รายงานวิจัย ฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นสำเภา

Anticancer compounds with topoisomerase inhibitory activity from *Chaetocarpus castanocarpus* stem

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.อารีรัตน์ ลออปักษา
อาจารย์ ดร.ศุภกาญจน์ ชำนิ

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสำเภา ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chaetocarpus castanocarpus* (Roxb.) Thwaites จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งขึ้นในพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ต้นสำเภาได้ถูกนำมาศึกษาและพบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลมีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 (topoisomerase I) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอชนิด supercoil (supercoiled DNA) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จะส่งผลรบกวนกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งสามารถนำหลักการนี้มาพัฒนาเพื่อค้นหายารักษาโรคมะเร็งได้ คณะผู้ดำเนินการวิจัยได้แยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นสำเภาด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี แล้วทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ด้วยวิธี Yeast cell-based assay ซึ่งใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ RS190 ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมโดยการแทนที่ยีนเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของยีสต์ด้วยยีนจากพืช *Arabidopsis thaliana* ผลการวิจัยสามารถแยกสารบริสุทธิ์จากต้นสำเภาได้เป็นครั้งแรก คือสาร b1 และ f3 โดยสาร b1 คือ 3-acetyl aleuritolic acid ส่วนสาร f3 นั้นจะต้องทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างต่อไป

คำสำคัญ: สำเภา, วงศ์ Euphorbiaceae, ต้านมะเร็ง, โทโพไอซอเมอเรส I, การแยกสารโดยใช้ฤทธิ์เป็นตัวนำ

Abstract

Chaetocarpus castanocarpus (Roxb.) Thwaites is in the Euphorbiaceae family. It was collected from Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiative of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Siridhorn, Samaesarn Island, Chonburi Province. Methanolic extract of *Chaetocarpus castanocarpus* stem exhibited anticancer with topoisomerase inhibitory activity. Topoisomerase I used for relaxing supercoiled DNA in the DNA replication step. Bioassay-guided fractionation with yeast cell-based assay has been used for isolation of bioactive compounds. *Saccharomyces cerevisiae* RS190 inserted with topoisomerase I from Arabidopsis thaliana was used for yeast screening. Two compounds, b1 and f3, were isolated from *Chaetocarpus castanocarpus* for the first time. Compound b1 is 3-acetyl aleuritolic acid. Identification of compound f3 is undergoing.

Keywords: *Chaetocarpus castanocarpus, Euphorbiaceae, anticancer, topoisomerase I, bioassay-guided fractionation*

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญเรื่อง..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญภาพ..... ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 1
วิธีดำเนินการวิจัย..... 3
ผลการศึกษา..... 7
- การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากต้นสำเภา..... 7
- การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ b1 9
- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารบริสุทธิ์ b1 และ f3..... 11
สรุปและวิจารณ์ผล..... 11
เอกสารอ้างอิง..... 13
ประวัติผู้วิจัย..... 14

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูล NMR spectra ของ 3-acetyl aleuritolic acid 9

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะการ spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	5
รูปที่ 2	ขั้นตอนการสกัดแยกสาร b1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นสำเภา.....	7
รูปที่ 3	ขั้นตอนการสกัดแยกสาร f3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นสำเภา..	8
รูปที่ 4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-acetyl aleuritolic acid (b1).....	10
รูปที่ 5	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารบริสุทธิ์ f3 และ b1.....	11

สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นสำเภา

GENETIC STUDIES IN THE GENUS *STRYCHNOS*

สุชาดา สุขหร่อง อารีรัตน์ ลออปักษา ศุภกาญจน์ ชำนิ

Suchada Sukrong, Areerat Laorpaksa, Supakarn Chamni

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลกระทรวงสาธารณสุขพบว่าคนไทยมีอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มว่าจะมีผู้ป่วยเพิ่มขึ้น โรคมะเร็งจัดเป็นโรคค่าใช้จ่ายสูงและโรคเรื้อรัง อีกทั้งยังเป็นกลุ่มโรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาชนก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิตจากการเจ็บป่วย ส่งผลไปถึงทำให้เพิ่มรายจ่ายด้านสุขภาพของครัวเรือน สังคม ตลอดจนเป็นภาระค่าใช้จ่ายโดยรวมของประเทศ ถ้าสามารถศึกษาเพื่อค้นพบยาหรือสมุนไพรที่มีฤทธิ์ดังกล่าวก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยเป็นอย่างมาก

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าเซลล์ปกติ ดังนั้นเซลล์มะเร็งย่อมมีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) สูงตามไปด้วย ซึ่งขั้นตอนของการจำลองตัวที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งขั้นตอนหนึ่ง คือ การคลายเกลียวของดีเอ็นเอชนิด supercoil (supercoiled DNA relaxation) โดยเอนไซม์ที่ใช้สำหรับการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ คือ เอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (topoisomerase I) ซึ่งจะทำหน้าที่คลายปมเหนือจุดแยกด้วยการทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับไฮโดรเจนของสายดีเอ็นเอ ดังนั้นเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จึงเป็นเป้าหมายหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธีเคมีบำบัด เนื่องจากหากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว เซลล์ก็จะไม่สามารถแบ่งตัวได้ เซลล์มะเร็งซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวสูงก็จะได้รับผลกระทบมากกว่าเซลล์ปกติ ในปัจจุบันมีการใช้ยารักษาโรคมะเร็งที่มีฤทธิ์ยับยังเอนไซม์ดังกล่าวแล้ว ได้แก่ camptothecin และ อนุพันธ์ของ camptothecin คือ Irinotecan® และ Topotecan® ในการรักษาโรคมะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ และมะเร็งปากมดลูก

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาศักยภาพในการต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I จากต้นสำเภา พืชที่ขึ้นในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ อันเนื่องมาจาก

พระราชดำริฯ เกาะแสมสาร และทำการสกัดแยกสารเพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีเพื่อค้นหาสารตัวใหม่ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์ทางยาจากพืชไทย

