รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

เรื่อง

องค์ประกอบทางเคมีและแอกทิวิตีทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ผึ้งจากผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และชันโรง (*Tetragonula laeviceps*)

Chemical components and bioactivities of bee products from *Apis cerana* and *Tetragonula laeviceps*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากมาจากการช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากนายณัฐ ทัศนียานนท์ และนายณัฐวัฒน์ วรรัตนวงศ์ นิสิตภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ทรงจันทร์ ภู่ทอง จากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2556

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้สนใจฤทธิ์ในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งกับฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (AHB) ของน้ำผึ้ง และ AHB ของพรอพอลิสจากซันโรงชนิด *Tetragonula laeviceps* ในส่วนของน้ำผึ้ง นำน้ำผึ้ง 90 กรัม มาสกัดด้วย 96% เอทานอล (EtOH) และน้ำ เพื่อให้ได้สารสกัดอย่างหยาบ CHE และ CHW ตามลำดับ (นำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง 5 ชนิด (BT474, Chago, Hep-G2, KATO-III และ SW620) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ได้แก่ CH-liver ด้วยวิธี MTT assay วิเคราะห์ผลจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (PS) และค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0 พบว่าฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและ PS ของสารสกัดอย่างหยาบทั้ง 2 ชนิดอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ผลจากการทำ Partition พบว่าสารสกัดอย่างหยาบด้วย Hexane (CHH) มีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งดีที่สุด แต่หลังจากทำการสกัดบริสุทธิ์ด้วย Quick column chromatography พบว่าทั้ง 6 แฟรกชันที่ได้ไม่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดเลย ในส่วนของการทดสอบความสามารถทาง AHB ใช้วิธี Hemagglutination inhibition assay ผลพบว่าทั้ง CHE และ CHW ไม่มีผลต่อ AHB หลังทำ Partition พบว่าสารสกัดอย่างหยาบทั้งหมด (CHM, CHD, และ CHH) ไม่มีฤทธิ์ต่อ ABH จึงเปลี่ยนมาดูฤทธิ์ ABH ของพรอพอลิสแทน ยังคงพบว่าทั้ง CPE และ CPW ไม่มีผลต่อ ABH จึงสรุปได้สองข้อคือ 1) สารที่ออกฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งจะมีผลในรูปแบบของ Synergistic effect ดังนั้นเมื่อแยกสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นแล้วจะทำให้ฤทธิ์ดังกล่าวลดลง 2) สารสกัดจากผลิตภัณฑ์ของ *T. laeviceps* ไม่มีฤทธิ์ต่อ ABH

คำสำคัญ: *Tetragonula laeviceps*, น้ำผึ้ง, เซลล์มะเร็ง, Hemagglutination inhibition assay, Propolis, ไวรัสไข้หวัดใหญ่ สายพันธุ์ H1N1

Abstract

In this research, it was focused on the anti-proliferation of cancer cells and the anti-agglutination of human blood cell infected by H1N1 virus (AHB) of honey and AHB of propolis from *Tetragonula laeviceps*. Honey (90 g) was extracted by 96% EtOH and H_2O resulting in CHE and CHW, respectively, Later, it was tested against the proliferation of 5 cancer cell lines (BT474, Chago, Hep-G2, KATO-III, and SW620) and CH-liver as normal cell by MTT assay. The data was estimated from the average of percentage of cell viability (PS) and statistically analysed by SPSS statistics 17.0. The result showed that PS of CHE and CHW were closed. After partition, CHH gave the best activity. However, after being purified by quick column chromatography, 6 fractions contained no activity. Furthermore, for AHB, hemagglutination inhibition assay was used. It presented that both CHE and CHW had no AHB activity. In addition, after partition, all CHM, CHD, and CHH still had no ABH activity. Instead, propolis was focused. Both CPE and CPW still had no ABH activity. Thus, it could be concluded that 1) anti-proliferation compounds had synergistic effect to each other so more purification decreased the activity. 2) Crude extracts of bee products from *T. laeviceps* had no ABH activity at all.

