

## ผลเบื้องต้นของสารสกัดยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) ต่อฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อรา และการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC

ชวลิต โยงรัมย์<sup>\*</sup>, สริน ทัดทอง<sup>†</sup>, นาถธิดา วีระปรียากร<sup>‡</sup>, เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง<sup>‡,§</sup>

<sup>\*</sup> หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>†</sup> สาขาวิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดนครนายก 26120

<sup>‡</sup> สาขาวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>§</sup> ผู้รับผิดชอบบทความ: pploenthip@kku.ac.th

### บทคัดย่อ

ยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G. Don) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้ในหลาย ๆ ประเทศในทวีปเอเชีย ในประเทศไทยมีการใช้ยางนาในการรักษาโรคผิวหนัง โรคไขข้อ โรคตับ เป็นต้น ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อรา รวมไปถึงศึกษาองค์ประกอบจำพวกสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC ของสารสกัดใบ เปลือก และ กิ่งของยางนา พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยยับยั้ง เซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Jurkat) ได้ดีที่สุด รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก (HeLa) และมะเร็งตับ (HepG2) ตามลำดับ อีกทั้ง ยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง (Vero) สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อราพบว่า สารสกัดใบและเปลือกสามารถ ยับยั้งการเจริญได้เพียงเชื้อ *T. mentagrophytes* และสารสกัดยางนาทั้ง 3 ส่วนไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคลากและ ก่อรังแคอื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบเมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPLC พบสาร gallic acid ในใบ เปลือก และกิ่ง สาร protocatechuic acid ในเปลือก และพบสาร *p*-coumaric acid และ ferulic acid ในกิ่ง การศึกษานี้ให้ข้อมูลเบื้องต้น ที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดยางนาที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ทางการแพทย์ในการรักษาโรคมะเร็ง และเป็นการส่งเสริมการใช้พืชพื้นบ้านในประเทศไทย

**คำสำคัญ:** ยางนา, ฤทธิ์ต้านมะเร็ง, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา, สารประกอบฟีนอลิก

## The Preliminary Study of Yang Na (*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don) Extracts on Anticancer and Antifungal Activities and the HPLC Analysis of the Phenolic Compounds

Chawalit Yongram\*, Sarin Tadtong<sup>†</sup>, Natthida Weerapreeyakul<sup>‡</sup>, Ploenthip Puthongking<sup>‡,§</sup>

\*Biomedical Science Program, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>†</sup>Division of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok 26120, Thailand

<sup>‡</sup>Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>§</sup>Corresponding author: pploenthip@kku.ac.th

### Abstract

*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don is a medicinal plant in Asia. In Thailand, this plant was used for skin, rheumatism and liver diseases. This study was determined to assess the anticancer and antifungal activities of the extracts from leaves, bark and twig of *D. alatus* as well as to identify the phenolic compounds in these extracts using HPLC analysis. The results suggest that all of extracts exhibited the highest cytotoxicity against Jurkat cancer cell line followed by HeLa and HepG2 cancer cell lines but do not show cytotoxicity against the non-cancerous cells (Vero cell line). Regarding its antifungal activity, extracts of the leaves and bark inhibited only *T. mentagrophytes* but have no capacity against other tested fungal stains. The HPLC analysis revealed the presence of, gallic acid in all extracts. Protocatechuic acid was found only in bark, while, *p*-coumaric acid and ferulic acid were found in twig. The result obtained suggested that *D. alatus* might be further explored for its contribution in cancer therapy. The obtained information could be useful for promoting the exploitation of the Thai medicinal plant.