สำเภา (*Chaetocarpus castanocarpus* (Roxb.) Thwaites) หรือ ขี้หนอน ขี้หนอนขาว เป็นไม้ต้น จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae (เต็ม สมิตินันทน์, 2544) สูงได้ถึง 45 เมตร มีหูใบรูปไข่กลับ หลุดร่วงง่าย ใบ เดี่ยว เรียงสลับ แผ่นใบรูปไข่ กว้าง 1.5–8 เซนติเมตร ยาว 3.5–18.5 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลม โคนใบสอบ ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนา มีจุดโปร่งแสง เส้นแขนงใบ 7–9 คู่ ดอก เล็ก สีเหลืองอมเขียว หรือเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ แยกเพศ ดอกเพศผู้เล็กกว่าดอกเพศเมีย ออกเป็นช่อตามง่ามใบ มีขนหนาแน่น กลีบเลี้ยงมี 4 กลีบ ไม่มีกลีบดอก จานฐานดอกมีสีชมพูหรือแดง ผล ค่อนข้างกลม ขนาด 0.8–1.8 เซนติเมตร มีขนแข็ง สีเหลืองแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง เมื่อแก่แตกเป็น 3 พู เมล็ดรูปไข่ มีเยื่อบางๆ หุ้ม ประโยชน์ของสำเภาคือ ใบอ่อนใช้เป็นอาหาร เนื้อไม้ค่อนข้างแข็งใช้ในการก่อสร้างและทำด้ามเครื่องมือเครื่องใช้ ปัจจุบันยังไม่ปรากฏรายงานการใช้สำเภาเป็นยาและยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน การศึกษาในครั้งนี้จึงนับเป็นครั้งแรกในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นสำเภา

งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายจะทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ของสารสกัดจากต้นสำเภาโดยการแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้หลักการ bioassay-guided fractionation เพื่อหาสารสำคัญที่เป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I โดยอาศัย Yeast cell-based assay

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I นั้น มีรายงานการใช้ยีสต์เป็นตัวทดสอบ การใช้ยีสต์เป็นตัวทดสอบจัดเป็น cell-based assay วิธีหนึ่ง และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี (Sangmalee *et al*., 2012) โดยใช้สารมาตรฐาน camptothecin เป็นตัวควบคุมผลบวก เนื่องจากสาร camptothecin เป็นสารที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I (Bjornsti, 1991; Hsiang *et al*., 1995; Sirikantaramas *et al*., 2008; Reid *et al*, 1998) เหตุที่ใช้ยีสต์เพราะยีสต์เป็น eukaryote เช่นเดียวกับมนุษย์ ทำให้การแปลผลข้อมูลเพื่อการนำไปใช้ทางการแพทย์สำหรับมนุษย์มีความเป็นไปได้สูงกว่า ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ที่ใช้ในการทดสอบเป็นยีสต์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนแล้ว เป็นยีสต์ที่ถูกตัดยีนโทโพไอซอเมอเรส I ของตัวเองออกแล้วถูกแทนที่ด้วยยีนโทโพไอซอเมอเรส I ของพืช *Arabidosis thaliana* ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนโทโพไอซอเมอเรส I ให้มากขึ้นได้ (โดยใช้ galactose-induced system) ทำให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้มากขึ้นจนสามารถใช้ในการคัดกรองได้ เหตุที่เลือกใช้ *A. thaliana* เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ของพืชดังกล่าวตอบสนองได้ดี (sensitive) ต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอ

เรส I (Sirikantaramas *et al*., 2008) ผลการทดลองจะวัดจากการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ถูกนำมาเลี้ยงร่วมกับสารที่แยกได้จากใบสำเภาที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งหากสารที่เรานำมาทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส I ได้ ยีสต์ก็จะไม่เจริญเติบโตหรือเติบโตน้อยกว่าตัวควบคุม แต่หากสารที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ดังกล่าวยีสต์ก็จะเจริญเติบโตได้ตามปกติ

สารสำคัญที่แยกได้จากใบสำเภาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นการเพิ่มศักยภาพของพืชไทยในการใช้ประโยชน์ทางยา และเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้สารจากธรรมชาติต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาศักยภาพในการใช้ประโยชน์ทางยาจากต้นสำเภา สกัดแยกและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญจากต้นสำเภาที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งด้วยกลไกการยับยั้งโทโพไอซอเมอเรส I ด้วยวิธี Bioassay-guided fractionation

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารที่แยกได้จากต้นสำเภาเพื่อใช้ประโยชน์ทางยาและเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้สนใจจะทำการวิจัยต่อ นอกจากนี้โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของใบสำเภาอาจใช้เป็น lead compound ในการพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ และงานวิจัยนี้สามารถเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการระดับชาติหรือนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

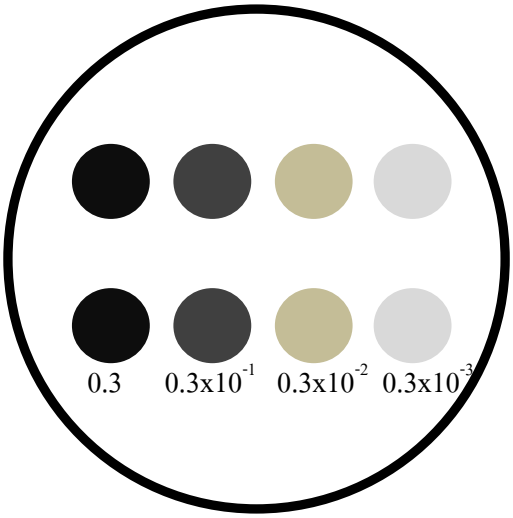
1. การเก็บตัวอย่างสำเภา เก็บต้นสำเภาจากพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ที่บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี
2. การเตรียมตัวอย่างสำเภาเพื่อตรวจหาส่วนของพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 โดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วผ่านการลดขนาด
3. แช่สกัดส่วนต้นของสำเภาปริมาณ 4.4 kg ด้วย 95% EtOH ปริมาตร 10-13 L ระยะเวลา 4-5 วัน ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำมาระเหยแห้งภายใต้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนจนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