Key words: *Tetragonula laeviceps*, honey, cancer cells, hemagglutination inhibition assay, propolis, H1N1 virus

สารบัญเรื่อง

	เลขที่หน้า
หน้าปก	1
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	8
บทนำ	9
วิธีดำเนินการวิจัย	13
ผลการวิจัย	20
อภิปราย / วิจารณ์ผลการทดลอง	31
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการทำวิจัยในขั้นต่อไป	35
บรรณานุกรม	37
ประวัตินักวิจัย	39

สารบัญตาราง

	เลขที่หน้า
ตารางที่ 1	22
ตารางที่ 2	25
ตารางที่ 3	28

สารบัญภาพ

	เลขที่หน้า
ภาพที่ 1	17
ภาพที่ 2	18
ภาพที่ 3	19
ภาพที่ 4	20
ภาพที่ 5	23
ภาพที่ 6	25
ภาพที่ 7	28
ภาพที่ 8	29
ภาพที่ 9	30
ภาพที่ 10	33
ภาพที่ 11	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

AHB: Agglutination of human blood

CHE: Crude honey by ethanol

CHW: Crude honey by H_2O

CHH: Crude honey by hexane

CHM: Crude honey by methanol

CHD: Crude honey by dichloromethane

CPE: Crude propolis by ethanol

CPW: Crude propolis by H_2O

EtOH: Ethanol

MtOH: Methanol

บทนำ

ในปัจจุบันคนไทยมีสถิติการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งสูงเป็นอันดับหนึ่ง จากข้อมูลในช่วงปี 2548 - 2552 ของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข พบว่าสถิติการเสียชีวิตของคนไทยจากโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ประมาณ 53,000 รายต่อปี คิดเป็น 13.57% จากสาเหตุการเสียชีวิตทั้งหมด โดยมาจากสาเหตุอื่น เช่น ความดันเลือดสูงและโรคหลอดเลือดในสมอง คิดเป็น 4.05% (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์, 2553) สาเหตุของโรคมะเร็งนั้นมีมากมาย นอกจากเกิดจากสาเหตุทางพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถเกิดจากสภาพแวดล้อม เช่น รังสี U.V. สารก่อมะเร็ง ฯลฯ การรักษาให้หายขาดกำลังมีการศึกษากันมากมายทั้งในประเทศไทย และจากต่างประเทศ ดังนั้นหากมีวิธีการที่จะยับยั้งการเกิดของมะเร็งได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

มะเร็งเกิดจากการที่เซลล์ของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมกล่าวคือ เกิดการแบ่งตัวผิดปกติและเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยกลไกของร่างกายไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้เกิดเป็นก้อนเนื้อร้าย เมื่อก้อนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้อวัยวะที่เกิดมะเร็งไม่สามารถทำงานเป็นปกติได้ บางครั้งก้อนอาจมีขนาดใหญ่จนกระทั่งไปเบียดหรือกด หรือมีการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆ ได้ ซึ่งหากเกิดขึ้นกับอวัยวะที่สำคัญแล้ว จะทำให้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งเสียชีวิตจากโรคมะเร็ง ในปัจจุบันวิธีการรักษามะเร็งมี 3 วิธีที่สำคัญคือ การผ่าตัด การฉายรังสี และการให้เคมีบำบัด (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550)

นอกจากมะเร็งแล้ว ไวรัสไข้หวัดใหญ่ก็เป็นอีกโรคที่เป็นปัญหาใหญ่ในสังคมไทยในปัจจุบัน เป็นต้นเหตุในการก่อโรคและการเสียชีวิตเป็นจำนวนมากในมนุษย์ โดยมีการรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 (Swine origin) และสายพันธุ์ H5N1 (Avian origin) (Michaelis et al., 2009; Neumann et al., 2009) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในสัตว์และเกิดการกลายพันธุ์มาก่อโรครุนแรงในคนได้ ยกตัวอย่างเช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ในปี 2009 เป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่าง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Classical swine จากหมู, North American avian จากนก, Human (H3N2) ในคน และ Eurasine avian like swine ซึ่งเกิดการระบาดครั้งแรกที่ประเทศ Mexico มีการแพร่กระจายไปทั่วโลกในระยะเวลาอันสั้น

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มีการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มักเกิดกระบวนการที่สำคัญ 2 ประการคือ การสลายตัวของโปรตีน RNA polymerase II และลดอัตราการเกิดกระบวนการ Transcription ของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าว เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Rodriguez et al., 2007) หลังจากที่เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนแล้วเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จะอาศัย Neuraminidase activity ของโปรตีน Neuraminidase ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผิวของไวรัส โดยทำหน้าที่ทำลายพันธะระหว่างโปรตีนที่ผิวของไวรัสกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์ที่ติดเชื้อส่งผลให้ไวรัสสามารถแพร่ออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อไปยังเซลล์อื่นๆ ได้

ในปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสไข้หวัดใหญ่ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นทั้งก่อนและหลังการติดเชื้อ (Hayden, 2009) ยกตัวอย่างเช่น การรณรงค์เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคไข้หวัดใหญ่ การพัฒนาวัคซีนจากไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคเพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านไวรัสไข้หวัดใหญ่ก่อนการติดเชื้อ (Jefferson et al., 2009) และมีการใช้ยาในการรักษาการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ อาทิเช่น ยา Oseltamivir และ Zanamivir ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Neuraminidase ซึ่งเป็นการยับยั้งไม่ให้ไปตัดพันธะระหว่างไวรัสกับเซลล์ที่ติดเชื้อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสในสิ่งมีชีวิต และยา Adamantane ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน M2 ซึ่งเป็นทางผ่านของสารที่มีประจุบนผิวของไวรัส ส่งผลให้เชื้อไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ดีในปัจจุบันได้มีการพบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เกิดการกลายพันธุ์สามารถที่จะหลบหลีกยาทั้งสองชนิด เมื่อทำการรักษาด้วยยาดังกล่าว (Lackenby et al., 2009; Cheng et al., 2009)

มีการศึกษาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเพื่อหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สารสกัดหยาบจากต้นบานบุรีเหลือง (วัลยาและไพศาล, 2548) สารสกัดจาก Brazilian propolis (Awale et al., 2008) และสารสกัดจากน้ำผึ้ง (Jaganathan and Mandal, 2009) งานวิจัยก่อนหน้านี้ส่วนใหญ่ทำการศึกษาสารเคมีชนิดใหม่ที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นสารสกัดจากพืช (Chinou et al., 2009) และมีรายงานก่อนหน้านี้เพียงบางส่วนที่พบว่าสารสกัดจากผลิตภัณฑ์จากผึ้งที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไวรัส (Kujumgiev et al., 1999) ดังนั้นจึงเกิดงานวิจัยชิ้นนี้ขึ้นเพื่อศึกษาสารสกัดบางส่วนจากน้ำผึ้ง *Tetragonula laeviceps* ที่มี

ผลต่อการยับยั้งการเจริญของไวรัสไข้หวัดใหญ่และยับยั้งการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

น้ำผึ้งคือของเหลวข้นที่มีรสหวาน เป็นผลิตภัณฑ์หลักอย่างหนึ่งที่ผึ้งได้เก็บรวบรวมน้ำต้อย (Nectar) จากดอกไม้ ซึ่งมีต่อมผลิตน้ำต้อย (Nectary gland) หรือน้ำหวานจากส่วนอื่นๆ ของพืช (Extra floral nectary gland) มาเก็บสะสมไว้ในกระเพาะน้ำผึ้ง (Honey crop) ภายในกระเพาะน้ำผึ้งมีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยน้ำตาลโมเลกุลสายสั้นๆ และน้ำตาลโมเลกุลคู่ จนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยทั่วไปองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งคือ น้ำ 17.2%, ฟรุกโทส 38.19%, กลูโคส 31.29%, ซูโครส 1.31% และสารอื่นๆ รวมทั้งสารที่ไม่ทราบชนิดอีก 12.01% (สมนึกและธนานิธ, 2544)

คุณสมบัติของน้ำผึ้งนอกจากใช้เป็นส่วนประกอบในการสร้างรังและเป็นอาหารของตัวอ่อนแล้ว ยังสามารถมีคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย รวมถึงจุลินทรีย์ต่างๆ (Dias et al., 2008) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าอาจจะส่งผลถึงการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งด้วยก็เป็นได้ (Chinou et al., 2009)

ทั้งนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของน้ำผึ้ง นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาหารที่ผึ้งเก็บมานั้น ยังขึ้นอยู่กับชนิดของผึ้งด้วย (Chanchao et al., 2006) โดยงานวิจัยนี้สนใจน้ำผึ้งจากชันโรงซึ่งเป็นแมลงผสมเกสรตัวเล็กๆ จัดอยู่ในจำพวกผึ้ง ซึ่งมีวิวัฒนาการสูงกว่าผึ้งป่าและผึ้งหึ่ง เชื่อกันว่าน้ำผึ้งชันโรงมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่าน้ำผึ้งจากผึ้งชนิดอื่นๆ (สมนึกและธนานิธ, 2544) มีงานวิจัยพบว่าน้ำผึ้งชันโรงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและจุลินทรีย์ (Bruni et al., 2009)

