

โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเน้นศักยภาพ
ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพรรณพืชในประเทศไทย

โดย ผศ. ดร. ชวลิต สิทธิสมบัติ และคณะ

มีนาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเน้นศักยภาพ
ฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพรรณพืชในประเทศไทย

ผศ. ดร. ขวาลิต สิทธิสมบัติ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งให้การสนับสนุนการวิจัยนี้ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ให้ความอนุเคราะห์การใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีบางส่วน

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับการติดต่อเก็บตัวอย่างพืชและการตรวจสอบเอกลักษณ์พืช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของตัวอย่างสารสกัดจากพืช ศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยศิลปากรสำหรับการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสาร

ขอขอบคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านทุกสถาบันที่แม่มีได้ออกนามไว้ ณ. ที่นี้มีส่วนเกี่ยวข้องในทุกขั้นตอนของงานวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ :	MRG4780143
ชื่อโครงการ :	โครงการศึกษาวิจัยและพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเน้นศักยภาพฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพรรณพืชในประเทศไทย
ชื่อผู้วิจัย	ผศ.ดร.ชวลิต ลิขิตสมบัติ ศ.ดร.วิชัย รั้วตระกูล ¹ ศ.ดร.มนัส พรหมโคตร ¹ Prof. Dr. François TILLEQUIN ² Prof. Dr. Sylvie MICHEL ²
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ² Faculté de Pharmacie Université René Descartes- Paris 5, France
เบอร์อีเมล :	chavalit@su.ac.th
ระยะเวลาโครงการ :	2547-2553

จากวัตถุประสงค์ของโครงการเพื่อทำการสำรวจทางพฤกษเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) โดยเน้นการศึกษาในพืชบางสกุลบางชนิด และสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์นั้น ได้ทำการเก็บ รวบรวม พร้อมทั้งตรวจสอบชนิดของพืชทั้งสองวงศ์จำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย พืชวงศ์ยาง ได้แก่ ยางแดง (*Dipterocarpus turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) และ พะยอม (*Shorea roxburghii*) และพืชวงศ์ส้ม ได้แก่ มะกรูด (*Citrus hystrix*) กะอวม (*Acronychia pedunculata*), มะนาวผี (*Atalantia monophylla*), ประยงค์ขนบาง (*Glycosmis puberula* var *crabii*), ช้างงาเดียว (*Luvunga scandens*), เพี้ยกระทิง (*Melicope pteleifolia*) และ *Micromelum hirsutum* นำส่วนของพืชอย่างน้อย 3 ส่วนคือ เนื้อไม้ เปลือกต้น และใบ ส่วนของพืชนำมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซนและเอทานอล การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองใช้เซลล์มะเร็ง 6 ชนิดคือ Murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) ผลการทดสอบพบว่า มีสารสกัดจากพืช 3 ชนิดของพืชวงศ์ยาง ได้แก่ ยางแดง (*D. turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), และตะเคียนทอง (*H. odorata*) และสารสกัดจากพืช 2 ชนิดของพืชวงศ์ส้ม ได้แก่ ประยงค์

ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*) และช้างงาเดียว (*L. scandens*) ที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20 µg/ml

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดเฮกเซนจากส่วนเนื้อไม้ของยางปาย (*D. costatus*) พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดยกเว้นเซลล์ ASK นับเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดโดยมีค่า $ED_{50} = 4.03$ µg/ml ต่อเซลล์ P-388 ตะเคียนทอง (*H. odorata*) ซึ่งเป็นพืชที่มีประโยชน์ทางยาใช้สำหรับการสมานแผลนั้นพบว่า สารสกัดเอธานอลจากส่วนเนื้อไม้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ Lu-1 ($ED_{50} = 15.18$ µg/ml) สารสกัดเอธานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ P-388 ($ED_{50} = 6.79$ µg/ml) นับเป็นรายงานครั้งแรกของการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชวงศ์ยางในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด การศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาเคมีพบว่าสารที่มีฤทธิ์น่าจะเป็นสารประกอบกลุ่ม terpenoids เมื่อนำส่วนเนื้อไม้ของยางปายมาสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี column chromatography พบสาร CHA008 ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสาร β -amyrin ที่จัดอยู่ในกลุ่ม terpenoids สารมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะฤทธิ์ต่อเซลล์ KB

จากพืชวงศ์ส้ม สารสกัดเฮกเซนจากส่วนใบและดอกของประยงค์ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*), และสารสกัดจากส่วนใบของช้างงาเดียว (*L. scandens*) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ($ED_{50} = 5.28$ - 19.44 µg/ml) สารสกัดเฮกเซนจากส่วนดอกของประยงค์ขนบางและจากส่วนใบของช้างงาเดียวนั้นมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างขวาง มีฤทธิ์สูงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ($ED_{50} = 5.28$ - 8.07 µg/ml) และยังมีฤทธิ์ต่อเซลล์ ASK ตันมะกรูดแม้ว่าจะไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของส่วนรากต้นมะกรูดโดยสกัดแยกด้วยวิธี column chromatography สามารถแยกสารประกอบกลุ่ม coumarins ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดได้ 2 ชนิดคือ seselin และ xanthyletin นอกจากนี้การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC-MS ทำให้พบสารประกอบกลุ่ม coumarins อีก 2 ชนิดคือ 6,7-dimethylesculin และ suberosin การศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารเหล่านี้พบว่ามีฤทธิ์ที่น่าสนใจหลายประการ เช่น พบว่าสาร seselin ซึ่งเป็นสารหลักในรากมะกรูดมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี การพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารนี้น่าจะนำไปสู่สารที่มีฤทธิ์สูงขึ้น

กุญแจคำ: ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง พืชวงศ์ส้ม พืชวงศ์ยาง เทอร์พีนอยด์ คูมารินส์

Abstract

Project Code : MRG4780143

Research Title : Research and development of bioactive compounds with anticancer potential from plants in Thailand

Researcher : Assist. Prof. Dr. CHAVALIT SITTISOMBUT

Prof. Dr. VICHAI REUTRAKUL¹

Prof. Dr. MANAT POHMAKOT¹

Prof. Dr. FRANCOIS TILLEQUIN²

Prof. Dr. SYLVIE MICHEL²

Office : Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

¹ Faculty of Science, Mahidol University

² Faculté de Pharmacie, Université René Descartes- Paris 5, France

Email Address : chavalit@su.ac.th

Project Period : 2547-2553

From the purpose of this study which is to investigate and evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of plants in families of Rutaceae and Dipterocarpaceae, we collected 11 plants, *Dipterocarpus turbinatus*, *D. costatus*, *Hopea odorata*, *Shorea roxburghii*, *Citrus hystrix*, *Acronychia pedunculata*, *Atalantia monophylla*, *Glycosmis puberula* var. *crabii*, *Luvunga scandens*, *Melicope pteleifolia* and *Micromelum hirsutum*. Plant parts (at least, woods, barks and leaves) were extracted with hexane and ethanol respectively and tested, *in vitro*, with 6 cancer cell lines, murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) and rat glioma (ASK). It has been found that extracts from *D. turbinatus*, *D. costatus*, *H. odorata*, *G. puberula* var. *crabii*, and *L. scandens* were cytotoxic against cancer cells at concentration less than 20 µg/ml.

The hexane extract of the wood of *D. costatus* had broad spectrum of cytotoxic activity against various cells, except the ASK, and was the highest cytotoxicity with the ED₅₀ = 4.03 µg/ml against the P-388. The ethanol extract of the wood of *H. odorata* is active against Lu-1

with the ED_{50} = 15.18 μ g/ml while the leaf extract was cytotoxic against P-388 (ED_{50} = 6.79 μ g/ml). It is the first time that cytotoxic activity of dipterocarpaceous plants was performed against various cancer cells *in vitro*. The preliminary phytochemical study indicated that active extracts contained terpenoids. In the isolation of the wood of *D. costatus* by column chromatography a substance called 'CHA008' with chemical structure closed to β -amyrin, a terpenoid, was obtained. This substance had broad spectrum of cytotoxicity, especially against KB cells.

From rutaceous plants, the hexane extract of leaves and flowers of *G. puberula* var. *crabii* and leaf extract of *L. scandens* were cytotoxic (ED_{50} = 5.28-19.44 μ g/ml). The hexane extract of flowers of *G. puberula* var. *crabii* and leaf extract of *L. scandens* had broad spectrum of cytotoxicity, were active against MCF-7 (ED_{50} = 5.28-8.07 μ g/ml) and active against the ASK. Though extracts of the *C. hystrix* were inactive to the tested cancer cells, we isolated two coumarins, seselin and xanthyletin, from the root bark. By using the GC-MS we could also identify two additional coumarins, 6,7-dimethylesculin and suberosin. These known coumarins were reported that possessed some interesting pharmacological activities. We have confirmed the cytotoxic and anti-HIV activities of seselin. These compounds have potential for drug discovery program as their chemical structures can be modified to obtain compounds with improved activity.

Key words: Cytotoxic activity, Rutaceae, Dipterocarpaceae, Terpenoids, Coumarins

Executive Summary

เนื่องจากปัจจุบันนี้โรคมะเร็งได้เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประชากรโลกและประชาชนไทย โดยที่ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรชีวภาพที่มีศักยภาพสูง โครงการนี้จึงมุ่งค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพรรณพืชในประเทศไทยเน้นการสำรวจพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) โดยทำการเก็บและรวบรวมพืชพร้อมทั้งตรวจสอบชนิดของพืชทั้งสองวงศ์ เน้นการศึกษาในพืชบางสกุลบางชนิด นำส่วนต่างๆของพืชตั้งแต่ราก ลำต้น ใบ ดอก และผลมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซนและเอทานอล จากนั้นนำส่วนสกัดของพืชมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืชจำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย พืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) อันได้แก่ ยางแดง (*Dipterocarpus turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) และ พะยอม (*Shorea roxburghii*) และพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) อันได้แก่ มะกรูด (*Citrus hystrix*) กะอาม (*Acronychia pedunculata*), มะนาวผี (*Atalantia monophylla*), ประยงค์ขนบาง (*Glycosmis puberula* var. *crabii*), ช้างงาเดี๋ย (*Luvunga scandens*), เพี้ยกระทิง (*Melicope pteleifolia*) และ *Micromelum hirsutum* ต่อเซลล์มะเร็ง 6 ชนิดคือ Murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) พบว่ามีสารสกัดจากพืช 3 ชนิดของพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) อันได้แก่ ยางแดง (*D. turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), และตะเคียนทอง (*H. odorata*) และสารสกัดจากพืช 2 ชนิดของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) อันได้แก่ ประยงค์ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*), และช้างงาเดี๋ย (*L. scandens*) ที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20 µg/ml โดยมีสาร Ellipticine เป็นตัวเปรียบเทียบ

