



แอลคาลอยด์จากเปลือกกรากมะขวงที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง Cytotoxic Alkaloids from the Root Bark of *Zanthoxylum rhetsa*

พิชิต สุดตา^{1*} กานต์ หลินลาโก¹ และจรรยา ปันโป่ง¹

¹Research Unit of Natural Product Chemistry, Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology,
Phetchaburi Rajabhat University, Phetchaburi, 76000 Thailand

*Corresponding Author, E-mail: pichitsud@gmail.com

บทคัดย่อ

การแยกสารจากเปลือกกรากมะขวง (*Zanthoxylum rhetsa*) ได้แอลคาลอยด์ที่ทราบโครงสร้างแล้ว 8 ชนิด จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและการเปรียบเทียบกับข้อมูลสารที่เคยมีรายงานแล้วพบว่าสารที่แยกได้มีโครงสร้างเป็น dihydroavicine (1) dihydronitidine (2) paraensidimerine C (3) *N*-methylflindersine (4) 8-acetyldihydroavicine (5) paraensidimerine A (6) 8-acetyldihydronitidine (7) และ akimmianine (8) ในบรรดาแอลคาลอยด์ที่แยกได้ถือว่าเป็นครั้งแรกในการพบสาร 3-6 ในพืชชนิดนี้ การประเมินฤทธิ์ความเป็นพิษของแอลคาลอยด์ทั้งหมดต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งปอด (NCI-H187) พบว่ามอนอเมอร์คิวโนลิโนแอลคาลอยด์ 4 แสดงฤทธิ์ในระดับดีต่อเซลล์ NCI-H187 (IC_{50} 0.536 ไมโครกรัม/มล.) และ KB (IC_{50} 25.16 ไมโครกรัม/มล.) เมื่อเทียบกับบิสควิโนลิโนแอลคาลอยด์ 3 และ 6 ในบรรดาเบนโซฟิรีแนนทรินแอลคาลอยด์พบว่า สาร 7 มีประสิทธิภาพดีสุดในการเป็นสารต้านเซลล์มะเร็งทุกชนิด และแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์ NCI-H187 (IC_{50} 0.025 ไมโครกรัม/มล.) ได้ดีกว่ายามาตรฐาน ellipticine (IC_{50} 3.14 ไมโครกรัม/มล.) ประมาณ 126 เท่า จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าแอลคาลอยด์ 4 และ 7 อาจสามารถใช้เป็นสารต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับการออกแบบและสังเคราะห์สารอนุพันธ์เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการเป็นสารต้านมะเร็ง

ABSTRACT

Eight known alkaloids were isolated from the root barks of *Zanthoxylum rhetsa*. Based on the spectroscopic data analysis and the comparison with previous spectral of reported alkaloids, their structures were established as dihydroavicine (1), dihydronitidine (2), paraensidimerine C (3), *N*-methylflindersine (4), 8-acetyldihydroavicine (5), paraensidimerine A (6), 8-acetyldihydronitidine (7) and akimmianine (8). Among the alkaloids, 3-6 are first time found in this plant. The cytotoxicity of all alkaloids were evaluated against human cancer cell lines (KB, MCF-7 and NCI-H187). Mono-mercurionolignans alkaloid 4 showed good activity against NCI-H187 (IC_{50} 0.536 μ g/ml) and KB (IC_{50} 25.16 μ g/ml) when compared with bis-mercurionolignans alkaloid 3 and 6. Among the benzofirane alkaloids, 7 showed the best activity in all cancer cell lines and showed activity against NCI-H187 (IC_{50} 0.025 μ g/ml) better than ellipticine (IC_{50} 3.14 μ g/ml) approximately 126 times. The results show that alkaloid 4 and 7 may be used as a model for the design and synthesis of novel derivatives to improve the efficacy of anticancer agents.

(6), 8-acetyldihydroneopterin (7), and akimianine (8). Among them, alkaloids 3-6 were obtained for the first time from this plant. The cytotoxic evaluation of these alkaloids toward three cancer cell lines, epidermoid carcinoma of oral cavity (KB), breast adenocarcinoma (MCF-7) and small cell lung cancer (NCI-H187) found that monomeric quinolinone alkaloid 4 exhibited effective cytotoxicity against NCI-H187 (IC_{50} 0.536 $\mu\text{g/mL}$) and KB (IC_{50} 25.16 $\mu\text{g/mL}$) cells. Among benzophenanthridine alkaloids, compound 7 was proved to be more potent as an anticancer agent to all cancer cell lines and was approximately 126 folds greater than that of the standard drug ellipticine (IC_{50} 3.14 $\mu\text{g/mL}$) to NCI-H187. The presented results demonstrate that alkaloids 4 and 7 can be recommended as appropriate lead structures for the design and synthesis of their analogs to improve efficacy.

คำสำคัญ: เปลือกกรากมะขวง แอลคาลอยด์ ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Keywords: *Zanthoxylum rhetsa* root bark, Alkaloids, Cytotoxic activity

บทนำ

ในปัจจุบันพบว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดการตายของมนุษย์ในลำดับต้นๆ ที่เมื่อเทียบกับโรครุนแรงชนิดอื่นๆ และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี (Bray et al., 2013) อาจเป็นเพราะการที่ยังไม่มีวิธีรักษาที่มีประสิทธิภาพสูงเพียงพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันก่อให้เกิดอาการข้างเคียงรุนแรงจนอาจส่งผลให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งได้รับอันตรายจนถึงขั้นเสียชีวิต (Cho, 2011) และที่สำคัญคือ การใช้ยาต้านมะเร็งในปัจจุบันมักก่อให้เกิดภาวะดื้อยาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพและการดูแลสุขภาพไปยิ่งอวัยวะสำคัญอื่นๆ อย่างรวดเร็ว (Ullah, 2008) ดังนั้นการคิดค้นเพื่อหาโมเลกุลของยาชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติทั้งการทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ และการออกฤทธิ์อย่างมีความจำเพาะเจาะจงเพื่อลดผลข้างเคียงต่างๆ จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง (Atkins and Gershell, 2002) พืชสมุนไพรถือได้ว่าเป็นแหล่งของการค้นพบสารที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งที่สำคัญ (Saeidnia and Abdollahi, 2014) ดังจะเห็น

ได้จากการค้นพบโมเลกุลที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในปัจจุบันหลายชนิดได้มาจากพืช เช่น paclitaxel (Taxol®) quinine digoxin vincristine และ vinblastin เป็นต้น (Graham et al., 2000) แต่ยังมีสารแสดงฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งที่มีประสิทธิภาพสูงบางชนิดที่ได้จากพืชแต่ยังไม่สามารถพัฒนาต่อให้เป็นยารักษาโรคได้เนื่องมาจากมีความเป็นพิษสูง (Newmann and Cragg, 2007) จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยอย่างเร่งด่วนเพื่อค้นหาโมเลกุลทดแทนจากพืชสมุนไพรชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยกว่า

มะขวง (*Z. rhetsa* (Roxb.) DC.) มีชื่อพ้องคือ *Z. limonella* และ *Z. budraga* Wall Ex. DC. (Somanabandhu et al., 1992; Suksathan et al., 2009) พบมากในภาคเหนือของประเทศไทยและบางพื้นที่ของภาคตะวันตก (Suksathan et al., 2009) ส่วนต่างๆ ของมะขวงนิยมนำมาใช้เป็นสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนเปลือกกราก ใช้ในการกระตุ้นเซลล์ประสาท รักษาสมดุมน้ำตาลในเลือด และใช้แก้อาการอักเสบของแผลต่างๆ (Chowdhury et al.,