ชันโรงที่ใช้ในการศึกษาคือชันโรงชนิด *Tetragonula laeviceps* ซึ่งเป็นชันโรงที่เลี้ยงได้ โดยนำน้ำผึ้งชันโรงมาทำการสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ทำการแยกด้วยการ partition และการทำโครมาโตกราฟี ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะเลือกสารที่มีฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุด [เซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2 cell line) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III cell line) เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474 cell line) เซลล์มะเร็งปอด (Chago cell line) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620 cell line) รวมทั้งศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติโดยเซลล์ที่ใช้คือ เซลล์ตับปกติ (CH-liver)] หรือให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เมื่อเลี้ยงในหลอดทดลอง และให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคน (Hemagglutination inhibition assay) ได้ดีที่สุดมาใช้ในการสกัดบริสุทธิ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

เก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำผึ้งและพรอพอลิสซันโรงจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งซันโรงของเกษตรกร ตำบลวังแซ่ม อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 โดยได้รับการสนับสนุนจาก อาจารย์ ดร. อรวรรณ ดวงภักดี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตราชบุรี

สกัดอย่างหยาบโดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย

ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้งหรือพรอพอลิส 90 g นำมาผสมกับ 96% EtOH 400 ml จากนั้นเขย่าด้วยเครื่อง Incubator shaker ที่อุณหภูมิ 15 °C, 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C, 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วน นำส่วนที่เป็นตะกอนที่เหลือทั้งหมดมาสกัดซ้ำด้วย 96% EtOH ปริมาตร 100 ml นำไปปั่นตกตะกอนและแยกเก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำมารวมกับส่วนใสที่แยกเก็บไว้ในการสกัดครั้งแรก หลังจากนั้นแบ่งส่วนของของเหลวใสเป็นสองส่วน ส่วนละ 200 ml ส่วนหนึ่งนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 °C จนกว่าสารสกัดจะมีลักษณะหนืดข้น จะได้เป็นสารสกัดอย่างหยาบด้วย EtOH (CHE หรือ CPE) ส่วนของเหลวใสอีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำ โดยนำไปผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 20 μM, pH 7.0 ปริมาณ 200 ml จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C จนกว่าสารสกัดจะมีลักษณะหนืดข้นเช่นเดียวกัน จะได้เป็นสารสกัดอย่างหยาบด้วยน้ำ (CHW หรือ CPW) นำไปทำ MTT assay และ Hemagglutination inhibition assay โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Partition

นำสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งหรือพรอพอลิสของซันโรงที่สกัดได้จาก 96% EtOH และน้ำ มาทำให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยการทำ Partition ด้วยกรวยแยกและใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันได้แก่ 40% MtOH (ตัวทำละลายที่มีขั้วมาก) ไดคลอโรมีเทน (ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง) และ Hexane (ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุด) การสกัดเริ่มจากผสมตัวทำละลาย 80% MtOH

200 ml ผสมกับสารสกัดอย่างหยาบในกรวยแยกให้เข้ากันจนสารละลายไม่เหนียว จากนั้นเติม Hexane ในปริมาตรเท่ากันเข้าไปผสมกับสารละลาย วางทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารละลายเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น โดยกลุ่มสารที่ไม่มีขั้วจะแยกอยู่ในชั้นของ Hexane ซึ่งจะลอยอยู่ทางชั้นบน ในขณะที่กลุ่มสารมีขั้วมากกว่าจะละลายในชั้น 80% MtOH ซึ่งจะแยกชั้นอยู่ชั้นล่าง จากนั้นแยกสารในชั้น Hexane ทั้งหมดออกจากกรวยแยกและนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้สารสกัดในชั้น Hexane (CHH หรือ CPH ซึ่งมีสภาพขั้วน้อย) ส่วนสารละลายในชั้น 80% MtOH นั้นนำมาเติมน้ำลงไปปริมาตรเท่าที่มีเพื่อเจือจางให้เป็น 40% MtOH เพื่อเพิ่มความมีขั้วของสารละลายให้มากขึ้น จากนั้นเติมไดคลอโรมีเทนลงไปเท่ากับปริมาตรของ 40% MtOH ที่มีอยู่ วางทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้สารละลายเกิดการแยกชั้นเป็น 2 ชั้น สารที่มีขั้วมากกว่าจะละลายอยู่ในชั้น 40% MtOH ซึ่งจะแยกชั้นอยู่ชั้นบน และสารที่มีขั้วปานกลางจะละลายอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทน ซึ่งจะอยู่แยกชั้นอยู่ชั้นล่าง แยกสารทั้งสองชั้นนี้ออกจากกันและนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ก็จะได้สารสกัดในชั้น 40% MtOH และไดคลอโรมีเทนซึ่งเป็นสารที่มีขั้วมากและปานกลาง (CHM, CPM, CHD และ CPD ตามลำดับ) ดังนั้นจะได้สารสกัดที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด นำสารสกัดหยาบทั้งหมดที่ได้ไปทดสอบ นำไปทำ MTT assay และ Hemagglutination inhibition assay โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Quick column chromatography

