



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการหาค่าประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแก่นของต้นศรี และ
ศักยภาพในการเป็นสารคล้ายเอสโตรเจน และสารต้านเอสโตรเจน

โดย

อรรรรณ มณฑกานติรัตน์ และคณะ

สิงหาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการหาค่าประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแก่นของ
ต้นศรี และศักยภาพในการเป็นสารคล้ายเอสโตรเจน และสารต้าน
เอสโตรเจน

คณะผู้วิจัย

อรรรรณ มณฑาทิรัตน์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สัญญาเลขที่ MRG538113

โครงการ "การหาค่าประกอบทางเคมีของสารสกัดจากแก่นของต้นศรี และศักยภาพในการเป็นสารคล้าย
เอสโตรเจน และสารต้านเอสโตรเจน"

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการ

ชื่อผู้รับทุน ดร.อรรณพ มณฑานัตร์

โครงการเริ่มเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2553-15 พฤศจิกายน 2555 รวมเวลาที่ทำวิจัยทั้งสิ้น 24 เดือน

ส่วนที่ 2 รายงานเนื้อหา

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

อายุขัยของประชากรในปัจจุบันยาวขึ้น โรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมจึงมีอุบัติการณ์ตามมามากขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งเป็นปัญหาต่อเนื่องถึงคุณภาพชีวิต เศรษฐกิจของผู้ป่วยและประเทศชาติ อาทิโรคหรือกลุ่มอาการที่เกิดจากการพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความจำเป็นต่อการควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกาย เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบสมอง ระบบหัวใจและหลอดเลือด มวลกระดูก เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันแนวทางการรักษาโดยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนแต่อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบางชนิดได้เช่นกัน เป็นที่ทราบกันว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารประกอบสำคัญแหล่งหนึ่ง มีรายงานการศึกษาพบว่าสารประกอบจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อที่มีความจำเพาะต่อรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์ในเชิงทดแทนฮอร์โมน ในการศึกษาหาสารประกอบทางเคมีในพืชที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ estrogenic และ antiestrogenic หรือ phytoestrogen ในพืชครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาในต้นศรีโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี และตรวจสอบโครงสร้างสารประกอบทางเคมีจากแก่นของต้นศรี ซึ่งมีรายงานการใช้เป็นยาแผนไทยในโรคสตรีที่มีระดูผิดปกติ ให้ได้ทั้งชนิด และปริมาณ เพื่อนำไปศึกษาคัดกรองฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของสารองค์ประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47-D รวมถึงศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารประกอบกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ โดยเริ่มจากการแยกสกัด สารสกัดแต่ละชั้นตอนจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ โดยใช้เซลล์ เพื่อคัดเลือกส่วนสกัดที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์นำมาแยกบริสุทธิ์ โดยเทคนิคการแยกสกัด และทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค NMR, UV, CD, Mass spectrometer จากนั้นสารบริสุทธิ์จะนำมาทดสอบคล้ายเอสโตรเจนของสารองค์ประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47-D และศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารประกอบกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ตามจุดมุ่งหมายที่จะระบุไว้ในวัตถุประสงค์ของโครงการตามลำดับ ผู้วิจัยได้ทำการแยกสกัด และแยกบริสุทธิ์สาร และทำการตรวจสอบโครงสร้างของสารประกอบทางเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด 34 สาร โดยกลุ่มใหญ่ที่พบเป็นกลุ่ม ไอโซฟลาโวน (isoflavones) 18 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 5 สาร ได้แก่ krinone A-E และสารเคยทราบแล้ว

13 สารได้แก่ 7-Demethylrobustigenin, 2-Methoxybiochanin A, Tectoritigenin, Pratensein, 2'-Methoxyformononetin, Formononetin, 3'-Methoxydaidzein, Calycosin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Bowdichion กลุ่มไอโซฟลาวาโนน (isoflavanones) 7 สาร เป็นสารใหม่จำนวน 3 สาร ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone และสารที่เคยทราบแล้ว 4 สารได้แก่ Violanone, Isodalparviquinone, Isodarpavinol B, 2',3',7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone กลุ่มไอโซฟลาแวน (isoflavans) 1 สารคือ Claussequinone กลุ่มฟลาโวน (flavones) 1 สารคือ 4',7-Dihydroxyflavone กลุ่มฟลาวาโนน (flavanones) 3 สารได้แก่ 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin กลุ่มฟลาวาโนนอล (flavanonols) ซึ่งเป็นสารใหม่ 1 สารคือ 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol กลุ่มเพเทอโรคาแปน (pterocarpan) 1 สารคือ (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan กลุ่มซินามิลฟีนอล (cinnamylphenols) 1 สารคือ Xenognsin กลุ่มซาลโคน (chalcones) 1 สารคือ 2'-Methoxyisoliquiritigenin และจากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ในการคล้ายเอสโตรเจน พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวนได้แก่ 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, Khirnone D, Biochanin A, Tectoritigenin, 2'-Methoxyformononetin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone สารประกอบไอโซฟลาวาโนน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, Isodarpavinol B, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone สารประกอบไอโซฟลาแวน Claussequinone สารประกอบฟลาวาโนน ได้แก่ 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบ ฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบฟลาวาโนนอล 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol สารประกอบเพเทอโรคาแปน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan สารประกอบซินามิลฟีนอล Xenognsin และสารประกอบซาลโคน 2'-Methoxyisoliquiritigenin ทั้งนี้สารประกอบที่มีความแรงมากที่สุดได้แก่ 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Genistein และ Claussequinone ซึ่งมีค่า EqE_{10} ซึ่งมีค่าความเข้มข้นในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ และการทดสอบด้วย luciferase reporter gene พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวนได้แก่ 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, Khirnone D, Biochanin A, Formononetin, Theralin, Genistein, Bowdichione สารประกอบฟลาวาโนน ได้แก่ Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบเพเทอโรคาแปน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan และสารประกอบซินามิลฟีนอล Xenognsin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความแรงสูงโดยมีค่าความเข้มข้น (EqE_{10}) ในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ พบว่าฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขึ้นกับการมีอยู่ของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 4' ของ ring A ของ flavonoids ซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาที่ histidine 524 และ หมู่hydroxyl ตำแหน่งที่ 3' และ 5' ของวงอะโรมาติก B ของ flavonoids จะเกิดอันตรกิริยากับ glutamine 353, arginine 394 สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์

ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์เชิงปริมาณ (QSAR) ที่เอื้อให้โครงสร้างของสารจับรีเซพเตอร์ estrogen receptor α and β (ER α และ ER β) อธิบายในเชิงพลังงานพันธะในการเกิดอัตรกิริยา (affinity) ที่ดีและมี correlation R^2 value 0.89 ในการ validation model ระหว่าง observed estrogenic activities and computed descriptors โดยใช้ LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเกิดอัตรกิริยาของ ER α และ ER β ไม่มีผลเกี่ยวเนื่องกันหรือเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้น การกระตุ้นอัตรกิริยา และการแย่งจับของสารกับรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดเกิดขึ้นด้วยการมีอยู่ หรือการหายไปของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่อธิบายในข้างต้น ซึ่งใช้เป็น การพิจารณาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวเนื่องกับเอสโตรเจนได้ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก งานวิจัยนี้น่าจะมีประโยชน์ในการสนับสนุนองค์ความรู้ใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกของการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งในระดับในกาย (in vivo) ในระดับโมเลกุล หรืออีกแง่หนึ่งคือการศึกษาในแง่การเป็นสารต้านเอสโตรเจน เพื่อการพัฒนาเป็นยาป้องกัน หรือรักษาทดแทนฮอร์โมนในภาวะพร่องฮอร์โมน หรือเป็นยาด้านมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเช่นมะเร็งเต้านมก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ

บทคัดย่อ

ต้นครีเป็นพืชในสมาชิวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ที่มีการใช้เป็นยาแผนไทยในโรคสตรีที่มีระดูผิดปกติ แต่ยังไม่มีการวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อใช้อธิบายฤทธิ์ดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี และตรวจสอบโครงสร้างสารประกอบทางเคมีจากแก่นของต้นครี ทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ โดยในการศึกษาได้ใช้การแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีต่างๆ และตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค NMR, UV, CD, Mass spectrometer จากนั้นสารบริสุทธิ์จะนำมาทดสอบคล้ายเอสโตรเจนของสารประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47-D และศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารประกอบกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบทางเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด 34 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 9 สาร ได้แก่ krinone A-E, 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone และสารเคยทราบแล้ว 22 สาร ได้แก่ 7-Demethylrobustigenin, 2-Methoxybiochanin A, Tectoritigenin, Pratensein, 2'-Methoxyformononetin, Formononetin, 3'-Methoxydaidzein, Calycosin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Bowdichion, Violanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 2',3',7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone, Claussequinone, 4',7-Dihydroxyflavone, 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, Xenognsin และ 2'-Methoxyisoliquiritigenin และจากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ในการคล้ายเอสโตรเจน พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Khrinone D, Biochanin A, Tectoritigenin, 2'-Methoxyformononetin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Claussequinone, 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin 4',7-Dihydroxyflavone, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, Xenognsin และ 2'-Methoxyisoliquiritigenin ทั้งนี้สารประกอบที่มีความแรงมากที่สุดได้แก่ 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Genistein และ Claussequinone ซึ่งมีค่า EqE_{10} ซึ่งมีค่าความเข้มข้นในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ และการทดสอบด้วย luciferase reporter gene พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Khrinone D, Biochanin A, Formononetin, Theralin, Genistein, Bowdichione, Liquiritigenin, Naringenin, 4',7-Dihydroxyflavone, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan และ Xenognsin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความแรงสูงโดยมีค่าความเข้มข้น (EqE_{10}) ในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ พบว่าฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขึ้นกับการมีอยู่ของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 4' ของ ring A ของ flavonoids ซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาที่ histidine 524 และ หมู่hydroxyl ตำแหน่งที่ 3' และ 5' ของวงอะโรมาติก B ของ flavonoids จะเกิดอันตรกิริยากับ glutamine 353, arginine 394 สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์เชิงปริมาณ (QSAR) ที่เอื้อให้โครงสร้างของสารจับรีเซพเตอร์ estrogen receptor α and β ($ER\alpha$ และ $ER\beta$) อธิบายในเชิงพลังงานพันธะในการเกิดอันตรกิริยา (affinity) ที่

ดีและมี correlation R^2 value 0.89 ในการ validation model ระหว่าง observed estrogenic activities and computed descriptors โดยใช้ LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเกิดอันตรกิริยาของ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ ไม่มีผลเกี่ยวเนื่องกันหรือเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้น การกระตุ้นอันตรกิริยา และการแย่งจับของสารกับรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดเกิดขึ้นด้วยการมีอยู่ หรือการหายไปของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่อธิบายในข้างต้น ซึ่งใช้เป็นการพิจารณาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจนได้ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการสนับสนุนองค์ความรู้ใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกของการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งในระดับในกาย (*in vivo*) ในระดับโมเลกุล

คำสำคัญ : ศรี, ไฟโตเคมี, ฤทธิ์เอสโตรเจน, การทดสอบในเซลล์, การทดสอบด้วยคอมพิวเตอร์

Abstract

Dalbergia parviflora Roxb is a family member of Fabaceae has been used to normalize the menstruation in Thai traditional medicine. To support its common use, further investigation on its constituents were carried out. The heartwood was chromatographed on a silica gel column chromatography and elucidate structure by using spectroscopic technique such as UV, NMR, MS. Estrogenic activity and antiestrogenic activities were evaluated by monitoring cell proliferation of estrogen responsive human breast cancer, MCF-7 and T47D cells and luciferase reporter gene assay. This set of compounds was studied by means of computational techniques including quantitative structure-activity relationships (QSAR) and molecular modeling. This investigation yields 34 compounds with 9 novel compounds e.g. krinone A-E, 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, isodalparviquinone, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone and 22 known compounds such as 7-demethylrobustigenin, 2-methoxybiochanin A, tectoritigenin, pratensein, 2'-methoxyformononetin, formononetin, 3'-methoxydaidzein, calycosin, theralin, genistein, 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, bowdichion, violanone, isodalparviquinone, isodarpavinol B, 2',3',7-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone, claussequinone, 4',7-dihydroxyflavone, 3',4',6-trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin, 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, xenognsin and 2'-methoxyisoliquiritigenin. It was found that 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, khrinone D, biochanin A, tectoritigenin, 2'-methoxyformononetin, theralin, genistein, 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, 7,4'-dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, isodalparviquinone, isodarpavinol B, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone, claussequinone, 3',4',6-trihydroxy-7-methoxyflavanone, liquiritigenin, naringenin, 4',7-dihydroxyflavone, 6,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanonol, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan, xenognsin and 2'-methoxyisoliquiritigenin, among these 4',7-dihydroxy-8-methoxyisoflavone, genistein and claussequinone at EqE_{10} less than 0.01 μ M. The determination by luciferase reporter gene found that 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, khrinone D, biochanin A, formononetin, theralin, genistein, bowdichione, liquiritigenin, naringenin, 4',7-Dihydroxyflavone, (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan and xenognsin showed high potency at $EqE_{10} < 0.01 \mu$ M. The estrogenic potencies of the studied compounds depend mainly upon the presence/absence of hydroxyl groups attached to 3' and 5' positions of B ring of the isoflavone scaffold and the inter-atomic distance between the hydroxyl groups attached to the outer terminal positions 7 of A ring and 4' of B ring. In a QSAR model employing ligand-receptor interaction energy descriptors, the LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module, which describes the receptor affinities of simultaneous binding to estrogenic receptors α and β ($ER\alpha$ and $ER\beta$), led to the best correlation between the observed estrogenic activities and computed descriptors. Correlation with R^2 value of 0.89 confirmed the validity of this model. Consideration of independent binding to $ER\alpha$ and $ER\beta$

did not result in statistically significant QSAR models. It was thus concluded that simultaneous and possibly competitive interaction of the compounds with the ER α and ER β receptors, in which the presence of hydroxyl groups at the abovementioned positions of the isoflavonoids and diphenolics molecular scaffold plays a dominant role, may determine the estrogenic potency of the considered phytochemicals. The further study, the mechanism of action *in vivo* model and molecular level would be examined for development of phytoestrogen therapy or anticancer induced by estrogen hormone.