สารสกัดเฮกเซนจากส่วนเนื้อไม้ของยางปาย (*D. costatus*) เป็นสารสกัดเดียวที่ไม่เพียงมีฤทธิ์กว้างขวางต่อหลายชนิดเซลล์มะเร็งยกเว้นเซลล์ ASK แล้ว สารสกัดเฮกเซนนี้ยังเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดโดยมีค่า $ED_{50} = 4.03 \mu\text{g/ml}$ ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 murine lymphocytic leukemia ตะเคียนทอง (*H. odorata*) ซึ่งเป็นพืชที่ใช้สมุนไพรแผ่นนั้นพบว่า สารสกัดเอทานอลจากส่วนเนื้อไม้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ Lu-1 human lung cancer ($ED_{50} = 15.18 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเอทานอลจากส่วนเปลือกต้นยังมีฤทธิ์ต่อเซลล์ P-388, KB และ MCF-7 สารสกัดเอทานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia cells ($ED_{50} = 6.79 \mu\text{g/ml}$) ฤทธิ์สารสกัดอยู่ในระดับเดียวกับสารสกัดเรซินของตะเคียนทองที่รายงานไว้แล้ว (Ruangsri, 2002) อย่างไรก็ตามนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชวงศ์ยางในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด การศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาพบว่าสารที่มีฤทธิ์น่าจะเป็นสารประกอบกลุ่ม terpenoids เมื่อนำส่วนเนื้อไม้ของยางปายมาสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี column chromatography พบสาร CHA008 ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสาร β -amyrin ที่จัดอยู่ในกลุ่ม terpenoids สารมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด เมื่อเทียบกับสารสกัดเฮกเซนพบว่าฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ลดลง ขณะที่ฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง KB สูงขึ้น

สารสกัดจากพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) นั้นส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ ขณะที่สารสกัดเฮกเซนจากส่วนใบและดอกของประยงค์ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*), และสารสกัดจากส่วนใบของช้างงาเดียว (*L. scandens*) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ($ED_{50} = 5.28-19.44 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเฮกเซนจากส่วนดอกของประยงค์ขนบางและจากส่วนใบของช้างงาเดียวนั้นมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างขวางต่อส่วนใหญ่ของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะมีฤทธิ์ต่อเซลล์ ASK และมีฤทธิ์สูงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ($ED_{50} = 5.28-8.07 \mu\text{g/ml}$) อย่างไรก็ตามด้วยข้อจำกัดของแหล่งของพืชทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างพืชเพิ่มเติมได้ แม้ว่าสารสกัดจากต้นมะกรูดจะไม่มีฤทธิ์ แต่ด้วยความสนใจส่วนตัวจึงได้ลองทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของส่วนรากต้นมะกรูด เมื่อนำส่วนรากของต้นมะกรูดมาสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี column chromatography และทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ทำให้สามารถแยกสารประกอบกลุ่ม coumarins ได้ 2 ชนิดคือ seselin และ xanthyletin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัด นอกจากนั้นการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค GC-MS ทำให้ตรวจพบสารประกอบกลุ่ม coumarins ได้อีก 2 ชนิด คือ 6,7-dimethylesculin และ suberosin

การศึกษาข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารเหล่านี้พบว่ามีความน่าสนใจหลายประการ เนื่องจากสามารถแยกสารได้ในปริมาณสูงและจากการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี พบว่าสาร seselin ในรากมะกรูดมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี ผู้วิจัยจึงได้เตรียมที่จะศึกษาแนวทางพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารต่อไปซึ่งเชื่อว่าจะนำไปสู่สารที่มีฤทธิ์สูงขึ้น

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	5
Executive summary	7
สารบัญเรื่อง	9
สารบัญตาราง	10
สารบัญภาพ	11
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	12
I. บทนำ	13
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	13
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย	14
- ขอบเขตของการวิจัย	15
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
II. วิธีการดำเนินการวิจัย	16
- สารเคมี	16
- เครื่องมือและอุปกรณ์	16
- วิธีการวิจัย	17
III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	19
IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	30
ประวัติผู้วิจัย	34
Output ที่ได้จากโครงการ	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Cytotoxic and antimitotic activities (ASK assay) of dipterocarpaceous plants	20
ตารางที่ 2 Cytotoxic activities of rutaceous plants	22
ตารางที่ 3 Phytochemical detection of some dipterocarpaceous plant extracts	24
ตารางที่ 4 Cytotoxic activity of CHA008 and CHA012	26
ตารางที่ 5 Cytotoxic activity of CHA001 and CHA002	27
ตารางที่ 6 Anti-HIV activity of CHA001 and CHA002	27

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 Structure of amyrins	26
ภาพที่ 2 Structure of Seselin (CHA001) and Xanthyletin (CHA002)	26

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ASK	rat glioma cell
Col-2	human colon cancer cell
ED ₅₀	ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการยับยั้ง 50% ของเซลล์มะเร็ง
EtOH	Ethanol
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectroscopy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IR	Infrared
KB	human nasopharyngeal carcinoma cell
Lu-1	human lung cancer cell
MCF-7	human breast cancer cell
µg	microgram
ml	millilitre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
P-388	Murine lymphocytic leukemia cell
RT	Reverse Transcriptase
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
กก.	กิโลกรัม

I. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคมะเร็งนับเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากอัตราการตายของประชากรจากโรคนี้อยู่ในอันดับสูงสุดของประเทศ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศในแต่ละปีนับเป็นมูลค่ามหาศาล การรักษาโรคมะเร็งนั้นประกอบด้วยหลายวิธี¹⁻³ การรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) หรือการรักษาด้วยยาต้านมะเร็งนั้นเป็นวิธีหนึ่งที่สำคัญและใช้ร่วมกับการรักษาโดยวิธีอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษา ทั้งนี้อาจเป็นการใช้ยาก่อน ระหว่าง หรือหลังการผ่าตัดหรือรังสีรักษา ยาต้านมะเร็งจึงนับว่ามีความสำคัญในทางการแพทย์ยิ่ง

อย่างไรก็ตามแม้ว่าปัจจุบันจะมียาต้านมะเร็งอยู่จำนวนมาก ปัญหาของการใช้ยาต้านมะเร็งยังมีอยู่หลายประการ⁴ เช่น ประสิทธิภาพของยาต่อการรักษาโรคมะเร็งแต่ละประเภท ภาวะการดื้อยาที่ทำให้ต้องใช้ยาที่แรงขึ้นหรือใช้ยาาร่วมกันมากขึ้น ผลข้างเคียงของยาที่รุนแรงต่อผู้ป่วยจนต้องชะลอการรักษาเป็นครั้งคราวหรือผลที่ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเลวลง ตลอดจนปัญหาราคายาที่แพงมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยพัฒนายาต้านมะเร็งชนิดใหม่อย่างต่อเนื่อง

หากพิจารณาว่ายาต้านมะเร็งที่ใช้ในปัจจุบันจะพบว่ามีที่มาจากแหล่งธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ ยาบางชนิดเป็นยาที่ยังคงต้องได้มาจากแหล่งธรรมชาติเช่น vincristine และ vinblastine จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus* (Linn.) G.Don., Apocynaceae) ยาจากธรรมชาติหรือจากพืชนั้นบางครั้งมีผลข้างเคียงรุนแรงจึงต้องมีการดัดแปลงสูตรโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ได้ยาที่ปลอดภัยมากขึ้นเช่นยา topotecan ที่ดัดแปลงมาจากสาร camptothecin ที่ได้จากพืช *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae)⁵ นอกจากนั้นยาใหม่หลายชนิดพัฒนามาจากพืชเช่น paclitaxel และ docetaxel เป็นต้น อาจกล่าวได้ว่าพืชนับเป็นแหล่งสำคัญในการพัฒนายาต้านมะเร็ง

การศึกษาวิจัยพัฒนายาต้านมะเร็งจากพืชสมุนไพรในประเทศไทยนั้น ในระยะแรกเป็นการศึกษาทางพฤกษเคมีในพืชเช่น ชิงช้า (*Capparis micracantha* DC., Capparidaceae) ขันทองพยาบาท (*Suregada multiflorum* (A.Juss.) Baill., Euphorbiaceae) เขยตาย (*Glycosmis pentaphylla* (Retz.) DC., Rutaceae) และหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour., Stemonaceae)⁶ ต่อมาจึงได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืชเช่น อ้อยแดง (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) และหนุมานประสานกาย (*Schefflera leucantha* R. Vig., Araliaceae)⁷ ในระยะหลังจึงมีการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง พ.ศ. 2539 Soonthorncharoenon และคณะ⁸ รายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารกลุ่ม acetogenins ในต้นข้าวหลาม (*Goniothalamus marcanii* Craib., Annonaceae) Jiratchariyakul และคณะ⁹ รายงานการพบสารต้านมะเร็ง cucurbitacin B ในบวบขม (*Trichosanthes cucumerina* Linn., Cucurbitaceae) Picha และคณะ¹⁰

พบว่าสาร curculathyrane B จากต้นสบู่ขาว (*Jatropha curcas* Linn., Euphorbiaceae) มีผลต่อเซลล์มะเร็งเมื่อให้ร่วมกับภาวะ hyperthermia ในระยะ 4-5 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืชกันมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยใดที่สามารถพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจนถึงการวิจัยทางคลินิกหรือพัฒนาจนสามารถใช้เป็นยาใหม่ได้

ในการศึกษารั้งนี้ คณะผู้วิจัยมุ่งทำการสำรวจทางพฤกษเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืชพรรณในประเทศไทย โดยการสำรวจพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) โดยเฉพาะในกลุ่มพืชที่ยังมีการศึกษาในประเทศไทยน้อยเกี่ยวกับพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นการสำรวจที่เน้นการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืชบางสกุลบางชนิดและสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อทำการสำรวจทางพฤกษเคมีและทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) โดยเน้นการศึกษาในพืชบางสกุลบางชนิด และสกัดแยกหาสารที่มีฤทธิ์

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

พืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) มีประมาณ 150 สกุล 1,600 ชนิด¹¹ กระจายพันธุ์ในประเทศไทยประมาณ 21 สกุล 65 ชนิด มีทั้งไม้ต้น ไม้พุ่ม และไม้เถาเลื้อย มีหลายชนิดที่เป็นพืชเศรษฐกิจเช่น มะนาว มะกรูด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน และมะตูม เป็นต้น acronycine¹² เป็นสารอัลคาลอยด์จากพืชในออสเตรเลียชื่อ *Acronychia baueri* Schott (Rutaceae) การสกัดแยกสารอนุพันธ์ acronycine epoxide จากพืชในปริมาณน้อยและสารไม่ค่อยคงตัว นำไปสู่การปรับปรุงสูตรโครงสร้างทางเคมีจนได้สารอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งสูงจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการและในสัตว์ทดลองชื่อสาร benzo[b]acronycine diacetate และปัจจุบันอยู่ระหว่างการศึกษากทางคลินิก

พืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) มีประมาณ 15 สกุล 580 ชนิด¹¹ กระจายพันธุ์ในประเทศไทย 8 สกุล 50 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นไม้ต้นขนาดใหญ่ มีหลายชนิดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ พืชบางชนิดในวงศ์นี้มีประโยชน์ทางยาเช่น เปลือกต้นยางนา แก้วปวดข้อ¹³ การศึกษาพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชวงศ์นี้ในประเทศไทยยังมีน้อย เร็วๆนี้การศึกษาพืชในวงศ์นี้พบสารกลุ่ม stilbenes ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง¹⁴ และมีฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี¹⁵ เรซินของตะเคียน (*Hopea odorata* Roxb.) *Cotylelobium melanoxylon* Pierre and *Shorea henryana* Pierre มีประโยชน์ทางยาใช้สำหรับการรักษาแผล ส่วนเรซินจากยางนา (*D. alatus* Roxb.) และยางปาย (*D. costatus* Gaertn. F.) ใช้รักษาวัณโรค โภโณเรีย โรคผิวหนัง และรักษาแผล¹⁶ จากการศึกษาพบว่าพืชสมุนไพรหลายชนิดที่ใช้รักษา