**Key words:** *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don, anticancer, antifungal, phenolic compounds

### บทนำ

พืชในวงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) เป็นพืชที่อยู่ในป่าฝนแถบทวีปเอเชีย ซึ่งพบมีหลายสกุลเช่น สกุลไม้เต็ง-สยา (*Shorea*) สกุลไม้ตะเคียน (*Hopea*) และสกุลไม้ยาง (*Dipterocarpus*) เป็นต้น โดยพืชที่อยู่ในสกุล *Dipterocarpus* มีประมาณ 69 สายพันธุ์<sup>[1]</sup> พืชในวงศ์ไม้ยางมีการรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพ อาทิ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านไวรัส HIV ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น<sup>[2]</sup> และใช้เป็นสมุนไพรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้<sup>[3]</sup> ยางนา

(*Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don) เป็นพืชที่ใช้เป็นสมุนไพรในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย ภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทยได้นำส่วนต่าง ๆ จากต้นยางนามาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ ได้แก่ ใบใช้บรรเทาอาการปวดฟันปวดเหงือก ฟันโยกคลอนหรือใช้ขับเลือด ตัดลูก (ทำให้เป็นหมัน) เปลือกใช้รักษาโรคปวดข้อ ตับอักเสบ บำรุงร่างกาย<sup>[4]</sup> อีกทั้งในตำรายาอายุรเวทของอินเดียระบุสรรพคุณต้นอ่อนของต้นยางนาซึ่งใช้แก้โรคไขข้อและโรคที่เกี่ยวข้องกับตับ<sup>[5]</sup> รวมไปถึงน้ำมันยางนาใช้ในการรักษาบาดแผล

ภายนอก โรคหนองใน และโรคผิวหนังต่าง ๆ<sup>[6-7]</sup>

เมื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Dipterocarpus* พบว่าสารสกัดของใบและกิ่งของ *D. tuberculatus* สามารถยับยั้งการทำงานของ NF- $\kappa$ B และลดการ phosphorylation ของเอนไซม์ IKK และ Akt ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการอักเสบได้<sup>[3]</sup> อีกทั้ง  $\alpha$ -viniferin ที่แยกได้จาก *D. verrucosus* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึงร้อยละ 86.5 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Thiobarbituric acid method นอกจากนี้สารดังกล่าวยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* และ *Escherichia coli* ได้ดีเมื่อเทียบกับ streptomycin<sup>[8]</sup> และยังมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยพบว่า dipterocarpol A และ hopeahainol A จากเนื้อไม้ของยางนาสามารถยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ดีด้วยค่า IC<sub>50</sub> 8.3 และ 11.3  $\mu$ M ตามลำดับ<sup>[9]</sup> สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดเปลือกและใบของ *D. turbinatus* พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง คือ เซลล์ MDA-MB-231 ด้วยค่า IC<sub>50</sub> 0.27 และ 0.008 mg/ml ตามลำดับ<sup>[10]</sup> องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุลยางนาพบสารสำคัญหลายชนิด เช่น sesquiterpenes, triterpenes, flavonoids และ resveratrol (oligostilbenoids)<sup>[2]</sup> จากการศึกษาที่มีรายงานมาก่อนว่าพบ เปลือกของ *D. hasseltii*, *D. intricatus*, *D. confertus*, *D. retusus* และ *D. elongates* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่ม oligostilbenoids ที่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองคือ murine leukaemia P-388<sup>[11]</sup> และสารสกัดจากลำต้นของ *D. obtusifolius* เปลือกของ *D. confertus* และน้ำยางของ *D. alatus* พบสารในกลุ่ม triterpenes ที่มีสารออกฤทธิ์ต้าน

มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้หลายชนิด เช่น corosolic acid สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งในระบบทางเดินอาหาร SNU-1 ได้ ส่วน betulonic acid สามารถยับยั้งเซลล์ HepG2 อีกทั้ง cinnamic acid สามารถยับยั้งเซลล์ P-388 รวมไปถึง dipterocarpol สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งผิวหนัง KB ได้ดี<sup>[2,12-13]</sup> และเมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสำคัญที่พบในพืชสกุล *Dipterocarpus* ในกลไกการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิส พบว่าสารสำคัญบางตัว อาทิ asiatic acid, betulonic acid และ  $\beta$ -sitosterol สามารถเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งผ่านกลไก intrinsic pathway<sup>[14-16]</sup> และ  $\alpha$ -viniferin ก็เหนี่ยวนำการตายของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว K562 ผ่านกลไก intrinsic pathway ได้เช่นกัน<sup>[17]</sup> จะเห็นว่าในแต่ละส่วนของพืชสกุลยางนามีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน เป็นผลให้มีการแสดงฤทธิ์ หรือความแรงที่แตกต่างกันไป แต่ยังมีรายงานการศึกษาสำหรับต้นยางนา ซึ่งเป็นพืชในพระราชดำริอันดับที่ 9 น้อย และเพื่อเป็นการส่งเสริมและเพิ่มมูลค่าของพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ พืชอันดับที่ 9 ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งและฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดยางนาจากส่วน ใบ เปลือก และกิ่ง รวมถึงศึกษาองค์ประกอบจำพวกสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC

## ระเบียบวิธีศึกษา

### 1. การเตรียมและการสกัดตัวอย่าง

ใบ เปลือก และกิ่งของต้นยางนาเก็บในมหาวิทยาลัยขอนแก่นในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ.

2557 ซึ่งตัวอย่างยางนา (No. PSKKF03682) ถูกนำมาตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดย รศ. ศุภชัย ตียวรนนท์ สาขาวิชาเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเก็บตัวอย่างยางนาไว้ในห้องปฏิบัติการเภสัชเวทและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และในการเตรียมสารสกัดเริ่มโดยนำส่วนต่าง ๆ ของยางนามาทำความสะอาด แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปแช่สกัดด้วยเมทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปกรองและระเหยแห้งตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ แล้วนำไปทำให้เป็นผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

## 2. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

### 2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ Human hepatocellular carcinoma (HepG2) เซลล์ cervical adenocarcinoma (HeLa) และ เซลล์ African green monkey kidney (Vero) จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มีการเติม 10% fetal bovine serum (FBS) และเซลล์ human acute T cells leukemia cells line (Jurkat) จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI ที่มีการเติม 10% fetal bovine serum (FBS) โดยทุกเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอุณหภูมิ 37 °C ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5%

### 2.2 การทดสอบความเป็นพิษในเซลล์มะเร็ง

การศึกษาความเป็นพิษของเซลล์ใช้วิธี Neutral red uptake assay โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในถาดหลุมชนิด 96 หลุม (96 well plate) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเซลล์จะถูกทดสอบด้วยการเติมสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10-500  $\mu\text{g/ml}$  บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์และเติม neutral

red ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  แล้วบ่มอีก 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์และเติม 0.33% HCl ใน isopropanol นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 537 nm และความยาวคลื่นอ้างอิงที่ 650 nm และคำนวณเป็นค่า  $\text{IC}_{50}$  [18]

## 3. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

### 3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การทดลองนี้แบ่งเชื้อทั้งหมด 2 กลุ่มคือเชื้อราก่อโรคกลากได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes* ATCC9533, *Trichophyton rubrum* ATCC MYA4438, *Microsporum gypseum* ATCC MYA4604 และ *Epidermophyton floccosum* ATCC15694 เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. mentagrophytes* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วัน เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *E. floccosum* ในอาหาร Sabourad dextrose broth (SDB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 5 วัน และกลุ่มเชื้อราก่อรังแคได้แก่ *Malassezia furfur* ATCC14521 เพาะเลี้ยงเชื้อราใน modified Dixon's broth (MDB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 วัน

### 3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากด้วยวิธี broth macrodilution (โดยทดสอบในหลอดทดลอง ปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร/หลอดทดลอง) และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อรังแคด้วยวิธี broth microdilution (โดยทดสอบในถาดหลุมชนิด 96 หลุม ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร/หลุม) เริ่มจากการเตรียมสารแขวนตะกอนเชื้อราในน้ำปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำสารแขวนตะกอนที่ได้มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เหมาะสมให้มีปริมาณ

ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5%v/v นำไปผสมกับสารสกัดยางนาที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้นในอัตราส่วนที่เท่ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 วันสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ บ่มเป็นเวลา 5 วันสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *E. floccosum* และเป็นเวลา 2 วันสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *M. furfur* แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อราด้วยตาเปล่า ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราจะเป็นค่า MIC และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) 1% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุม (solvent control) และใช้ clotrimazole และ ketoconazole เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control)<sup>[19]</sup>