1994; Ghani, 1998; Reddy and Jose, 2011) เคยมีรายงานการค้นพบสารองค์ประกอบในรากมะขังที่หลากหลายได้แก่ ลิกแนน คูมาลิน เทอร์พีนอยด์ และมีแอลคาลอยด์เป็นสารกลุ่มหลัก (Chatterjee et al., 1959; Ruangrunsi et al., 1981; Banerjee et al., 1989; Joshi et al., 1991; Rhaman et al., 2008 และ Tantapakul et al., 2012) ซึ่งสารแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบส่วนมากมีรายงานถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ส่วนฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่ายังมีรายงานน้อย เช่น สาร simuloquinoline 2, 1, 1-didemethoxyvepridimerine B chelerybulgarine 2'-episimuloquinoline และสาร rhetsidimerine ซึ่งแยกได้จากส่วนเปลือกกรากของมะขัง แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารของมนุษย์ (cell lines; SCL SCL-6 SCL-37'6 SCL-9 Kato-3 และ NUGC-4) ด้วยค่า ED_{50} อยู่ในช่วง 37.47-94.28 ไมโครโมลาร์ (Ahsan et al., 2014) เป็นต้น จากการค้นพบว่าแอลคาลอยด์จากพืชหลายชนิดสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Mohan et al., 2012) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการค้นพบว่าพืชชนิดเดียวกันแต่เจริญเติบโตในพื้นที่ต่างกันจะส่งผลถึงความหลากหลายทางด้านโครงสร้างทางเคมีและปริมาณของสารองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (Garsia et al., 2013) และจากการที่มะขังซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก ประกอบการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะขังในประเทศไทยนิยมในมะขังจากพื้นที่ภาคเหนือเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการสกัดและแยกสารแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกกรากมะขังที่พบในจังหวัดเพชรบุรี (ภาคตะวันตกของไทย) และศึกษาความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างโครงสร้างและการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของแอลคาลอยด์ที่

แยกได้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของการค้นพบแอลคาลอยด์ต้นแบบชนิดใหม่ในการพัฒนาต่อยอดสู่การเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พืชและการเก็บตัวอย่างพืช

เปลือกกรากของมะขังเก็บจาก ต.ยางน้ำกลัดเหนือ อ.หนองหญ้าปล้อง จ.เพชรบุรี เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ตรวจสอบชนิดพืชโดยการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้มะขัง (*Z. rhetsa*) ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เก็บตัวอย่างพืชแห้ง (PCS-Z-002) ที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

2. วิธีการเตรียมสารสกัดและการทดสอบแอลคาลอยด์

บดเปลือกกรากมะขังแห้งให้ละเอียด (3.5 กก.) สกัดด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ในตัวทำละลาย hexane (12 ลิตร) เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำการกรองเพื่อแยกกากออก ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง ได้สารสกัด hexane (43.61 กรัม, 1.24%) แยกกากพืชที่เหลือด้วย EtOAc (3x12 ลิตร) และ MeOH (3x12 ลิตร) ตามลำดับ โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการสกัดด้วย hexane ได้สารสกัด EtOAc (239.11 กรัม, 6.83%) และสารสกัด MeOH (527.53 กรัม, 15.07%) ตามลำดับ นำสารสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบการมีแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบด้วย Dragendorff's reagent และเลือกสารสกัดที่เกิดตะกอนสีแดงส้มในปริมาณมากเพื่อใช้ในการสกัดแอลคาลอยด์

3. วิธีการสกัดและการแยกแอลคาลอยด์

นำสารสกัด hexane และสารสกัด EtOAc มาทำการสกัดสารแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบ

ด้วยวิธีการทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดซึ่งใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ (2012) โดยใช้สารสกัด hexane (20.79 กรัม) ละลายด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง CH_2Cl_2 และ EtOH (1:3 v/v) จากนั้นนำมาเติม 5% H_2SO_4 จำนวน 500 มล. กวนสารละลายเป็นเวลา 21 ชม. กรองสารละลายและนำส่วนที่เป็นกรดมาทำการสกัดด้วย Et_2O (3×150 มล.) รวมชั้น Et_2O และระเหยให้แห้ง จะได้ของแข็งหนืดสีน้ำตาลเข้ม (Fraction PCS-Hex1, 2746.0 มก.) ส่วนสารละลายกรดที่เหลือถูกทำให้อยู่ในสภาพเบสโดยการเติมสารละลาย NH_4OH และสกัดด้วย Et_2O (3×100 มล.) รวมชั้น Et_2O แล้วระเหยให้แห้งจะได้สารของแข็งสีเหลืองอ่อน (Fraction PCS-Hex2, 1,371.4 มก.) สำหรับการสกัดแอลคาลอยด์จากสารสกัด EtOAc ใช้วิธีเช่นเดียวกับสารสกัด hexane โดยใช้สารสกัด EtOAc หนัก 26.33 กรัม ได้สาร Fraction PCS-Et1 เป็นของแข็งหนืดสีน้ำตาลเข้มหนัก 6553.1 มก. และสารสกัดที่ได้จากการเติมเบส Fraction PCS-Et2 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองเข้มหนัก 4,219.4 มก.

นำ Fraction PCS-Hex2 ที่ได้จากสารสกัด hexane จำนวน 1,050.0 มก. มาทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี (CC) โดยใช้ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค 0.063-0.020 มม. ใช้ระบบชะเริ่มต้นด้วย hexane และเพิ่มความเป็นขั้วด้วย acetone เก็บสารละลายและรวมเป็นกลุ่ม ได้สารหลักทั้งหมด 4 กลุ่มหลัก (PCS-Hex2A – PCS-Hex2D) นำสารกลุ่มหลัก PCS-Hex2A (256.1 มก.) มาแยกต่อด้วย CC ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค < 0.063 มม. ชะด้วย hexane hexane-acetone และ acetone ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย (PCS-Hex2A1 – PCS-Hex2A5) นำสารกลุ่มย่อย PCS-Hex2A1 และ PCS-Hex2A3 ไปผ่านการล้างตะกอนด้วย acetone-hexane (1:4) ได้สารของแข็งสีขาว PCS-Hex2A1E (สาร 1, 27.0 มก. หรือ