แผลในทางการแพทย์พื้นบ้านมีศักยภาพของฤทธิ์ต้านมะเร็ง (cytotoxic activity) หรือการป้องกันมะเร็ง (chemopreventive activity) ดังตัวอย่างเช่น ขมิ้นชัน¹⁷ และสมุนไพรสกุล *Terminalia* spp.¹⁸⁻¹⁹ อันที่จริงแล้วยังมีรายงานว่าผลิตภัณฑ์จากส่วนเนื้อไม้ของพืชสกุล *Shorea* เช่น *S. almon*, *S. astylosa*, *S. negrosensis* และ *S. palembanica* ซึ่งพบการกระจายแถบประเทศฟิลิปปินส์นั้นมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง²⁰ จึงเห็นได้ว่าพืชวงศ์ยางและพืชวงศ์ส้มที่คัดเลือกมาศึกษาน่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ต้านมะเร็งได้

ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาทางพฤกษเคมีและการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของพืช โดยครอบคลุมพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) และเน้นการศึกษาในพืชบางสกุลบางชนิดซึ่งคาดว่าจะมีสารที่มีศักยภาพทางยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงศักยภาพฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารในพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) ที่ศึกษาเพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาอย่างกว้างขวางในพืชวงศ์ที่น่าสนใจต่อไป
2. ได้สารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่มีศักยภาพที่ใช้เป็นต้นแบบเพื่อการศึกษาขั้นต่อไปของกระบวนการพัฒนา

II. วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Acetone
Ethanol
Methanol
Butanol
Chloroform
Ethyl acetate
Hexane
Petroleum ether
Dimethyl sulfoxide
Ellipticine
Hydrochloric acid
Nitric acid
Potassium bromide
Potassium hydroxide
Sodium bicarbonate
Sodium hydroxide
Sodium sulfate
Sulfuric acid
Vanillin
Silica gel for column chromatography
Silica gel for TLC

เครื่องมือและอุปกรณ์

NMR spectrophotometer
GC-MS spectrophotometer
UV spectrophotometer
IR spectrophotometer
Hot air oven
Grinder
Rotary evaporator

Dessicator
Soxhlet's apparatus
Water Bath
UV chamber

วิธีทำการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชจากเขตจังหวัดภาคเหนือ จำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย พืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) อันได้แก่ ยางแดง (*Dipterocarpus turbinatus*) ยางปาย (*D. costatus*) ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) และ พะยอม (*Shorea roxburghii*) และพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) อันได้แก่ มะกรูด (*Citrus hystrix*) กะอวม (*Acronychia pedunculata*) มะนาวผี (*Atalantia monophylla*) ประยงค์ขนบาง (*Glycosmis puberula* var. *crabii*) ช้างงาเดียว (*Luvunga scandens*) เพี้ยกระทิง (*Melicope pteleifolia*) และ *Micromelum hirsutum* พร้อมทั้งจำแนกชนิดของพืช การจำแนกพืชวงศ์ยางทำโดยเจ้าหน้าที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พร้อมการเปรียบเทียบตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช ส่วนการจำแนกพืชวงศ์ส้มทำโดย J.F. Maxwell และคณะ พร้อมการเปรียบเทียบตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์พืช ตัวอย่างพืชแห้งเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร การเก็บตัวอย่างพืช ประกอบด้วย ส่วนเนื้อไม้ เปลือกต้น และใบเป็นอย่างน้อย หากเป็นไปได้เก็บส่วนราก ดอกและผลด้วย

2. การเตรียมตัวอย่างและการเตรียมสารสกัด

ตัวอย่างพืชที่เก็บนำมาทำให้แห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C. นำตัวอย่างพืชแห้งไปบดละเอียด ชั่งตัวอย่างพืช 100 กรัมและสกัดด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซนและเอทานอลตามลำดับด้วย soxhlet's apparatus สารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator สารสกัดแห้งที่ได้บรรจุภาชนะและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 8°C. ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง

สารสกัดแห้งจากพืชนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง โดยวิธีของ Likhitwitayawuid และคณะ²¹ และ Swanson และคณะ²² เซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย 6 ชนิด คือ Murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) โดยมีสาร Ellipticine ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่ใช้ทางคลินิกในปัจจุบันเป็นตัวเปรียบเทียบ จะถือว่า

สารสกัดมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองเมื่อค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้าน 50% ของ เซลล์มะเร็ง (ED₅₀) มีค่าต่ำกว่า 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4. การทดสอบเบื้องต้นทางพิษเคมี

นำสารสกัดจากพืชที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองมาทดสอบทางพิษเคมีเพื่อทราบถึงกลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบ นำสารสกัดจำนวน 20 มิลลิกรัมมาละลายในเมทานอล 2 มิลลิลิตร การทดสอบใช้เทคนิค thin layer chromatographic (TLC) technique บน silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ตรวจสอบโดยใช้ spraying reagents และ/หรือใช้วิธีการที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว²³

5. การแยกสารบริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้างทางเคมี

นำส่วนของพืชที่พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองสูงมาทำการสกัดแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ส่วนของพืชที่นำมาศึกษาคือ ส่วนเนื้อไม้ของยางปาย ส่วนรากของต้นมะกรูด

เก็บตัวอย่างพืชจำนวนประมาณ 3 กก. นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายคือ เฮกเซนและเอทานอลตามลำดับ สารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator สารสกัดแห้งที่ได้นำไปแยกองค์ประกอบโดยใช้เทคนิค column chromatography ใช้ silica gel เป็น adsorbent สารที่แยกได้นำไปพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยวิธี NMR, UV, IR spectroscopy และ GC-MS spectroscopy

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HIV-1

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HIV-1 ของสาร CHA001(seselin) และ CHA002(xanthyletin) ที่สกัดแยกได้โดยการดูผลการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1 RT) ทำตามวิธีที่มีผู้ศึกษาไว้⁴⁶

III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากพืชวงศ์ยาง

จากการทดสอบสารสกัดของพืชจำนวน 24 สารสกัดของพืช 4 ชนิดในวงศ์ยางเพื่อดูฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งจำนวน 6 ชนิดคือ murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) ผลการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองจะต้องมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้าน 50% ของเซลล์มะเร็ง (ED_{50}) ต่ำกว่า 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดเฮกเซนของส่วนเนื้อไม้ต้นยางปาย (*D. costatus*) สารสกัดเฮกเซนของส่วนเนื้อไม้และส่วนเปลือกต้นยางแดง (*D. turbinatus*) สารสกัดเอธานอลของส่วนเนื้อไม้ต้นตะเคียนทอง (*H. odorata*) สารสกัดเอธานอลส่วนเปลือกต้นตะเคียนทอง และสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอธานอลของส่วนใบต้นตะเคียนทองเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ ส่วนสารสกัดที่เหลือเป็นสารสกัดที่ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง

ตะเคียนทอง (*H. odorata*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการสมานแผลนั้นพบว่ามีหลายสารสกัดที่มีฤทธิ์ สารสกัดเอธานอลจากส่วนเนื้อไม้ไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งปานกลางต่อเซลล์มะเร็งปอด Lu-1 human lung cancer (ED_{50} = 15.18 μ g/ml) สารสกัดเอธานอลจากส่วนเปลือกต้นมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปานกลางต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388, เซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปาก KB และเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ED_{50} = 17.64, 16.69 และ 18.26 μ g/ml ตามลำดับ) ส่วนสารสกัดจากส่วนใบนั้นสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปานกลางต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388 (ED_{50} = 11.12 μ g/ml) และต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ED_{50} = 17.43 μ g/ml) สารสกัดเอธานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่แรงต่อเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia cells (ED_{50} = 6.79 μ g/ml) ฤทธิ์สารสกัดนี้อยู่ในระดับเดียวกันกับสารสกัดเรซินของต้นตะเคียนทองที่มีผู้รายงานไว้แล้ว (Ruangrungsri, 2002) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าฤทธิ์ส่วนใหญ่อยู่ในสารสกัดที่เป็นตัวทำละลายที่มีอำนาจการสกัดสูงคือเอธานอล

สารสกัดจากส่วนต่างๆของต้นยางแดง (*D. turbinatus*) นั้นพบว่า มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเฉพาะสารสกัดเฮกเซนของส่วนเนื้อไม้และส่วนเปลือกต้นและฤทธิ์ของสารสกัดที่พบเป็นแบบปานกลาง สารสกัดเฮกเซนของส่วนเนื้อไม้ไม่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388, เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอด Lu-1 human lung cancer (ED_{50} = 15.35, 15.89 และ 19.44 μ g/ml ตามลำดับ) สารสกัดเฮกเซนของส่วนเปลือกต้นมีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388 (ED_{50} = 13.61 μ g/ml)

สารสกัดเฮกเซนจากส่วนเนื้อไม้ของยางปาย (*D. costatus*) เป็นสารสกัดเดียวจากพืชที่ไม่เพียงมีฤทธิ์เท่านั้นแต่ยังมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิดยกเว้นเซลล์ ASK และสารสกัดเฮกเซนนี้

ตารางที่ 1. Cytotoxic and antimitotic activities (ASK assay) of dipterocarpaceous plants.

extract	Cytotoxicity (ED ₅₀ , µg/ml)						ASK assay
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK	
<i>D. costatus</i> wood/hexane	4.03	19.71	18.93	11.15	13.63	>20	-
<i>D. costatus</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> wood/hexane	15.35	>20	>20	15.89	19.44	>20	-
<i>D. turbinatus</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> bark/hexane	13.61	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> wood/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	15.18	>20	-
<i>H. odorata</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> bark/EtOH	17.64	16.69	>20	18.26	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> leaf/hexane	11.12	>20	>20	17.43	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> leaf/EtOH	6.79	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> wood/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
Ellipticine	0.58	0.56	0.58	0.77	0.47	-	-

Cytotoxic assay: ED₅₀<20 µg/ml is considered active for extracts; P-388: murine lymphocytic leukemia, KB: human nasopharyngeal carcinoma, Col-2: human colon cancer, MCF-7: human breast cancer, Lu-1: human lung cancer, ASK: rat glioma; + = active, - = inactive

ยังเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดต่อเซลล์มะเร็ง P-388 murine lymphocytic leukemia ในกลุ่มสารสกัดจากพืชวงศ์ยางที่นำมาทดสอบโดยมีค่า $ED_{50} = 4.03 \mu\text{g/ml}$ แม้ว่าฤทธิ์ต้านมะเร็งอื่นจะสูงปานกลาง แต่พบว่าเป็นสารสกัดเดียวที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งทางเดินอาหาร Col-2 ($ED_{50} = 18.93 \mu\text{g/ml}$) และเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งสูงสุดในกลุ่มสารสกัดของพืชวงศ์ยางที่ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม (MCF-7) และสารสกัดที่ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (Lu-1, human lung cancer) ($ED_{50} = 11.15$ และ $13.63 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) สารสกัดเฮกเซนจากส่วนเนื้อไม้ของยางปายนี้จึงนับเป็นสารสกัดที่น่าสนใจ

3.2 ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากพืชวงศ์ส้ม

จากการทดสอบสารสกัดของพืชจำนวน 24 สารสกัดของพืช 4 ชนิดในวงศ์ส้มเพื่อดูฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง 6 ชนิดคือ murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) ผลการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองจะต้องมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการต้าน 50% ของเซลล์มะเร็ง (ED_{50}) ต่ำกว่า 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สารสกัดด้วยเฮกเซนและเอธานอลของส่วนต่างๆของต้นกะอวม (*Acronychia pedunculata*) และต้นมะนาวผี (*Atalantia monophylla*) ไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรไม่ว่าจะเป็นส่วนของเนื้อไม้ เปลือกต้น และใบ ใบอ่อนต้นกะอวมใช้เป็นเครื่องปรุงรสเนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ส่วนรากแก้โรคปวดข้อและไข้เปื้อปลา อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่สามารถเก็บส่วนรากมาศึกษาได้ ทั้งนี้มีผู้ศึกษาส่วนของเปลือกรากและลำต้นของกะอวมในประเทศจีนสามารถแยกองค์ประกอบได้สาร acrovestone ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง²⁴ ส่วนใบต้นมะนาวผีมีประโยชน์ใช้ในโรคทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตามไม่พบว่าส่วนนี้มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ แม้ว่าการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ส่วนใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส herpes simplex virus type 2²⁵ และมีฤทธิ์ฆ่า

การทดสอบสารสกัดของต้นเพี้ยกระทิง (*Melicope ptelefolia*) และ *Micromelum hirsutum* (ไม่มีชื่อไทย) ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดด้วยเฮกเซนและเอธานอลของส่วนเนื้อไม้ เปลือกต้น ใบ และผลของพืชทั้งสองชนิดพบว่า ไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้ในพืชสกุล *Melicope* มีผู้ศึกษาพบสารประกอบกลุ่ม alkaloids²⁶, flavonoids²⁷, coumarins, lignans²⁸, acetophenones²⁹ ในขณะที่พืชสกุล *Micromelum* มีรายงานการพบเฉพาะสารประกอบกลุ่ม alkaloids, flavonoids, coumarins³⁰⁻³¹ และไม่พบรายงานฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารที่สกัดแยกได้

ตารางที่ 2. Cytotoxic activities of rutaceous plants.