Keywords : *Dalbergia parviflora*, phytoestrogen, estrogenic activity, cell based assay, *in silico*

บทนำ

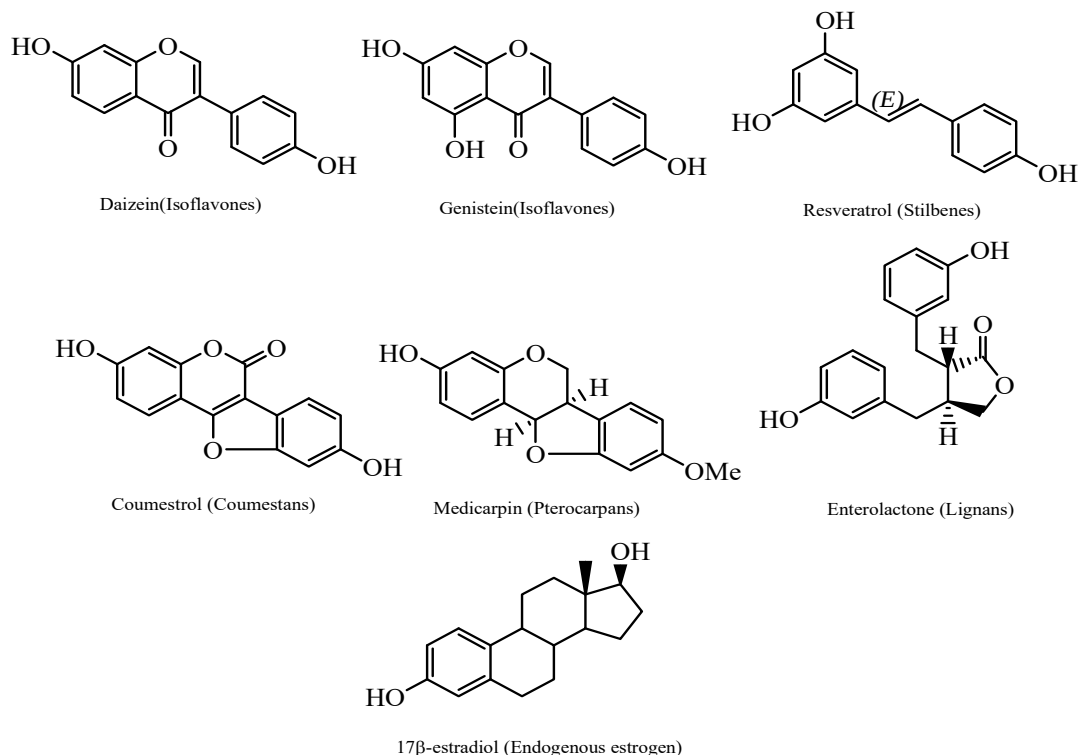
ปัจจุบันกระแสความนิยมสมุนไพร ของประชากรทั่วโลกเพิ่มขึ้นอย่างมาก เพราะเริ่มเล็งเห็นว่ายาที่ได้จากการสังเคราะห์มีความไม่ปลอดภัยในการใช้ โรคจำนวนมากไม่สามารถรักษาได้ด้วยยาแผนปัจจุบันที่มีอยู่ได้ และยาสมุนไพรไทยก็มีสรรพคุณสูง เช่น ฟ้าทะลายโจร สามารถบรรเทาอาการไข้หวัดใหญ่ 2009 รวมถึงความนิยมอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ มูลค่าตลาดต่อปีของผลิตภัณฑ์สมุนไพรมีตัวเลขค่อนข้างสูง อาทิ ในค.ศ. 1996 ออสเตรเลียมีมูลค่าพืชน้ำมันดอลลาร์สหรัฐหรือประมาณ 3.6 พันล้านบาท ในค.ศ.1999 สำนักงานอาหารและยาสหรัฐอเมริกาได้ประมาณการมูลค่าตลาดต่อปีของผลิตภัณฑ์ที่มีสรรพคุณเป็นสมุนไพร ไว้ประมาณกว่า 2.7 พันล้านเหรียญสหรัฐหรือกว่า 1 แสนล้านบาท มีอัตราการเติบโตปีละไม่ต่ำกว่าร้อยละ 15 จากประมาณการของ Doctor of naturopathy ในกลุ่มประเทศยุโรปประเมินมูลค่าตลาดสมุนไพรของอียูไว้ประมาณ 6.9 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือประมาณ 2.5 แสนล้านบาท ซึ่งเป็นขนาดตลาดที่ใหญ่กว่าสหรัฐเกือบ 2 เท่าตัว สำหรับญี่ปุ่น The Japan Herb Association ได้ประมาณความต้องการสินค้าสมุนไพรตลาดสมุนไพรในญี่ปุ่นมีมูลค่าประมาณ 3.1 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือกว่า 1 แสนล้านบาท และในตลาดอาเซียนประเทศที่มีศักยภาพในการบริโภคสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากที่สุดแห่งหนึ่งของอาเซียนคือ สิงคโปร์ มาเลเซีย โดยมาเลเซียบริโภคสินค้าสมุนไพรประมาณ 526 ล้านดอลลาร์ หรือประมาณกว่า 2 หมื่นล้านบาท ในจำนวนนี้เป็นยอดจากการนำเข้าประมาณ 113 ล้านดอลลาร์ หรือประมาณกว่า 4.5 พันล้านบาท ซึ่งใน ค.ศ. 2007 องค์การอนามัยโลกระบุมูลค่าการบริโภคทั่วโลกสูงถึงปีละ 2 ล้านล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในทุกประเทศทั่วโลก^{1,2} นอกจากความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจแล้วยังมีความสำคัญในแง่ธุรกิจระหว่างประเทศ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกฎหมายสิทธิบัตร หรือระบบความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา ที่เอื้อประโยชน์กับประเทศที่พัฒนาแล้ว แต่ไม่เป็นธรรมกับประเทศเจ้าของทรัพยากรธรรมชาติ ดังที่มีให้เห็นหลายกรณี อาทิ กรณีข้าวหอมมะลิ และเป้าน้อยของไทยเป็นต้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยสมุนไพรพื้นบ้านของไทยเพื่อเป็นการแสดงสิทธิความเป็นเจ้าของ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นสูงจึงมีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีสมุนไพรนานับชนิด และมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปของยาแผนโบราณ เช่น ยาต้ม ยาดอง ยาลูกกลอน หรืออยู่ในรูปแบบของยาเตรียมแผนปัจจุบัน เช่น ยาครีม ยาขงละลายน้ำ เป็นต้น³ ตามความเป็นจริงแล้ว วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยาแผนปัจจุบันประมาณเกือบครึ่งหนึ่งได้มาจากสมุนไพร ไม่ว่าจะเป็นสภาพสกัดเป็นสารบริสุทธิ์ สารผสม หรือสารกึ่งสังเคราะห์ ซึ่งได้มาจากสารตั้งต้นในสมุนไพร ส่วนยาแผนโบราณเกือบทั้งหมดได้มาจากพืช หากพิจารณาในแง่ของการพัฒนาสมุนไพรไทยเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยาอย่างมีคุณภาพ และสามารถควบคุมมาตรฐานการผลิตทุกขั้นตอน เริ่มต้นตั้งแต่การคัดเลือกวัตถุดิบ จนแล้วเสร็จเป็นผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต้องหาสารสำคัญ ที่รู้จักในเกณฑ์สากลว่า marker หรือ characteristic compound ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพและมาตรฐานของสมุนไพรแต่ละชนิด หากเป็นไปได้สารสำคัญตัวนั้น ๆ ควรเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ตามข้อบ่งใช้ในการรักษาด้วย และหากสมุนไพรชนิดนั้นๆ มีข้อบ่งใช้ในการรักษาโรคหลายชนิดก็ควรที่ต้องพัฒนาหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์แปรตามการรักษาโรคนั้นๆ ด้วย มีตัวอย่างสมุนไพรที่ใช้สารสำคัญเป็นตัวกำหนดมาตรฐาน เช่น ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees) ใช้ สาร andrographolide หรือ กลุ่มอนุพันธ์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีน (diterpenoid) และแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เป็นตัวกำหนดมาตรฐานสมุนไพร ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* L.) ใช้สารในกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone) ที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย เช่น สาร sennosides A, B เป็นตัวกำหนดมาตรฐาน เป็นต้น และเป็นที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งว่า วัตถุดิบที่เป็นตัวยาสสำคัญในยาแผนปัจจุบันแทบจะทั้งสิ้น ไม่ได้มีการผลิตภายในประเทศ ถึงแม้ว่าจะมีโรงงานผลิตยาแผนปัจจุบัน

มากกว่าสองร้อยโรงงาน แต่วัตถุดิบในการผลิตยาเกือบทั้งหมดล้วนแต่นำเข้า ทำให้ประเทศไทยเสียดุลการค้าสมุนไพรไทยหลายชนิด จึงควรได้รับการศึกษาวิจัย เพื่อให้มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและสอดคล้องกับสภาพสังคมของประเทศ

อนึ่งอายุขัยของประชากรในปัจจุบันยาวขึ้น โรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมจึงมีอุบัติการณ์ตามมามากขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ซึ่งเป็นปัญหาต่อเนื่องถึงคุณภาพชีวิต เศรษฐกิจของผู้ป่วยและประเทศชาติ อาทิโรคหรือกลุ่มอาการที่เกิดจากการพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความจำเป็นต่อการควบคุมการทำงานของอวัยวะต่างๆในร่างกาย เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบสมอง ระบบหัวใจและหลอดเลือด มวลกระดูก เป็นต้น มีการศึกษามากมายที่ระบุว่า การพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดกลุ่มอาการหลังหมดประจำเดือน (menopausal symptoms)^{4,5} โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) โรคซึมเศร้า โรคหลอดเลือดอุดตัน โรคกระดูกพรุน หรือแม้กระทั่งมีความสัมพันธ์ต่อการลดอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งต่อมลูกหมากในผู้ชาย⁶ ซึ่งในปัจจุบันแนวทางการรักษาโดยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนนั้นมีข้อโต้แย้ง⁷ เนื่องจากการให้ฮอร์โมนทดแทนไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ที่ควบคุมการทำงานดังกล่าว ในทางตรงกันข้ามอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งบางชนิดได้เช่นกัน⁸ จึงต้องศึกษาสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งที่เกี่ยวข้องเนื่องจากภาวะความผิดปกติของฮอร์โมน อาทิ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันมีอุบัติการณ์ของผู้ป่วยสูง และเป็นสาเหตุของการตายเป็นอันดับต้นๆ ดังนั้นการศึกษานี้จึงศึกษาสารประกอบคล้ายเอสโตรเจน ที่มีความจำเพาะต่อ รีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์ในเชิงทดแทนฮอร์โมน และสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ที่มีความจำเพาะต่อ รีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์ในเชิงทดแทนฮอร์โมน และเชิงต้านการแบ่งตัวของเซลล์ มะเร็ง น่าจะเป็นแนวทางการรักษาที่เหมาะสมและปลอดภัยยิ่งกว่า เป็นที่ทราบกันว่าพืชสมุนไพรเป็นแหล่งของสารประกอบสำคัญแหล่งหนึ่ง มีรายงานการศึกษาพบว่าสารประกอบจากพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต่อที่มีความจำเพาะต่อรีเซพเตอร์ที่เกี่ยวข้องต่อการออกฤทธิ์ในเชิงทดแทนฮอร์โมน จึงถูกเรียกว่า Phytoestrogens ซึ่งนิยามของ Phytoestrogens คือสารประกอบทุติยภูมิจากพืช ที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ซึ่งมีผลต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของต่อมไทรอยด์ ระบบประสาท และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย^{4,5} จากรายงานด้านระบาดวิทยาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าสารกลุ่ม Phytoestrogens นอกจากจะมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนต่ออวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์โดยตรงเช่น กระตุ้นการเจริญของมดลูกและมีฤทธิ์ต้านการเกิดภาวะกระดูกพรุน⁶ ยังพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก โดยจะมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการแย่งจับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์กับเอสโตรเจนในร่างกาย มีข้อมูลที่บ่งบอกว่าประชากรของชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และพื้นที่ที่บริโภคอาหารที่มีองค์ประกอบของสาร Phytoestrogens ปริมาณสูงนั้นจะมีอุบัติการณ์ของมะเร็งในเต้านมต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับประชากรที่บริโภคอาหารที่มี Phytoestrogens ในปริมาณต่ำ^{11,12}