คิดเป็น 7×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) และ PCS-Hex2A3E (สาร 2, 18.3 มก. คิดเป็น 5×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) ตามลำดับ ส่วนสารกลุ่มย่อย PCS-Hex2A4 (สาร 3) เป็นผลึกสีขาวหนัก 53.2 มก. (1.4×10^{-3} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) นำ Fraction PCS-Et2 ซึ่งได้จากสารสกัด EtOAc จำนวน 3,042.1 มก. มาทำการแยกด้วย CC (ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค 0.063-0.020 มม.) ใช้ระบบชะเริ่มต้นเป็น hexane และเพิ่มความเข้มข้นขั้วด้วย acetone ตามด้วย MeOH ได้สารหลัก 9 กลุ่ม (PCS-Et2A – PCS-Et2I) นำสารกลุ่มหลัก PCS-Et2A (369.2 มก.) มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC (ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค 0.063-0.020 มม. ชะด้วย hexane hexane-acetone และ acetone) ได้สาร 5 กลุ่มย่อย (PCS-Et2A1 – PCS-Et2A5) สารกลุ่ม PCS-Et2A2 (สาร 4) เป็นสารบริสุทธิ์ของแข็งสีขาวหนัก 78.3 มก. (2.2×10^{-3} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) นำสารกลุ่มย่อย PCS-Et2F หนัก 444.6 มก. มาแยกต่อด้วยเทคนิค CC ได้สารทั้งหมด 5 กลุ่มย่อย คือ PCS-Et2F1-PCS-Et2F5 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ 3 สารได้แก่กลุ่มย่อย PCS-Et2F1 (สาร 5) เป็นของแข็งสีขาวหนัก 31.1 มก. (8.9×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) กลุ่มย่อย PCS-Et2F2 (สาร 6) เป็นของแข็งสีขาวหนัก 21.5 มก. (6.1×10^{-4} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) และกลุ่มย่อย PCS-Et2F5 (สาร 7) มีลักษณะเป็นผลึก สีขาวหนัก 89.1 มก. (2.5×10^{-3} % ของน้ำหนักพืชแห้ง) นำสารกลุ่มย่อย PCS-Et2G หนัก 211.3 มก. มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิค CC (ซิลิกาเจลขนาดอนุภาค < 0.063 มม.) ชะด้วยระบบตัวชะแบบเกรเดียนท์ ตั้งแต่ hexane และเพิ่มความเข้มข้นขั้วด้วย acetone ได้สารทั้งหมด 4 กลุ่มย่อย คือ PCS-Et2G1-PCS-Et2G4 สารกลุ่มย่อย PCS-Et2G1 หนัก 36.4 มก. เป็นสารบริสุทธิ์ชนิดเดียวกับสาร 7 ในขณะที่สารกลุ่มย่อย PCS-Et2G3 (สาร 8) เป็นสารบริสุทธิ์ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกขนาดเล็ก

สีขาวหนัก 44.0 มก. (1.25×10^{-3} % ของน้ำหนักพืชแห้ง)

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอลคาลอยด์บริสุทธิ์

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารแอลคาลอยด์บริสุทธิ์ 1-8 โดยการบันทึกจุดหลอมเหลว วิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิค NMR (1D และ 2D NMR) และเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี และการเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารบริสุทธิ์ที่เคยมีรายงานการวิจัยแล้ว

dihydroavicine (1): ของแข็งสีขาว 27.0 มก.; m.p. 180-183 °C (lit. m.p. 186-188 °C; Joshi et al., 1991); $R_f = 0.61$ (hexane:acetone, 70:30); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 2.56 (3H, s, NCH_3), 4.07 (3H, s, H-8), 5.97 (2H, s, C2- OCH_2O -C3), 6.03 (2H, s, C12- OCH_2O -C13), 6.75 (1H, s, H-1), 7.09 (1H, s, H-11), 7.26 (1H, s, H-4), 7.46 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10), 7.60 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9), 7.61 (1H, s, H-14); ESI-MS: m/z (%) 332 [M-H^-] (100)

dihydranitidine (2): ของแข็งสีขาว 18.3 มก.; m.p. 169-172 °C (lit. m.p. 192-195 °C; Moura et al., 1997); $R_f = 0.55$ (hexane:acetone, 70:30); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 2.60 (3H, s, NCH_3), 3.95 (3H, s, 2- OCH_3), 4.00 (3H, s, 3- OCH_3), 4.10 (2H, s, H-8), 6.05 (2H, s, C12- OCH_2O -C13), 6.80 (1H, s, H-1), 7.12 (1H, s, H-4), 7.31 (1H, s, H-11), 7.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10), 7.66 (1H, s, H-14), 7.70 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9); ESI-MS: m/z (%) 348 [M-H^-] (100)

paraensidimerine C (3): ผลึกสีขาว 53.2 มก.; m.p. 283-285 °C (lit. m.p. 280-281 °C; Jurd et al., 1982); R_f 0.45 (hexane : acetone, 70:30); $[\alpha]_D^{25} 0$ (c 0.081, CHCl_3 ; lit. Optically inactive;

Jurd et al., 1982); ESI-MS: m/z (%) 507 [M+Na^+] (100) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 1

N-methylflindersine (4): ของแข็งสีขาว 78.3 มก.; m.p. 78-80 °C (lit. m.p. 83-85 °C; Chen et al., 2007); $R_f = 0.42$ (hexane:acetone, 70:30); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 1.51 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 3.69 (3H, s, NCH_3), 5.53 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-2'), 6.75 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-1'), 7.23 (1H, dd, $J = 7.1$, 7.9 Hz, H-6), 7.31 (1H, d, $J = 8.5$, H-8), 7.54 (1H, ddd, $J = 1.3$, 7.1, 8.5 Hz, H-7), 7.96 (1H, dd, $J = 1.3$, 7.9 Hz, H-5); ESI-MS: m/z (%) 505 [2M+Na^+] (55)

8-acetyldihydroavicine (5): ของแข็งสีขาว 31.1 มก.; m.p. 187-189 °C (lit. m.p. 184-185 °C; Nissanka et al., 2001); $R_f = 0.41$ (hexane:acetone, 70:30); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 1.96 (3H, s, CH_2COCH_3), 2.30 (1H, dd, $J = 6.0$, 15.9 Hz, H-8), 2.61 (3H, s, NCH_3), 2.66 (1H, dd, $J = 8.7$, 15.9 Hz, CH_2COCH_3), 4.52 (1H, dd, $J = 6.0$, 8.7 Hz, CH_2COCH_3), 5.98 (2H, d, $J = 1.5$ Hz, C2- OCH_2O -C3), 6.04 (2H, d, $J = 1.5$ Hz, C12- OCH_2O -C13), 6.81 (1H, s, H-1), 7.11 (1H, s, H-4), 7.29 (1H, s, H-14), 7.47 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-10), 7.54 (1H, s, H-11), 7.62 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-9); ESI-MS: m/z (%) 390 [M+H^+] (100)

paraensidimerine A (6): ของแข็งสีขาว 21.5 มก.; m.p. 308-312 °C (lit. m.p. 311-312 °C; Jurd et al., 1982) มีค่า R_f 0.37 (hexane : acetone, 70:30); $[\alpha]_D^{25} 0$ (c 0.058, CHCl_3 ; lit. Optically inactive, Jurd et al., 1982); ESI-MS: m/z (%) 483 [M-H^-] (68) ข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR แสดงในตารางที่ 2

8-acetyldihydronitidine (7): ผลึกไม่มีสี 125.6 มก.; m.p. 164-166 °C (lit. m.p. 165-167 °C; Nissanka et al., 2001); $R_f = 0.35$ (hexane:acetone, 70:30); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 1.97 (3H, s, CH_2COCH_3), 2.32 (1H, dd, $J = 5.6, 15.7$ Hz, CH_2COCH_3), 2.61 (3H, s, NCH_3), 2.69 (1H, dd, $J = 8.6, 15.7$ Hz, CH_2COCH_3), 3.94 (3H, s, 3-OCH₃), 3.99 (3H, s, 2-OCH₃), 4.55 (1H, dd, $J = 5.6, 8.6$ Hz, H-8), 6.03 (2H, d, $J = 1.2$ Hz, C12-OCH₂O-C13), 6.85 (1H, s, H-1), 7.12 (1H, s, H-14), 7.32 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10), 7.51 (1H, s, H-4), 7.70 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-9); ESI-MS: m/z (%) 428 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100)

skimianine (8): ผลึกสีขาว 36.9 มก.; m.p. 178-179 °C (lit. m.p. 140 °C; Moura et al., 1997; m.p. 179-181 °C; Ratheesh et al., 2013); $R_f = 0.30$ (hexane:acetone, 70:30); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} ; 4.03 (3H, s, 7-OCH₃), 4.12 (3H, s, 8-OCH₃), 4.42 (3H, s, 4-OCH₃), 7.03 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-3'), 7.23 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-6), 7.58 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-2'), 8.01 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-5); ESI-MS: m/z (%) 260 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (30), 541 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ (100)

5. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก KB (epidermoid carcinoma of oral cavity) มะเร็งเต้านม MCF-7 (breast adenocarcinoma) และมะเร็งปอด NCI-H187 (small cell lung cancer) ของแอลคาลอยด์ 1-8 โดยห้องปฏิบัติการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ใช้วิธี Resazurin microplate assay (REMA) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ O' Brien และ

คณะ (2000) โดยเตรียมเซลล์ให้อยู่ในช่วง logarithmic growth phase เจือจางให้มีความเข้มข้น 7×10^4 เซลล์/มล. สำหรับ KB ส่วนเซลล์ MCF-7 และ NCI-H187 ให้มีความเข้มข้น 9×10^4 เซลล์/มล. ผสมสารละลายของแอลคาลอยด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆใน 5% DMSO จำนวน 5 ไมโครลิตร กับสารแขวนลอยของเซลล์มะเร็งจำนวน 45 ไมโครลิตรใน 384-well plates บ่มในสภาวะอุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ (เป็นเวลา 3 วันสำหรับเซลล์ KB และ MCF-7 และ 5 วันสำหรับ NCI-H187) เติมสารละลาย resazurin (62.5 ไมโครกรัม/มล.) 12.5 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมของ 384-well plates บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชม. วัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่อง SpectraMax M5 multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมสารแอลคาลอยด์ คำนวณค่า % inhibition และหาค่า IC₅₀ (The half maximal inhibitory concentration) ของสารที่มี % inhibition มากกว่า 50% โดยโปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งใช้ 0.5% DMSO เป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และใช้ยา tamoxifen doxorubicin และ ellipticine เป็นชุดควบคุมผลบวก (positive control)

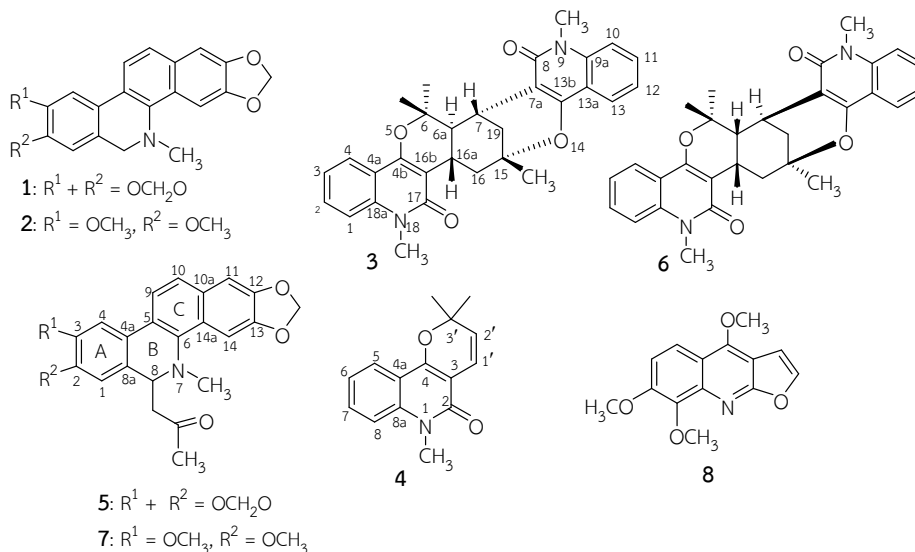
ผลและการวิจารณ์ผล

1. การสกัด การแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร

จากการสกัดและการแยกสารแอลคาลอยด์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัด hexane และสารสกัด EtOAc ตลอดทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอลคาลอยด์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่างๆ (1D NMR 2D NMR และ MS) ประกอบกับการเปรียบเทียบข้อมูลกับสารที่เคยมีรายงานการวิจัยแล้วพบว่าสามารถแยกแอลคาลอยด์ที่ทราบโครงสร้างแล้วได้

ทั้งหมด 8 ชนิด (โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1) ซึ่งประกอบด้วยสารที่เคยมีรายงานการเป็นองค์ประกอบในมะขวงแล้ว 4 ชนิด โดยเป็นสารกลุ่มเบนโซฟีแนนทรินดีนแอลคาลอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ dihydroavicine (1) (Joshi et al., 1991) dihydronitidine (2) (Moura et al., 1987) และ 8-acetyldihydronitidine (7)

(Nissanka et al., 2001) และสารพิวโรควินอลีนแอลคาลอยด์อีก 1 ชนิดคือ skimmianine (8) (Moura et al., 1997; Ratheesh et al., 2013) ส่วนแอลคาลอยด์อีก 4 ชนิด พบว่ายังไม่เคยมีรายงานการเป็นองค์ประกอบในมะขวงมาก่อน นั่นคือ สาร 3-6



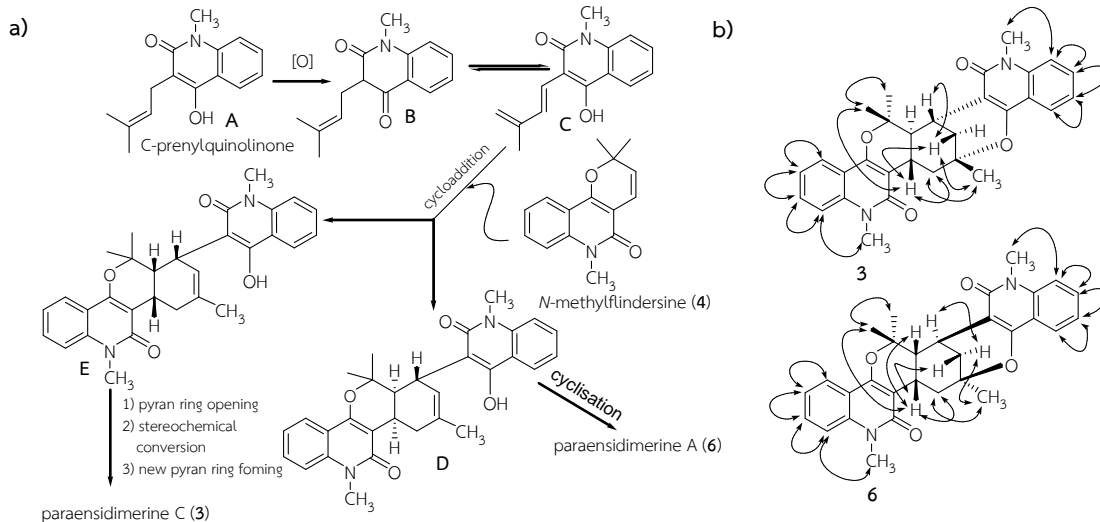
รูปที่ 1 โครงสร้างของสารแอลคาลอยด์ 1-8 ซึ่งแยกได้จากเปลือกกรากมะขวง (*Z. rhetsa*)

ข้อมูล ^1H NMR ของสาร 4 ปรากฏสัญญาณ aromatic protons ที่ δ_{H} 7.23 (H-6) 7.31 (H-8) 7.54 (H-7) และ 7.96 (H-5) พบสัญญาณซิงเกิลของ *N*-methyl proton 1 แห่ง ที่ δ_{H} 3.69 พบสัญญาณแบบดับเบลตของแอลคีนโปรตอน 2 สัญญาณที่ δ_{H} 5.53 ($J = 9.9$ Hz) และ δ_{H} 6.75 ($J = 9.9$ Hz) และปรากฏสัญญาณของหมู่เมทิลเป็นแบบซิงเกิล 1 แห่งที่ δ_{H} 1.51 (6H, s, $2 \times \text{CH}_3$) ซึ่งแสดงถึงคุณลักษณะของสารประเภท *N*-methylquinolone ที่ถูกเชื่อมต่อกับวงไดไฮโดรไพเพอแรน และมีลักษณะคล้ายกับ ^1H NMR ของ 8-methoxy-*N*-methylflindersine ซึ่งเคยมีรายงานว่า เป็นองค์ประกอบในส่วนเปลือกกรากของมะขวง (Ahsan et al., 2014) ยกเว้นการที่ ^1H NMR ของสาร