#### 4. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยเทคนิค HPLC

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วย HPLC (1100 Series, Agilent) ด้วย column ขนาด 5  $\mu\text{m}$  particle size, 250 x 4.6 mm (HiQsil, Tokyo, Japan) โดยใช้ mobile phase ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง 1% acetic acid (v/v) ในน้ำปราศจากไอออน (solvent A) และ acetonitrile (solvent B) ซึ่งใช้ระบบ gradient program เริ่มจาก 0-5 นาที, 5% solvent B; จาก 5-15 นาที, 9% solvent B; จาก 15-22 นาที, 11% solvent B; จาก 22-38 นาที, 18% solvent B; จาก 38-43 นาที, 23% solvent B; จาก 43-44 นาที, 90% solvent B; จาก 44-45 นาที, 80% solvent B; จาก 45-55 นาที, isocratic ที่ 80% solvent B; จาก 55-65 นาที, re-equilibration ที่ 5% solvent B; linear gradient จาก 65-70 นาที, 5% solvent B ที่อัตราการ

ไหล 0.8 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 40 °C และฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  โดยใช้ UV-diode array detector ที่ความยาวคลื่น 280 nm (hydroxybenzoic acids) และ 320 nm (hydroxycinnamic acids) ซึ่ง HPLC chromatogram ของสารตัวอย่างจะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิกที่เวลาเดียวกัน<sup>[20]</sup>

#### 5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ จะถูกแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจะใช้ one-way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) ด้วยโปรแกรม SPSS 19.0

### ผลการศึกษา

#### 1. การเตรียมสารสกัดยางนา

ในการเตรียมสารสกัดยางนาโดยนำตัวอย่างยางนาในแต่ละส่วนมาแช่สกัดด้วยเมทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าใบยางนาได้ปริมาณของสารสกัดสูงสุดโดยพบร้อยละของผลได้ 11.8 รองลงมาคือสารสกัดจากกิ่งและเปลือกตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดของยางนาในส่วนต่าง ๆ

ส่วน ของ ยางนา	น้ำหนัก ตัวอย่างแห้ง (g)	น้ำหนัก สารสกัดที่ได้ (g)	ร้อยละ ของผลผลิต (%)
ใบ	1,300	153.5	11.8
เปลือก	700	29.7	4.2
กิ่ง	1,900	115.4	6.1

## 2.ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดยางนาในส่วนต่าง ๆ โดยใช้เซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดยางนาในทุก ๆ ส่วนไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง (Vero) เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดใบยางนามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ต่ำมาก เพราะมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเติบโตของ HepG2 ที่ 50% (IC<sub>50</sub>) ด้วยค่าที่สูง และสารสกัดทั้งสามส่วนมีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก แต่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Jurkat) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบระหว่างเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 2) โดยสารสกัดจากกิ่งยางนามีฤทธิ์ดีที่สุดเพราะสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดได้อย่างจำเพาะเหนือกว่าเซลล์ Vero โดยพบว่ามีค่า Selective index (SI) มากกว่า cisplatin ซึ่งฤทธิ์รองลงมาได้แก่สารสกัดใบและเปลือกยางนาตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดทุก ๆ ส่วนยังคงมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่ำกว่า cisplatin ในทุก ๆ เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ

## 3.ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดยางนา แสดงให้เห็นว่าสารสกัด มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันในการต้านเชื้อราก่อโรคกลากที่นำมาทดสอบทั้ง 4 ชนิดนี้ ซึ่งได้แก่ *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *E. floccosum* ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยที่สารสกัดจากส่วนใบ และเปลือกที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ ส่วนกิ่งไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าว และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราที่อวัยวะแคบว่า สารสกัดยางนาต่าง ๆ ไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่อวัยวะแคบที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. furfur* ได้ แต่อย่างไรก็ตามกลุ่มควบคุมเชิงบวกทั้งสองกลุ่มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ รวมไปถึงกลุ่มควบคุมเชิงลบและกลุ่มตัวทำลายยังพบการเจริญของเชื้อราทดสอบตามปกติ