โครงสร้างทางเคมีของกลุ่มสารที่เป็น Phytoestrogens และแหล่งที่พบ^{9,13,14} ได้แก่ (รูปที่ 1)

- Isoflavones : Daidzein, Genistein พบในถั่วเหลือง (*Glycine max*)
- Stilbenes : Resveratrol พบในองุ่น (*Vitis vinifera*)
- Coumestans : Coumestrol พบใน clover (*Trifolium sp.*)
- Pterocarpanes : Medicarpin พบใน Lucerne (*Medicago sativa*)
- Lignans : Enterolactone พบใน Flaxseed (*Linum usitatissimum*)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างเคมีของกลุ่มสารที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารประกอบทางธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต่อเอสโตรเจนรีเซพเตอร์แรงที่สุด ณ ขณะนี้คือ miroestrol เป็นสารในกลุ่ม flavonoids จากรากกวาวเครือขาว ซึ่งเป็นพืชในตระกูลถั่ว (Leguminosae) เช่นกัน จากความรู้เรื่องอนุกรมวิธานพืชกับความสัมพันธ์ต่อการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืช ซึ่งพบว่าพืชตระกูลถั่วเป็นแหล่งสำคัญในการสังเคราะห์สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังนั้น พืชสมุนไพรที่มีองค์ประกอบของ Phytoestrogens ในปริมาณสูง จึงเป็นแหล่งวัตถุดิบในการศึกษาวิจัยฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนเพื่อใช้ในการแพทย์ ทั้งนี้พืชสมุนไพรของไทยก็เป็นแหล่งวัตถุดิบที่น่าสนใจในการศึกษาหาสารประกอบที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนเช่นกัน สำหรับการวิจัยในโครงการนี้ มุ่งศึกษาฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของพืชสมุนไพรไทย ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกสมุนไพร คือ ต้นครี (Dalbergia parviflora) ที่ได้ทำการศึกษานำร่องในสารสกัดหยาบส่วนที่มีขี้ผึ้ง ทั้งในแง่การหาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน พบว่ามีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนดังที่ได้รายงานไว้แล้วโดยคณะผู้วิจัย¹⁰ นอกจากนี้จากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดหยาบส่วนที่มีขี้ผึ้งน้อย พบว่ายังคงมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่น่าสนใจ ดังนั้นการศึกษาส่วนนี้ทั้งทางด้านเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

Dalbergia เป็นจีนัส (genus) ของพรรณไมขนาดเล็กและขนาดกลาง จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* หรือ Leguminosae-Papilionoideae และวงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* ของอันดับ Fabales พรรณไม้ในจีนัสนี้มีจำนวนประมาณ 100 ชนิด กระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตร้อนได้แก่ ตอนกลางของอเมริกาใต้ แอฟริกา มาดากัสการ์ เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพรรณไม้หลายสปีชีส์ในจีนัส *Dalbergia* ที่มีความสำคัญนอกจากจะใช้เป็นยาแล้วยังมักใช้เป็นเครื่องเรือนเป็นไม้ที่มีเนื้อไม้สีสวย มักมีสีแดง มีกลิ่นหอม จึงมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่นไม้ชิงชัน (*Dalbergia oliveri*) ไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*) นอกจากนี้ไม้บางชนิดเป็นไม้เนื้อหอมคล้ายกลันทาหลายชนิดเนื่องจากน้ำมันหอมระเหย จึงถูกเรียกว่า rosewood

เช่นไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis*, Siamese rosewood) ในประเทศแถบตะวันตกมีต้นที่มีชื่อเสียง คือ *Dalbergia nigra* (Brazilian rosewood) และ *Dalbergia atifolia* (Indian rosewood) สำหรับประเทศไทยมีต้นไม้ในจีนัส *Dalbergia* มีทั้งสิ้น 26 ชนิด กระจายตัวทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ต้นครี มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า “*Dalbergia parviflora* Roxb” และมีชื่อเรียกอื่น ๆ อีกหลายชื่อ ดังนี้ ขรี, กระซิก, สร้อย และ สักขี พืชชนิดนี้เป็นไม้เถาขนาดกลาง สูงได้ถึง 10 เมตร ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ออกสลับ มีใบย่อย 5-7 ใบ รูปขอบขนานหรือขอบขนานแกมรูปไข่ กว้างประมาณ 2-6 ซม. ยาวประมาณ 4-12 ซม. ดอกเป็นแบบดอกถั่วมีสีขาว ออกเป็นช่อใหญ่ที่ปลายกิ่ง ผลเป็นฝักแบนนูน สีน้ำตาลอ่อน แตกได้ ดังแสดงในรูปที่ 2 มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย พม่า มาเลเซียและ อินโดนีเซีย พบตามป่าพรุ ตำรายาไทยใช้แก่นเป็นยาบำรุงโลหิต บำรุงหัวใจ ขับประจำเดือน ขับเสมหะ และขับลม น้ำมันใช้รักษาแผล เนื้อไม้แก้ไข้ และใบมีฤทธิ์กระตุ้นกำหนดอย่างอ่อน

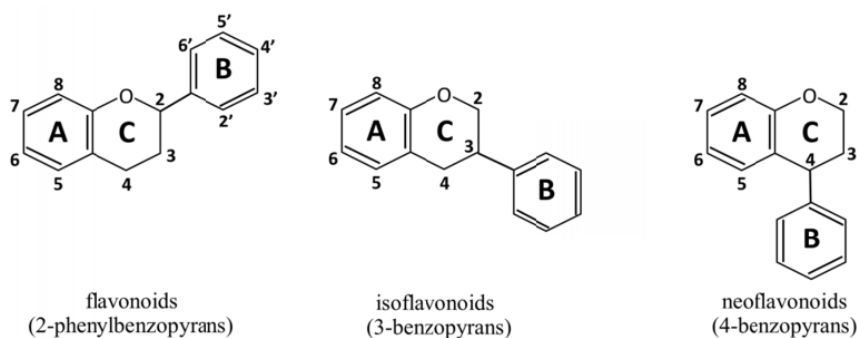
15-18



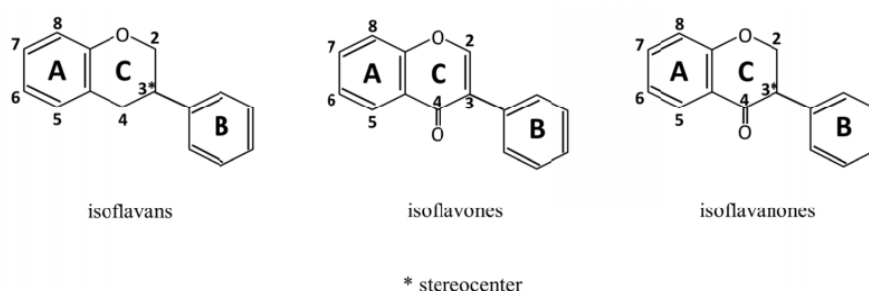
รูปที่ 2 แสดงถิ่นที่อยู่ของต้นครีและลักษณะของต้นครี เนื้อไม้ และ สารสกัด

รูปที่ 3 การคาดการณ์ความสัมพันธ์ของชีวสังเคราะห์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์





รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ flavonoids, isoflavonoids และ neoflavonoids และแสดงการระบุตำแหน่งของโครงสร้างตามระบบ IUPAC



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของ isoflavoids 3 ชนิดคือ isoflavans, isoflavones และ isoflavanone แสดงการระบุตำแหน่งของโครงสร้างตามระบบ IUPAC

จากการค้นคว้าข้อมูลของต้นศรีพญา มีรายงานองค์ประกอบทางเคมีน้อย คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแก่นศรี และจากศึกษาฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของสารประกอบที่แยกบริสุทธิ์ได้จากสารสกัดส่วนที่มีขี้ หรือสารสกัดหยาบชั้น MeOH จากแก่นศรี ด้วยการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T7D ที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน คณะผู้วิจัยพบสารประกอบมากกว่า 40 ชนิดที่แยกสกัดบริสุทธิ์ได้จากสารสกัดจากแก่นศรี และสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ MCF-7 ได้ ในระดับความเข้มข้น 10-0.01 μM ทั้งนี้จากข้อมูลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของแก่นศรีในส่วนสารสกัดที่มีขี้ขี้ นั้นจะสังเกตเห็นว่ามีความหลากหลายขององค์ประกอบทางเคมีสูงมาก และมีสารออกฤทธิ์ทางยาที่สำคัญอาทิ สารกลุ่ม isoflavones ได้แก่ genistein, formononetin, khinone A-E สารกลุ่ม isoflavans ได้แก่ mucronulatol, khinone สารกลุ่ม isoflavanones ได้แก่ sativanone, violanone, vestitone, dalparvin, สารกลุ่ม flavanones ได้แก่ naringenin, liquiritigenin สารกลุ่ม flavanols ได้แก่ dalparvinol A-B และสารประกอบ polyphenol อื่นๆ¹⁰ ซึ่งสารกลุ่ม flavonoids นั้นเป็นสารสำคัญกลุ่มหนึ่งที่มีรายงานฤทธิ์ต่อเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ นอกจากนี้ จากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดหยาบส่วนที่มีขี้ขี้ น้อย พบว่ายังคงมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่น่าสนใจเช่นกัน จากความหลากหลายของชนิดของสารทุติยภูมิที่พบในสารสกัดหยาบที่มีขี้ของแก่นศรี และผลการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ของสารสกัดหยาบส่วนที่มีขี้ขี้ น้อยของแก่นศรี ผู้ทำวิจัยยังพบว่ามีสารใหม่ในสารสกัดหยาบในส่วนที่มีขี้ขี้ น้อย ที่ยังเป็นส่วนที่ไม่มีรายงานในการพบสารทั้งในต้นศรี และสารใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งยังคงมีความหลากหลายของชนิดสารที่น่าสนใจ รวมถึงมีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน และต้านเอสโตรเจน ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ได้ผลที่น่าพอใจในการศึกษา

ต่อยอดเพื่อหาองค์ประกอบทางเคมีจากแก่นครีในสารสกัดหยาบส่วนที่มีขั้วน้อย และทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน และต้านเอสโตรเจน รวมถึงศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารสำคัญต่อเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ที่จำเพาะ โดยวิธีทาง *in vitro* และ *in silico* ซึ่งผลการศึกษานี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐาน ในการศึกษาต่อยอดในหลายแขนง เช่น ชีวสังเคราะห์ของพืชและความสัมพันธ์ต่ออนุกรมวิธาน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสำคัญที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาต่อไปเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากการบกพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือสารต้านเอสโตรเจน และพัฒนาต่อไปเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านเอสโตรเจนที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเอสโตรเจน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดแยกองค์ประกอบทางเคมี จากแก่นของต้นครี ให้ได้ทั้งชนิด และปริมาณ
2. เพื่อตรวจสอบและหาโครงสร้างทางเคมีของสารองค์ประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ ที่แยกสกัดได้
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนของสารองค์ประกอบทางเคมีบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้ โดยใช้เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47D cell line และยืนยันการทดสอบด้วยเทคนิค reporter gene
4. เพื่อศึกษาการจับกันระหว่างโมเลกุลของสารประกอบกับ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์

ขอบเขตของการวิจัย

ในงานวิจัยครั้งนี้จะแบ่งงานเป็น 3 ขั้นตอน

1. การเก็บตัวอย่าง (collection) การตรวจหาชนิดที่ถูกต้องของพืช (identification) การแยกสารองค์ประกอบเคมีให้บริสุทธิ์ (isolation and purification) และบ่งชี้ชนิดของสารประกอบที่แยกบริสุทธิ์ได้ (chemical identification) โดยเน้นศึกษาสารสกัดส่วนที่มีขั้วต่ำ (non-polar part) การตรวจหาคุณสมบัติทางฟิสิกส์ต่างๆ การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีทางสเปกโตรสโคปี (spectroscopic method) หรือวิธีทางเคมี (chemical method) จนกระทั่งทราบโครงสร้างเคมีของสารองค์ประกอบที่แยกได้
2. ทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogenic activity) โดยการทดสอบฤทธิ์กระตุ้น และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน และสารที่มีฤทธิ์ที่น่าสนใจจะนำไปทำการทดสอบยืนยันฤทธิ์ด้วยเทคนิค reporter gene
3. ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนกับ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์

วิธีการดำเนินการวิจัย

เทคนิค อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1 Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC).

Technique	:	One dimension, ascending
Adsorbent	:	Silica gel 60 F ₂₅₄ (E. Merck) precoated plate (Aluminium sheet)
Layer thickness	:	0.25 mm.

Distance : 5 cm.

Temperature : Laboratory temperature (25-35^oc)

Detection : 1. Ultraviolet light (254 and 365 nm)
2. 50% H₂SO₄ in H₂O and heating at 105^oc for 10 min

2 Column Chromatography.

2.1 Vacuum Liquid Column Chromatography.

Absorbent : Silica gel 60 (No. 7734) particle size 0.063-0.200 nm
(70-230 mesh ASTM) (E. Merck)

Packing method : Dry packing

Sample loading : The sample was dissolved in a small amount of organic solvent, mixed with a small quantity of absorbent, dried, triturated and then placed gently on top of the column

Detection : Fractions were examined by TLC observing under UV light (254 and 356 nm) and 50% H₂SO₄ spraying reagent in hot condition.