4 ไม่ปรากฏสัญญาณของหมู่เมทอกซิล (8-OCH_3) ที่ δ_{H} 3.93 (3H, s) และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลสาร *N*-methylflindersine ซึ่งเป็นสารที่พบในพืช *Fhellodendron chinense* (Ronghui et al., 1994) พบว่ามีข้อมูลที่สอดคล้องกัน ดังนั้นสาร 4 จึงเป็นสาร *N*-quinolinone alkaloid ที่ไม่มีหมู่เมทอกซิลตรง C-8 และมีโครงสร้างเป็น *N*-methylflindersine สำหรับสาร 5 (R_f 0.45; hexane : acetone, 70:30) เป็นสารที่มีสภาพความเป็นขั้วต่ำกว่าสาร 8-acetyldihydronitidine (7, R_f 0.35; hexane : acetone, 70:30) จากการเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR กับสาร 7 พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน โดยยังคงปรากฏสัญญาณของหมู่เอเซโทนิลที่ δ_{H} 1.96 (CH_2COCH_3) และ

δ_H 2.66 และ 4.52 (CH_2COCH_3) และปรากฏสัญญาณแบบดับเบิ้ลตในช่วงความเข้มสนามแม่เหล็กต่ำเพิ่มขึ้นอีก 1 สัญญาณที่ δ_H 5.98 ($J = 1.5$ Hz) ซึ่งต่อมาได้กำหนดเป็นโปรตอนของหมู่เมทิลินไดออกซีแทนหมู่เมทอกซิล 2 หมู่ตรงตำแหน่ง C-2 และ C-3 ในสาร **7** เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสาร **5** กับข้อมูลของ 8-acetyldihydroavicine ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบในพืช *Zanthoxylum tetraspermum* (Nissanka et al., 2001) พบว่ามีข้อมูลที่สอดคล้องกัน ดังนั้นสาร **5** จึงมีโครงสร้างเป็น 8-acetyldihydroavicine สาร **3** มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เป็นของผสมราชิมิก ($[\alpha]_D^{25}$ 0 (c 0.081, CHCl_3 ; lit. Optically inactive, Jurd et al., 1982) เมื่อใช้เทคนิค COSY DEPT HMQC และ HMBC เพื่อระบุตำแหน่งของไฮโดรเจนและคาร์บอน ได้ผลดังตารางที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร **3** เกิดจากการรวมกันของ เอ็น-เมทิลควิโนลิโนน 2 หน่วยย่อย

(รูปที่ 2a) แล้วเกิดวงไซโคลเฮกเซนซึ่งเชื่อมต่อกับวงไพแรน เมื่อพิจารณาค่า coupling constant (J) ใน $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม ของ H-6a (δ_H 1.64) และ H-16a (δ_H 3.27) พบว่ามีค่าเท่ากับ 12.4 เฮิรตซ์ ซึ่งแสดงถึงการมีความสัมพันธ์แบบทรานส์ ตรงตำแหน่งเชื่อมต่อกันระหว่างวงไซโคลเฮกเซนกับวงไพแรน โดยสามารถสนับสนุนความสัมพันธ์นี้จากการไม่พบความสัมพันธ์ NOE ของ H-6a และ H-16a ใน NOESY สเปกตรัม (รูปที่ 2b) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ของสาร **3** กับ paraensidimerine C (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นสารบิสควิโนลิโนนแอลคาลอยด์ที่เคยแยกได้จากแก่นลำต้นของพืช *Euxylophora paraensis* (Jurd et al., 1982) พบว่ามีข้อมูลที่สอดคล้องกันจึงสรุปได้ว่าสาร **3** มีโครงสร้างเป็น paraensidimerine C



รูปที่ 2 a) การเกิดสาร **3** และ **6** จากปฏิกิริยาไซโคลแอตดิชันของ C-prenylquinolinone และสาร **4** ซึ่งเสนอโดย Jurd และคณะ (1982); b) ความสัมพันธ์ NOE ของสาร **3** และ **6** ใน NOESY สเปกตรัม

ตารางที่ 1 ข้อมูล ^1H (CDCl_3) และ ^{13}C NMR (CDCl_3) ของสาร 3 เทียบกับสาร paraensidimerine C

| ตำแหน่ง C | paraensidimerine C (Jurd et al., 1982) | | สาร 3 | |
|---------------------|---|--|----------------|--|
| | U_C (25.03 MHz) | U_H (m, J in Hz) (200 MHz) | U_C (75 MHz) | U_H (m, J in Hz) (300 MHz) |
| 1 | 113.5 | 7.23 (1H, m) | 113.5 | 7.28 (1H, m) |
| 2 | 130.2 | 7.50 (1H, m) | 130.2 | 7.52 (1H, br t, 6.9) |
| 3 | 121.4 | 7.23 (1H, m) | 121.4 | 7.18 (1H, m) |
| 4 | 122.9 | 7.92 (1H, dd, 1.5, 6.7) | 122.9 | 7.95 (1H, br t, 8.4) |
| 4a | 115.8 | | 114.5 | |
| 4b | 155.0 | | 154.9 | |
| 6 | 81.5 | | 81.4 | |
| 6a | 52.2 | 1.63 (1H, dd, 3.5, 12.4) | 52.2 | 1.64 (1H, dd, 3.4, 12.4) |
| 6-CH ₃ | 29.3 | 1.73 (3H, s) | 28.9 | 1.72 (3H, s) |
| 6-CH ₃ | 28.5 | 1.90 (3H, s) | 28.4 | 1.89 (3H, s) |
| 7 | 25.7 | 2.66 (1H, dt, 4.3, 12.6) | 25.6 | 2.66 (1H, ddd, 3.4, 4.3, 9.1) |
| 7a | 107.6 | | 107.6 | |
| 8 | 161.9 | | 161.7 | |
| 9a | 138.8 | | 138.8 | |
| 9-NCH ₃ | 29.4 | 3.69 (3H, s) | 29.4 | 3.70 (3H, s) |
| 10 | 113.6 | 7.23 (1H, m) | 113.6 | 7.26 (1H, m) |
| 11 | 130.2 | 7.50 (1H, m) | 130.2 | 7.50 (1H, m) |
| 12 | 121.4 | 7.23 (1H, m) | 121.4 | 7.17 (1H, m) |
| 13 | 123.3 | 7.96 (1H, dd, 1.3, 6.5) | 123.3 | 7.92 (1H, br t, 8.4) |
| 13a | 116.5 | | 116.4 | |
| 13b | 158.0 | | 155.9 | |
| 15 | 78.5 | | 78.5 | |
| 15-CH ₃ | 20.7 | 1.33 (3H, s) | 20.7 | 1.33 (3H, s) |
| 16 | 39.7 | ax. 2.17 (1H, dd, 3.5, 13.6) eq. 1.48 (1H, dd, 4.9, 13.2) | 39.6 | ax. 2.17 (1H, dd, 3.4, 13.5) eq. 1.50 (1H, m) |
| 16a | 25.6 | 3.27 (1H, dt, 3.2, 12.4) | 25.6 | 3.27 (1H, ddd, 2.5, 3.4, 12.4) |
| 16b | 116.7 | | 116.7 | |
| 17 | 162.8 | | 162.8 | |
| 18-NCH ₃ | 29.0 | 3.64 (3H, s) | 29.2 | 3.64 (3H, s) |
| 18a | 138.8 | | 138.8 | |
| 19 | 31.2 | ax. 1.45 (1H, t, 12.7) eq. 3.89 (1H, dd, 4.7, 14.7) | 31.0 | ax. 1.46 (1H, m) eq. 3.89 (1H, dd, 4.3, 14.6) |