Extracts	Cytotoxicity (ED ₅₀ , µg/ml)					
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK
C. hystrix Root/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Root/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Root bark/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Root bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Wood/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Bark/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Leaf/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
C. hystrix Leaf EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Leaf Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
At. monophylla Leaf EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Leaf Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Ac. pedunculata Leaf EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Leaf Hexane	12.97	>20	>20	17.10	>20	>20
G. puberrula Flower Hexane	12.77	10.13	10.43	5.28	11.16	10.13
G. puberrula Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Leaf EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
G. puberrula Flower EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20

ตารางที่ 2. Cytotoxic activities of rutaceous plants. (continued)

Extracts	Cytotoxicity (ED ₅₀ , µg/ml)					
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK
L. scandens Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
L. scandens Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
L. scandens Leaf Hexane	11.43	12.12	>20	8.07	13.63	12.12
L. scandens Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
L. scandens Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
L. scandens Leave EtOH	19.44	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Leave Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Fruit Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Leave EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Me. pteleifolia Fruit EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Wood Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Bark Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Leave Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Fruit Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Wood EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Bark EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Leave EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Mi. hirsutum Fruit EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20

สารสกัดของส่วนต่างๆของต้นประยงค์ขนบาง (*Glycosmis puberula* var. *crabii*) ส่วนใหญ่ไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นสารสกัดด้วยเฮกเซนของส่วนใบและส่วนดอก สารสกัดด้วยเฮกเซนของส่วนใบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P-388 murine lymphocytic leukemia (ED₅₀ = 12.97 µg/ml) และมะเร็งเต้านม MCF-7 (ED₅₀ = 17.10 µg/ml) จะเห็นว่าแม้สารสกัดจะมีฤทธิ์ต้านมะเร็งแต่ฤทธิ์ก็ไม่สูงมาก ในขณะที่สารสกัดด้วยเฮกเซนของส่วนดอกแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองอย่างกว้างขวางเนื่องจากสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ทดสอบ (ED₅₀ = 5.28-12.77 µg/ml) และแสดงฤทธิ์สูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (ED₅₀ = 5.28 µg/ml) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่สามารถเก็บส่วนดอกของพืชมาศึกษา

เพิ่มเติมได้ พืชในสกุลนี้มีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารกลุ่มอัลคาลอยด์³²⁻³⁵ สารหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม flavonoids³⁶ และ terpenoids³⁷ ยังไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของต้นประยงค์ขนบาง จึงน่าจะมีการศึกษาต่อไป

ช้างงาเดียว (*Luvunga scandens*) เป็นไม้รื้อเลื้อย สารสกัดของส่วนเนื้อไม้และเปลือกต้นของช้างงาเดียวไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง แต่สารสกัดของส่วนใบที่สกัดด้วยเอทานอลแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองปานกลาง ($ED_{50} = 19.44 \mu\text{g/ml}$) และที่สำคัญคือสารสกัดของส่วนใบที่สกัดด้วยเฮกเซนแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองค่อนข้างกว้างขวางเนื่องจากสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิดยกเว้นเซลล์มะเร็งลำไส้ Col-2 ($ED_{50} = 8.07-12.12 \mu\text{g/ml}$) และแสดงฤทธิ์สูงสุดต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ($ED_{50} = 8.07 \mu\text{g/ml}$) ส่วนใบของช้างงาเดียวจึงมีศักยภาพสูงรองจากส่วนดอกของต้นประยงค์ขนบาง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าในใบพืชสกุลเดียวกันมีสารในกลุ่ม terpenoids³⁸⁻³⁹

พืชชนิดสุดท้ายของวงศ์ที่น่ามาศึกษาคือ มะกรูด (*Citrus hystrix*) มะกรูดเป็นพืชในสกุลส้ม (*Citrus*) ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมใช้ใบมะกรูดและผิวมะกรูดเป็นเครื่องปรุงอาหาร น้ำมะกรูดมีรสเปรี้ยว กลิ่นฉุน การใช้มะกรูดสระผมเป็นที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณ การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดของส่วนต่างๆของพืชไม่ว่าจะเป็นสารสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลของส่วนของเนื้อไม้ เปลือกต้น ใบ รากและเปลือกรากพบว่า ไม่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรต่อเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบทั้ง 6 ชนิด

3.3 การตรวจสอบชนิดของกลุ่มสารเบื้องต้น

การตรวจสอบชนิดของกลุ่มสารเบื้องต้นโดยวิธีการทางพิษเคมีและตามวิธีการของ Harborne²³ ในสารสกัดของพืชที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองสูง ได้แก่ สารสกัดด้วยเฮกเซนของส่วนของเนื้อไม้ต้นยางปาย (*D. costatus*) และสารสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลของส่วนใบของต้นตะเคียนทอง (*H. odorata*) ทำให้สามารถทราบชนิดของกลุ่มสารในพืชดังนี้ สารสกัดด้วยเฮกเซนส่วนของเนื้อไม้ต้นยางปายพบสารประกอบในกลุ่ม terpenoids ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซนและเอทานอลของส่วนใบของต้นตะเคียนทองพบสารประกอบในกลุ่ม terpenoids และสารประกอบฟีนอลิกที่อาจเป็นสาร tannins ไม่พบสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่ม flavonoids, anthraquinones และสารในกลุ่ม alkaloids ในพืชทั้งสองชนิด ดูตารางที่ 3

ในพืชสกุล *Dipterocarpus* นั้นมีรายงานการพบสารประกอบในกลุ่ม terpenoids³²⁴⁰ มีการพบสาร stilbenes ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกและมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองในส่วนเปลือกต้นพืช *D. hasseltii* ในอินโดนีเซีย³³⁴¹ ส่วนพืชสกุล *Hopea* นั้นมีรายงานการพบสารประกอบในกลุ่ม terpenoids³⁴⁴² human lung cancer สารประกอบฟีนอลิก³⁵⁴³ มีการพบสารประกอบฟีนอลิกกลุ่ม

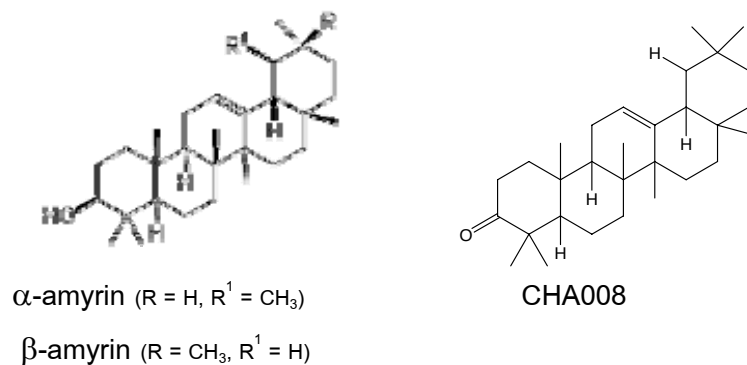
stilbenes ในส่วนเปลือกต้นพืช *H. parviflora* ในอินเดีย³⁶⁴⁴ และสารกลุ่ม flavonoids ในส่วนใบของพืชสกุล *Hopea* ในศรีลังกา³⁷⁴⁵

ตารางที่ 3. Phytochemical detection of some dipterocarpaceous plant extracts.

Phytochemical groups	<i>D. costatus</i> wood/hexane extract	<i>H. odorata</i> leaf/ hexane extract	<i>H. odorata</i> leaf/ EtOH extract
Alkaloids	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-
Flavonoids	-	-	-
Tannins	-	+/-	+
Terpenoids	+	+	+

3.4 การแยกองค์ประกอบทางเคมีและการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชวงศ์ยางพบว่า มีส่วนของพืชบางชนิดมีฤทธิ์ที่น่าสนใจ จึงได้คัดเลือกนำส่วนเนื้อไม้ของยางปายมาทำการสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมี เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์คือสารใด อย่างไรก็ตามการศึกษาเบื้องต้นทางพิษเคมีพบว่าสารที่มีฤทธิ์น่าจะเป็นสารประกอบกลุ่ม terpenoids การสกัดแยกสารสกัดส่วนเนื้อไม้ของยางปายทำโดยวิธี column chromatography พบสาร 3-4 ชนิด แต่เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องเวลาจึงไม่สามารถจะพิสูจน์โครงสร้างสารทั้งหมดได้ สารที่แยกได้บริสุทธิ์และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีแล้วคือสาร CHA008 โดยมีชื่อทางเคมีของสารเป็น 4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-octamethyl-1,2,4a,5,6,6a,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a-hexadecahydricen-3(4H,6bH,14bH)-one (Chemdraw Ultra 9.0) สารมีโครงสร้างคล้ายสาร β -amyrin ที่จัดอยู่ในกลุ่ม terpenoids เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสารมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด ดูตารางที่ 4 เมื่อเทียบกับสารสกัดเฮกเซนพบว่าฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง murine lymphocytic leukemia P-388 ลดลง ขณะที่ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดอื่นสูงขึ้นโดยเฉพาะเซลล์มะเร็ง human nasopharyngeal carcinoma KB, human breast cancer MCF-7 และ human lung cancer Lu-1 ส่วนสาร CHA012 ที่ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีได้นั้นมีฤทธิ์ต่ำกว่าสาร CHA008

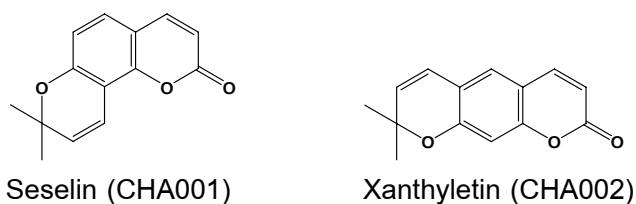


ภาพที่ 1. Structure of amyrins

ตารางที่ 4. Cytotoxic activity of CHA008 and CHA012.