2.2 Gradient Formation Liquid Column Chromatography.

Absorbent : Silica gel 60 (No. 7734) particle size 0.063-0.200 nm
(70-230 mesh ASTM) (E. Merck)

Packing method : Wet packing

Sample loading : The sample was dissolved in a small amount of organic solvent, mixed with a small quantity of absorbent, dried, triturate and then placed gently on top of the column

Detection : Fractions were examine in the same manner as described in section 2.2.1

2.3 Porus Polymer Gel Chromatography.

Absorbent : Diaion HP-20

Packing method : Wet packing

Sample loading : The sample was dissolved in water and then placed on top of the column.

Detection : Fractions were examine in the same manner as described in section 2.2.1

2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Column (Preparative) : Develosil-Lop-ODS No. 0603110, 10-20 µm, 5x100 cm
(Nomura Chemical Co., Ltd.)

(Semi-prep.) : Capcell Pak ODS No. AQED 01063, 5µm, 2x25 cm
(Shiseido Fine Chemical Co., Ltd.)

(Analytical) : Capcell Pak ODS, 5µm, 0.46x25 cm

Flow rate : 45 mL/min for semi-preparative column

		6-9 mL/min for semi-preparative column
		1 mL/min for analytical column
Mobile phase	:	Acetonitrile (MeCN) in H ₂ O
Sample preparative	:	The sample was dissolved in a small amount of eluent and injected into the column.
Injection volume	:	2 g in 10 mL for preparative column
		50 mg in 500 µL for semi-preparative column
		1 mg in 10 µL for analytical column
Pump	:	1. 887-PU (Jasco) for preparative column
		2. 880-PU (Jasco) for semi-preparative and analytical column
		3. PU-2089 Plus (Jasco) for semi-preparative column
Detector	:	UV-Vis detector 875-UV (Jasco) variable wavelength
Recorder	:	1. Hitachi 561
		2. Sekonic SS-250 F
Temperature	:	Room temperature

2.3 Spectroscopy

2.3.1 Ultraviolet (UV) Absorption Spectra

: Hitachi-U 3410 Spectrometer (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

2.3.2 Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (¹H and ¹³C-NMR)

Spectra : JEOL JNM- α 400 instrument. (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

Solvents for NMR spectra: dimethylsulfoxide (DMSO-*d*₆), deuterated chloroform (CDCl₃), deuterated acetone (CD₃OCD₃), deuterated methanol (CD₃OD), tetramethylsilane (TMS) as an internal standard

2.3.3 Mass Spectra.

FABMS were obtained on a JEOL JMS-700 mass spectrometer in *m*-nitrobenzyl alcohol (NBA) as the matrix agent. (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

2.4 Physical Properties

2.4.1 Optical Rotations: JASCO DIP-360 digital polarimeter. (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

2.4.2 Circular Dichroism (CD) Spectra: JASCO J-20A spectropolarimeter. (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan)

2.5 Solvents

- Methanol (commercial grade, AR grade, HPLC grade)
- Ethanol (commercial grade, AR grade)

- Chloroform (commercial grade, AR grade)
- Dichloromethane (commercial grade, AR grade)
- Ethyl acetate (commercial grade, AR grade)
- Acetone (commercial grade, AR grade)
- DMSO (AR grade)
- deuterated organic solvents for NMR measurement (methanol, acetone, chloroform, DMSO)

2.6 สารเคมีสำหรับเซลล์

Eagle's MEM and RPMI media (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)

Fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA)

Antibiotics (Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokyo, Japan)

L-Glutamine (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)

17β -Estradiol, dextran-coated charcoal (DCC) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA)

OPTI-MEM Reduce Serum Medium, LIPOFECTAMINE™ Reagent (Invitrogen, CA, USA)

Pica Gene Luminescence Kit, Pica Gene Cell Culture Lysis Reagent LUC/PGC-50 (Toyo Ink Co., Tokyo, Japan)

ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยในโครงการนี้แบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน ดังนี้

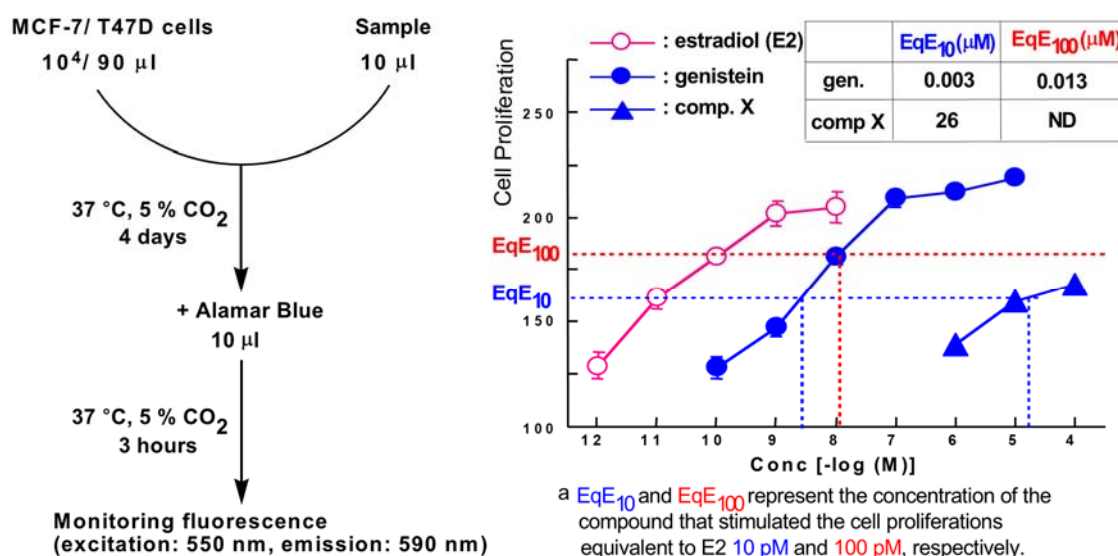
ขั้นที่ 1 : การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง (Plant Collection, Identification, Drying and Grinding) ในขั้นตอนนี้จะเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรสด จากจังหวัดนราธิวาส หรือบริเวณจังหวัดใกล้เคียง ส่วนของพืชที่ใช้คือลำต้น ตัวอย่างที่ได้นำมาหาชนิดที่ถูกต้อง โดยวิธีการทางพฤกษศาสตร์จำแนกพวก (Plant taxonomy) จากนั้นตัวอย่างที่ได้จะนำมาทำให้แห้ง และย่อยขนาดให้มีขนาดเล็กพอที่จะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ได้

ขั้นที่ 2 : การสกัดและแยกส่วน (Extraction and Partition) ขั้นตอนนี้จะเป็นการสกัดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในขั้นที่ 1 โดยใช้ Methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัด ด้วยวิธี reflux ที่อุณหภูมิ 50 องศา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการ reflux ซ้ำ 2 ครั้ง สารสกัดที่ได้ จะถูกนำไประเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (reduced pressure rotary evaporator) สารสกัดแห้งที่ได้จะนำไปแยกส่วนระหว่างน้ำกับ CH_2Cl_2 และน้ำกับ EtOAc ตามลำดับ นำสารสกัดทั้งสองส่วนไประเหยแห้งภายใต้แรงดันต่ำ ส่วนที่ละลายในน้ำ นำไปผ่านเรซินสังเคราะห์ แล้วล้างออกด้วย MeOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำไประเหยแห้งเตรียมไว้สำหรับขั้นที่ 3 ต่อไป

ขั้นที่ 3 : การสกัดแยกสาร และการตรวจหาโครงสร้างเคมีของสารองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้ (Isolation and Structural Determination of Purified Compounds) ในขั้นนี้จะมุ่งเน้นศึกษาวิเคราะห์องค์ประกอบเคมี ของส่วนที่ละลายที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ EtOAc หลังจากผ่าน

เรซินสังเคราะห์ แล้วนำไปทำการแยกสารที่น่าสนใจโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี แบบต่างๆ เช่น column chromatography; medium and high pressure liquid chromatography เป็นต้น จนกระทั่งสามารถแยกสารองค์ประกอบเคมีต่างๆ ได้บริสุทธิ์ จึงนำไปศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีโดยวิธีการทางสเปกโตรสโกปี เช่น ultraviolet spectroscopy (UV), infrared spectroscopy (IR) และ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) โดยใช้เทคนิคเฉพาะแบบต่างๆ ตลอดจนการหาน้ำหนักมวลของสารโดยใช้เทคนิค mass spectrometry (MS) หรือนำไปตรวจคุณสมบัติทางฟิสิกส์ต่างๆ เช่น ตรวจหาจุดหลอมเหลว ตรวจหาค่า optical rotation เป็นต้น นอกจากนี้ยังอาจใช้วิธีการอื่นๆ ที่จำเป็น เช่น การทำปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อให้เกิดเป็นอนุพันธ์ที่ง่ายเพื่อช่วยให้ง่ายต่อการพิสูจน์โครงสร้าง การใช้เอนไซม์ช่วยในปฏิกิริยาย่อยสาร เป็นต้น จนกระทั่งสามารถอธิบายโครงสร้างเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้อย่างสมบูรณ์

ขั้นที่ 4 : การทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (Estrogenic activity) โดยการทดสอบฤทธิ์กระตุ้น และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน เป็นการทดสอบการตอบสนองต่อเอสโตรเจนของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และ T47D เตรียมเซลล์ MCF-7 และ T47D ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^4 cells/well เพาะเลี้ยงใน 96 Well flat bottom plate ร่วมกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1- 100 $\mu\text{g/ml}$ ใน ethanol หรือสารบริสุทธิ์ หรือ 17β -estradiol (100 pM) ร่วมกับสารบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.01- 100 μM ใน ethanol โดยมี 0.7% ethanol เป็น control และใช้ 17β -estradiol เป็น positive control สำหรับฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน นำ plate ไป incubate ที่ 37°C ใน 5% CO_2 humidified incubator เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นนำ plate ออกมาเติม Alamar blue แล้ว incubate ต่ออีก 3 ชั่วโมง วัดค่า fluorescence ที่ emission 590 nm. และ excitation 550 nm. รายงานผล เป็นความเข้มข้นของสารทดสอบ (uM) ที่มีฤทธิ์เทียบเท่ากับ ความเข้มข้นของ estradiol ที่ความเข้มข้น 10 pM และ 100 pM ตามลำดับ โดยแสดงเป็นค่า Equivalence effect to estradiol (EqE_{10} , EqE_{100})



รูปที่ 6 แผนภาพแสดงวิธีการทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

ขั้นที่ 5 : การทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค Reporter gene โดย Reporter gene EREx3-pGV-P2 สร้างขึ้นโดยใช้ luciferase reporter gene pGV-P2 เป็น basic vector MCF-7 หรือ T47D cells ถูก transfected ด้วย EREx3-pGV-P2 plasmid โดยใช้ lipofectamine จากนั้นเพาะเลี้ยง luciferase transfected-MCF-7 (MCF-7/LUC) หรือ luciferase transfected-T47D (T47D/LUC) cell ใน 96 well plates ให้ได้ความเข้มข้น 2×10^4 cells/well incubate 24 ชั่วโมง เติมสารบริสุทธิ์ (test compound) ที่ความเข้มข้น 1-100 µM และ 17β-estradiol (positive control) ที่ความเข้มข้น 1-100 pM จากนั้นล้างด้วย Phosphate Saline Buffer (PBS) แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (Pica gene assay kit; Toyo Ink Co. Tokyo) ตรวจสอบ luciferase activities โดยใช้ luciferase substrate (Pica gene assay kit; Toyo Ink Co. Tokyo) ใน Luminometer (Chemiluminescence detector) รายงานผลเป็นค่า ED₅₀ (effective dose at 50% increase luciferase expression) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ MCF-7/LUC หรือ T47D/LUC gene ได้ 50% เปรียบเทียบกับ control