นำ Fraction ที่ให้ผลในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งดีที่สุดมาทำการแยกสารออกฤทธิ์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ Quick column chromatography และเลือกชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์โดยพิจารณาจากผลการทำ Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อแยกสารออกเป็นกลุ่มย่อย ผลที่ได้จากการทำ TLC และนำไปเป็นชนิดของตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันคือ 100% hexane, 75% hexane-CH_2Cl_2, 50% hexane-CH_2Cl_2 และ 25% hexane-CH_2Cl_2 วิธีการทำ Quick column chromatography เริ่มจากการบรรจุ silica gel ลงในคอลัมน์ให้แน่น นำสารใน Fraction ของ Hexane ผสมกับ Silica gel แล้วบรรจุลงในด้านบนของคอลัมน์ จากนั้นจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วจนถึงตัวทำละลายที่มีขั้วมากที่สุด ใช้ Vacuum ช่วยในการดูดอากาศให้ตัวทำละลายถูกชะผ่านคอลัมน์ เก็บ Fraction ที่

ชะได้ทั้งหมดไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Evaporator แล้วนำไปทำ MTT assay และ Hemagglutination inhibition assay โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

Cell culture และการเตรียมสารสกัด

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2 cell line), เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III cell line), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474 cell line), เซลล์มะเร็งปอด (Chago cell line) และเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620 cell line) และเซลล์ปกติที่ใช้คือ เซลล์ตับปกติ (CH-liver) เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงด้วย RPMI medium ที่มี 5% fetal calf serum ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2

วิธีการทดสอบคือ ชั่งสารสกัดอย่างหยาบแต่ละชนิดมา 0.210 และ 0.224 g ตามลำดับ และละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) ในปริมาตรที่ทำให้ได้ของผสมที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 1 g/µl จากนั้นจึงทำ serial dilution อัตราส่วน 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1: 16, 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256 และ 1: 512 นำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่เลี้ยงในอาหาร 200 µl โดยใช้ปริมาตร 2 µl จากนั้นจึงทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติด้วยวิธี MTT assay

MTT assay

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยให้มีเซลล์จำนวน 5,000 เซลล์ (200 µl) ในแต่ละหลุมของ flat 96 well plate และเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารสกัดข้างต้นในความเข้มข้นที่ต้องการใส่ลงไปในหลุมๆ ละ 2 µl ส่วนกลุ่มควบคุมใช้ DMSO 2 µl และเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 อีก 48 ชั่วโมง เติมสารละลาย MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml) ในปริมาตร 10 µl ลงในแต่ละหลุม บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดในแต่ละหลุมออก เพื่อให้เหลือแต่ผลึกของ formazan และละลายผลึกนี้ด้วย DMSO (150 µl) และ glycine (25 µl) แล้วทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้ ELISA plate reader (Benchmark microplate reader, Biorad, CA, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 nm นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ทั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์

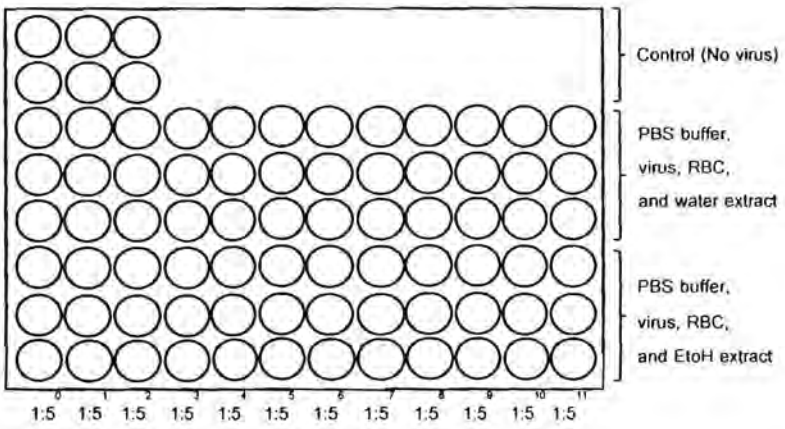
นำค่า Absorbance ที่ 540 nm ที่วัดได้มาคิดเป็นค่า % cell viability เทียบกับกลุ่มควบคุมโดยให้กลุ่มควบคุมคิดเป็น 100% cell viability คำนวณจากสูตร

$$\%\ cell\ viability = \frac{absorbance\ (treat)}{absorbance\ (control)} \times 100$$