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดใบ เปลือก กิ่ง ยางนาต่อเซลล์ไลน์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

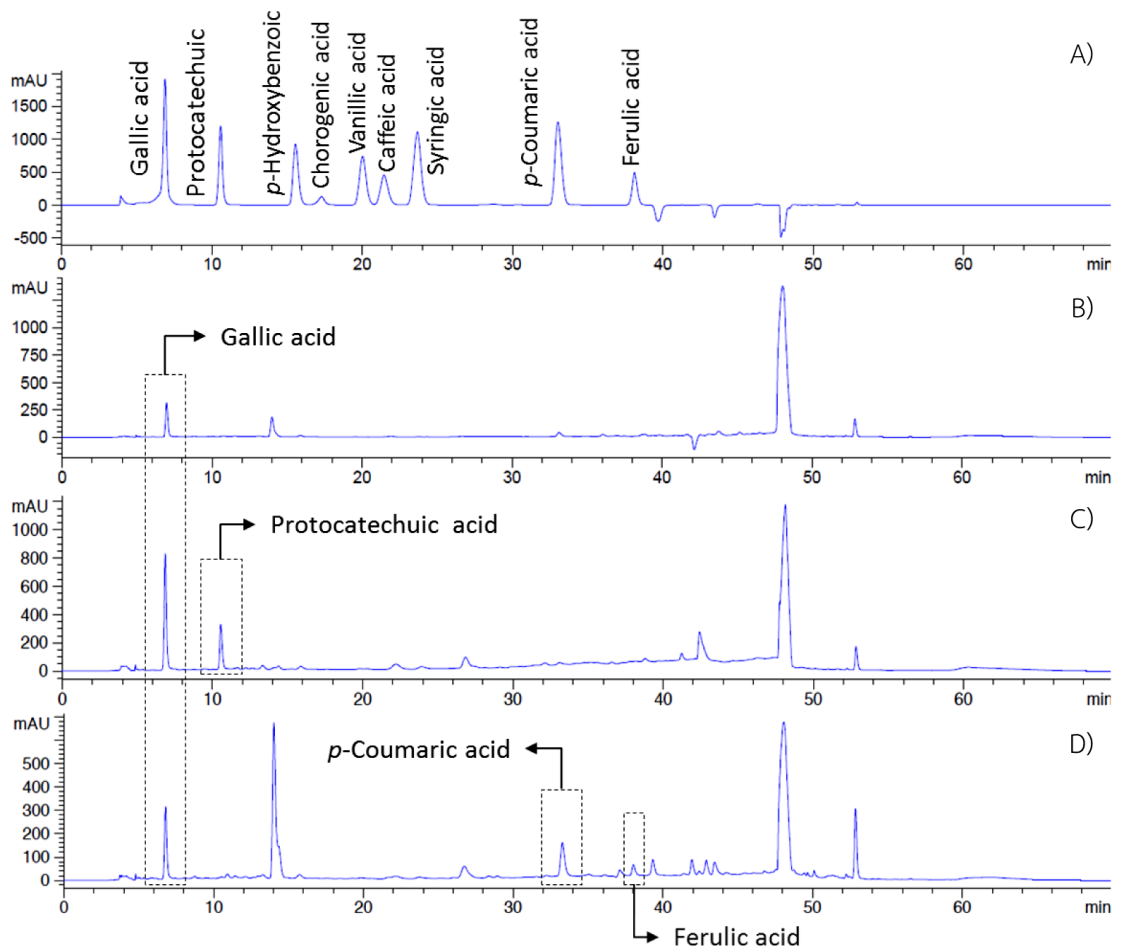
สารทดสอบ	IC <sub>50</sub> (µg/ml)			
	Vero	HepG2 (SI)	HeLa (SI)	Jurkat (SI)
ใบ	> 500 <sup>b</sup>	421.0 <sup>b</sup> ± 8.0 (1.2)	280.3 <sup>c</sup> ± 22.6 (1.8)	29.0 <sup>b</sup> ± 4.8 (17.2)
เปลือก	> 500 <sup>b</sup>	> 500 <sup>c</sup> (1.0)	169.9 <sup>b</sup> ± 26.7 (2.9)	44.7 <sup>c</sup> ± 6.3 (11.2)
กิ่ง	> 500 <sup>b</sup>	> 500 <sup>c</sup> (1.0)	186.1 <sup>b</sup> ± 13.7 (2.7)	16.5 <sup>a</sup> ± 0.6 (30.3)
Cisplatin	92.3 <sup>a</sup> ± 3.6	77.7 <sup>a</sup> ± 6.9 (1.2)	13.3 <sup>a</sup> ± 0.3 (6.9)	6.1 <sup>a</sup> ± 0.8 (15.1)