ขั้นที่ 6 : ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์

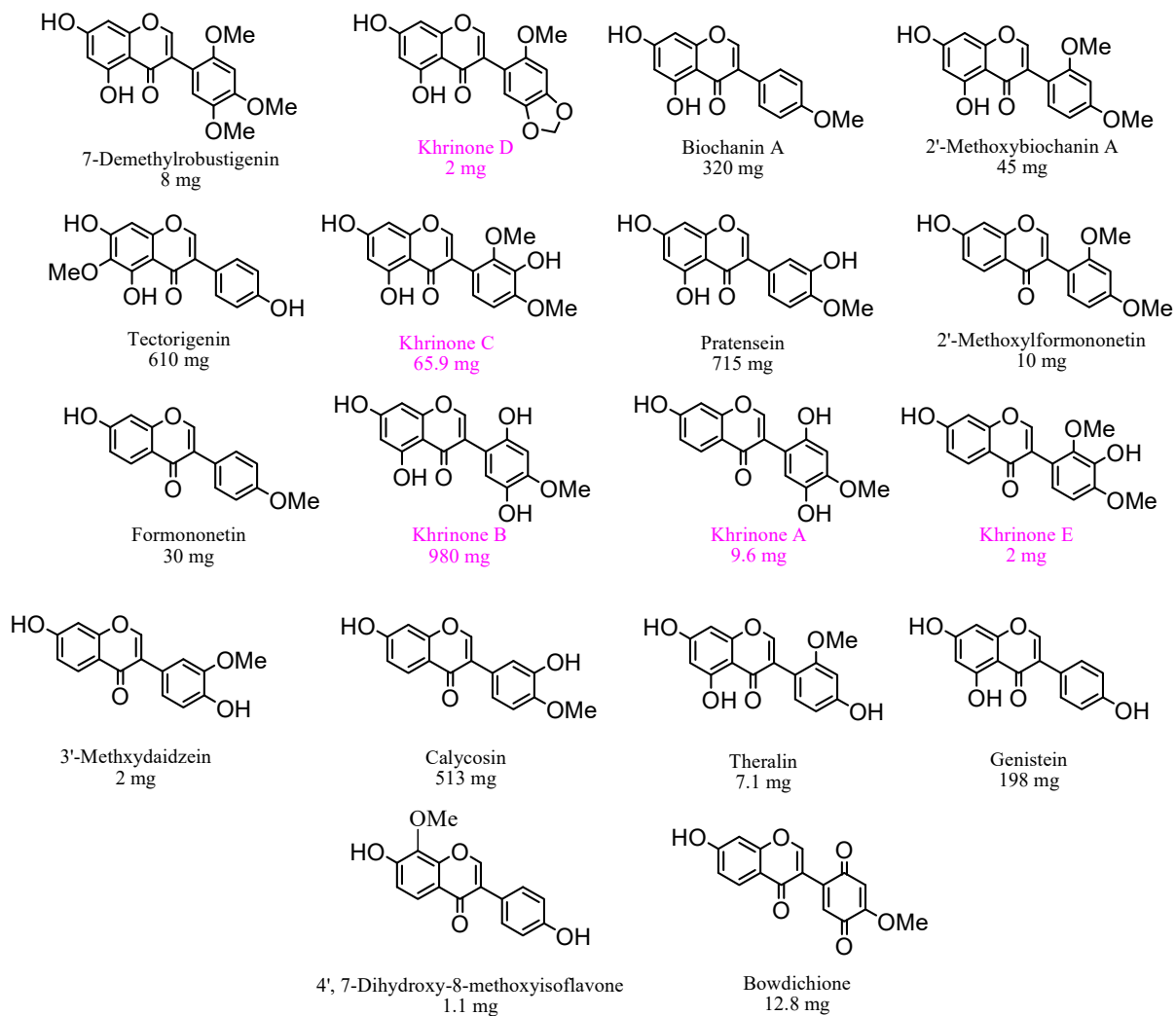
โครงสร้างผลึกของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ จากฐานข้อมูล Protein Data Bank [Crystal structure ER-alpha complex กับ estradiol; PDB entry code 1A52 และ ER-beta complex กับ genistein; PDB entry code 1X7J] ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นแบบจำลองสามมิติของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ โดยการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลน้ำ, ไฮโดรเจนและประจุ เพื่อให้มีสภาพเหมือนจริงในร่างกาย แล้วจึงทำการ Validate แบบจำลองเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ที่พัฒนาขึ้นมา รูปร่างและขนาดของ ligand binding sites ในรีเซพเตอร์ ER-alpha และ ER-beta จะถูก mapping 3D energy grids ด้วย resolution 0.25Å ด้วยโปรแกรม LigFit module of Cerius², Docking score (ligand-receptor interaction energy) คำนวณด้วย CFF91 force field, linear QSAR (quantitative structure-activity relationship) model อธิบายด้วยการใช้ least-square fitting ระหว่าง Di กับ EqE₁₀ (estrogenic activity) ซึ่งได้จากการค่า proliferation ของ MCF-7 cell และ T47D cell โดยการตอกกึ่งกับสาร สารที่มีศักยภาพในการ

ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ตรวจสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติด้วย Fischer *F*-test และด้วยวิธี leave-one-out cross-validation สำหรับการศึกษา 3D-QSAR ทำการศึกษาด้วยการวิเคราะห์ comparative molecular field (CoMFA) ด้วยตัวแปร steric และ electrostatic fields surrounding set of ligands เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสมการระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ (QSAR) ศึกษาอิงตามวิธี Grid Independent Descriptors (GRIND) method

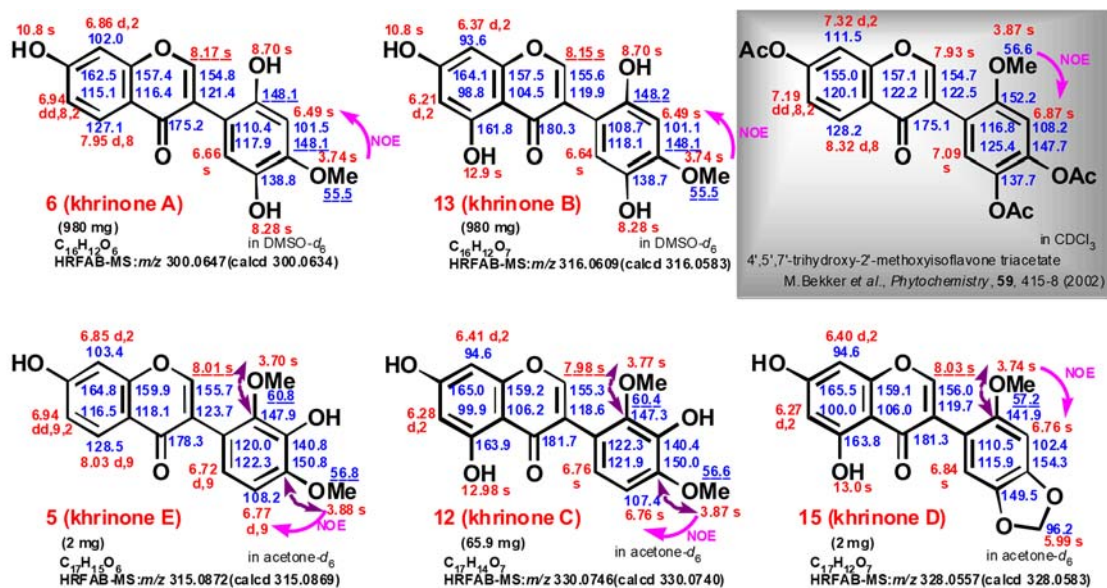
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการศึกษา

1. องค์ประกอบทางเคมีที่แยกบริสุทธิ์จากแก่นครี

การแยกสารองค์ประกอบเคมีให้บริสุทธิ์ (isolation and purification) และบ่งชี้ชนิดของสารประกอบที่แยกบริสุทธิ์ได้ (chemical identification) โดยเน้นศึกษาสารสกัดจากแก่นครีส่วนที่มีขั้วต่ำ (non-polar part) ตรวจสอบคุณสมบัติทางฟิสิกส์ต่างๆ การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีทางสเปกโตรสโกปี (spectroscopic method) หรือวิธีทางเคมี (chemical method) จนกระทั่งทราบโครงสร้างเคมีของสารองค์ประกอบที่แยกได้ ทั้งนี้ในการสกัดสารสกัดหยาบด้วยเมทานอลร้อนได้สารสกัดหยาบ 910 กรัม โดยเริ่มต้นจากแก่นต้นครี 2.5 กิโลกรัม สารสกัดจากแก่นครีส่วนที่ได้จากการแยกส่วน (partition) ได้จากชั้นเอทิลอะซิเตท 150 กรัม นำมาแยกบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี พบว่าสารสกัดในส่วนเอทิลอะซิเตท มีสารประกอบทางเคมีในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ได้จำนวน 34 สาร ประกอบด้วยสารประกอบกลุ่มย่อยได้แก่ กลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavones) 18 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 5 สาร กลุ่มไอโซฟลาแวน (isoflavans) 1 สาร กลุ่มไอโซฟลาวาโนน (isoflavanones) 7 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 3 สาร กลุ่มฟลาโวน (flavones) 1 สาร กลุ่มฟลาวาโนน (flavanones) 3 สาร กลุ่มฟลาวาโนนอล (flavanonols) ซึ่งเป็นสารใหม่ 1 สาร กลุ่มเพเทอร์คาแปน (pterocarpan) 1 สาร กลุ่มซินามิลฟีนอล (cinnamylphenols) 1 สาร กลุ่มซาลิโคน (chalcones) 2 สาร ดังแสดงในรูปที่ 7-11

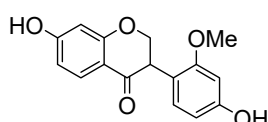


รูปที่ 7 แสดงโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากแก่นศรีประเทพไอโซพลาโน

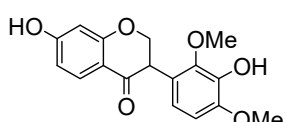


รูปที่ 8 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบไอโซพลาโนใหม่ ด้วย NMR และ MS

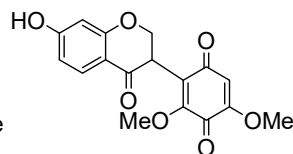
Isoflavanone



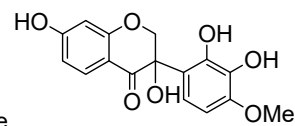
7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone
227.7mg



Violanone
8.5mg

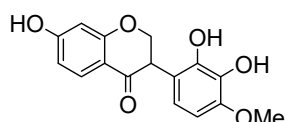


Isodalparviquinone
9.9 mg

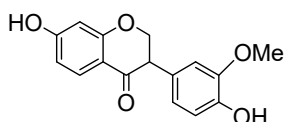


Isodarparvinol B
1.1mg

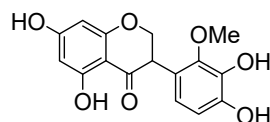
Isoflavan



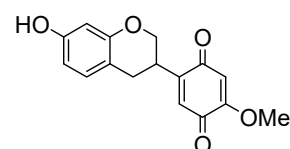
2',3', 7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone
6.6mg



7,4'-Dihydroxy-2'-methoxyisoflavone
2.1mg



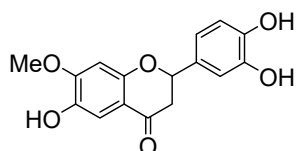
5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone
4.1 mg



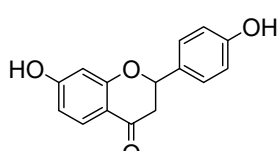
Claussequinone
242.6 mg

รูปที่ 9 โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากแก่นครีประเภทไอโซฟลาวาโนน และไอโซฟลาแวน