4. กระจายสารสกัดหยาบ ประมาณ 50 g ลงในน้ำปริมาตร 400 ml เทใส่ลงใน separating funnel จากนั้นเติม EtOAc ปริมาตร 100 ml ลงไปเขย่าให้เกิดการแยกชั้น (partition) จากนั้นไขเก็บสารสกัดในชั้น EtOAc (ชั้นบน) ออกมา แล้วค่อยเติม EtOAc ลงไปทำซ้ำจนครบ 3 ครั้ง ต่อมานำสารสกัดชั้นน้ำที่เหลือมา partition ต่อด้วย EtOAc ซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยจะทำขั้นตอนนี้ซ้ำจนกว่าจะครบปริมาณของ crude extract ที่สกัดออกมาได้
5. รวมสารสกัดชั้น EtOAc ทั้งหมดที่ได้มาทั้งหมด นำมาระเหยแห้งภายใต้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุนจนได้สารสกัดของชั้น EtOAc
6. รวมสารสกัดชั้นน้ำทั้งหมดมาเป่าลมที่อุณหภูมิห้องจนได้สารสกัดข้นเหนียวของชั้นน้ำ
7. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารสกัดหยาบ, สารสกัดชั้น EtOAc และสารสกัดชั้นน้ำ ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 µg/ml
8. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารสกัดต้น ที่ความเข้มข้น 125, 250 และ 500 µg/ml ด้วยวิธี yeast cell-based assay

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จะทำการทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ RS190 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส ยีสต์ที่ใช้ในการทดสอบจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C โดยที่ก่อนนำยีสต์มาใช้ทดสอบจะต้องทำการ subculture ยีสต์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งลักษณะเอียงเป็นแนวลาด (slant agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

<u>ขั้นตอนการเตรียมยีสต์มาใช้ในการทดสอบ</u>

1) subculture จาก slant agar ที่เก็บไว้ในตู้เย็น ลงบน slant agar อันใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2) subculture ยีสต์จาก slant agar ลงใส่ลงในอาหารเหลว (broth) จากนั้นนำไปเขย่า 200 rpm ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3) ตรวจดูความสมบูรณ์ของยีสต์ โดยย้อมสียีสต์ด้วย nigrosin แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า
4) วัด OD ของ broth ที่มียีสต์ ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.3
5) เจือจางความเข้มข้นยีสต์ลง 10 เท่าด้วย broth ได้เป็น serial dilution มีความเข้มข้นที่ 0.3, $0.3x10^{-1}$, $0.3x10^{-2}$ และ $0.3x10^{-3}$ OD/ml
6) spot ยีสต์ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงด้วยปริมาตร 5 µl ในลักษณะดัง**รูปที่ 1**



รูปที่ 1 ลักษณะการ spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบ

1) เตรียม stock solution ของสารสกัดและแคมป์โทเธซินโดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย
2) เจือจาง stock solution ด้วย DMSO ให้ได้เป็นความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ
3) นำสารทดสอบแต่ละความเข้มข้นที่ปริมาตร 100 µl ไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปริมาตร 10 ml
4) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารทดสอบแล้วลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วจึง spot ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5) วิเคราะห์ผลที่ได้จากการเลี้ยงยีสต์ ถ้ายีสต์สามารถเจริญเติบโตบนอาหารสูตรกลูโคส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารสูตรกาแลคโตส แสดงว่าสารทดสอบนั้นมีฤทธิ์ยับยั้ง TOP1 โดยในการทดสอบนี้จะใช้แคมป์โทเธซินเป็นตัวควบคุมผลบวกและ DMSO เป็น vehicle control

9. หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสารสกัดด้วย column chromatography

การศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมจะใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) โดยการนำสารสกัดที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC ในระบบตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้

- MeOH
- MeOH : H_2O (9:1)
- MeOH : H_2O (1:1)
- MeOH : CH_2Cl_2 (9:1)
- EtOAc : CH_2Cl_2 (7:3)
- EtOAc : CH_2Cl_2 (3:7)
- EtOAc : hexanes (7:3)
- EtOAc : hexanes (3:7)