br คือ broad; ax คือ ตำแหน่ง axial; eq คือ ตำแหน่ง equatorial

สาร 6 มีสมบัติเป็นของผสมราซิมิก ($[a]_D^{25}$ 0; c 0.0058, CHCl_3 ; lit. Optically inactive, Jurd et al., 1982) มีข้อมูลทั้ง ^1H และ ^{13}C NMR คล้ายกับสาร 3 โดยมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนของวงไซโคลเฮกเซนเชื่อมต่อกับวงไพแรนเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบข้อมูล ^1H NMR กับสาร 3 พบการเลื่อนไปยังตำแหน่งความเข้มสนามแม่เหล็กที่ต่ำกว่าของ H-6a และ H-16a ที่ δ_{H} 2.17 และ 3.03 ตามลำดับ และที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือการที่ H-6a และ H-16a ของ 6 มีความสัมพันธ์แบบซิส ซึ่งยืนยันได้จากการมีความสัมพันธ์ NOE อย่างชัดเจนใน NOSEY สเปกตรัม

(รูปที่ 2b) ประกอบกับการที่ H-6a และ H-16a มีค่า vicinal coupling constant (J) ใน ^1H -NMR เท่ากับ 6.3 เฮิรตซ์ ซึ่งเป็นคุณลักษณะของความสัมพันธ์แบบซิสเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ที่เคยมีรายงานไว้แล้วของสาร paraensidimerine A (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์อีกชนิดหนึ่งที่พบในพืช *Euxylophora paraensis* (Jurd et al., 1982) ประกอบกับการอธิบายกลไกปฏิกิริยาไซโคลแอตดิชันเพื่อเกิดเป็นบิสควิโนลิโนแอลคาลอยด์ของ Jurd และคณะ (1982) ดังแสดงใน รูปที่ 2a ดังนั้นสาร 6 จึงเป็นไอโซเมอร์ของสาร 3 และมีโครงสร้างเป็น paraensidimerine A

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^1H (CDCl_3) และ ^{13}C NMR (CDCl_3) ของสาร 6 เทียบกับสาร paraensidimerine A

| ตำแหน่ง C | paraensidimerine A (Jurd et al., 1982) | | สาร 6 | |
|--------------------|--|------------------------------|----------------|------------------------------|
| | U_c (25.03 MHz) | U_H (m, J in Hz) (200 MHz) | U_c (75 MHz) | U_H (m, J in Hz) (300 MHz) |
| 1 | 113.5 | 7.25 (1H, m) | 113.5 | 7.25 (1H, m) |
| 2 | 130.2 | 7.52 (1H, m) | 130.2 | 7.52 (1H, dd, 1.1, 6.9) |
| 3 | 121.4 | 7.25 (1H, m) | 121.4 | 7.25 (1H, m) |
| 4 | 123.3 | 7.97 (1H, dd, 1.5, 8.0) | 123.3 | 7.97 (1H, dd, 1.0, 8.0) |
| 4a | 115.8 | | 114.5 | |
| 4b | 155.0 | | 155.0 | |
| 6 | 77.0 | | 77.0 | |
| 6a | 43.8 | 2.22 (1H, d, 7.8) | 43.6 | 2.17 (1H, br dd, 3.3, 6.3) |
| 6-CH ₃ | 29.3 | 1.55 (3H, s) | 28.7 | 1.55 (3H, s) |
| 6-CH ₃ | 28.7 | 1.86 (3H, s) | 27.7 | 1.86 (3H, s) |
| 7 | 29.2 | 3.05 (1H, m) | 29.2 | 3.03 (1H, dt, 3.3, 5.7) |
| 7a | 108.0 | | 108.0 | |
| 8 | 161.9 | | 162.0 | |
| 9a | 138.6 | | 138.6 | |
| 9-NCH ₃ | 28.9 | 3.68 (3H, s) | 28.9 | 3.68 (3H, s) |
| 10 | 113.6 | 7.25 (1H, m) | 113.6 | 7.25 (1H, m) |
| 11 | 130.3 | 7.52 (1H, m) | 130.3 | 7.53 (1H, m) |
| 12 | 121.5 | 7.25 (1H, m) | 121.5 | 7.24 (1H, m) |
| 13 | 123.5 | 8.08 (1H, dd, 1.4, 1.0) | 123.5 | 8.07 (1H, dd, 1.0, 8.0) |
| 13a | 116.5 | | 116.5 | |
| 13b | 158.0 | | 158.1 | |
| 15 | 79.9 | | 79.9 | |

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^1H (CDCl_3) และ ^{13}C NMR (CDCl_3) ของสาร **6** เทียบกับสาร paraensidimerine A (ต่อ)

| ตำแหน่ง C | paraensidimerine A (Jurd et al., 1982) | | สาร 6 | |
|--------------------|--|--|----------------|--|
| | U_c (25.03 MHz) | U_H (m, J in Hz) (200 MHz) | U_c (75 MHz) | U_H (m, J in Hz) (300 MHz) |
| 15- CH_3 | 24.9 | 1.56 (3H, s) | 24.4 | 1.55 (3H, s) |
| 16 | 39.5 | <i>ax.</i> 2.21 (1H, dd, 2.5, 13.4) <i>eq.</i> 1.75 (1H, dt, 2.7, 12.9) | 39.4 | <i>ax.</i> 2.19 (1H, m) <i>eq.</i> 1.73 (1H, m) |
| 16a | 26.5 | 3.07 (1H, dt, 6.2, 12.5) | 26.4 | 3.03 (1H, ddd, 3.0, 5.7, 6.3) |
| 16b | 109.6 | | 109.6 | |
| 17 | 162.8 | | 162.9 | |
| 18- NCH_3 | 29.1 | 3.62 (3H, s) | 29.1 | 3.62 (3H, s) |
| 18a | 138.7 | | 138.7 | |
| 19 | 32.2 | <i>ax.</i> 1.62 (1H, t, 13.5) <i>eq.</i> 3.20 (1H, ddd, 2.4, 5.5, 13.5) | 32.2 | <i>ax.</i> 1.62 (1H, dd, 5.7, 11.2) <i>eq.</i> 3.21 (1H, dd, 5.7, 11.2) |

br คือ broad; *ax* คือ ตำแหน่ง axial; *eq* คือ ตำแหน่ง equatorial

2. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เมื่อนำแอลคาลอยด์ **1-8** มาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 KB และ NCI-H187 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 ผลการทดสอบพบว่าสารแอลคาลอยด์ส่วนมากไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 ยกเว้นสาร **7** และ **8** ที่แสดงฤทธิ์ในระดับปานกลางด้วยค่า IC_{50} 22.23 และ 27.60 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ในขณะที่สาร **1** และ **5** ไม่แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิด ส่วนสาร **4** แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษในระดับปานกลางต่อเซลล์ KB (IC_{50} 25.16 ไมโครกรัม/มล.) และไม่แสดงฤทธิ์ต่อ MCF-7 แต่แสดงฤทธิ์ในระดับดีต่อเซลล์ NCI-H187 (IC_{50} 0.536 ไมโครกรัม/มล.) ซึ่งดีกว่ายา ellipticine (IC_{50} 3.14 ไมโครกรัม/มล.) ประมาณ 6 เท่า สาร **2** แสดงฤทธิ์ปานกลางต่อเซลล์

