - (\text{FU}_T / \text{FU}_C)] \times 100$$

เมื่อ FU_T และ FU_C คือ ค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์จากสถานะที่เดิมและไม่ได้เติมสารทดสอบตามลำดับ

กราฟการตอบสนองต่อขนาดสารที่ให้ (Dose response curve) สามารถทำได้จากการเตรียมสารตัวอย่าง 6 ความเข้มข้นโดยการเจือจางสารตัวอย่างทดสอบสองเท่าและค่าความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% หรือค่า IC_{50} สามารถคำนวณได้จากการใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านมะเร็งของเอื้องดอกมะขาม โดยใช้เทคนิคทาง chromatography ได้แก่ column chromatography และ gel filtration chromatography นั้น สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 3 ชนิด คือ flavanthrin (1), gigantol (2) และ batatasin III (3) ตามลำดับ

สาร 1: (flavanthrinin) มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล ละลายได้ใน acetone มีสูตรโครงสร้าง $C_{15}H_{12}O_3$ ESI-MS มี pseudomolecular ion $[M+H]^+$ m/z 241 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 4.15 (3H, s, MeO-4), 6.98 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-3), 7.06 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-1), 7.08 (1H, dd, J = 7.5, 2.5 Hz, H-6), 7.40 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-8), 7.42 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-5), 7.49 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-10), 7.62 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-9); ^{13}C NMR (125 MHz, acetone- d_6) δ : 58.5 (MeO-4), 102.5 (C-3), 107.7 (C-1), 114.0 (C-4a), 116.9 (C-6), 119.9 (C-4b), 121.0 (C-8), 126.9 (C-10), 127.4 (C-5), 129.7 (C-9), 134.9 (C-8a), 137.0 (C-10a), 155.2 (C-7), 156.3 (C-2), 157.3 (C-4) (Zhang *et al.*, 2008)

สาร 2: (gigantol) มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล ละลายได้ใน acetone มีสูตรโครงสร้าง $C_{16}H_{18}O_4$ ESI-MS มี pseudomolecular ion $[M+H]^+$ m/z 275 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 2.78 (4H, m, H_2 - α , H_2 - α'), 3.69 (3H, s, MeO-3'), 3.78 (3H, s, MeO-3), 6.22 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-2), 6.28 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-4), 6.30 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-6), 6.64 (1H, dd, J = 8.0, 1.5 Hz, H-6'), 6.69 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.79 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'); ^{13}C NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 37.9 (C- α'), 39.0 (C- α), 55.2 (MeO-3'), 56.1 (MeO-3), 99.6 (C-4), 106.2 (C-2), 108.8 (C-6), 112.5 (C-2'), 115.5 (C-5'), 121.5 (C-6'), 134.0 (C-1'), 145.1 (C-4'), 145.5 (C-1), 148.0 (C-3'), 159.2, (C-5), 161.8 (C-3) (Yegao *et al.*, 2007)

สาร 3: (batatasin III) มีลักษณะเป็นผลึกสีน้ำตาล ละลายได้ใน acetone มีสูตรโครงสร้าง $C_{15}H_{16}O_3$ ESI-MS มี pseudomolecular ion $[M+H]^+$ m/z 245 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 2.80 (4H, br s, H_2 - α , H_2 - α'), 3.70 (3H, s, MeO-3), 6.23 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-2), 6.30 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-4), 6.32 (1H, t, J = 2.0 Hz, H-6), 6.64 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-4'), 6.70 (1H, br d, J = 8.0 Hz, H-6'), 6.71 (1H, d, J = 2.0

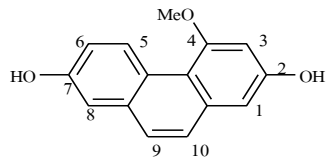
Hz, H-2'); ^{13}C NMR (500 MHz, acetone- d_6) δ : 38.2 (C- α), 38.5 (C- α'), 55.3 (MeO-3), 99.7 (C-4), 106.2 (C-6), 108.7 (C-2), 113.6 (C-4'), 116.2 (C-2'), 120.4 (C-6'), 130.0 (C-5'), 144.3 (C-1'), 145.0 (C-1), 158.2 (C-3'), 159.2 (C-5), 161.8 (C-3) (Kusum *et al.*, 1986)

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB พบว่า สาร (1) และ (3) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB (ดูตารางที่ 1) โดยที่ความเข้มข้น 50 $\mu g/ml$ ของ flavanthrinin (1) และ batatasin III (3) นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 89.77%, และ 97.76% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50% (IC_{50}) พบว่า flavanthrinin (1) และ batatasin III (3) มีค่า IC_{50} 64.32 และ 81.67 μM จากการทดลองจึงสามารถสรุปได้ว่า สาร flavanthrinin (1) และ batatasin III (3) มีฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากชนิด KB ในระดับปานกลาง

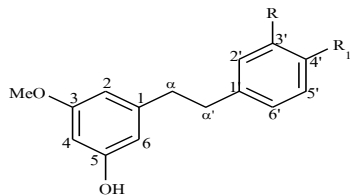
ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาพืชสมุนไพรชนิดนี้เป็นสารต้านมะเร็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

ตารางที่ 1 ฤทธิ์เป็นพืชต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB ของสารที่แยกได้