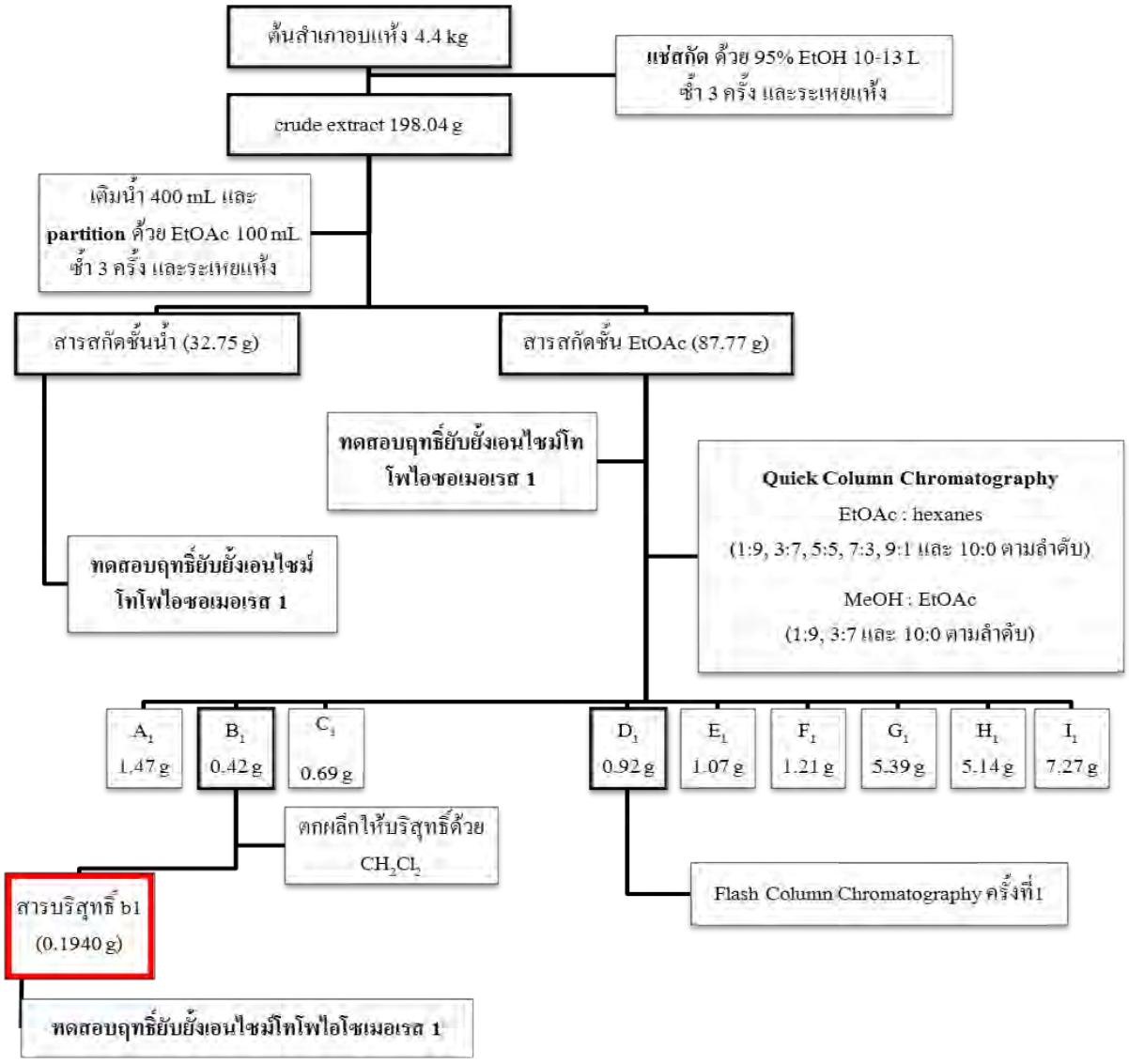
พบว่าระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารสกัดได้ดี ซึ่งได้แก่ระบบตัวทำลายของ EtOAc : heaxane มาใช้เป็นระบบตัวทำละลายสำหรับ Quick Column Chromatography

10. แยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี Column Chromatography

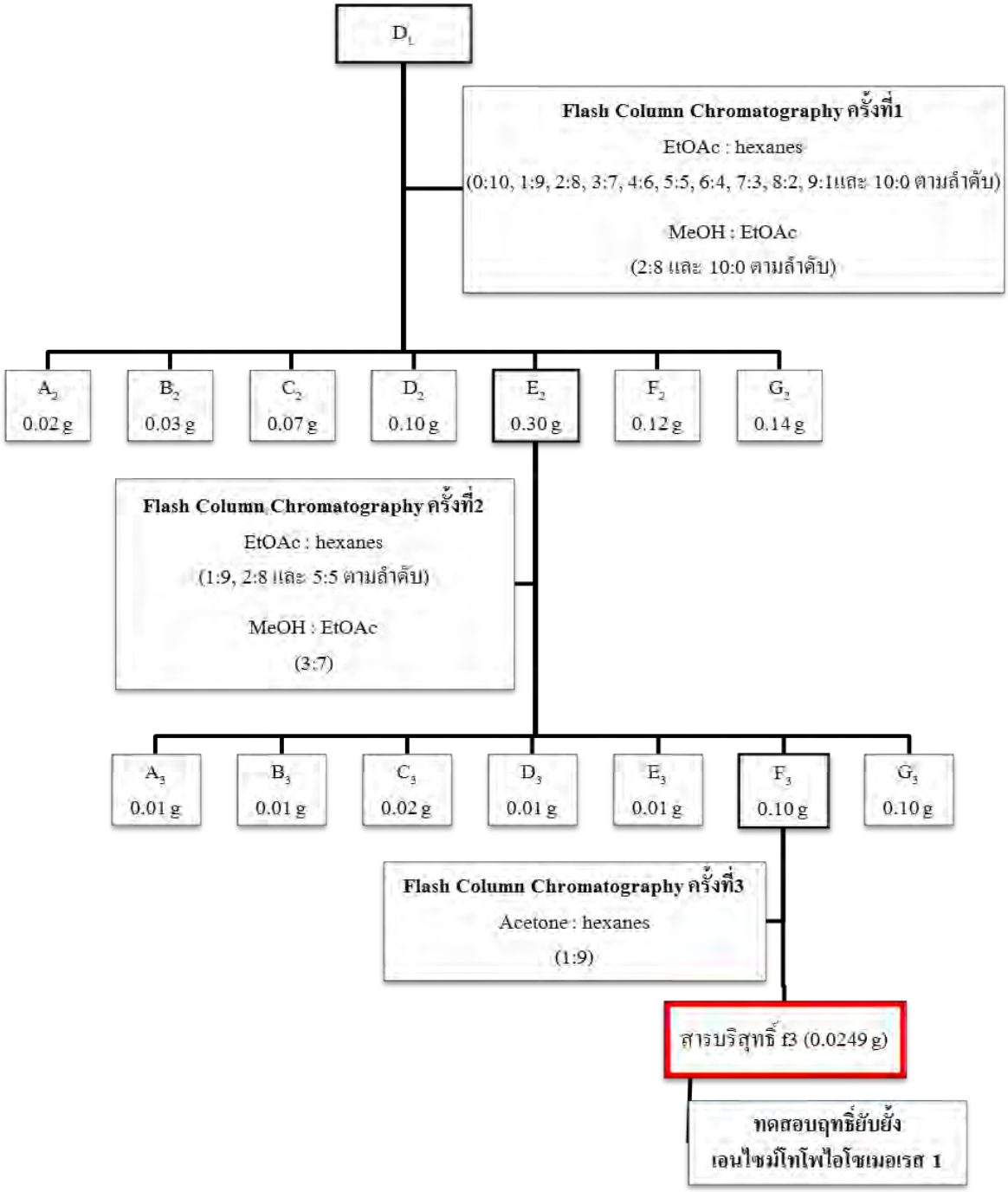
ผลการศึกษา

การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากต้นสำเภา

สามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ b1 และ f3 จากสารสกัดหยาบส่วน ethyl acetate ของต้นสำเภาที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 โดยกระบวนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์แสดงดัง**รูปที่ 2-3**