หมายเหตุ: a, b, c หมายถึงมีความแตกต่างกันตามสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเปรียบเทียบค่า IC<sub>50</sub> ระหว่างสารสกัดและ cisplatin ในเซลล์ไลน์เดียวกัน

ตารางที่ 3ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดขานา

สารทดสอบ	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	กลุ่มเชื้อราทอโรคกลาก				กลุ่มเชื้อราทอริงแค
	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>E. floccosum</i>	<i>M. furfur</i>
ใบ	200	> 200	> 200	> 200	> 200
เปลือก	200	> 200	> 200	> 200	> 200
กิ่ง	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
Ketoconazole*	ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ				
Clotrimazole†	ไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ				

หมายเหตุ: \*คือ ketoconazole ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g/ml}$  และ †คือ clotrimazole ที่ความเข้มข้น 250  $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 1 HPLC chromatogram ของ (A) สารมาตรฐานฟีนอลิก (B) สารสกัดจากใบ (C) สารสกัดจากเปลือกและ (D) สารสกัดจากกิ่งของขานา ที่ความยาวคลื่น 280 nm

#### 4. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด ยางนา ด้วยเทคนิค HPLC

ในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของยางนา โดยเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิก 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม hydroxybenzoic acids (gallic acid, protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid และ syringic acid) และกลุ่ม hydroxycinnamic acids (chorogenic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid และ ferulic acid) สามารถระบอบุคประกอบทางเคมีในสารสกัดยางนาได้ดังนี้ ส่วนใบ เปลือก กิ่ง พบ gallic acid เป็นองค์ประกอบ โดยพบในเปลือกมากที่สุด อีกทั้งเปลือกยังพบ protocatechuic acid ส่วนกิ่งยางนาพบสาร *p*-coumaric acid และ ferulic acid ดังแสดงใน HPLC chromatogram (ภาพที่ 1)

#### อภิปรายผล

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดยางนาในแต่ละส่วนพบว่าสารสกัดยางนาทุกส่วนมีฤทธิ์ต้านการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งในการจัดกลุ่มของสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งสามารถได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 potentially cytotoxic ( $IC_{50} < 100$ ;  $SI \geq 3$ ) กลุ่มที่ 2 moderate cytotoxic ( $100 < IC_{50} < 1000$ ;  $SI \geq 3$ ) กลุ่มที่ 3 moderate cytotoxic ( $IC_{50} \leq 1000$ ;  $SI < 3$ ) กลุ่มที่ 4 มีความเป็นพิษเฉพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็ง (Vero cells) และกลุ่มที่ 5 ไม่มีฤทธิ์<sup>[21]</sup> ซึ่งจากผลการทดลองสามารถจัดกลุ่มได้ดังนี้ สารสกัดจากใบ เปลือก และกิ่งของยางนา มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในระดับ potentially cytotoxic (กลุ่มที่ 1) และสารสกัดทั้งสามส่วนยังมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับ moderate cytotoxic ที่จัด

อยู่ในกลุ่มที่ 3 เนื่องจากมีค่า  $SI < 3$  รวมไปถึงสารสกัดจากใบที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับในระดับ moderate cytotoxic ส่วนสารสกัดจากเปลือกและกิ่งยางนาไม่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ (กลุ่มที่ 5)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากและก่อรังแคพบว่าไม่มีเพียงสารสกัดจากใบและเปลือกของยางนาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคกลากสายพันธุ์ *T. mentagrophytes* แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดยางนาไม่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบได้

การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากยางนาด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งสามารถระบุถึงสารประกอบฟีนอลิกได้ทั้งกลุ่ม hydroxybenzoic acids และ hydroxycinnamic acids โดยพบว่าในสารสกัดยางนาพบสาร gallic acid, *p*-coumaric acid, protocatechuic acid และ ferulic acid ซึ่งมีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าวที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยพบว่า gallic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด (Jurkat) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส<sup>[22]</sup> และ *p*-coumaric acid ที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-15) ผ่าน ROS-mitochondrial pathway<sup>[23]</sup> อีกทั้ง protocatechuic acid ที่เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิดเช่น มะเร็งเต้านม (MCF7) มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (LNCaP) ผ่านกลไก DNA fragmentation และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ caspase-3 และ 8 ที่ส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส<sup>[24]</sup> รวมไปถึง ferulic acid ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231)<sup>[25]</sup> ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากกิ่งยางนามีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดได้ดีที่สุด ซึ่งสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิก



ที่ตรวจพบได้และมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นยางนาในแต่ละส่วน ที่จะนำไปศึกษาพิษวิทยาของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งและรูปแบบการตายของเซลล์มะเร็งในอนาคต อีกทั้งเป็นแนวทางในการเลือกใช้ส่วนต่าง ๆ ของยางนาให้เหมาะสมกับฤทธิ์ที่จะศึกษาต่อไป

### ข้อสรุป

สารสกัดยางนาจากทั้ง ใบ เปลือก และกิ่ง สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดได้ดีที่สุด รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก และมะเร็งตับตามลำดับ อีกทั้งยังไม่พบความเป็นพิษในเซลล์ที่มีใช้เซลล์มะเร็ง โดยที่ยังมีฤทธิ์ต่ำเมื่อเทียบกับ cisplatin ในทุกเซลล์ไลน์ แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดยางนามีความจำเพาะ (selectivity) ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดและมะเร็งปากมดลูกมากกว่า cisplatin ส่วนในการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลาก สารสกัดจากใบและเปลือกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. mentagrophytes* แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อรังแคในสารสกัดจากทั้งสามส่วนของยางนา และจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกพบว่าสามารถระบุสารสำคัญได้ดังนี้ พบ gallic acid ในใบ เปลือก และกิ่ง พบ protocatechuic acid ในเปลือก และพบ *p*-coumaric acid และ ferulic acid ในกิ่ง จะเห็นได้ว่าส่วนต่าง ๆ ของต้นยางนา มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วยสนับสนุนการใช้พืชพื้นบ้านของไทย

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนทุนวิจัยของโครงการวิจัยอุดหนุน

ทั่วไป มุ่งเป้ายางนา ประจำปีงบประมาณ 2559 และ 2560 (KKU-YN-014) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ปีงบประมาณ 2560 [KKU-วช. (บัณฑิต) 016/2560] และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

### References

- Dayanandan S, Ashton PS, Williams SM, Primack, RB. Phylogeny of the tropical tree family Dipterocarpaceae based on nucleotide sequences of the chloroplast RBCL gene. *American Journal of Botany*. 1999;86(8):1182-90.
- Khiev P, Kwon OK, Song HH, Oh SR, Ahn KS, Lee HK, Chin YW. Cytotoxic terpenes from the stems of *Dipterocarpus obtusifolius* collected in Cambodia. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*. 2012;60(8):955-61.
- Yang WS, Lee BH, Kim SH, Kim HG, Yi YS, Htwe, KM, Kim YD, Yoon KD, Hong S, Lee WS, Cho JY. *Dipterocarpus tuberculatus* ethanol extract strongly suppresses *in vitro* macrophage-mediated inflammatory responses and *in vivo* acute gastritis. *Journal of Ethnopharmacol*, 2013;146(3):873-80.
- Bupabanpot J, Ratanapracha S, Poopath M, Phueaknang C, Danchutham A. Conservation and utilization of Dipterocarpaceae. Bangkok: Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation; 2013. 115.
- Karnick CR, Hocking GM. Ethnobotanical records of drug plants described in valmiki ramayana and their uses in the Ayurvedic system of medicine. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*. 1975;13(3):143-54.
- Wiat, C. Medicinal plants of the Asia-pacific: drugs for the future?. Singapore: world scientific publishing Co. Pte. Ltd; 2006. 139.
- Prasad PRC. Ecological analysis of Dipterocarpaceae of north Andaman forest, India. *Journal of Plant Development*. 2011;18:135-49.
- Zuraida W, Zain WM, Ahmat N, Norizan NH, Ainaa N, Nazri AM. The evaluation of antioxidant, antibacterial