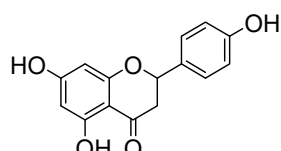
Flavanone



3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone
7.4mg

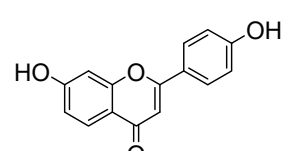


Liquiritigenin
357.5mg



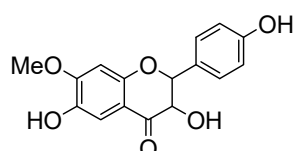
Naringenin
106.7mg

Flavone



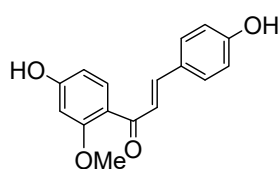
4',7-Dihydroxyflavone
2.3 mg

Flavanonol

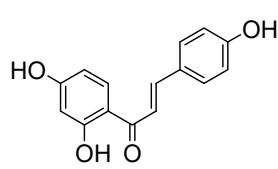


6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol
65.9 mg

Chalcone

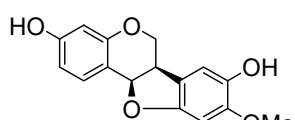


2'-Methoxyisoliquiritigenin
26.6 mg



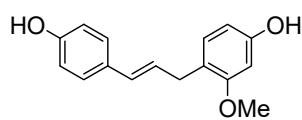
Isoliquiritigenin
116.0 mg

Pterocarpan



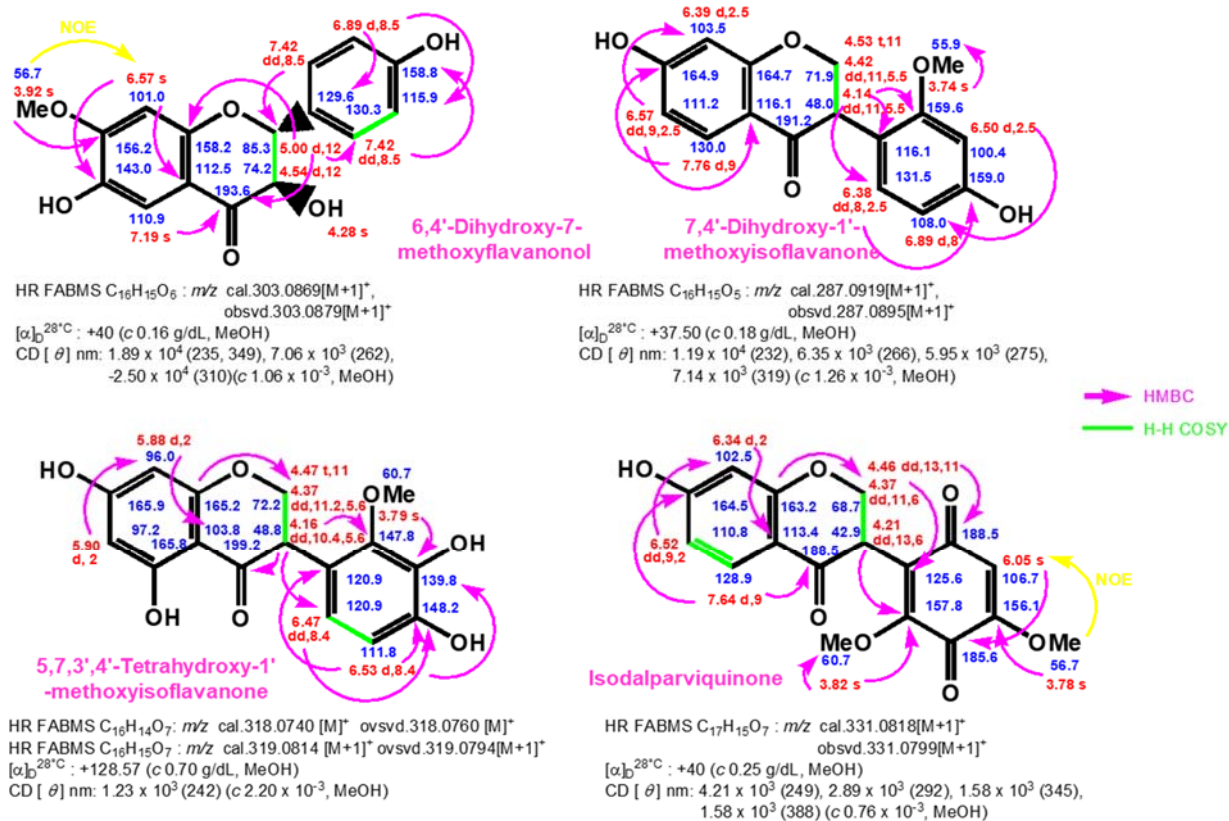
(6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan
36.0 mg

Cinnamylphenol



Xenognsin
15.0 mg

รูปที่ 10 โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากแก่นครีประเภทฟลาโวน ฟลาวาโนน ฟลาวาโนนอล ชาลโคน พเทอโรคาแปน และซินามิลฟีนอล



รูปที่ 11 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบไอโซฟลาโวนอน และ ฟลาโวนอนอลใหม่ด้วย NMR และ MS

2.ฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (Estrogenic activity) ขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครี

2.1 การคัดกรองฤทธิ์เบื้องต้นด้วย MCF-7 breast cancer cell line และ T47D cell line

ในการทดสอบคัดกรองฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครีใน MCF-7 breast cancer และ T47D cell line ซึ่งดูจากความสามารถของสารประกอบในการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง (poliferation) แสดงผลเป็นค่า เป็นความเข้มข้นของสารทดสอบ (uM) ที่มีฤทธิ์เทียบเท่ากับค่าความเข้มข้นของ estradiol ที่ความเข้มข้น 10 pM และ 100 pM ตามลำดับ โดยแสดงเป็นค่า Equivalence effect to estradiol (EqE₁₀, EqE₁₀₀) พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวนได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Khirone D, Biochanin A, Tectoritigenin, 2'-Methoxyformononetin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone สารประกอบไอโซฟลาโวนอน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone สารประกอบไอโซฟลาแวน Claussequinone สารประกอบฟลาโวนอน ได้แก่ 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบฟลาโวนอล 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol สารประกอบพเทอโรคาเพน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan สารประกอบซินามิล ฟีนอล Xenognsin และสารประกอบซาลิโคน 2'-Methoxyisoliquiritigenin ทั้งนี้สารประกอบที่มีความแรงมากที่สุดได้แก่ 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Genistein และ Claussequinone ซึ่งมีค่า EqE₁₀ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครุฑใน MCF-7 breast cancer และ T47D cell line

Compounds	MCF-7		T47D	
	EqE ₁₀ (μ M)	EqE ₁₀₀ (μ M)	EqE ₁₀ (μ M)	EqE ₁₀₀ (μ M)
Isoflavones				
7-Demethylrobustigenin	ND	ND	0.1	ND
Khrinone D	1.5	4.2	<0.01	ND
Biochanin A	0.3	3.8	0.3	0.46
2-Methoxybiochanin A	3.2	ND	0.4	ND
Tectoritigenin	0.5	2.7	0.3	6.9
Khrinone C	4.5	93.3	0.2	8.6
Pratensein	ND	ND	ND	ND
2'-Methoxyformononetin	0.3	5.2	<0.01	1.7
Formononetin	ND	ND	0.08	ND
Khrinone B	ND	ND	ND	ND
Khrinone A	ND	ND	ND	ND
Khrinone E	4.7	ND	ND	ND
3'-Methoxydaidzein	4.6	ND	ND	ND
Calycosin	ND	ND	4.1	ND
Theralin	0.5	ND	0.7	ND
Genistein	0.01	0.11	<0.001	0.1
4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone	<0.01	3.45	ND	ND
Bowdichione	ND	ND	ND	ND
Isoflavanones				
7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone	0.38	0.05	ND	ND
Violanone	2.05	9.44	ND	ND
Isodalparviquinone	1.63	<0.01	ND	ND
Isodarparvinol B	1.12	ND	ND	ND
2',3',7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone	2.07	4.73	ND	ND
5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone	1.49	0.18	2.14	8.90
Isoflavans				
Claussequinone	<0.01	0.01	ND	ND

EqE₁₀ and EqE₁₀₀ : E₂10 pM, 100 pM equivalent cell proliferation activity of the concentration of test compound : (μ M)

ND : not determine

ตารางที่ 1 แสดงฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครุฑใน MCF-7 breast cancer และ T47D cell line (ต่อ)

Compounds	MCF-7		T47D	
	EqE ₁₀ (uM)	EqE ₁₀₀ (uM)	EqE ₁₀ (uM)	EqE ₁₀₀ (uM)
Flavanones				
3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone	0.06	6.15	ND	ND
Liquiritigenin	0.14	0.65	0.64	ND
Naringenin	0.18	0.66	0.09	1.57
Flavones				
4',7-Dihydroxyflavone	0.06	1.82	ND	ND
Flavanonols				
6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol	0.65	56.0	ND	ND
Chalcones				
2'-Methoxyisoliquiritigenin	95.5	0.24	ND	ND
Pterocarpan				
(6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan	0.72	ND	ND	ND
Cinnamylphenols				
Xenognsin	0.34	ND	0.67	ND

EqE₁₀ and EqE₁₀₀ : E₂10 pM, 100 pM equivalent cell proliferation activity of the concentration of test compound : (μM)

ND : not determine

2.2 การทดสอบฤทธิ์ด้วย luciferase reporter gene ใน MCF-7 breast cancer cell line

ในการทดสอบยืนยันการคัดกรองฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครุฑใน MCF-7 breast cancer และ T47D cell line ด้วย reporter gene ซึ่งดูจากความสามารถของสารประกอบในการเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ ด้วยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เพาะเลี้ยง (poliferation) แสดงผลเป็นค่า เป็นความเข้มข้นของสารทดสอบ (uM) ที่มีฤทธิ์เทียบเท่ากับค่าความเข้มข้นของ estradiol ที่ความเข้มข้น 10 pM และ 100 pM ตามลำดับ โดยแสดงเป็นค่า Equivalence effect to estradiol (EqE₁₀, EqE₁₀₀) พบว่า สารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, Khinone D, Biochanin A, Formononetin, Theralin, Genistein, Bowdichione สารประกอบฟลาโวน ได้แก่ Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบฟเทอโรคาแปน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan และสารประกอบซินามิลฟีนอล Xenognsin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความแรงสูงโดยมีค่าความเข้มข้น (EqE₁₀) ในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขององค์ประกอบทางเคมีจากต้นครั้นใน MCF-7 breast cancer และ T47D cell line ด้วย luciferase reporter gene

Compounds	MCF-7		T47D	
	EqE ₁₀ (μ M)	EqE ₁₀₀ (μ M)	EqE ₁₀ (μ M)	EqE ₁₀₀ (μ M)
Isoflavones				
7-Demethylrobustigenin	5.41	7.79	6.27	ND
Khrinone D	<0.01	0.58	5.27	ND
Biochanin A	ND	ND	<0.01	<0.01
2-Methoxybiochanin A	ND	ND	1.78	3.11
Tectoritigenin	ND	ND	1.39	2.23
Khrinone C	ND	ND	0.20	1.99
Pratensein	ND	ND	ND	ND
2'-Methoxyformononetin	ND	ND	1.81	6.24
Formononetin	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Khrinone B	ND	ND	ND	ND
Khrinone A	ND	ND	5.64	8.40
Khrinone E	5.81	ND	ND	ND
3'-Methoxydaidzein	1.07	2.20	1.18	5.84
Calycosin	0.60	4.67	8.84	ND
Theralin	<0.01	0.44	ND	ND
Genistein	<0.01	<0.01	<0.01	0.55
4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone	0.66	0.88	ND	ND
Bowdichione	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Isoflavanones				
Violanone	ND	ND	0.61	1.10
Flavanones				
Liquiritigenin	1.65	2.63	<0.01	5.83
Naringenin	<0.01	<0.01	<0.01	5.88
Pterocarpan				
(6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan	<0.01	<0.01	ND	ND
Cinnamylphenols				
Xenognsin	ND	ND	<0.01	5.71

EqE₁₀ and EqE₁₀₀ : E₂10 pM, 100 pM equivalent cell proliferation activity of the concentration of test compound : (μ M)

ND : not determine

3. อันตรกิริยาระหว่างสารที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนกับ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์

จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบที่แยกได้จากต้นครุฑที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนกับ เอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์ ในครั้งนี้โดยทดสอบกับโครงสร้างผลึกของเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ จากฐานข้อมูล Protein Data Bank [Crystal structure ER-alpha complex กับ estradiol; PDB entry code 1A52 และ ER-beta complex กับ genistein; PDB entry code 1X7J] ด้วยโปรแกรม LigFit module of Cerius², Docking score (ligand-receptor interaction energy) คำนวณด้วย CFF91 force field, linear QSAR (quantitative structure-activity relationship) model อธิบายด้วยการใช้ least-square fitting ระหว่าง Di กับ EqE_{10} (estrogenic activity) ซึ่งได้จากการค่า proliferation ของ MCF-7 cell และ T47D cell โดยการดักจับกับสาร สารที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ตรวจสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติด้วย Fischer F -test และด้วยวิธี leave-one-out cross-validation สำหรับการศึกษา 3D-QSAR ทำการศึกษาด้วยการวิเคราะห์ comparative molecular field (CoMFA) ด้วยตัวแปร steric และ electrostatic fields surrounding set of ligands เพื่อหาความสัมพันธ์ทางสมการระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์ (QSAR) ศึกษาอิงตามวิธี Grid Independent Descriptors (GRIND) method ผลการศึกษา QSAR ของ MCF-7 activity กับ อะตอม และโมเลกุล อาทิเช่น Net Matz Kollman atom charge on C13, interatomic distance, molecular weight, number of hydrogen bond acceptor โดย GFA approach แสดงความสัมพันธ์ และค่าทางสถิติดังตารางที่ 3 และรูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ที่คำนวณจากสมการในตารางที่ 3 สำหรับการศึกษา QSAR models ของ MCF-7 and T47D activity ที่อธิบายในตัวแปรของ receptor binding affinities และ pharmacokinetic สามารถสร้างสมการในการวิเคราะห์ได้ดังตารางที่ 4 ด้วยค่าความน่าเชื่อถือ (r^2 , q^2) ที่ค่าความเชื่อมั่น $r^2 = 0.99$ และ $q^2 > 0.5$ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 3 QSAR models of the MCF-7 activity derived by GFA approach from atomic and molecular descriptors.