รูปที่ 2 ขั้นตอนการสกัดแยกสาร b1 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นสำเภา



รูปที่ 3 ขั้นตอนการสกัดแยกสาร f3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากต้นสำเภา

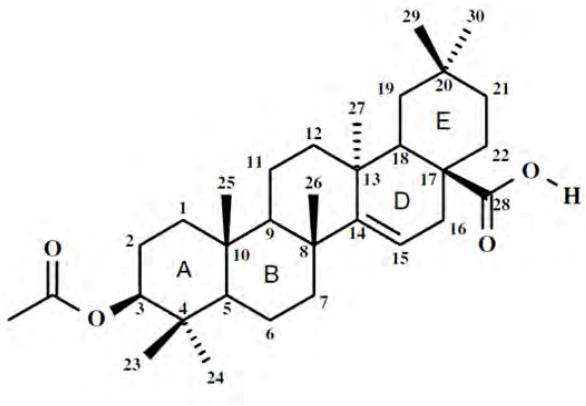
การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ b1 เทียบกับ reference

ตารางที่ 1 ข้อมูล NMR spectra ของ 3-acetyl aleuritolic acid (Probowo, W. C., et. al. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. **2013**, *5*, 851-853.; Viswanadh, G. S., et. al. *J. Trop. Med. Plants.*, **2006**, *7*, 267-273.)

ตำแหน่ง	δc (ppm)		δH (ppm)	
	ข้อมูลที่ตีพิมพ์	ข้อมูลสารที่แยกได้	ข้อมูลที่ตีพิมพ์	ข้อมูลสารที่แยกได้
1	37.33	37.38	-	-
2	23.45	23.46	-	-
3	81.24	80.88	4.48 (*dd*, *J* = 10, 6 Hz)	4.48 (*dd*, *J* = 9.4, 6.3 Hz)
4	37.24	37.31	-	-
5	55.62	55.59	0.88 (*m*)	0.88 (*m*)
6	18.69	18.73	-	-
7	40.87	40.75	-	-
8	38.98	39.03	-	-
9	49.08	49.07	-	-
10	37.92	37.93	-	-
11	17.55	17.31	-	-
12	33.69	33.66	-	-
13	37.35	37.68	-	-
14	160.43	160.55	-	-
15	116.78	116.83	5.54 (*dd*, *J* = 8, 4 Hz)	5.54 (*dd*, *J* = 8.0, 3.4 Hz)
16	31.55	31.31	-	-
17	51.21	51.48	-	-
18	41.87	41.40	-	-
19	35.43	35.33	-	-
20	29.28	29.31	-	-

21	33.37	33.32	-	-
22	30.91	30.70	-	-
23	27.95	27.96	0.89 (*s*)	0.88 (*s*)
24	16.56	16.60	0.85 (*s*)	0.86 (*s*)
25	15.56	15.64	0.95 (*s*)	0.95 (*s*)
26	26.00	26.20	0.95 (*s*)	0.95 (*s*)
27	22.36	22.46	0.92 (*s*)	0.92 (*s*)
28	182.40	184.06	-	-
29	31.99	31.86	0.94 (*s*)	0.93 (*s*)
30	28.71	28.66	0.91(*s*)	0.90 (*s*)
CH_3(CO)	21.27	21.30	2.04 (*s*)	2.06 (*s*)
CH_3(*CO*)	171.50	170.99	-	-

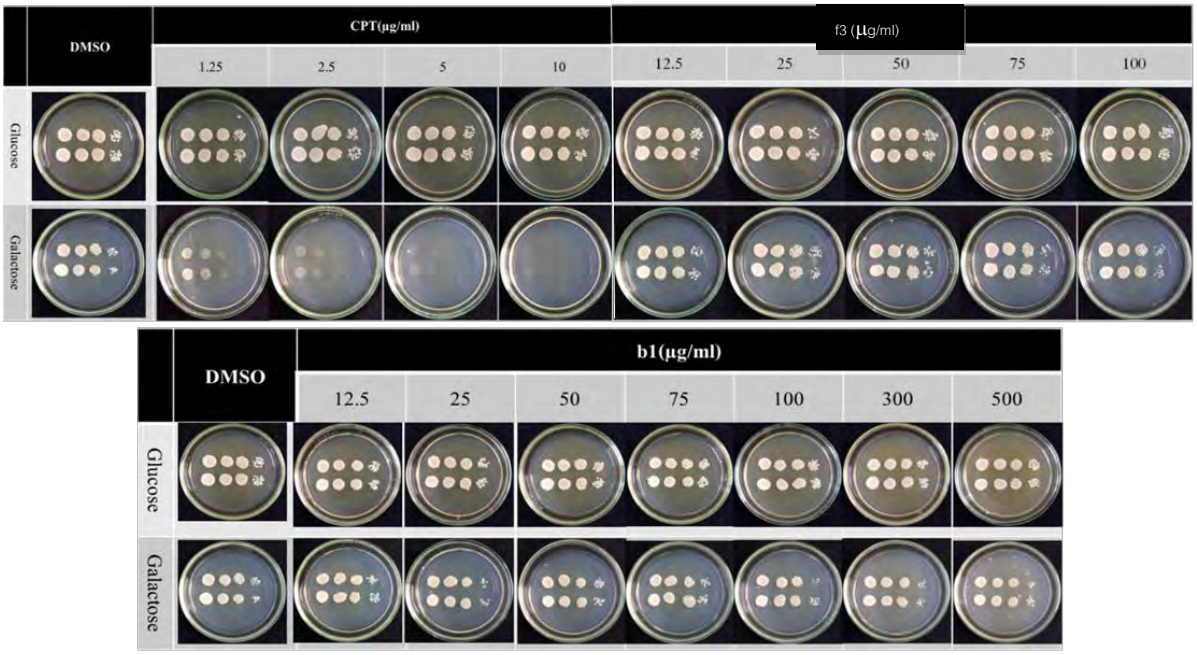
จากการเปรียบเทียบกับ reference พบว่าสารบริสุทธิ์ b1 มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดัง**รูปที่ 4**