- and structural identification activity of trimer resveratrol from Malaysia's Dipterocarpaceae. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011;5(5):926-9.
9. Chen CJ, Jiang R, Wang G, Jiao RH, Tancharoen C, Sudto K, Vajarothai S, Hannongbua S, Ge HM, Tan RX. Oligostilbenoids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Dipterocarpus alatus*. *Planta Medica*. 2014;80:1641-6.
  10. Akter R, Uddin SJ, Grice ID, Tiralongo E. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*. 2014;68(1):246-52.
  11. Muhtadi HEH, Syah YM, Juliawaty LD, Achmad A, Latip J. Resveratrol tetramer compounds from *Dipterocarpus intricatus* and activity against murine leukemia P-388 cells. *Proceeding of the International Seminar on Chemistry*; 30-31 Oct 2008; Jatinangor, Indonesia. Jatinangor: University Padjadjaran; 2008. 585.
  12. Huong DTT, Thuy TTT, Hien TT, Tra NT, Tien NQ, Smirnova IE, Kazakova OB, Minnibaeva EM, Tolstikov GA. Synthesis and cytotoxicity of derivatives of dipterocarpol, a metabolite of *Dipterocarpus alatus*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2013;49(1):58-65.
  13. Muhtadi M, Indrayudha P, Wibowo A, Yen KH. Cytotoxic activity of secondary metabolites from the bark of *Dipterocarpus Confertus* Sloat. *Journal of Advances in Chemistry*. 2014;9(1):1861-5.
  14. Park BC, Bosire KO, Lee ES, Lee YS, Kim JA. Asiatic acid induces apoptosis in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Cancer Letters*. 2005;218:81-90.
  15. Park C, Moon DO, Rhu CH, Choi BT, Lee WH, Kim GY, Choi YH. Beta-sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(7):1317-23.
  16. Yang S, Zhao Q, Xiang H, Liu M, Zhang Q, Xue W, Song B, Yang S. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of constituents from *Toona sinensis* on human cancer cells. *Cancer Cell International*. 2013;13(1):1-12.
  17. Gong FK, Wang XQ, Li ZX, Zhang B.  $\alpha$ -Viniferin induced apoptosis in K562 cells via mitochondrial pathway. *Chinese Pharmacological Bulletin*. 2015;31(3):391-5.
  18. Srisayam M, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Tanthanuch W, Thumanu K. Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid. *Journal of Dermatological Science*. 2014;73:241-50.
  19. Tadtong S, Suppawat S, Tintawee A, Saramas P, Jar-eonvong S, Hongratanaworakit T. Antimicrobial activity of blended essential oil preparation. *Natural Product Communications*. 2012;7(10):1401-4.
  20. Kaisoon O, Siriamornpun S, Weerapreeyakul N, Meeso N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods*. 2011;3(2):88-99.
  21. Prayong P, Barusrux S, Weerapreeyakul N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*. 2008;79(7-8):598-601.
  22. Sourani Z, Pourgheysari B, Beshkar P, Shirzad H, Shirzad M. Gallic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in lymphoblastic leukemia cell line (C121). *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2016;41(6):525-30.
  23. Jaganathan SK, Supriyanto E, Mandal M. Events associated with apoptotic effect of *p*-coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. *World journal of gastroenterology*. 2013;19(43):7726-34.
  24. Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu CK. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(14):6468-73.
  25. Zhang X, Lin D, Jiang R, Li H, Wan J, Li H. Ferulic acid exerts antitumor activity and inhibits metastasis in breast cancer cells by regulating epithelial to mesenchymal transition. *Oncology Reports*. 2016;36(1):271-8.