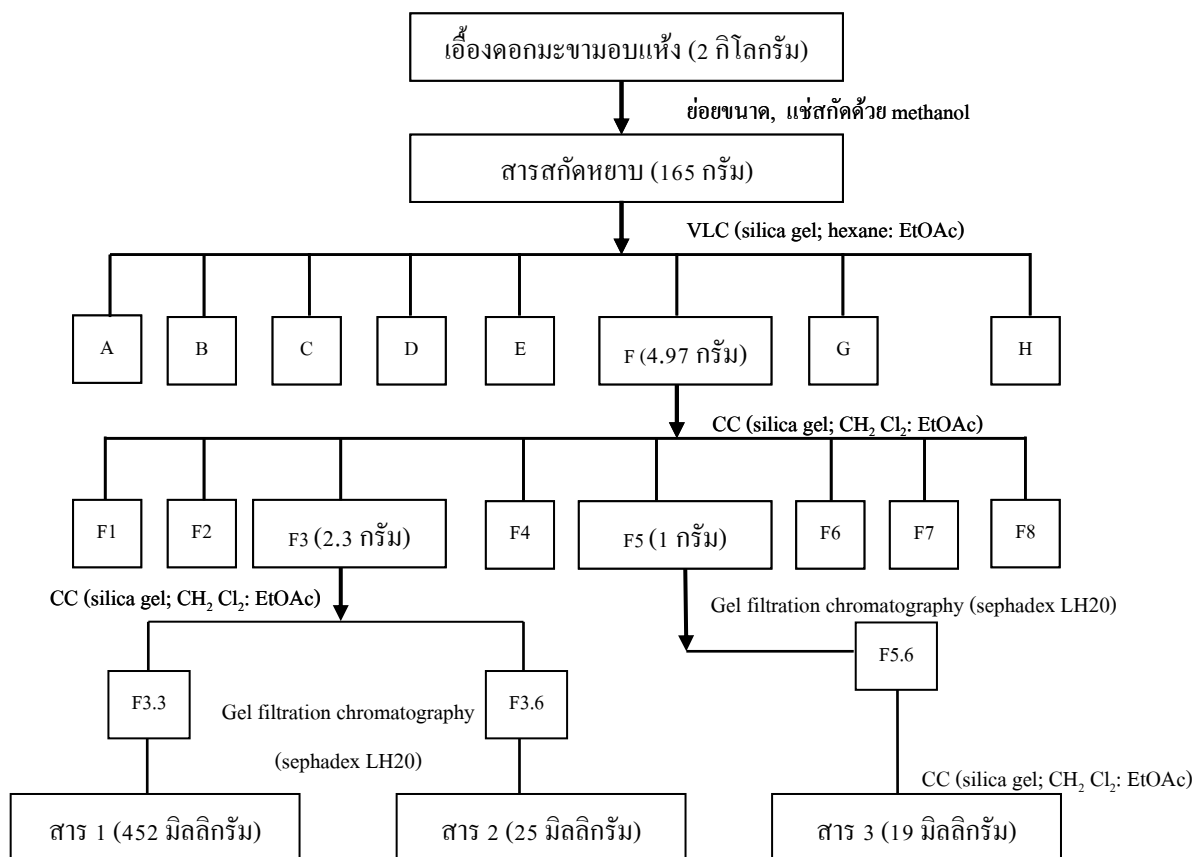
ชื่อสาร (ความเข้มข้น)	% Inhibition	IC_{50} (μM)
Flavanthrinin (1) (50 $\mu g/mL$)	89.77 %	64.32
Gigantol (2) (50 $\mu g/mL$)	10.79 %	-
Batatasin III (3) (50 $\mu g/mL$)	97.76 %	81.67
Ellipticine (5 $\mu g/mL$)	99.04 %	4.83
Doxorubicin (5 $\mu g/mL$)	73.25 %	1.93



Flavanthrinin (1)



	R	R ₁
Gigantol (2)	OMe	OH
Batatasin III (3)	OH	H



รูปที่ 1 ขั้นตอนการแยกสกัดสารบริสุทธิ์จากเอื้องดอกมะขาม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์
จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.
กรุงเทพมหานคร. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้
สำนักวิชาการป่าไม้. กรมป่าไม้.
นันทิยา วรรณะภูติ. 2555. ดอกเอื้อง.
กรุงเทพมหานคร. โอเดียนสโตร์.
วรชัย รัตนธรร. 2541. ตำราการรักษาโรคมะเร็ง 2.
พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โฮลิสติก แพบลิช
ซึ่งจำกัด.
Georg, GI., Chen, TT., Ojima, I., and Vyas, DM.
1994. Taxane anti cancer Agents. American
Chemical Society. 277: 665-667.

Kusum, S., and Dinesh, KK. 1986. Phenolic
constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry*.
25:499-502.
O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pogan, F. 2000.
Investigation of the Alamar Blue (resazurin)
fluorescent dye for the assessment of
mammalian cell cytotoxicity. *European Journal
of Biochemistry*. 267: 5421-5426.
Yegao C., Junju X., Hong Y., Chen Q., Yanli Z.,
Liqin W., *et al.* 2007. Cytotoxic phenolic from
Bulbophyllum odoratissimum. *Food Chemistry*.
107: 169-173.
Zhang, X., Xu, JK., Wang, NL., *et al.* 2008.
Antioxidant phenanthrenes and lignans from
Dendrobium nobile. *Journal of Chinese
Pharmaceutical Sciences*. 17:314-318.