นำค่า % cell viability ที่ได้มาสร้างกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้นของสาร และแกน Y เป็น % cell viability

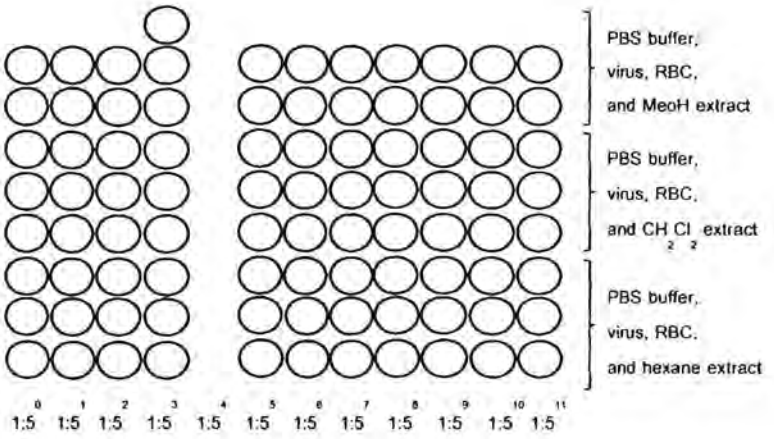
<u>ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1</u>

ทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition assay ซึ่งเป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการวัดประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันไวรัสไข้หวัดใหญ่ โดยการทดลองจะอาศัยเม็ดเลือดแดงของคนจากผู้บริจาคเลือดจากสภากาชาดไทย นำมาเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 0.75% โดยดูดเลือดจากถุงเก็บเลือดมา 75 µl ใส่ Phosphate Buffer Saline (PBS) 10 ml แล้วนำไปปั่นแยกส่วนที่เป็นของเหลวใสและส่วนที่เป็นเม็ดเลือดแดงออกจากกันโดยใช้เครื่อง Centrifuge ที่ 1500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งส่วนที่เป็นของเหลวใสออกไปเพื่อทำลายโปรตีนอื่นๆ ที่มากับเลือด จากนั้นใส่ 1X PBS ปริมาตร 10 ml เพื่อเจือจางความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังอาศัยเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 จากห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นำมาเตรียมให้มีปริมาณ 8 HAU (Hemagglutination unit) โดยทำการวัดด้วยกระบวนการ Hemagglutination assay ใส่ 1X PBS หลุมละ 50 µl นำเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 มาทำ 2-fold dilution ใน 96 well plate จากนั้นใส่เม็ดเลือดแดง 0.75% หลุมละ 50 µl แล้ว Incubate ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ถ้ามีไวรัส เม็ดเลือดแดงจะไม่ตกตะกอน เนื่องจากโปรตีน Hemagglutinin (HA) ของไวรัสจับกับ Sialic acid ซึ่งเป็น HA receptor อยู่บนผิวของเม็ดเลือดแดงทำให้เกาะกันโครงสร้างร่างแห ถ้าไม่มีไวรัส ไม่มี HA ของไวรัสไม่จับกับ Receptor บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน โดยปริมาณของไวรัสที่น้อยที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเกิด Agglutination หรือปริมาณไวรัสที่มากที่สุดที่ทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอนจะมีหน่วยเป็น HAU หรือ Hemagglutination unit ดังภาพที่ 1