extract	Cytotoxicity (ED_{50} , $\mu g/ml$)					
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK
<i>D. costatus</i> wood/hexane	4.03	19.71	18.93	11.15	13.63	>20
CHA008	12.33	6.57	12.4	8.34	9.88	16.59
CHA012	17.88	9.29	15.71	10.97	12.01	18.62

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในส่วนต่างๆของต้นมะกรูดจะพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งก็ตาม ด้วยความสนใจส่วนตัวที่จะศึกษาพืช จึงได้นำส่วนรากของต้นมะกรูดมาสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมี โดยวิธี column chromatography ซึ่งทำให้สามารถแยกสารประกอบกลุ่ม coumarins ได้ 2 ชนิด เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยวิธี NMR, UV, IR และ MS spectroscopy ทำให้ทราบว่าเป็นสาร seselin (CHA001) และ xanthyletin (CHA002) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัด นอกจากนั้นการหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC-MS ทำให้ตรวจพบสารประกอบกลุ่ม coumarins ได้อีก 2 ชนิด คือ 6,7-dimethylesculin และ suberosin สารที่สกัดแยกได้เป็นสารที่ทราบโครงสร้างทางเคมีแล้วแต่จากการค้นคว้าเอกสารยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับสารทั้งสี่ชนิดในส่วนรากของต้นมะกรูดมาก่อน



ภาพที่ 2. Structure of Seselin (CHA001) and Xanthyletin (CHA002)

เมื่อทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ของสาร seselin และ xanthyletin (CHA001 และ CHA002) พบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งของสาร seselin มีฤทธิ์ปานกลาง ($ED_{50} = 15.32 \mu\text{g/ml}$) ส่วนสาร xanthyletin มีค่า $ED_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$ ดูตารางที่ 5 การตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งชนิดอื่นพบว่าสารทั้งสองไม่มีฤทธิ์ที่ความเข้มข้น $20 \mu\text{g/ml}$ หรือต่ำกว่า

ตารางที่ 5. Cytotoxic activity of CHA001 and CHA002.

Extract/compound	Cytotoxicity (ED_{50} , $\mu\text{g/ml}$)					
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK
<i>C. hystrix</i> Root/Hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20
<i>C. hystrix</i> Root/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20
CHA001	15.32	>20	>20	>20	>20	>20
CHA002	>20	>20	>20	>20	>20	>20

เนื่องจากฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารประกอบทั้งสองไม่สูงนักและจากการศึกษาอื่นๆพบว่าสารประกอบกลุ่ม coumarins บางกลุ่มมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี แม้ไม่ได้ระบุการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีไว้แต่แรก ผู้วิจัยได้ลองนำสารทั้งสองไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีโดยการดูผลการยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1 RT)⁴⁶ ดูตารางที่ 6 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น $200 \mu\text{g/ml}$ สาร CHA001 หรือ seselin สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 68.64% ซึ่งถือได้ว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT ในระดับปานกลาง (M, moderately active) ส่วนสาร CHA002 หรือ xanthyletin สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 71.24% ซึ่งถือได้ว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT ในระดับสูง (VA, very active) ดังนั้นการศึกษาพัฒนาหรือปรับปรุงโครงสร้างของสารทั้งสองอาจเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HIV-1 RT ที่สูงจนนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาต้านเชื้อไวรัสเอชไอวีต่อไป

ตารางที่ 6. Anti-HIV activity of CHA001 and CHA002

Compound	HIV-1 RT inhibition	Activity
CHA001	68.64%	VA
CHA002	71.24%	M

HIV-1 RT inhibition ทำที่ความเข้มข้น $200 \mu\text{g/ml}$ การประเมินผลเป็น very active, VA เมื่อการยับยั้งสูงกว่า 70%, moderately active, M เมื่อการยับยั้ง >50-70%, weakly active เมื่อการยับยั้ง = 30-50%, inactive เมื่อการยับยั้ง <30%

IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโรคมะเร็งเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โครงการนี้จึงมุ่งค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพรรณพืชเพื่อประโยชน์ในการศึกษาศักยภาพแหล่งทรัพยากรชีวภาพหรือพืชพรรณในประเทศไทย โดยเน้นการสำรวจฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) และพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) จำนวน 11 ชนิด ประกอบด้วย พืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) อันได้แก่ ยางแดง (*Dipterocarpus turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), ตะเคียนทอง (*Hopea odorata*) และ พะยอม (*Shorea roxburghii*) และพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) อันได้แก่ มะกรูด (*Citrus hystrix*) กะอวม (*Acronychia pedunculata*), มะนาวผี (*Atalantia monophylla*), ประยงค์ขนบาง (*Glycosmis puberula* var. *crabii*), ช้างงาเดี๋ย (*Luvunga scandens*), เพี้ยกระทิง (*Melicope pteleifolia*) และ *Micromelum hirsutum*

การศึกษาทำโดยการเก็บและรวบรวมพืชพร้อมทั้งตรวจสอบชนิดของพืช นำส่วนต่างๆของพืช ตั้งแต่ราก ลำต้น ใบ ดอก และผลมาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเฮกเซนและเอทานอล จากนั้นนำส่วนสกัดของพืชมาทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง จากการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง ต่อเซลล์มะเร็ง 6 ชนิดคือ Murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) และ rat glioma (ASK) พบว่ามีสารสกัดจากพืช 3 ชนิดของพืชวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) อันได้แก่ ยางแดง (*D. turbinatus*), ยางปาย (*D. costatus*), และตะเคียนทอง (*H. odorata*) และสารสกัดจากพืช 2 ชนิดของพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) อันได้แก่ ประยงค์ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*), และช้างงาเดี๋ย (*L. scandens*) ที่มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้การระบุว่าสารสกัดจากพืชมีฤทธิ์ต้านมะเร็งในหลอดทดลองต่อเมื่อสารสกัดสามารถยับยั้ง 50% ของเซลล์มะเร็งที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 20 µg/ml

สารสกัดเฮกเซนจากส่วนเนื้อไม้ของยางปาย (*D. costatus*) ไม่เพียงมีฤทธิ์กว้างขวางต่อหลายชนิดเซลล์มะเร็งยกเว้นเซลล์ ASK ยังเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดโดยมีค่า $ED_{50} = 4.03 \mu\text{g/ml}$ ต่อเซลล์มะเร็ง P-388 murine lymphocytic leukemia ตะเคียนทอง (*H. odorata*) ซึ่งเป็นพืชที่ใช้สมุนไพรนั้นพบว่า สารสกัดเอทานอลจากส่วนเนื้อไม้มีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ Lu-1 human lung cancer ($ED_{50} = 15.18 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเอทานอลจากส่วนเปลือกต้นยังมีฤทธิ์ต่อเซลล์ P-388, KB และ MCF-7 สารสกัดเอทานอลจากส่วนใบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อเซลล์ P-388 lymphocytic leukemia cells ($ED_{50} = 6.79 \mu\text{g/ml}$) นับเป็นรายงานครั้งแรกของการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชวงศ์ยางในประเทศไทยต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด การทดสอบทางพิษวิทยาพบว่ามีฤทธิ์นำจะเป็นสารประกอบกลุ่ม terpenoids เมื่อนำส่วนเนื้อไม้ของยางปายมาสกัดแยกหาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี column chromatography พบสาร CHA008 ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายสาร β -amyrin ที่จัดอยู่ในกลุ่ม terpenoids

สารมีฤทธิ์กว้างขวางต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด เมื่อเทียบกับสารสกัดเฮกเซนพบว่าฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งสูงขึ้น ยกเว้นต่อเซลล์มะเร็ง P-388 ที่ฤทธิ์ลดลง

สารสกัดจากพืชวงศ์ส้ม (Rutaceae) นั้นส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ สารสกัดเฮกเซนจากส่วนใบและดอกของประยงค์ขนบาง (*G. puberula* var. *crabii*), และสารสกัดจากส่วนใบของช้างงาเดียว (*L. scandens*) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ($ED_{50} = 5.28-19.44 \mu\text{g/ml}$) สารสกัดเฮกเซนจากส่วนดอกของประยงค์ขนบางและจากส่วนใบของช้างงาเดียวนั้นมีฤทธิ์ค่อนข้างกว้างขวางต่อส่วนใหญ่ของเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะมีฤทธิ์ต่อเซลล์ ASK และมีฤทธิ์สูงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ($ED_{50} = 5.28-8.07 \mu\text{g/ml}$) อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดของแหล่งของพืชทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างพืชเพิ่มเติมได้ ผู้วิจัยมีความสนใจต่อต้านมะเร็งเป็นพิเศษแม้ว่าสารสกัดจากต้นมะกรูดจะไม่มีฤทธิ์ จึงได้ทำการศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนรากต้นมะกรูด เมื่อนำส่วนรากของต้นมะกรูดมาสกัดแยกโดยวิธี column chromatography สามารถแยกสารประกอบกลุ่ม coumarins ได้ 2 ชนิดคือ seselin และ xanthyletin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัด การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC-MS ทำให้ตรวจพบสารประกอบกลุ่ม coumarins อีก 2 ชนิด คือ 6,7-dimethylesculin และ suberosin

การศึกษาข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบกลุ่ม coumarins พบว่ามีฤทธิ์ที่น่าสนใจหลายประการ เนื่องจากสามารถแยกสาร seselin ในรากมะกรูดได้ในปริมาณสูงและพบว่าสารมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งและต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี ผู้วิจัยจึงเห็นว่าการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารน่าจะนำไปสู่สารที่มีฤทธิ์สูงขึ้น นอกจากนี้ควรทำการศึกษาเพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของพืชที่พบว่ามีฤทธิ์แต่ยังไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาทำการศึกษาเพิ่มเติมว่าจะได้สารใหม่หรือสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งสูงหรือไม่ เช่นเดียวกับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งในพืชชนิดอื่นของพืชทั้งสองวงศ์ก็นับเป็นสิ่งที่ควรทำอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. Pratt WB and Ruddon RW, *The Anticancer Drugs*, Oxford University Press, New York, 1979.
2. Hill BT and Price LA, The potential role of chemotherapy in improving survival in some common cancers. *Pharm. Int.*, 1984, 5, 268-272.
3. Carter SK, Adjuvant chemotherapy of cancer. *Drugs*, 1986, 31, 337-367.
4. Haskell CM, Principle of cancer chemotherapy. In: Haskell CM, ed. *Cancer Treatment*, 2nd, 1985.
5. Kinghorn AD and Balandrin MF, eds., *Human Medicinal Agents from Plants*. American Chemical Society, Washington DC, 1993.
6. เอมอร โสมพันธ์ การวิจัยเพื่อหาตัวยาต่อต้านโรคมะเร็งจากพืชในตระกูลมะเขือที่มีในประเทศไทย.
7. กฤษดา อาชามาส และคณะ การศึกษาทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรอ้อยแดงและหนุมานประสานกาย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2523.
8. Soonthorncharoenon N, Cassady JM, Patarapanich C, Bavovada R, and Suwanborirux K. 1996. Goniiothalamusins : new monotetrahydrofuran acetogenins from *Goniiothalamus marcanii*. Current Advanced in Natural Product Research. 3rd NRCT-JSPS Joint Seminar. Bangkok. November 27-29, 1996.
9. Jiratchariyakul W, Moongkarndi P, Theppeang K, Sethajintanin D, Jarikasem S, and Frahm AW. 1996. Cytotoxic principles from *Trichosanthes cucumerina*. Current Advanced in Natural Product Research. 3rd NRCT-JSPS Joint Seminar. Bangkok. November 27-29, 1996.
10. Picha P, Naengchamnong W, Kano E, Hayashi S, Ohtsubo T, Matsumoto H, Shioura H, and Ondee S. 1996. Effect of a natural pure compound, curculathylene B, from *Jatropha curcas* on thermosensitivity and development of thermotolerance in Chinese hamster V-79 cells *in vitro*. Current Advanced in Natural Product Research. 3rd NRCT-JSPS Joint Seminar. Bangkok. November 27-29, 1996.
11. ขวลิต นิยมธรรม, ไม้ต้นในพื้นที่ป่าพรุ จังหวัดนราธิวาส บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ, 2540.
12. Thi Mai HD, Gaslonde T, Michel S, Tillequin F, Koch M, Bongui JB, Elomri A, Seguin E, Pfeiffer B, Renard P, David-Cordonnier MH, Laine W, Bailly C, Kraus-Berthier L, Leonce S, Hickman JA and Pierre A. 2003. Structure-activity relationships and mechanism of action of antitumor benzo[b]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one acronycine analogues. *J. Med. Chem.* 46, 3072-3082.