Descriptor	Cmp. ^a	R ²	R ² _{xv}	F-test	Regression Equation
Q ₁₃ ^b Q ₃₂ D _{OO} ^c	41	0.85	0.82	70.9	$-\log_{10}EqE_{10} = -1.1052 - 2.2404 \cdot Q_{13} + 0.8079 \cdot Q_{32} + 0.0659 \cdot D_{OO}$
Q ₁₃ Q ₃₂	38	0.83	0.80	84.3	$-\log_{10}EqE_{10} = -0.3556 - 2.2559 \cdot Q_{13} + 0.7698 \cdot Q_{32}$
Q ₁₃ M _w ^d	41	0.81	0.78	80.8	$-\log_{10}EqE_{10} = 3.6418 - 1.3488 \cdot Q_{13} - 0.0128 \cdot M_w$
Q ₂₄ HB _{acc} ^e	39	0.81	0.78	76.2	$-\log_{10}EqE_{10} = 2.6812 - 0.8086 \cdot Q_{24} - 0.4909 \cdot HB_{acc}$
Q ₁₃ HB _{acc}	40	0.80	0.77	73.4	$-\log_{10}EqE_{10} = 2.8177 - 1.3931 \cdot Q_{13} - 0.5272 \cdot HB_{acc}$
Q ₁₃ D _{OO}	39	0.80	0.77	70.8	$-\log_{10}EqE_{10} = -1.0892 - 2.6961 \cdot Q_{13} - 0.0571 \cdot D_{OO}$

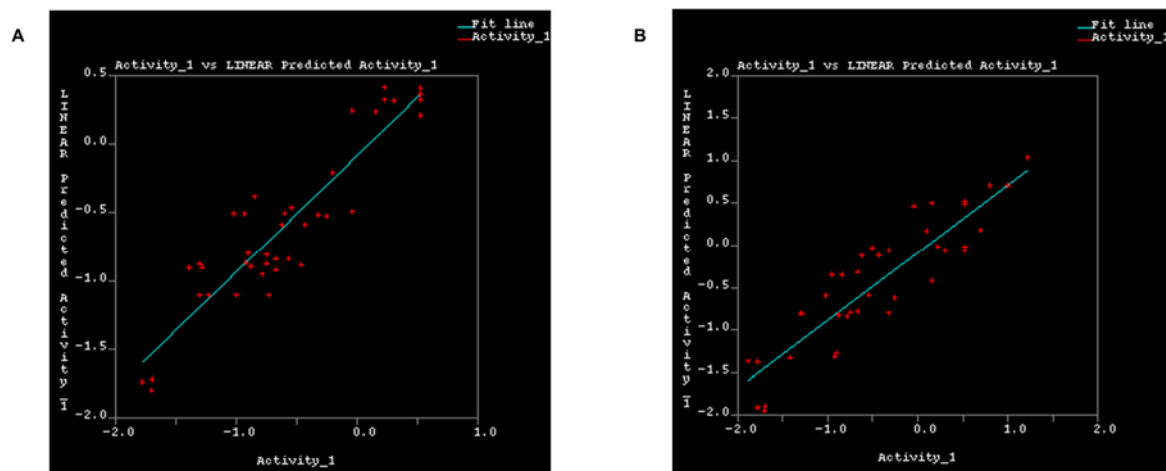
^a number of compounds in the correlation after removal of outliers,

^b Q₁₃ – net Mertz-Kollman atomic charge³⁵ on atom C13 (see Figure 2 for atom numbering) computed using Gaussian 03³⁴,

^c D_{OO} – interatomic distance between hydroxyl groups atoms O₂₈ and O₂₆ attached to carbons C₁₄ and C₆ (Figure 2) [Å],

^d M_w – molecular weight [Da],

^e HB_{acc} – number of hydrogen bond (proton) acceptors in the molecule.



รูปที่ 12 Correlation of estrogenic activity measured in MCF-7 cells versus the activity predicted from QSAR regression equations (Table 1):

A: $-\log_{10} \text{EqE}_{10}[\text{MCF7}] = -1.1052 - 2.2404 \cdot \text{Q13} + 0.8079 \cdot \text{Q32} + 0.0659 \cdot \text{DOO}$

B: $-\log_{10} \text{EqE}_{10}[\text{MCF7}] = 2.8177 - 1.3931 \cdot \text{Q13} - 0.5272 \cdot \text{HBacc}$

ตารางที่ 4 QSAR models for MCF-7 and T47D activity containing receptor binding affinities and pharmacokinetic descriptors

Descriptor	Cells	Cmp. ^a	R ²	R ² _{xv}	F-test	Regression Equation
LigScoreER _α ^b LigScoreER _β AlogP98 ^c	MCF7	34	0.83	0.79	47.27	$-\log_{10} \text{EqE}_{10}[\text{MCF7}] = -3.6636 + 0.0095 \cdot \text{LigScoreER}_{\alpha} + 0.4462 \cdot \text{LigScoreER}_{\beta} + 0.5575 \cdot \text{AlogP98}$
Compounds included		BC16, BC2, E33, E35, E36, E37, E38, E41, E42, E43, E45, E10, E12, E13, E14, E15, E16, E17, E4, E5, E6, E40, E56, E51, E54, E48, E49, E53, E23, BC13, BC12, 4A, 7A, Daidzein				
LigScoreER _α LigScoreER _β AlogP98	T47D	23	0.80	0.72	24.63	$-\log_{10} \text{EqE}_{10}[\text{T47D}] = -6.9752 + 0.6286 \cdot \text{LigScoreER}_{\alpha} - 0.0348 \cdot \text{LigScoreER}_{\beta} + 1.8832 \cdot \text{AlogP98}$
Compounds included		BC13, BC5, E28, E33, E35, E37, E38, E41, E42, E43, E45, E10, E12, E16, E17, E18, E40, E54, E47, E53, E11A, 13A, Daidzein				

^a number of compounds in the correlation after removal of outliers.

^b LigScoreER_α is the ligand-receptor binding affinity of the estrogen receptor ER_α computed by LigScore scoring function of Cerius² 27.

^c AlogP98 – water/octanol partitioning coefficient descriptor of the QSAR module of the Cerius² is a pharmacokinetic descriptor, which characterizes the ability of the compound to permeate cellular membrane.

ตารางที่ 5 3D-QSAR models calculated for ER_α and ER_β conformers for both cell growth assay activities. The models are characterized by high predictive capacity expressed in terms of q².

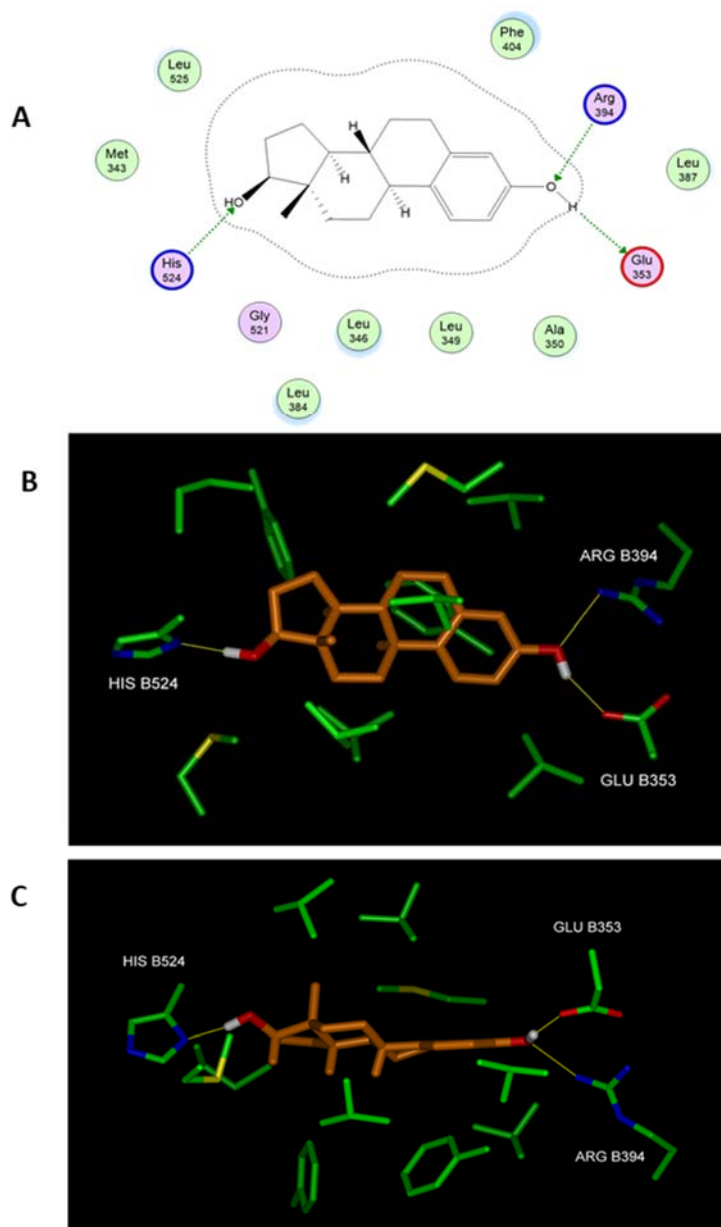
Activity	Data set	Compounds ^a	r ² ^b	q ² (LOO) ^c
MCF-7	ER _α conformers	24	0.99	0.70
	ER _β conformers	27	0.99	0.62
T47D	ER _α conformers	18	0.99	0.61
	ER _β conformers	19	0.99	0.55

^a number of compounds in the model after removal of outliers.

^b correlation coefficient; describes the ability of the model to explain the variance of the original variables

^c predictive correlation coefficient calculated by the leave-one-out (LOO) cross validation.

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอัตราการเกิดของ estradiol ที่ binding site ของ estrogen receptor alpha (ER-) พบว่า หมู่ฟังก์ชันที่สำคัญในการเกิดอัตราการเกิดของ ligand กับ amino acid functional group ใน binding site ของ receptor คือ hydroxyl group (-OH) ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 4' ของ ring A ซึ่งจะเกิดอัตราการเกิดที่ histidine 524 และ hydroxyl group (-OH) ตำแหน่งที่ 3' และ 5' ของ ring B จะเกิดอัตราการเกิดกับ glutamine 353, arginine 394 ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 13 Estradiol at the binding site of estrogen receptor ER α . A. Essential hydrogen bonds between terminal OH groups of the ligand and residues of the receptor lining the binding site are shown. B. 3D-structure of the ligand at the ER α active site. Hydrogen bonding interactions are shown as yellow lines. Front view. C. Side view.

ดังนั้นสารที่แยกบริสุทธิ์ได้จากแก่นต้นครี ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นฟลาโวนอยด์ซึ่งคล้ายเอสโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบประเภทไอโซฟลาโวน มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลคล้ายเอสโตรเจน และมี functional group ที่สำคัญ (-OH) คล้ายเอสโตรเจนหลายตัว เช่น genistein, diadzein, theralin, khirone D เป็นต้นจึงมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่มีศักยภาพสูง

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดแก่นต้นครี ซึ่งเป็นต้นไม้สมาชิกในวงศ์ถั่วซึ่งตามอนุกรมวิธานสารในวงศ์นี้มีมีชีวสังเคราะห์ผ่าน shikimic pathway ที่จะสามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย และใช้เป็นยาหลายกลุ่มโรค ดังเช่นทฤษฎีจากกรวิจัยครั้งนี้พบว่าต้นครีสามารถผลิตองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ อีกทั้งยังมีการกระจายตัวอยู่ในกลุ่มย่อยของฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด 34 สาร โดยกลุ่มใหญ่ที่พบเป็นกลุ่ม ไอโซฟลาโวน (isoflavones) 18 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 5 สาร ได้แก่ krinone A-E และสารเคยทราบแล้ว 13 สาร ได้แก่ 7-Demethylrobustigenin, 2-Methoxybiochanin A, Tectoritigenin, Pratensein, 2'-Methoxyformononetin, Formononetin, 3'-Methoxydaidzein, Calycosin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Bowdichion กลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavanones) 7 สาร ในจำนวนนี้มีสารใหม่จำนวน 3 สาร ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone และสารที่เคยทราบแล้ว 4 สาร ได้แก่ Violanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 2',3',7-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone กลุ่มไอโซฟลาแวน (isoflavans) 1 สารคือ Claussequinone กลุ่มฟลาโวน (flavones) 1 สารคือ 4',7-Dihydroxyflavone กลุ่มฟลาโวนอน (flavanones) 3 สาร ได้แก่ 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin กลุ่มฟลาโวนอนอล (flavanonols) ซึ่งเป็นสารใหม่ 1 สารคือ 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol กลุ่มเพเทอร์คาแปน (pterocarpan) 1 สารคือ (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan กลุ่มซินามิลฟีนอล (cinnamylphenols) 1 สารคือ Xenognsin กลุ่มชาลโคน (chalcones) 1 สารคือ 2'-Methoxyisoliquiritigenin และจากการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ในการคล้ายเอสโตรเจน r[;jk สารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, Khirone D, Biochanin A, Tectoritigenin, 2'-Methoxyformononetin, Theralin, Genistein, 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone สารประกอบไอโซฟลาแวน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy-1'-methoxyisoflavanone, Isodalparviquinone, Isodarparvinol B, 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-1'-methoxyisoflavanone สารประกอบไอโซฟลาแวน Claussequinone สารประกอบฟลาโวน ได้แก่ 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone, Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบ ฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบฟลาโวนอนอล 6,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanonol สารประกอบเพเทอร์คาแปน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan สารประกอบซินามิลฟีนอล Xenognsin และสารประกอบชาลโคน 2'-Methoxyisoliquiritigenin ทั้งนี้ สารประกอบที่มีความแรงมากที่สุดได้แก่ 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone, Genistein และ