KB และ NCI-H187 ด้วยค่า IC_{50} 26.50 และ 31.90 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ ในขณะที่สาร **3** และ **6** แสดงฤทธิ์ต่อเฉพาะเซลล์ NCI-H187 (IC_{50} 22.27 ไมโครกรัม/มล.) และเซลล์ KB (IC_{50} 43.75 ไมโครกรัม/มล.) ตามลำดับ และที่สำคัญคือ สาร **7** แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดได้ดีที่สุด โดยมีฤทธิ์ต้านเซลล์ KB (IC_{50} 1.26 ไมโครกรัม/มล.) ได้ดีกว่ายามาตรฐาน ellipticine (IC_{50} 1.73 ไมโครกรัม/มล.) และเกือบเทียบเท่า doxorubicin (IC_{50} 1.18 ไมโครกรัม/มล.) และที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือ การที่สาร **7** (IC_{50} 0.025 ไมโครกรัม/มล.) แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์ NCI-H187 ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่ายา ellipticine ถึง 126 เท่า และมีฤทธิ์ดีกว่า doxorubicin (IC_{50} 0.11 ไมโครกรัม/มล.) 4.4 เท่า

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ความเป็นพิษของสาร **1-8** ต่อเซลล์มะเร็ง KB MCF-7 และ NCI-H187

| สารแอลคาลอยด์/ยามาตรฐาน | IC_{50} (ไมโครกรัม/มล.) | | |
|--|----------------------------------|---------------|---------------|
| | KB | MCF-7 | NCI-H187 |
| dihydroavicine (1) | In^a | In^a | In^a |
| dihydronitidine (2) | 26.50 | In^a | 31.90 |
| paraensidimerine C (3) | In^a | In^a | 22.27 |
| <i>N</i> -methylflindersine (4) | 25.16 | In^a | 0.536 |

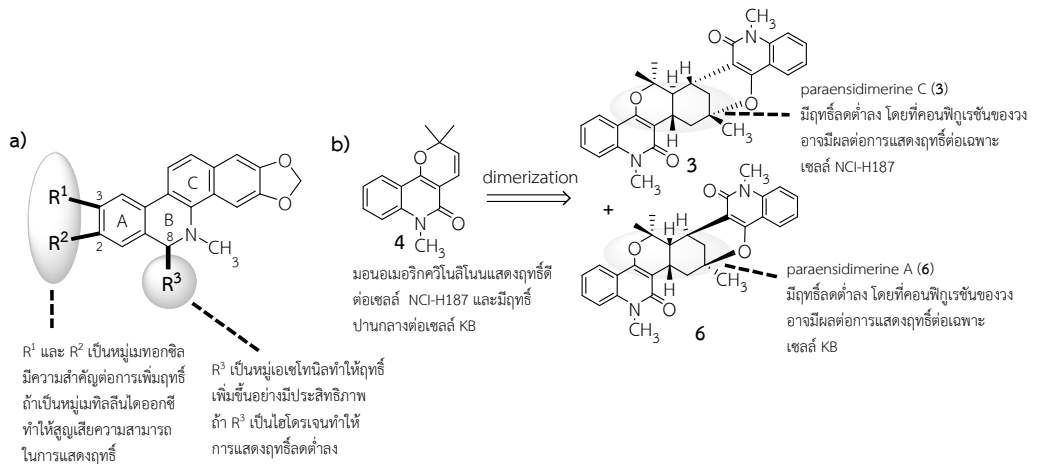
ตารางที่ 3 ฤทธิ์ความเป็นพิษของสาร 1-8 ต่อเซลล์มะเร็ง KB MCF-7 และ NCI-H187 (ต่อ)

| สารแอลคาลอยด์/ยามาตรฐานฐาน | IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มล.) | | |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | KB | MCF-7 | NCI-H187 |
| 8-acetyldihydroavicine (5) | ln ^a | ln ^a | ln ^a |
| paraensidimerine A (6) | 43.75 | ln ^a | ln ^a |
| 8-acetyldihydronitidine (7) | 1.26 | 22.23 | 0.025 |
| skimmianine (8) | ln ^a | 27.60 | ln ^a |
| ellipticine | 1.73 | - | 3.14 |
| doxorubicin | 1.18 | 10.68 | 0.11 |
| tamoxifen | - | 7.32 | - |

^a inactive คือ ไม่แสดงฤทธิ์ที่ค่า IC₅₀ > 50 ไมโครกรัม/มล.

จากผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสาร 1-8 พบความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างโครงสร้างและการแสดงฤทธิ์ของแอลคาลอยด์ 2 กลุ่ม (รูปที่ 3) กลุ่มแรก คือ ควิโนลิโนลินแอลคาลอยด์ 3-4 และ 6 ซึ่งพบว่าสารมอนอเมอร์ 4 แสดงฤทธิ์ต่อทั้งเซลล์ NCI-H187 และ KB แต่มีฤทธิ์ลดต่ำลงเมื่อเปลี่ยนเป็นสารประเภทบิสแอลคาลอยด์ 3 และ 6 โดยที่สาร 3 มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง NCI-H187 ลดต่ำลงถึง 42 เท่า และสาร 6 มีฤทธิ์ต้านเซลล์ KB ลดลงประมาณ 1.7 เท่า แสดงให้เห็นว่าการเกิดไดเมอร์ไรเซชันของ *N*-methylflindersine (3) ทำให้ฤทธิ์ต้านมะเร็งลดต่ำลง อาจเนื่องมาจากการสูญเสียธรรมชาติของวงไพแรนหรือการมีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นมีความไม่เหมาะสมต่อการเข้ายับยั้งเซลล์มะเร็ง แต่ถึงอย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังพบข้อดีของการมีโครงสร้างแบบบิสแอลคาลอยด์ในแง่ของความจำเพาะเจาะจง กล่าวคือ สาร 3 แสดงฤทธิ์ต่อเฉพาะเซลล์ NCI-H187 ในขณะที่ ไดเมอร์ 6 แสดงฤทธิ์ต่อเฉพาะเซลล์ KB ซึ่งความจำเพาะในการแสดงฤทธิ์นี้อาจมีผลมาจากคอนฟิกูเรชันที่แตกต่างกันของ 3 และ 6

ส่วนแอลคาลอยด์อีกกลุ่มคือ เบนโซฟีแนนทรีดีนซึ่งได้แก่ สาร 1-2 สาร 5 และ 7 พบความสัมพันธ์ที่น่าสนใจเช่นเดียวกัน กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบการมีฤทธิ์ของสาร 2 และการไม่แสดงฤทธิ์ของ 1 แสดงให้เห็นว่าหมู่เมทอกซิลที่ C-2 และ C-3 มีความสำคัญต่อการแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็ง และการมีหมู่เอเซโทนิลที่ C-8 ของสาร 7 จะช่วยเพิ่มฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการที่สาร 5 ไม่แสดงฤทธิ์เป็นการยืนยันว่าตำแหน่ง C-2 และ C-3 ไม่ควรเป็นหมู่เมทิลลีนไดออกซี จึงจะทำให้สารกลุ่มเบนโซฟีแนนทรีดีนแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้ได้รายงานถึงการค้นพบสารแอลคาลอยด์บางชนิดที่ไม่เคยมีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบในมะขามนั้นคือ สาร 3-6 และยังถือได้ว่าเป็นงานวิจัยที่ค้นพบความสัมพันธ์เบื้องต้นที่น่าสนใจระหว่างโครงสร้างและการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มควิโนลิโนน และเอเซโทนิลไดไฮโดรเบนโซฟีแนนทรีดีนแอลคาลอยด์ซึ่งส่วนใหญ่มีรายงานถึงเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพและฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (Chen et al., 2007; Luo et al., 2013)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างโครงสร้างและการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง;