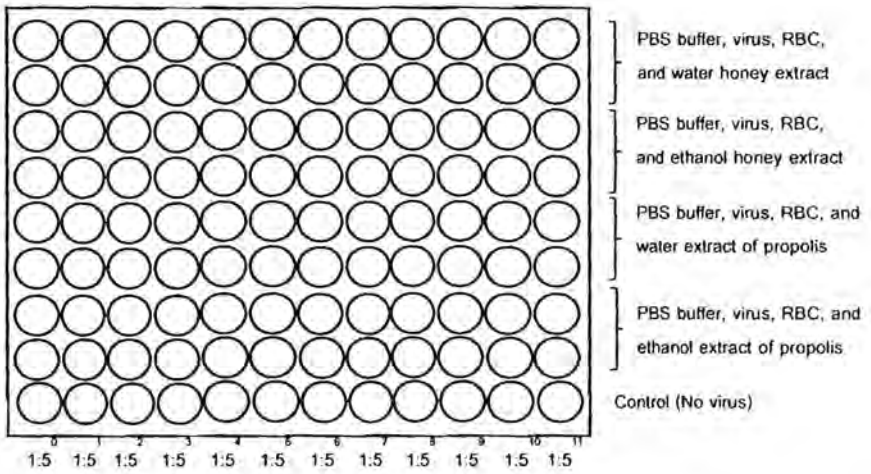
ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบ

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดง ทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition assay ซึ่งทำใน 96 well plate โดยแบ่งหลุมการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นตัวควบคุม ซึ่งจะไม่ใส่เชื้อไวรัส ส่วนที่ทำการทดสอบฤทธิ์ของ CHW และ CHE ในแต่ละส่วนการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อป้องกันความคาดเคลื่อน เริ่มการทดลองโดยใส่ 1X PBS หลุมละ 25 µl นำทั้ง CHW และ CHE มาทำ Serial dilution โดยเจือจางจากหลุมแรกไปยังหลุมสุดท้าย หลุมละ 5 เท่า จากนั้นใส่เชื้อไวรัสสายพันธ์ H1N1 ทุกหลุม หลุมละ 50 µl แล้ว Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารสกัดและเชื้อไวรัสทำปฏิกริยาให้สมบูรณ์ จากนั้นใส่เม็ดเลือดแดงของคนที่มีความเข้มข้น 0.75% ทุกหลุม หลุมละ 50 µl จากนั้น Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 2 การทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงที่มีสภาพขั้วต่างๆ

ภาพที่ 2 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงเพิ่มเติม ทำการทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition assay ซึ่งทำใน 96 well plate โดยแบ่งหลุมการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ทำการทดสอบฤทธิ์ของ CHM ส่วนที่สองทำการทดสอบฤทธิ์ของ CHD และส่วนที่สามทำการทดสอบฤทธิ์ของ CHH แต่ละส่วนการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้งเพื่อป้องกันความคาดเคลื่อน เริ่มการทดลองโดยใส่ 1X PBS หลุมละ 25 µl นำ CHM, CHD และ CHH มาทำ Serial dilution โดยเจือจางจากหลุมแรกไปยังหลุมสุดท้าย หลุมละ 5 เท่า จากนั้นใส่เชื้อไวรัสสายพันธ์ H1N1 ทุกหลุม หลุมละ 50 µl แล้ว Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารสกัดและเชื้อไวรัสทำปฏิกริยาให้สมบูรณ์ จากนั้นใส่เม็ดเลือดแดงของคนที่มีความเข้มข้น 0.75% ทุกหลุม หลุมละ 50 µl จากนั้น Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 3 การทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดอย่างหยาบจากน้ำผึ้งซันโรงและพรอพอลิส

นอกจากนี้ยังทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดง ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition assay เช่นกัน โดยทำใน 96 well plate ทำการแบ่งหลุมการทดลองออกเป็น 5 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นตัวควบคุม ซึ่งจะไม่ใส่เชื้อไวรัส ส่วนที่ทำการทดสอบฤทธิ์ของ CHW, CHE, CPW และ CPE เช่นเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบผลจาการทดสอบสารสกัดทั้งหมด ในแต่ละส่วนการทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อป้องกันความคาดเคลื่อน เริ่มการทดลองโดยใส่ 1X PBS หลุมละ 25 µl นำสารสกัดทั้งหมดมาทำ Serial dilution โดยเจือจางจากหลุมแรกไปยังหลุมสุดท้าย หลุมละ 5 เท่า จากนั้นใส่เชื้อไวรัสสายพันธ์ H1N1 ทุกหลุม หลุมละ 50 µl แล้ว Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารสกัดและเชื้อไวรัสทำปฏิกริยาให้สมบูรณ์ จากนั้นใส่เม็ดเลือดแดงของคนที่มีความเข้มข้น 0.75% ทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้น Incubate ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