13. สมุนไพรพื้นบ้านภาคอีสาน เล่ม 2 สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2543.
14. Ito T, Akao Y, Tanaka T, Iinuma M, and Nozawa Y. 2002. Vaticanol C, a novel resveratrol tetramer, inhibits cell growth through induction of apoptosis in colon cancer cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 147-148.
15. Dai JR, Hallock YF, Cardellina JH 2nd, and Boyd MR. 1998. HIV-inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*. *J Nat Prod.* 61, 351-353.
16. Chantanaparb L, Sri-Aran P, Hoamuangkaew W, 1985. Non-Wood Forest Products in Thailand. F.A.O. Bangkok, 180 pages.
17. Azuine MA, and Bhide SV. 1994. Adjuvant chemoprevention of experimental cancer: catechin and dietary turmeric in forestomach and oral cancer models. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 211-217.
18. Saleem A, Husheem M, Härkönen P, and Pihlaja K. 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 327-336.
19. Rane MM, and Mengi SA. 2003. Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark on incision and excision wounds in rats. *Fitoterapia* 74, 553-558.
20. ASEAN Centre for Biodiversity. ASEAN Regional Centre for Biodiversity Conservation (ARCBC). Checklist of Medicinal Plants in Southeast Asia. Available at http://www.aseanbiodiversity.org/medicinal_plants/page7 (November 2006).
21. Likhitwitayawuid K, Angerhofer CK, Cordell GA, Pezzuto JM, and Ruangrungsi N, 1993. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* 56, 30-38.
22. Swanson SM, Jiang JX, Chang YS, De Souza NJ, and Pezzuto JM. 1988. A rapid and sensitive bioassay involving cultured rat glioma cells to screen for substances capable of elevating intracellular cyclic AMP concentration. *Journal of Natural Products* 51, 929-936.
23. Harborne JB. 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall, London, pp. 33-211.
24. Wu TS, Wang ML, Jong TT, McPhail AT, McPhail DR, and Lee KH. 1989. X-ray crystal structure of acrovestone, a cytotoxic principle from *Acronychia pedunculata*. *Journal of Natural Products* 52, 1284-9.
25. Chansakaow S, Ruangrungsi N, and Ishikawa T. 1996. Isolation of pyropheophorbide a from the leaves of *Atalantia monophylla* (Roxb.) Corr. (Rutaceae) as a possible antiviral active principle against herpes simplex virus type 2. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44, 1415-7.

26. Kamperdick C, Van NH, Sung TV, and Adam G. 1999. Bisquinolinone alkaloids from *Melicope ptelefolia*. *Phytochemistry* 50, 177-181.
27. Cambie RC, Pan YC, and Bowden BF. 1996. Flavonoids of the barks of *Melicope simplex* and *Melicope ternate*. *Biochemical Systematics and Ecology* 24, 461-462.
28. Latip J, Hartley TG, and Waterman PG. 1999. Lignans and coumarins metabolites from *Melicope hayesii*. *Phytochemistry* 51, 107-110.
29. Muyard F, Bissoue AN, Bevalot F, Tillequin F, Cabalion P, and Vaquette J. 1996. Acetophenones and other constituents from the roots of *Melicope erromangensis*. *Phytochemistry* 42, 1175-1179.
30. Bowen IH, and Perera KC. 1982. Alkaloids, coumarins and flavonoids of *Micromelum zeylanicum*. *Phytochemistry* 21, 433-437.
31. Sohrab MH, Hasan CH, and Rashid MA. 1999. 6-Substituted-7-oxygenated coumarins from the leaves of *Micromelum minutum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 535-537.
32. Wang J, Zheng Y, Efferth T, Wang R, Shen Y, and Hao X. 2005. Indole and carbazole alkaloids from *Glycosmis montana* with weak anti-HIV and cytotoxic activities. *Phytochemistry* 66, 697-701.
33. Cuong NM, Taylor WC, and Sung TV. 1999. Glypetelotine, a sulphur-containing indole alkaloid from *Glycosmis petelotii*. *Phytochemistry* 52, 1711-1714.
34. Quader MA, Nutan MTH, and Rashid MA. 1999. Antitumor alkaloid from *Glycosmis pentaphylla*. *Fitoterapia* 70, 305-307.
35. Chakravarty AK, Sarkar T, Masuda K, and Shiojima K. 1999. Carbazole alkaloids from roots of *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry* 50, 1263-1266.
36. Wu TS, Chang FC, and Wu PL. 1995. Flavonoids, amidosulfoxides and an alkaloid from the leaves of *Glycosmis citrifolia*. *Phytochemistry* 39, 1453-1457.
37. Chakravarty AK, Das B, Masuda K, and Ageta H. 1996. Tetracyclic triterpenoids from *Glycosmis arborea*. *Phytochemistry* 42, 1109-1113.
38. Kamperdick C, Lien TP, Adam G, and Van Sung T. 2003. Apotirucallane and Tirucallane triterpenoids from *Luvunga sarmentosa*. *Journal of Natural Products* 66, 675-8.
39. Lien TP, Kamperdick C, Schmidt J, Adam G, and Van Sung T. 2002. Apotirucallane triterpenoids from *Luvunga sarmentosa* (Rutaceae). *Phytochemistry* 60, 747-54.
40. Bandaranayake WM, Gunasekera SP, and Karunanayake S. 1975. Terpenes of *Dipterocarpus* and *Doona* species. *Phytochemistry* 14, 2043-2048.

41. Hakim MEH, Juliawaty LD, Syah YM, Achmad SA, Latip J, Emilio L, and Ghisalberti EL. 2006. Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia* 77, 550-555.
42. Chan KC. 1969. Triterpenes of *Hopea pubescens* resins. *Phytochemistry* 8, 1051-1052.
43. Geevananda YA, Gunawardana P, Uvais M, Sultanbawa S, and Balasubramaniam S. 1980. Distribution of some triterpenes and phenolic compounds in the extractives of endemic dipterocarpaceae species of Sri Lanka. *Phytochemistry* 19, 1099-1102.
44. Tanaka T, Ito T, Ido Y, Son T-K, Nakaya K, Iinuma M, Ohyama M, and Chelladurai V. 2000. Stilbenoids in the stem bark of *Hopea parviflora*. *Phytochemistry* 53, 1015-1019.
45. Atun S, Achmad SA, Niwa M, Arianingrum R, and Aznam N. 2006. Oligostilbenoids from *Hopea Mengarawan* (Dipterocarpaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 642-644.
46. Tuchinda P, Pompimon W, Reutrakul V, Pohmakotr M, Yoosook C, Kongyai N, Sophasan S, Sujarit K, Upathum S and Santisuk T. 2002. Cytotoxic and anti-HIV-1 constituents of *Gardenia obtusifolia* and their modified compounds. *Tetrahedron* 58, 8073-8086.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย ชวลิต สิทธิสมบัติ
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Chavalit Sittisombut
2. รหัสประจำตัว
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ภาควิชาเภสัชเวช
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
อำเภอเมือง นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 034255800 โทรสาร 034255801
e-mail: chavalit@su.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
2546 Ph.D. (Chimie des substances naturelles, Pharmacognosie, Pharmacochimie)
Université René Descartes-Paris 5, France
2532 เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชเวช) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2524 เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา
 - ระดับปริญญาเอก
ชื่อเรื่อง Synthèse et activité biologique d'analogues structuraux de l'acronycine en series benzo[a]pyrano[3,2-*h*]xanthenes et benzo[a]pyrano[3,2-*h*]acridone
(A part of this study has been patented by the institution-U.S. Patent 20040266753)
ปีที่ดำเนินการ 2546
 - ระดับปริญญาโท
ชื่อเรื่อง The study on the effects of media modification in tissue culture of *Datura metel* L. on the tropane alkaloids
ปีที่ดำเนินการ 2532
6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ
เภสัชเวช
เคมีของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Ngawhirunpat T., Praneet Opanasopit P., Sukma M., **Sittisombut C.**, Atsushi Kat A., Adachi I. (2010). Antioxidant, free radical-scavenging activity and cytotoxicity of different solvent extracts and their phenolic constituents from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Pharmaceutical Biology*. 48(1), 55-62. (Impact factor 0.364, yr 2007).
2. Opanasopit P., Ruktanonchai U., Suwantong O., Panomsuk S., Ngawhirunpat T., **Sittisombut C.**, Suksamran T., Supaphol P. (2008). Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. *Journal of Cosmetic Science*, 59(3): 233-242. (Impact factor 0.233, yr 2008).
3. Nguyen T.M., **Sittisombut C.**, Boutefnouchet S., Lallemand M.-C., Michel S., Koch M., Tillequin F., Mazinghien R., Lansiaux A., David-Cordonnier M.-H., Pfeiffer B., Kraus-Berthier L., Leonce S., and Pierre A. (2006). Synthesis, antitumor activity, and mechanism of action of benzo[a]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one, analogues of acronycine. *J. Med. Chem.* 49 (11), 3383-3394. (Impact factor 4.898, yr 2008).
4. **Sittisombut C.**, Boutefnouchet S., Trinh Van-Dufat H., Tian W., Michel S., Koch M., Tillequin F., Pfeiffer B. and Pierré A., (2006). Synthesis and cytotoxic activity of benzo[a]pyrano[3,2-*h*] and [2,3-*l*]xanthone analogues of psorospermine, acronycine, and benzo[a]acronycine. *Chem. Pharm. Bull.*, 54 (8), 1113-1118. มี impact factor 1.246 (2005)
5. **Sittisombut C.**, Costes N., Michel S., Koch M., Pfeiffer B., Renard P., Pierré A. and Atassi Gh. (2001). Synthesis and cytotoxicity of benzopyranoxanthone analogues of benzo[b]acronycine and psorospermine. *Chem. Pharm. Bull.*, 49 (6), 675-679. มี impact factor 1.246 (2005)

8. ผลงานวิชาการอื่นๆ

8.1 Conference Proceeding and Abstract

1. Nuntanakorn P., Chaiyasut C., Saenjum C., **Sittisombut C.**, Tanamatayarat P., and Toyama O. (2008). Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of *Diospyros decandra* Lour. (Ebenaceae) Fruit Extracts. The 8th JSPS-NRCT joint seminar : Innovative research in natural products for sustainable development. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. December 3-4, 2008. (Poster presentation).