รูปที่ 4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3-acetyl aleuritolic acid (b1)

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารบริสุทธิ์ b1 และ f3

จากการสกัดแยกได้สารบริสุทธิ์ตัวแรก ชื่อว่า f3 และพบสารบริสุทธิ์จากการตกผลึกอีก 1 ตัว ชื่อว่า b1 จึงนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ทั้งสองตัวมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเอเรส 1 ดัง**รูปที่ 5** เมื่อพิจารณาผลการตายของยีสต์ในชุดของสารบริสุทธิ์ b1 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับการตายของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสในชุดของ DMSO ซึ่งแสดงว่าสาร b1 ไม่น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 และเมื่อมาพิจารณาการตายของยีสต์ในชุดของสารบริสุทธิ์ f3 พบว่าที่ความเข้มข้น 75 และ 100 µg/ml พบการตายของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลคโตสมากว่ายีสต์ในชุด DMSO เพียงเล็กน้อย



รูปที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ของสารบริสุทธิ์ f3 และ b1

สรุปและวิจารณ์ผล

สารสกัดส่วนต้นของสำเภามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ได้ดี จึงทำการแยกสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 จากสารสกัดส่วนต้นของสำเภา โดยเริ่มต้นจากการสกัดสารจากต้นสำเภาและทำการแยกส่วนออกมาเป็น 2 ส่วน คือส่วน EtOAc และส่วนน้ำ เพื่อแบ่งสารออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์และกลุ่มที่ละลายน้ำ หลังจากนั้นนำแต่ละส่วนไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง

เอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ซึ่งพบว่าส่วน EtOAc ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml และ 500 µg/ml มีฤทธิ์ที่ดีกว่าในทุกความเข้มข้นของชั้นน้ำ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 อยู่ในชั้น EtOAc จึงนำชั้น EtOAc มาแยกต่อเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์

เทคนิคแรกที่ใช้คือ Quick Column Chromatography โดยทำภายใต้ความดัน เพื่อให้สารชะลงมาในอัตราที่เร็วขึ้นจึงใช้เวลาในการทำน้อยลง จากนั้นนำทั้ง 9 fractions ที่ได้จากการรวม fraction แล้วไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 พบว่า fraction D_1 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับ fractions อื่นๆ และ DMSO ดังนั้นจึงตัดสินใจนำ fraction D_1 มาทำการแยกต่อไป ส่วนใน fraction E_1 และ F_1 ที่พบการตายของยีสต์ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลกโตสและน้ำตาลกลูโคส แสดงว่าสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ใน fraction เหล่านั้นอาจจะทำให้ยีสต์อาจตายด้วยกลไกอื่น หรืออาจจะเกิดจากสารทดสอบที่ใช้มีความเข้มข้นที่มากเกินไปจนทำให้เป็นพิษต่อเซลล์

หลังจากนั้นทำการแยก fraction D_1 ด้วยเทคนิค Flash Column Chromatography ได้ออกมาทั้งหมด 285 fractions และเมื่อพิจารณาผล TLC พบว่าช่วง fraction ที่ a1-f15 พบจุดขนาดใหญ่ 1 จุดมีสีม่วงบนแผ่น TLC จึงมีความเป็นไปได้ว่า ที่ fraction เหล่านี้จะมีสารบริสุทธิ์อยู่ เพราะว่าสารที่บริสุทธิ์จะมีจุดบนแผ่น TLC เพียงจุดเดียว ดังนั้นจึงทำการรวม fraction ที่ a1-f15 ออกมาเป็น fraction E_2 แล้วนำไปทำการแยกต่อด้วยเทคนิค Flash Column Chromatography ครั้งที่ 2 เพื่อทำการแยกจุดสีม่วงบนแผ่น TLC ให้ออกมาเป็นสารบริสุทธิ์ ผลที่ได้หลังจากการรวม fraction แล้ว พบว่า fraction F_3 เป็น fraction ที่มีจุดสีม่วงบนแผ่น TLC ชัดเจนที่สุด จึงนำ fraction F_3 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิค Flash Column Chromatography ครั้งที่ 3 แล้วพบว่ามีผลึกของสารบริสุทธิ์ f3 เกิดขึ้น จึงทำการแยกผลึกเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

เนื่องจาก fraction B_1 ที่ได้จากการทำ Quick Column Chromatography มีผลึกเกิดขึ้นภายใน fraction จึงทำการแยกให้ได้เป็นสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการตกผลึกให้บริสุทธิ์ โดยละลาย fraction B_1 ด้วย CH_2Cl_2 และตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แล้วนำผลึกที่ได้มาทำการตกผลึกซ้ำจนครบ 3 ครั้ง จากนั้นนำผลึกของสารบริสุทธิ์ b1 ที่แยกออกมาได้ นำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1ของสาร b1 และ f3 พบว่าสาร b1 ไม่น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของการตายของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลกโตสและกลูโคส เมื่อเทียบกับผลการตายของยีสต์ในชุด DMSO ส่วนสาร f3 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 เพียงเล็กน้อย เนื่องจากผลที่ความเข้มข้น 75 และ 100 µg/ml พบการตายของยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกาแลกโตส มากว่ายีสต์ในชุด DMSO เพียงเล็กน้อย ดังนั้นหากเพิ่มความเข้มข้นของสารทดสอบมากขึ้นอาจจะเห็นผลได้ชัดเจนมากขึ้น