a) เบนโซฟีแนนนทรินดินแอลคาลอยด์ b) มอนอและบิสควิโนลิโนแอลคาลอยด์

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่พบว่า แอลคาลอยด์ 3-6 นอกจากจะเป็นองค์ประกอบในพืชสกุล Rutaceae ชนิดอื่นๆ แล้ว แต่ยังสามารถพบในมะขวงได้เช่นเดียวกัน ซึ่งทำให้เห็นถึงความสำคัญอย่างยิ่งของสภาพพื้นถิ่นในการเพาะปลูกที่แตกต่างกันของมะขวง ซึ่งส่งผลถึงความหลากหลายทั้งในแง่โครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่เป็นองค์ประกอบ และที่สำคัญอย่างยิ่งงานวิจัยนี้พบว่า สาร N-methylflindersine (4) และ 8-acetyldihydro nitidine (7) อาจเป็นสารแอลคาลอยด์ต้นแบบที่สำคัญในการพัฒนาต่อยอดโดยการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีให้ได้โมเลกุลที่มีสมบัติเป็นยาต้านมะเร็งที่เหมาะสมในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. อภิชาติ สุขสำราญ สำหรับความอนุเคราะห์บันทึกข้อมูลแมสสเปกโตรม และ ศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ สำหรับการบันทึกข้อมูล NMR ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรสำหรับการบันทึกข้อมูล optical rotation และหน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี สำหรับวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีบางชนิด

เอกสารอ้างอิง

Ahsan, M., Haque, M.R., Hossain, Md.B., Islam, S.N., Gray, A.I. and Hasan, C.M. (2014). Cytotoxic dimeric quinolone-terpene alkaloids from the root bark of *Zanthoxylum rhetsa*. *Phytochemistry* 103: 8-12.

Atkins, J.H. and Gershell, L.J. (2002). Selective anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 491-492.

Banerjee, H., Pal, S. and Adityachaudhury, N. (1989). Occurrence of rutaecarpine in *Zanthoxylum budrunga*. *Planta Medica* 55(4): 403.

- Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E. and Ferlay, J. (2013). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008, International Journal of Cancer 135(5): 1133-1145.
- Chatterjee, A., Bose, S. and Ghosh, C. (1959). Rhetsine and rhetsinine: the quinazoline alkaloids of *Xanthoxylum rhetsa*. Tetrahedron 7: 257-261.
- Chen, J.J., Chen, P.H., Liao, C.H., Huang, S.Y. and Chen, I.S. (2007). New phenylpropenoids, bis(1-phenylethyl)phenols, bisquinolinone alkaloid, and anti-inflammatory constituents from *Zanthoxylum integrifolium*. Journal of Natural Products 70: 1444-1448.
- Cho, W.C.S. (2011). Evidence-based anticancer materia medica. New York: Springer, ISBN: 9789400705265. pp. 409-432.
- Chowdhury, Y.M., Wahab, M.A. and Begum, J. (1994). Medicinal plants of Bangladesh. Dhaka: BCSIR. p.264.
- Garcia, S.N.J., Cruz, M.A.V., Gonzalez, R.G.G., Pacheco, I.T., Hernandez, A.C. and Perez, A.A.F. (2013). Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes—a review. Polish Journal of Food and Nutrition Science 63(2): 67-68.
- Ghani, A. (1998). Medicinal plants of Bangladesh—chemical constituents and uses. Asiatic Society of Bangladesh, ISBN: 9845123481. p. 325.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R. (2000). Plants used against cancer. Journal of Ethnopharmacology 73(3): 347-377.
- Joshi, B., Puar, M., Moore, M. and Pletier, W. (1991). Isolation of dihydroavicine and rhetsinine from *Zanthoxylum budrunga*. Heterocycles 32: 1365-1370.
- Jurd, L., Wong, R.Y. and Benson, M. (1982). The structures of paraesidimerine A and C, two bisquinolinone alkaloids from *Euxylophora paraensis*. Australian Journal of Chemistry 35: 2505-2517.
- Luo, X., Pires, D., Ainsa, J.A., Gracia, B., Duarte, N., Mulhovo, S., Anes, E. and Ferreira M.J.U. (2013). *Zanthoxylum capense* constituents with anti-mycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis in vitro* and *ex vivo* within human macrophages. Journal of Ethnopharmacology 146: 417-422.
- Mohan, K., Jeyachandran, R. and Deepa. (2012). Alkaloids as anticancer agents. Annals of Phytomedicine 1(1): 46-53.
- Moura, N.F.D., Ribeiro, H.B., Machado, E.C.S., Ethur, E.M., Zanatta, N. and Morel, A.F. (1997). Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. Phytochemistry 46(8): 1443-1446.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products 70(3): 461-477.
- Nissanka, A.P.K., Karunaratne, V., Bandara, B.M.R., Kumar, V., Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Tillekerane, L.M.V., Wijesundara, D.S.A. and Gunatilaka, L.A.A. (2001). Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. Phytochemistry 56: 857-861.
- O' Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of

- mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Chemistry* 267(17): 5421-5426.
- Rahman, M.M., Gray, A.I., Khondkar, P. and Islam M.A. (2008). Antimicrobial activities of alkaloids and lignans from *Zanthoxylum budrunga*. *Natural Product Communication* 3(1): 45-47.
- Ratheesh, M., Sindhu, G. and Helen, A. (2013). Anti-inflammatory effect of quinolone alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. *Inflammation Research* 62: 367-376.
- Reddy, L. and Jose, B. (2011). Statistical analysis of the antibacterial activity of *Zanthoxylum rhetsa* seed essential oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3(1): 440-444.
- Ronghui, S., Mujo, K., Shuhei, N., Shozo, T. and Meng-y, L. (1994). Amides from the fruits of *Phellodendron chinense*. *Acta Botanica Sinica* 36(10): 817-820.
- Ruangrungsi, N., Tantivatana, P., Rorris, R.P. and Cordell, G.A. (1981). Traditional medicinal plants of Thailand. III. constituents of *Zanthoxylum budrunga* (Rutaceae). *Journal of The Science Society of Thailand* 7: 123-127.
- Saeidnia, S. and Abdollahi, M. (2014). Perspective studies on novel anticancer drug from natural origin: A comprehensive review. *International Journal of Pharmacology* 10(2): 90-108.
- Somanabandhu, A.O., Ruangrungsi, N., Lang, G.L. and Organ, M.G. (1992). Constituents of the stem bark of *Zanthoxylum limonella*. *Journal of the Science Society of Thailand* 18: 181-185.
- Suksathan, R., Trisonthi, C., Trisonthi, P. and Wangpakapattanawong, P. (2009). Note on spice plants in the genus *Zanthoxylum* (Rutaceae) in Northern Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany).The Flora Thailand Meeting* 197-204.
- Tantapakul, C., Phakhodee, W., Ritthiwigrom, T., Yossathera, K., Deachathai, S. and Laphookhieo, Surat. (2012). Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa*. *Archives of Pharmacal Research* 35(7): 1139-1142.
- Ullah, M.F. (2008). Cancer multidrug resistance (MDR): A major impediment to effect chemotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 9: 1-6.
- Yang, Z., Zhang, D., Ren, J. and Yang, M. (2012). Skimmianine, a furoquinoline alkaloid from *Zanthoxylum nitidum* as a potential acetylcholinesterase inhibitor. *Medicinal Chemistry Research* 21: 722-725.