2. Limmatvapirat S., Limmatvapirat C., Panchapornpon D., Nunthanid J., Luangtana-anan M., **Sittisombut C.**, Sriamornsak P., and Puttipipatkachorn S. (2008). Development of shellac from source available in Thailand as a potential polymer for enteric drug delivery. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.(Thailand Research Fund Seminar 2008) เพชรบุรี. 16-18 ตุลาคม 2551. (Poster presentation).
3. **Sittisombut C.**, Chaiedgumjorn A., Opanasopit P., and Ngawhirunpat T. (2008). Free radical scavenging activity of *Garcinia mangostana* fruit hull extracts: The effect of pH during aqueous extraction. The 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF on Natural Products with Pharmaceutical, Nutraceutical, Cosmetic and Agrochemical Interest. Athens, Greece. 3-8 August 2008. (Poster presentation).
4. Piriayaprasarth S., Opanasopit P., Luangtanaanan M., Chaiedgumjorn A., **Sittisombut C.** and Sriamornsak P. (2008). Stability of the extracts from fruit hull of mangosteen: effect of dilution, humidity and heat. 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. CCIB. Barcelona, Spain. April 7-10, 2008. (Poster presentation).
5. **Sittisombut C.**, Taechashongs T., Khampan N., and Patthanamongkhon T. (2007). Free radical scavenging activity and brine shrimp lethality of *Garcinia mangostana* fruit hull extracts. 1st Silpakorn University Research Fair, Nakhon Pathom, Thailand. November 22, 2007. (Poster presentation).
6. Panchapornpon D., Nuntanid J., Luangtana-anan M., **Sittisombut C.**, Puttipipatkachorn S., Limmatvapirat C., and Limmatvapirat S. (2007). Formation of shellac polycarboxylate esters through solid state reaction. 1st Silpakorn University Research Fair, Nakhon Pathom, Thailand. November 22, 2007. (Poster presentation).
7. Opanasopit P., Panomsuk S., Ngawhirunpat T., **Sittisombut C.**, Ruktanonchai U., Suwantong O., and Supaphol P. (2007). Electrospun polyvinyl alcohol polymeric fibrous system as carriers for extracts from fruit hull of mangosteen. 34th Annual Meeting of the Controlled Release Society. California, USA. July 7-11, 2007. (Poster presentation).
8. Phuagphong P., and **Sittisombut C.** (2007). Neuroprotective effect of Thai herbal food extracts possessing high antioxidant activity. The International Workshop on

Medicinal and Aromatic Plants 2007. Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiangmai, Thailand. January 15-18, 2007.

9. Sukma M., **Sittisombut C.**, Yahuaphai J., Siripong P., Tohda M. (2006). Neuroprotective and cytotoxic activity of oils from *Citrus hystrix*. 21st Congress of Federation of Asian Pharmaceutical Associations. Yokohama, Japan. November 18-21, 2006.
10. **Sittisombut C.**, Michel S., Tillequin F., Pohmakotr M., Reutrakul V. (2006). Investigation of anti-cancer activity of plants in families of Rutaceae and Dipterocarpaceae in Thailand. นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.(Thailand Research Fund Seminar 2006), Regent Hotel Cha-Am. Phetchaburi, Thailand. October 12-14, 2006.
11. Panchapornpon D., Nuntanid J., Luangtana-anan M., **Sittisombut C.**, Puttipatkhachorn S., Limmatvapirat C., and Limmatvapirat S. (2006). Solid-state of shellac succinate through mechanical and thermal activation. นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.(Thailand Research Fund Seminar 2006), Regent Hotel Cha-Am. Phetchaburi, Thailand. October 12-14, 2006.
12. Nguyen T.M., **Sittisombut C.**, Boutefnouchet S., Lallemand M.-C., Michel S., Koch M., Tillequin F., David-Cordonnier M.-H., Pfeiffer B., Kraus-Berthier L., Leonce S., and Pierre A. (2006). Synthesis and cytotoxic and antitumoral activity of 1,2-dihydroxy-1,2-dihydrobenzo[a]acronycine diesters. XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry ISMC 2006. Istanbul, Turkey. August 29 - September 2, 2006.
13. Nguyen T.M., **Sittisombut C.**, Boutefnouchet S., Lallemand M.-C., Michel S., Koch M., Tillequin F., David-Cordonnier M.-H., Pfeiffer B., Kraus-Berthier L., Leonce S., and Pierre A. (2006). 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydrobenzo[a]acronycine diesters: novel promizing antitumoral derivatives. 42^{eme} Rencontres Internationales de Chimie Therapeutique. Marseille, France. July 5-7, 2006.
14. Nguyen T.M., **Sittisombut C.**, Boutefnouchet S., Lallemand M.-C., Michel S., Koch M., Tillequin F., David-Cordonnier M.-H., Pfeiffer B., Kraus-Berthier L., Leonce S., and Pierre A. (2006). Synthesis and cytotoxic and antitumoral activity of 1,2-dihydroxy-1,2-dihydrobenzo[a]acronycine diesters. 13th FECHEM conference. Sopron, Hungary. May 28-31, 2006.

15. **Sittisombut C.**, Michel S., Koch M., Tillequin F., Pfeiffer B., Renard P., Pierré A., and Atassi Gh. (2005). Synthesis and cytotoxicity of aminobenzopyrano xanthenes. The 2nd AASP Symposium & APEM Conference, 2005. The Bangkok Monthien Riverside Hotel, Thailand. November 14-17, 2005.
16. Vongsak B., Pooltong N., Phisutthinusart S., and **Sittisombut C.** (2005). Anti-oxidant activity of some food herbal extracts. The 2nd AASP Symposium & APEM Conference, 2005. The Bangkok Monthien Riverside Hotel, Thailand. November 14-17, 2005.
17. **Sittisombut C.**, Michel S., Tillequin F., Pohmakotr M., and Reutrakul V. (2005). Survey of potential products as anti-cancer agents from plants in families of Rutaceae and Dipterocarpaceae in Thailand. นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. (Thailand Research Fund Seminar 2005), Regent Hotel Cha-Am. Phetchaburi, Thailand. November 13-15, 2005.
18. **Sittisombut C.**, Costes N., Michel S., Koch M., Tillequin F., Pfeiffer B., Renard P., Pierré A. and Atassi Gh. (2003). New benzopyranoxanthone analogues of benzo[b]acronycine and psorospermine : synthesis and cytotoxicity. The Sixth JSPS-NRCT Joint Seminar : Recent Advances in Natural Medicine Research. Bangkok, Thailand. December 2-4, 2003.
19. **Sittisombut C.**, Costes N., Michel S., Koch M., Tillequin F., Pfeiffer B., Renard P., Pierré A. and Atassi Gh. (2001) Synthèse et cytotoxicité de dihydroxydihydro benzopyranoxanthone. Communication par affiche. 8^{ème} Journée Jeunes Chercheurs. Société de Chimie Therapeutique. Paris, France. 26 janvier, 2001.
20. Ngamkham J., Ondee S., Sotanaphun U., **Sittisombut C.**, and Picha P. (2001). Cytotoxicity of leaf extracts of Plu, *Piper betle*, on cultured mammalian neoplastic cells. 16th Asian-Pacific Cancer Congress 2001. Manila, Philippine. November 18-21, 2001.
21. **Sittisombut C.**, Costes N., Michel S., Koch M., Tillequin F., Pfeiffer B., Renard P., Pierré A. et Atassi Gh. (2000). Synthèse de benzopyranoxanthenes analogues de la benzo[b]acronycine et de la psorospermine. Journées Internationales de Pharmacognosie, Liège, Belgium. 6-7 juillet, 2000.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (อยู่ระหว่างการติดต่อพิมพ์)

1. Chavalit Sittisombut, Sylvie Michel, François Tillequin, Manat Pohmakotr, Vichai Reutrakul, *In vitro* cytotoxic activity of some dipterocarpaceous plants in Thailand. Journal of Ethnopharmacology. (submitted, 18/12/2006, งานที่ส่งตีพิมพ์ครั้งแรก)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ – เชิงวิชาการ

1. ทำการศึกษาวิจัยต่อเนื่องในพืชวงศ์ยาง โดยเป็นงานวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาระดับปริญญาเอก ของคณะเภสัชศาสตร์ โดยมีผู้วิจัยเป็นอาจารย์ควบคุมวิทยานิพนธ์ ตั้งแต่ปีการศึกษา 2551 และเป็นงานที่ได้รับทุนจากสกอ.และรัฐบาลฝรั่งเศส ในลักษณะทุนวิจัยร่วมฝรั่งเศส-ไทย ตั้งแต่ปีการศึกษา 2552 (PHC Franco-Thai Program 2009-2010) โดยมีผู้วิจัยเป็นผู้ได้รับทุน

In vitro cytotoxic activity of some dipterocarpaceous plants in Thailand

Chavalit Sittisombut,^{a,*} Sylvie Michel,^b François Tillequin,^b Manat Pohmakotr,^c Vichai Reutrakul,^c

^a *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University,*

Sanamchandra Palace Campus, Nakorn Pathom 73000, Thailand,

^b *Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université René Descartes-Paris V,*

4, Avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris, France,

^c *Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok*

10400, Thailand

* Corresponding author. Tel.: +66 34 255800; fax: +66 34 255801

E-mail address: chavalit@email.pharm.su.ac.th (C. Sittisombut)

Abstract

In this present paper the cytotoxic activity of four dipterocarpaceous plants in Thailand which some of them possessed history of traditional use and potential of anticancer activity were evaluated. The dried extracts of selected plant parts were tested against six cancer cell lines *in vitro*. The hexane extract of the wood of *Dipterocarpus costatus* and the ethanol extract of the leaves of *Hopea odorata* showed their cytotoxicities against P-388 murine lymphocytic leukemia cells ($ED_{50} = 4.03$ and $6.79 \mu\text{g/ml}$, respectively) whereas the hexane extract of the wood of *D. costatus* presented its broad spectrum of cytotoxic activity against most of cancer cell lines tested. The result of this study clearly demonstrated that some dipterocarpaceous plants used for wound healing in Thailand, such as *H. odorata* and *D. costatus*, exhibited cytotoxic activity and this information may be useful as a clue in anticancer drug discovery from traditional medicine.

Keywords: *Dipterocarpus costatus*; *Dipterocarpus turbinatus*; *Hopea odorata*; *Shorea roxburghii*; Dipterocarpaceae; *In vitro* cytotoxic activity

1. Introduction

The search of plants for anticancer agents is really an ongoing challenge. Plants have been used in the treatment of cancers since ancient time. In modern medicine plants still play an important role. Vincristine and vinblastine are useful anticancer drugs isolated from *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), while *Podophyllum peltatum* Linn. and *P. emodii* Wallich are sources of podophyllotoxin for etoposide synthesis (Cragg and Newman, 2005). Several anticancer agents were also obtained from plants, and chemical derivatives of bioactive cytotoxic plant products were prepared and used as anticancer drugs.

The human physiological processes are complex and multi-steps. The wound healing process has close relation to cancer. When a wound occurs, growth and repair genes (GR genes, such as oncogenes and proto-oncogenes) in surrounding cells are activated and secretion of growth and repair factors (GR factors, such as growth factors) is stimulated to heal the wound. However, in case of persistent wound, damage or amplification of GR gene activation in surrounding cells may lead to a clinical cancer (Meng and Riordan, 2006). In traditional medicines, plants used for wound healing or some gastrointestinal diseases had potentials of cytotoxic effect or chemopreventive activity, as in case of turmeric (Azuine and

Bhide, 1994) and *Terminalia* spp. (Saleem et al., 2002; Rane and Mengi, 2003). Sangre de grado, an ethnomedicinal red sap from *Croton palanostigma*, which was used to treat gastrointestinal ulcers, cancers and to promote wound healing, induced apoptosis in human gastrointestinal cancer cells (Sandoval et al., 2002).