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิดด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี ได้แก่ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, COSY, DEPT, HSQC และ HMBC พบว่า b1 คือ 3-acetyl aleuritolic acid ซึ่ง ไม่น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ได้ดี ส่วนสาร f3 นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โทโพไอซอเมอเรส 1 ได้บ้างซึ่งจะต้องดำเนินการพิสูจน์สูตรโครงสร้างต่อไป อย่างไรก็ตามนับเป็นครั้งแรกที่มีการแยกสารบริสุทธิ์ออกจากต้นสำเภา

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด. 2544. หน้า 121.
2. Sangmalee S , Laorpaksa A, Sukrong S. (2012). A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.
3. Bjornsti MA. (1991). DNA topoisomerases. Current Opinion in Stuctural Biology. 1: 99-103.
4. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, and Liu LF. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. The Journal of Biological Chemistry. 260(27): 14873-14878.
5. Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K, (2008). Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer camptothecin in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. United States of America. 105(18): 6782-6786.
6. Reid RJD, Benedetti P, Bjornsti MA. (1998). Review yeast as a model organism for studying the actions of DNA topoisomerase-targeted drugs. Biochemica et Biophysica Acta. 1400: 289-300.

รองศาสตราจารย์ ภญ. ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง

หัวหน้าโครงการ

24 ตุลาคม 2557

ประวัติผู้วิจัย

ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ร.ต.อ.หญิง สุชาดา สุขหร่อง
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Police Captain Suchada Sukrong
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1206 00099 48 6
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail

   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330

   โทรศัพท์ : 02-218-8364 081-8196742, โทรสาร : 02-218-8357

   Email : suchada.su@chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2533
ภ.ม.	เภสัชเวท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Ph.D.	PlantPhysiology/ Biochemistry/ Molecular Biology	University of Kentucky, U.S.A.	2547

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   Bioactivity of natural products, Plant tissue culture

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย -
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556
2. การศึกษาพืชสมุนไพรไทยที่สร้างอัลคาลอยด์ต้านมะเร็ง: แคมโททีซิน, ทุนวิจัยทุนวิจัยเซเรบอส Cerebos Award (Thailand) 2008, ปี 2551
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2551
4. การชักนำให้เกิดรากขนของผักหลอดดอกขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการย้ายปลูก, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551
5. การพิสูจน์เอกลักษณ์วัตถุดิบสมุนไพรโดยใช้ลักษณะทางมหทรรศน์และจุลทรรศน์โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง และการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2551
6. การศึกษาความเสถียรของสีธรรมชาติเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง, โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (MAG Window I) ปี 2550
7. การศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นทางชีวภาพของน้ำหมักชีวภาพจากพืชต่อความทนทานภายใต้สภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นในข้าว, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2549-2551

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)*

1. Vimolmangkang S, Somkhanngoen C, Sukrong S. 2013. Potential pharmaceutical uses of silkworm excreta. Chiang Mai J Sci. (Accepted) IF=0.516
2. Suwanchaikasem P, Chaichantipyuth C, Sukrong S. 2013. Antioxidant-guided isolation of rosmarinic acid, a major constituent from Thunbergialaurifolia, and its use as a bioactive marker for standardization. Chiang Mai J Sci. (In press) IF=0.516

3. Suwanchaikasem P, Phadungcharoen T, Sukrong S. 2013. Authentication of the Thai medicinal plants known as 'Rang Chuet': Thunbergialaurifolia, Crotalaria spectabilis, and Curcuma aff. amada by combined techniques of TLC, PCR-RFLP fingerprints and antioxidant activities. ScienceAsia. 39(2):124-133. IF=0.398
4. Wiriyakarun S, Yodpetch W, Komatsu K, Zhu S, Ruangrungsi N, Sukrong S. **2012.** The discrimination of the rejuvenating herbs *Pueraria candollei* (White Kwao Khruea), *Butea superba* (Red Kwao Khruea), and *Mucuna collettii* (Black Kwao Khruea) using PCR-RFLP. J Nat Med. (in press)
5. Sukrong S, Yun KY, Stadler P, Kumar C, Facciuolo T, Moffatt BA, Falcone DL. **2012.** Improved growth and stress tolerance in the *Arabidopsis oxt*1 mutant triggered by altered adenine metabolism. Mol Plant. (in press)
6. Sangmalee S , Laorpaksa A, Sukrong S. **2012.** A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.
7. Boonsom T, Waranuch N, Ingkaninan K , Denduangboripant J, Sukrong S. **2012**. Molecular analysis of the genus *Asparagus* based on *mat*K sequences and its application to identify *A. racemosus*, a medicinally phytoestrogenic species. Fitotherapia. 83(5):947-953.
8. Suwanchaikasem P, Chaichantipyut C, Amnuoypol S, Sukrong S. **2012.** Random amplified polymorphic DNA analysis of *Thunbergia laurifolia* Lindl. and its related species. J Med Plant Res. 6(15):2955-2961.
9. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A**. 2012.** Synergistic growth of lactic acid bacteria and photosynthetic bacteria for possible use as a bio-fertilizer. African J Microbiol Res. 6(3):504-511.