Claussequinone ซึ่งมีค่า EqE_{10} ซึ่งมีค่าความเข้มข้นในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ และการทดสอบด้วย luciferase reporter gene พบว่าสารประกอบทางเคมีที่มีศักยภาพสูงในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ประกอบด้วยสารประกอบไอโซฟลาโวน ได้แก่ 7,4'-Dihydroxy -1'-methoxyisoflavanone, Khinone D, Biochanin A, Formononetin, Theralin, Genistein, Bowdichione สารประกอบฟลาโวนอน ได้แก่ Liquiritigenin, Naringenin สารประกอบฟลาโวน 4',7-Dihydroxyflavone สารประกอบพเทอโรคาแปน (6a,11a)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan และสารประกอบซินามิลฟีนอล Xenognsin ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความแรงสูงโดยมีค่าความเข้มข้น (EqE_{10}) ในระดับน้อยกว่า 0.01 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์พบว่าฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนขึ้นกับการมีอยู่ของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่ 7 และ 4' ของ ring A ของ flavonoids ซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาที่ histidine 524 และ หมู่ hydroxyl ตำแหน่งที่ 3' และ 5' ของวงอะโรมาติก B ของ flavonoids จะเกิดอันตรกิริยากับ glutamine 353, arginine 394 สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีและการออกฤทธิ์เชิงปริมาณ (QSAR) ที่เอื้อให้โครงสร้างของสารจับรีเซพเตอร์ estrogen receptor α and β ($ER\alpha$ และ $ER\beta$) อธิบายในเชิงพลังงานพันธะในการเกิดอันตรกิริยา (affinity) ที่ดีและมี correlation R^2 value 0.89 ในการ validation model ระหว่าง observed estrogenic activities and computed descriptors โดยใช้ LigScore scoring function of Cerius2 virtual screening module จากการศึกษาสรุปได้ว่าการเกิดอันตรกิริยาของ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ ไม่มีผลเกี่ยวเนื่องกันหรือเป็นอิสระต่อกัน ดังนั้นการกระตุ้นอันตรกิริยา และการแย่งจับของสารกับรีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดเกิดขึ้นด้วยการมีอยู่ หรือการหายไปของหมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่งที่อธิบายในข้างต้น ซึ่งใช้เป็นการพิจารณาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารที่ออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจนได้ หากมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก งานวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการสนับสนุนองค์ความรู้ใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกของการออกฤทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งในระดับในกาย (*in vivo*) ในระดับโมเลกุล หรืออีกแง่หนึ่งคือการศึกษาในแง่การเป็นสารต้านเอสโตรเจน เพื่อการพัฒนาเป็นยาป้องกันหรือรักษาทดแทนฮอร์โมนในภาวะพร่องฮอร์โมน หรือเป็นยาด้านมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเช่นมะเร็งเต้านมก็เป็นสิ่งที่น่าสนใจ

เอกสารอ้างอิง

1. หนังสือ สมุนไพร 2548. ปีที่ 5 ฉบับที่ 55 ประจำเดือนกรกฎาคม หน้า 80
2. หนังสือ สมุนไพรเพื่อสุขภาพ 2550. ปีที่ 7 ฉบับที่ 76 ประจำเดือนเมษายน
3. อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ 2544. “วิชาเภสัชวินิจฉัย” ใน นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ บรรณาธิการ ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร, 1-11.
4. Safe S., Connor, K., Ramamoorthy, K., Gaido, K. and Maness, S. Human exposure to endocrine-active chemicals: hazard assessment problems. *Regul. Toxicol. Pharmacol* 1997; 26: 52-8.
5. Jefferson, W. N. and Newbold, R. R. Potential endocrine-modulating effects of various phytoestrogens in diet. *Nutrition*. 2000, 16: 658-62.
6. Risbridger, G. P., Ellem, J.E. and McPherson, S.J. Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling. *J. Mol. Endocrinol.* 2007; 39:183-8.
7. Grimes, D.A. and Loba R. A. Perspectives on the women’s health initiative trial of hormone replacement therapy. *Obstetrics and gynecology*. 2002; 100: 1344-53.
8. Park, W.C. and Jordan, V.C. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends Mol. Med.* 2002; 8: 82-8.
9. Wange, C., Prasain, J.K., and Barnes, S. Reviews of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J. Chromatog. B.* 2002; 777: 32-8.
10. Umehara K, Nemoto K, Kimijima K, Matsushita A, Terada E, Monthakantirat O, De-Eknamkul W, Miyase T, Warashina T, Degawa M and Noguchi H. Estrogenic constituents of the heartwood of *Dalbergia parviflora*. *Phytochemistry* 2008; 69: 546-52.
11. Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M., and Lopez, D. Case – control study of phytoestrogens and breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 990-4.
12. Wu, A. H., Ziegler, R. G., and Horn-Ross, P. L. Tofu and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1996; 5: 901-6.
13. Alice, L. M., Gisela, W. and Susan, R. D. Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrin. Met.*, 1998; 83: 297-303.
14. Doris, M. T., Christopher, D. G. and Lilliam, L. H. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrin. Met.* 1998; 83: 2233-5.
15. Smitinand, T. *Thai plant names (botanical names-vernacular name)* revised edition. Bangkok: The Forest Herbarium, Royal Forest Department. 2001; p 73.
16. Niyomdham, C. An account of *Dalbergia* (Leguminosae-Papilionioideae) in Thailand. *Thai For. Bull.(Bot.)* 2002; 30: 124-66.
17. Boonyaprapassorn, N., et al. *Samunpai maipeanban (Domestic medicinal plants) Part IV*. Bangkok: Prachcheon press. 2000.
18. Phaetthanesuan, P. *Pramuan Sapphakhun ya thai part3*, Wat Po, Bangkok: Thailand. 1977.

19. Muangnoicharoen, N. and Frahm, A.W. New arylbenzofurans and neoflavonoids from the heartwood of *Dlbergia parviflora*.(abstract) *Abstr. 4th Asian Symp. Med. Plant Species Bangkok Thailand September 15-19 1980*: 163.
20. Muangnoicharoen, N. and Frahm, A.W. Aryllbenzofurans from *Dlbergia parviflora* *Phytochemistry* 1981; 20: 291-3.
21. Muangnoicharoen, N. and Frahm, A.W. Constituents of *Dlbergia parviflora* part2 *Phytochemistry* 1982; 21: 767-772.

ภาคผนวก

ก. บทความที่เผยแพร่ทางวิชาการ

1. K Umehara, K Nemoto, A Matsushita, E Terada, **Orawan Monthakantirat**, W De-Eknamkul, T Miyase, T Warashina, M Degawa, H Noguchi, Flavonoids from the Heartwood of the Thai Medicinal Plant *Dalbergia parviflora* and Their Effects on Estrogenic-Responsive Human Breast Cancer Cells. *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, Dec 2009; 72,12,2163-2168 | isi,scopus:
2. De-Eknamkul W, Umehara K, **Monthakantirat O**, Toth R, Frecer V, Knapic L, Braiuca P, Noguchi H, Miertus S. QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants. *J Mol Graph Model*. **2011**; Apr; 29 (6):784-94. | isi,scopus:

ข. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. นำเสนอผลงานวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ ชื่อเรื่อง QSAR Analysis of Flavonoids and Diphenolics from *Dalbergia parviflora* and *Belamcanda chinensis*. as Estrogen-Like Activity. The 131th Annual Research Meeting of The Pharmaceutical Society of Japan, March 29-31, 2011, Shizuoka, Japan.

QSAR Analysis of Flavonoids and Diphenolics from *Dalbergia parviflora* and *Belamcanda chinensis*. as Estrogen-Like Activity.

Orawan Monthakantirat ^{†,‡,§}, Wanchai De-Eknamkul ^{†,∇,*}, Kaoru Umehara ^{‡,∇}, Radovan Toth [∞],
Vladimir Frecer ^{∞,¶,∇}, Lorena Knapic [‡], Paolo Braiuca ^{‡,∇},
and Stanislav Miertus ^{∇,*}

[†] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[∇] International Centre for Science and High Technology, UNIDO, AREA Science Park, Trieste 34012, Italy

[‡] School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan

[§] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

[∞] Laboratory of Molecular, Biostructural and Nanomaterial Modeling, Consortium AREA Science Park of Trieste, AREA Science Park, Trieste 34012, Italy

[¶] Cancer Research Institute, Slovak Academy of Sciences, Bratislava 83391, Slovakia

[‡] Department of Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Trieste 34127, Italy

Abstract

A set of some flavonoids and diphenolics isolated from two species of Thai medicinal plants, *Dalbergia parviflora* R. (Leguminosae) and *Belamcanda chinensis* L. (Iridaceae) which used traditionally for the regulation of menstrual disorders, showed a wide range of estrogen-like activity as determined in breast cancer MCF-7 and T47D cell proliferation assays. This set of compounds was studied by means of computational techniques including quantitative structure-activity relationships (QSAR) and molecular modeling. It was found that the estrogenic potencies of the studied compounds depend mainly upon the presence/absence of hydroxyl groups attached to 3' and 5' positions of B ring of the isoflavone scaffold and the inter-atomic distance between the hydroxyl groups attached to the outer terminal positions 7 of A ring and 4' of B ring. In a QSAR model employing ligand-receptor interaction energy descriptors, the LigScore scoring function of Cerius² virtual screening module, which describes the receptor affinities of simultaneous binding to estrogenic receptors α and β (ER α and ER β), led to the best correlation between the observed estrogenic activities and computed descriptors. Correlation with R^2 value of 0.89 confirmed the validity of this model. Consideration of independent binding to ER α and ER β did not result in statistically significant QSAR models. It was thus concluded that simultaneous and possibly competitive interaction of the compounds with the ER α and ER β receptors, in which the presence of hydroxyl groups at the abovementioned positions of the isoflavonoids and diphenolics molecular scaffold plays a dominant role, may determine the estrogenic potency of the considered phytochemicals.

2. นำเสนอผลงานวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์ ชื่อเรื่อง QSAR Analysis of Flavonoids and Diphenolics from *Dalbergia parviflora* and *Belamcanda chinensis*. as Estrogen-Like Activity. The Phytochemical Society of North America (PSNA) meeting (10-15 December 2011) Hawaii, USA.

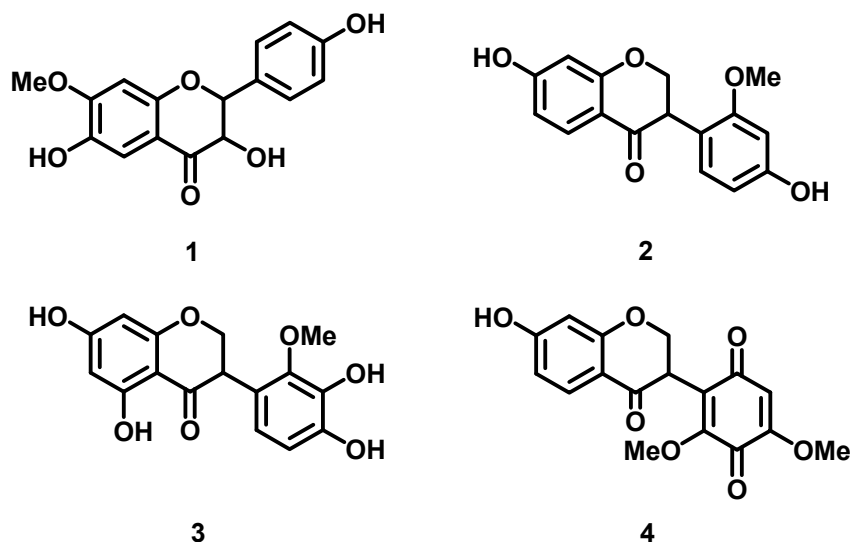
FOUR NOVEL FLAVONOIDS FROM *DALBERGIA PARVIFLORA* ROXB. WITH THE POTENTIAL TO ESTROGENIC AND ANTIESTROGENIC ACTIVITIES

Orawan Monthakantirat¹, Kaoru Umehara², Wanchai De-Eknamkul³, Toshio Miyase² and Hiroshi Noguchi²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand,

²School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

The heartwood of *Dalbergia parviflora* Roxb. (Leguminosae) has been used to normalize the menstruation in Thai traditional medicine. To support its common use, further investigation on its constituents were carried out. A part of methanol extract (150 g) of the heartwood was chromatographed on a silica gel column chromatography to yield 26 fractions. In this investigation, fraction R was focused for purification by using HPLC. Estrogenic activity and antiestrogenic activities were evaluated by monitoring cell proliferation of estrogen responsive human breast cancer, MCF-7 and T47D cells with various concentrations of isolates. Novel flavavone (1), isoflavanone (2-4), along with 7 known flavonoids, 3',4',6-Trihydroxy-7-methoxyflavanone (5), 4',7-Dihydroxyflavone (6), 4',7-Dihydroxy-8-methoxyisoflavone (7), 4',5,7-Trihydroxy-2'-methoxyisoflavone (8) 2',3',7-Trihydroxy-4'methoxyisoflavanone (9), Claussequinone (10) and 2'-Methoxyisoliquiritigenin (11) were isolated and determined their structures. Further purification and their bioactivity will be presented at the presentation.



ข. ตารางเปรียบเทียบ output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการและที่ได้จริง

Output		หมายเหตุ
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ(%)	
กิจกรรมที่1 การแยกบริสุทธิ์องค์ประกอบทางเคมี 1. การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง หั่น และบดตัวอย่าง 2. สกัดตัวอย่างด้วยด้วย เมทานอล 3. สกัดแยกส่วน	100	Output ของทุกกิจกรรมเป็นไปตามแผนที่ตั้งเอาไว้

4. การสกัดแยกสาร และการตรวจหาโครงสร้างเคมีของสารองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้ กิจกรรมที่ 2 การศึกษาฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 1. การทดสอบฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน 2.การทดสอบฤทธิ์ด้วยเทคนิค Reporter gene กิจกรรมที่ 3 ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารที่มีศักยภาพในการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนกับเอสโตรเจนรีเซพเตอร์ ด้วยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์	100 100	
---	-----------------------	--

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆต่อสทสว.

-

ลงนาม

(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

วันที่ 28 สิงหาคม 2563