The Dipterocarpaceae is one of relatively large plant families in tropical regions. In Thailand, this family composes of 8 genera, such as *Anisoptera*, *Cotylelobium*, *Dipterocarpus*, *Hopea*, *Shorea* and *Vatica* (Phengklae and Niyomdham, 1999). Many of these plants have been used as drugs in traditional medicine. Hard resins of *Hopea odorata* Roxb., *Cotylelobium melanoxydon* Pierre and *Shorea henryana* Pierre are used for the treatment of wound healing. Also, oleoresins of *Dipterocarpus alatus* Roxb. and *D. costatus* Gaertn. F. are claimed for the treatments of tuberculosis, gonorrhea, skin diseases, and wound healing (Chantanaparb et al., 1985). However, the pharmacological potential of most of the plants described above is unexplored (Wiat, 2006). In fact, wood extractives of various species of *Shorea*, such as *S. almon*, *S. astylosa*, *S. negrosensis* and *S. palembanica*, distributed in Philippines were reported of their tumour-inhibiting activity (ASEAN Centre for Biodiversity, 2006). In intention to

evaluate the pattern of anti-cancer potential of the plant constituents in this family, we aimed at the study of *in vitro* cytotoxic activity of some dipterocarpaceous plants.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Parts (at least, woods, barks and leaves) of 4 plants of dipterocarpaceous family, including *Dipterocarpus costatus* C.F. Gaertn., *D. turbinatus* C.F. Gaertn., *Hopea odorata* Roxb., and *Shorea roxburghii* G. Don were collected from northern provinces of Thailand in September, 2004, by a personnel of Queen Sirikit Botanic Garden, Chiangmai. Authentication was achieved by comparison with herbarium specimen in the Herbarium of the Queen Sirikit Botanical Garden, Chiangmai. Voucher specimens (PC0701-PC0704) were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand.

2.2 Preparation of extracts

After each part of the plants collected was dried and finely powdered, 100 g of plant material was extracted with hexane and ethanol respectively. The extracts were then

concentrated in vacuo. The dried hexane and ethanol extracts were used to evaluate the *in vitro* cytotoxic activity of plant parts.

2.3 TLC analysis of extracts

Using 20 mg extract dissolved in 2 ml of methanol, the identification of major phytochemical groups was carried out by thin layer chromatographic (TLC) technique on silica gel 60 F₂₅₄ Merck; spraying reagents and/or detection techniques were used according to standard procedures (Harborne, 1973).

2.4 *In vitro* cytotoxicity assays

The *in vitro* cytotoxic and antimitotic activities were evaluated according to the method described by Likhitwitayawuid et al. (1993) and Swanson et al. (1988) successively. Murine lymphocytic leukemia (P-388), human nasopharyngeal carcinoma (KB), human colon cancer (Col-2), human breast cancer (MCF-7), human lung cancer (Lu-1) and rat glioma (ASK) were 6 cancer cell lines selected for this study, using ellipticine, an anticancer drug, as positive control.

3. Results and Discussion

In Table 1, it was shown that *D. costatus*, *D. turbinatus* and *H. odorata*, had cytotoxic activity ($ED_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$) while all extracts of *S. roxburghii* were inactive against cancer cells tested. The hexane extract of the wood of *D. costatus* (or Yang Pai, in Thai) was the only one extract of the plant which not only presented its broad spectrum of cytotoxic activity against 5 cancer cell tested, except the ASK cells, but also was the most active plant extract tested ($ED_{50} = 4.03 \mu\text{g/ml}$, against the P-388 murine lymphocytic leukemia).

H. odorata (or Ta Kien, in Thai) which has been traditionally used for wound healing presented its cytotoxic activity as its wood ethanolic extract was cytotoxic active against Lu-1 human lung cancer ($ED_{50} = 15.18 \mu\text{g/ml}$) and the ethanolic extract of the bark had moderate activity against P-388, KB and MCF-7. The ethanolic extract of the leaves which was highly active against the P-388 lymphocytic leukemia cells ($ED_{50} = 6.79 \mu\text{g/ml}$) showed its activity in the same range of that from *H. odorata* resin (Ruangrungsri, 2002). It is, here, the first time that the *in vitro* cytotoxic activity of some dipterocarpaceous genera in Thailand in various types of cancer cells was established.

From the TLC analysis of the active extracts (Table 2) it could be stated that the chemical constituents imparted in the cytotoxic activity of the hexane extract of the wood of *D. costatus* may be terpenoids. In the active ethanol extract of the leaves of *H. odorata* phenolic compounds and terpenoids were detected. Phenolic compounds such as stilbenes had also been isolated from plant of the same genus, *H. parviflora* Bedd. (Tanaka et al., 2000).

The multiple pharmacological effects particularly the anticancer and wound healing activities can be observed in plants used in traditional medicines. Curcumin, the most important component in turmeric (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae), played its role in several *in vitro* wound healing steps and induction of growth factors was involved in this complex biological process (Maheshwari et al., 2006). Recently, the molecular basis of anti-cancer and chemopreventive effects of curcumin attributed to its effects on several targets including transcription factors, growth regulators, adhesion molecules, apoptotic genes, angiogenesis regulators and cell signaling molecules was reviewed (Aggarwal et al., 2003; Maheshwari et al., 2006). Triterpenes, isolated from roots of *Astragalus* species which were used to treat leukemia and for wound healing in Turkish folk medicine, showed their IL-2 inducing activity. This activity might be the mechanism involved in order to explain the immunomodulatory and anticancer

effects of *Astragalus* species (Yesilada et al., 2005). These examples showed that natural products which involved in promotion of wound healing process influenced the inhibition of cancer cell growth in different ways. In this study, we found that *H. odorata* and *D. costatus* valuable for wound healing treatment in traditional medicine had *in vitro* cytotoxic activity and may be potential sources of anticancer agents.

4. Conclusion

The evaluation of cytotoxic activity of dipterocarpaceous plants in Thailand were determined against 6 cancer cell lines *in vitro*. We found that the hexane extract of the wood of *D. costatus* and the ethanolic leaf extract of *H. odorata* showed interesting cytotoxicity, particularly against P-388 murine lymphocytic leukemia cells. This study also presented that dipterocarpaceous plants with traditional use in wound healing, such as *H. odorata* and *D. costatus*, had good cytotoxic activity. The ongoing of our study is directed to the isolation and structure elucidation of these active extracts and to the cytotoxic activity evaluation of isolated compounds which may reflect to the potential of clinical application of their active constituents.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission on Higher Education, Ministry of Education of Thailand. We thank the director of Queen Sirikit Botanic Garden, Chiangmai, for plant materials and technicians and some graduate students and personnel of the Faculty of Science, Mahidol University for the cytotoxicity testing. We also thank Dr. Nalinee Poolsub of Faculty of Pharmacy, Silpakorn University for some suggestions of our article preparation.

References

- Aggarwal, B.B., Kumar, A., Bharti, A.C., 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 23 (1A), 363-398.
- ASEAN Centre for Biodiversity. ASEAN Regional Centre for Biodiversity Conservation (ARCBC). Checklist of Medicinal Plants in Southeast Asia. Available at http://www.aseanbiodiversity.org/medicinal_plants/page7 (November 2006).
- Azuine, M.A., Bhide, S.V., 1994. Adjuvant chemoprevention of experimental cancer: catechin and dietary turmeric in forestomach and oral cancer models. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 211-217.

Chantanaparb, L., Sri-Aran, P., Hoamuangkaew, W., 1985. Non-Wood Forest Products in Thailand. F.A.O. Bangkok, 180 pages.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72-79.

Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical Methods*. Chapman and Hall, London, pp. 33-211.

Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Ruangrungsri, N., 1993.

Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* 56, 30-38.

Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Simal, R.C., 2006. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sciences* 78, 2081-87.

Meng, X., Riordan, N.H., 2006. Cancer is a functional repair tissue. *Medical Hypotheses* 66, 486-490.

Phengklai, C., Niyomdham, C., 1999. The Dipterocarpaceae of Thailand. In *Yang Na trees and Plants of the Dipterocarpaceae*. No.3. Royal Forest Department. Ministry of Agriculture of Thailand, Bangkok. pp. 5-206.

- Rane, M.M., Mengi, S.A., 2003. Comparative effect of oral administration and topical application of alcoholic extract of *Terminalia arjuna* bark on incision and excision wounds in rats. *Fitoterapia* 74, 553-558.
- Ruangrungsri, N., 2002. Anticancer potential of Thai medicinal plants. In The 2nd Continuing Training in Herbal Medicine. The Pharmaceutical Association of Thailand. 13-14 May, 2002. pp. 80-126. (in Thai).
- Saleem, A., Husheem, M., Härkönen, P., Pihlaja, K., 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 327-336.
- Sandoval, M., Okuhama, N.N., Clark, M., Angeles, F.M., Lao, J., Bustamante, S., Miller, M.J.S., 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 80, 121-129.
- Swanson, S.M., Jiang, J.X., Chang, Y.S., De Souza, N.J., Pezzuto, J.M., 1988. A rapid and sensitive bioassay involving cultured rat glioma cells to screen for substances capable of elevating intracellular cyclic AMP concentration. *Journal of Natural Products* 51, 929-936.

Tanaka, T., Ito, T., Ido, Y., Son, T.-K., Nakaya, K., Iinuma, M., Ohyama M., Chelladurai V., 2000.

Stilbenoids in the stem bark of *Hopea parviflora*. *Phytochemistry* 53, 1015-1019.

Wiat, C., 2006. *Medicinal Plants of the Asia-Pacific: Drugs for the Future?* World Scientific

Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore. pp. 138-146.

Yesilada, E., Bedir, E., Calis, I., Takaishi, Y., Ohmoto, Y., 2005. Effects of triterpene saponins

from *Astragalus* species on *in vitro* cytokine release. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 71-

77.

Table 1. Cytotoxic and antimitotic activities (ASK assay) of dipterocarpaceous plants.

extract	Cytotoxicity (ED ₅₀ , µg/ml)						ASK assay
	P-388	KB	Col-2	MCF-7	Lu-1	ASK	
<i>D. costatus</i> wood/hexane	4.03	19.71	18.93	11.15	13.63	>20	-
<i>D. costatus</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. costatus</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> wood/hexane	15.35	>20	>20	15.89	19.44	>20	-
<i>D. turbinatus</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> bark/hexane	13.61	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>D. turbinatus</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> wood/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> bark/EtOH	17.64	16.69	>20	18.26	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> leaf/hexane	11.12	>20	>20	17.43	>20	>20	-
<i>H. odorata</i> leaf/EtOH	6.79	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> wood/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> wood/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> bark/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> bark/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> leaf/hexane	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
<i>S. roxburghii</i> leaf/EtOH	>20	>20	>20	>20	>20	>20	-
Ellipticine	0.58	0.56	0.58	0.77	0.47	-	-

Cytotoxic assay: ED₅₀<20 µg/ml is considered active for extracts; P-388: murine lymphocytic leukemia,

KB: human nasopharyngeal carcinoma, Col-2: human colon cancer, MCF-7: human breast cancer, Lu-1:

human lung cancer, ASK: rat glioma; + = active, - = inactive

Table 2. Phytochemical detection of some dipterocarpaceous plant extracts.

Phytochemical groups	<i>D. costatus</i> wood/hexane extract	<i>H. odorata</i> leaf/ hexane extract	<i>H. odorata</i> leaf/ EtOH extract
Alkaloids	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-
Flavonoids	-	-	-
Tannins	-	+/-	+
Terpenoids	+	+	+