10. Ya-ut P, Chareonsap P, Sukrong S. **2011**. Micropropagation and hairy root culture of *Ophiorrhiza alata* Craib for camptothecin production. Biotech Letters 33(12):2519-2526.
11. Viraporn V, Yamazaki M, Saito M, Denduangboripant J, Chuanasa T, Sukrong S. **2011**. Correlation of camptothecin-producing ability and phylogenetic relationship in the genus *Ophiorrhiza* (Rubiaceae). Planta Med. 77(7):759-764.
12. Thitikornpong W, Phadungcharoen T, Sukrong S. **2011.** Pharmacognostic evaluations of *Lagerstroemia speciosa* leaves. J of Med Plant Res. 5(8):1330-1337.
13. Kantha T, Chaiyasut C, Kantachote D, Sukrong S, Muangprom A. **2010**. Selection of photosynthetic bacteria producing 5-aminolevulinic acid from soil of organic saline paddy fields from the Northeast region of Thailand. African J of Microbiol Res. 4(17): 1848-1855.
14. Manissorn, J, Sukrong, S, Ruangrungsi, N, and Mizukami, H. **2010**. Molecular phylogenetic analysis of *Phyllanthus* species in Thailand and the application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for *Phyllanthus amarus* identification. Biol Pharm Bull. 33(10): 1723-1727.
15. Manissorn, J, Ruangrungsi, N, Phadungcharoen, T, and Sukrong, S. **2010**. DNA fingerprinting of selected Thai *Phyllanthus* species by RAPD analysis. J Health Res. 24(2): 73-79.
16. Vongsak B, Kengtong S, Vajrodaya S, Sukrong S. **2008**. Sequencing analysis of the medicinal plant *Stemona tuberosa* and five related species existing in Thailand based on *trn*H-*psb*A chloroplast DNA. Planta Med; 74(14):1764-1766.
17. Nuchuchua O, Chaipompokin W, Maktrirat R, Phummiratch D, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus*

by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Acta Horticulturae 786: 107-114.

18. Picheansoonthon C, Chaiyoot A, Sukrong S. **2008**. Jirawongsea, a new genus of the family Zingiberacea. Folia malaysiana. 91(1): 1-16.
19. Nuchuchua O, Pongsamart S, Sukrong S. **2008**. Characterization of *Durio zibethinus* by molecular marker and soluble polysaccharide in fruit rinds. Proceedings of the International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants 107-111.
20. Sukrong S, Zhu S, Ruangrungsi N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. **2007**. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species *Mitragyna speciosa*. Biol Pharm Bull 30(7): 1284-1288.
21. Picheansoonthon C, Lim CK, Sukrong S, Chaiyoot A. **2007**. A new species of Caulokaempferia (Zingiberaceae) from Southern Thailand. Folia Malaysiana 8(2): 53-61.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ: ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1. ศักยภาพการใช้สารสกัดจากเซลล์ต้นกำเนิดในการใช้ประโยชน์ทางยา, มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ, สกอ, ปี 2554-2556 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 40
2. การพิสูจน์เอกลักษณ์เครื่องยา “รางจืด” โดยใช้ลักษณะทางเภสัชเวทร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window I) ปี 2552 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 95
3. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase II โดยการใช้ยีสต์, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-

สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2552 การวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละ 95

นางอารีรัตน์ ลออปักษา

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง อารีรัตน์ ลออปักษา
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Areerat Laorpaksa
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 100202296 711
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรศัพท์มือถือ โทรสาร และ e-mail
   หน่วยงาน ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8382 086-7621692, โทรสาร : 02-218-8381
   Email : lareerat @chula.ac.th

a. ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
ภ.บ.	เภสัชศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2522
ภ.ม.	จุลชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2526
พท.บ	แพทย์แผนไทยบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช	2552

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   วัคซีน สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ไม่มี
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
      1. การศึกษาการใช้และประสิทธิภาพน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้กับเครื่องมือแพทย์ในสถานพยาบาลโดยความร่วมมือกับกระทรวงสาธารณสุขปี 2540
      2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกจากสมุนไพรไทยทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ปี 2546

   ผู้ร่วมโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

1. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดยการใช้ยีสต์ที่ได้รับยีนถ่ายโอน, กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2551
2. การคัดกรองพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I II โดยการใช้เซลล์ยีสต์เป็นเกณฑ์ , กองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.-สถาบันการศึกษา (MAG Window II) ปี 2553

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)*

1. Sangmalee S , Laorpaksa A, Sukrong S. **2012.** A topoisomerase II poison screen of ethnomedicinal Thai plants using a yeast cell-based assay. Journal of Ethnopharmacology. 142(2):432-437.

2. Wimon Pothiwong, Areerat Laorpaksa, Nopadon Pirarat, Sujin Sirisawadi, Jantima Intarapanya, Suree Jianmongkol. **2007.** Autoxidation of Brain Homogenates from Various Animals as Measured by Thiobarbituric Acid Assay. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 56:336-338.

3. Areerat Laorpaksa,Wimon Pothiwong, Suree Jianmongkol. **2008.** Antimicrobial activity of endophytic bacteria isolated from Thai medicinal plant. Thai Journal Pharmaceutical Sciences. 32(1-2):21-32.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด : ไม่มี

นางสาวศุภกาญจน์ ชำนิ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวศุภกาญจน์ ชำนิ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Supakarn Chamni
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1101 02282 50 35
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ดร.
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   หน่วยงาน ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กทม. 10330
   โทรศัพท์ : 02-218-8364 โทรสาร : 02-218-8357 Email : supakarn.c@chula.ac.th
5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
ปริญญาตรี	เคมี	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	2548
ปริญญาเอก	เคมี	Texas A&M University	2554

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   การสกัดและแยกสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ *(โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย)*
   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย ไม่มี
   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย -
   ผู้ร่วมโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย “การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ oxyresveratrol”, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2555-2556
   7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : *(ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุนย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)*

1. **Chamni S**, Dang Y, He Q-L, Bhat S, Liu JO, Romo D Diazo. **2011**. Reagents with Small Steric Footprints for Simultaneous Arming/SAR Studies of Alcohol-Containing Natural Products via O–H Insertion. *ACS Chem. Biol.*, 6:1175–1181.

2. Zhang W, Richardson RD, **Chamni S,** Smith JW, Romo D. **2008**. β-Lactam Congeners of Orlistat as Inhibitors of Fatty Acid Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett. 28*, 2491-2494.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการ “การสังเคราะห์อนุพันธ์ของ Oxyresveratrol”, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2555-2556