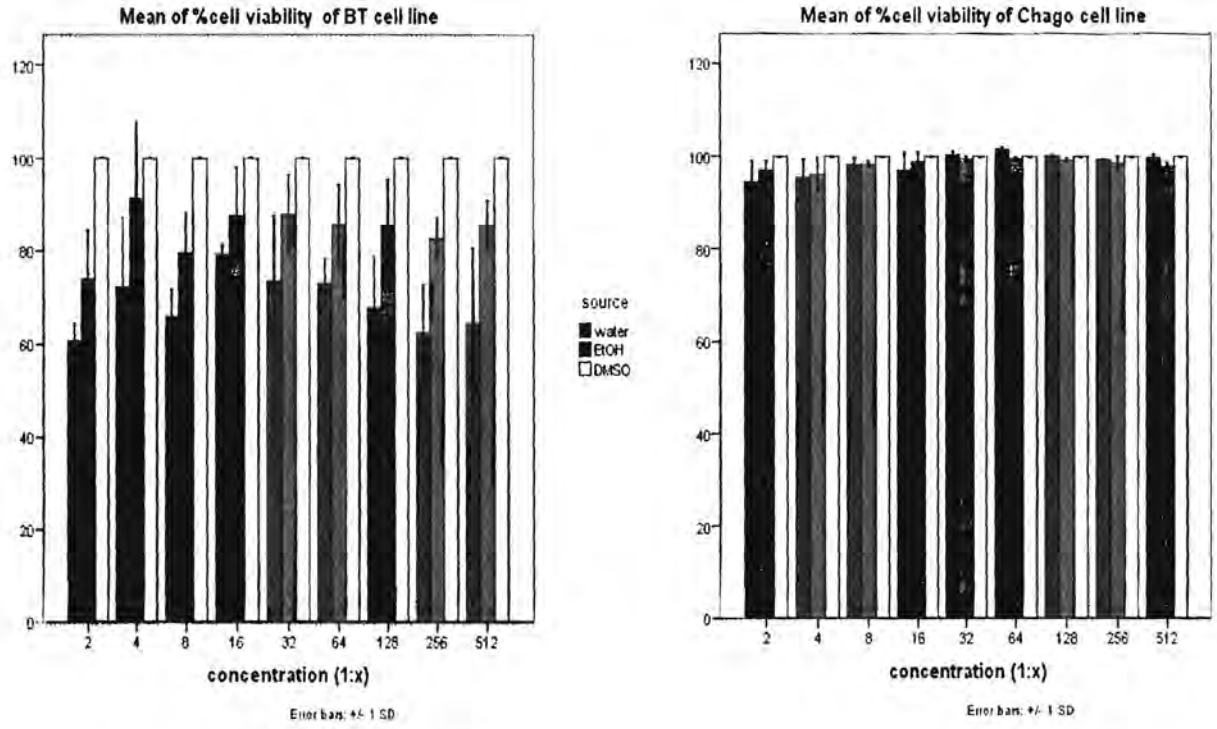
ผลการวิจัย

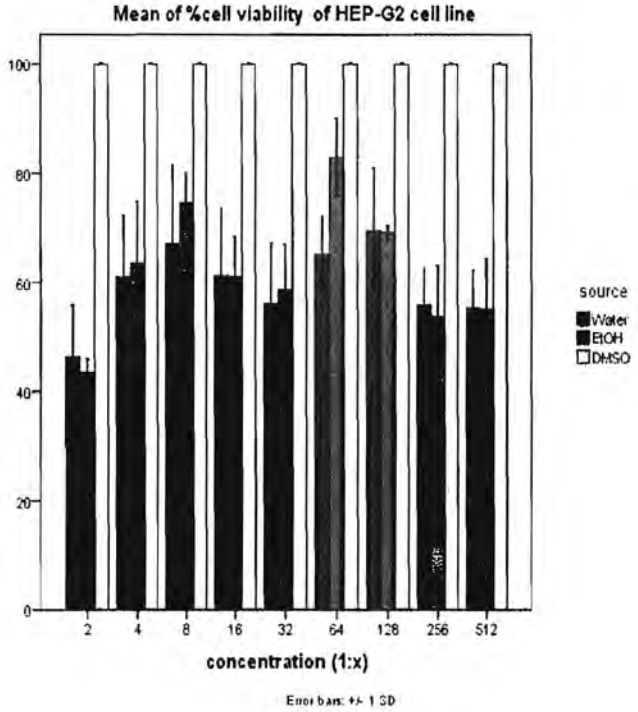
ผลการสกัดน้ำผึ้งด้วย 96% เอทานอล (CHE) และการสกัดด้วยน้ำ (CHW)

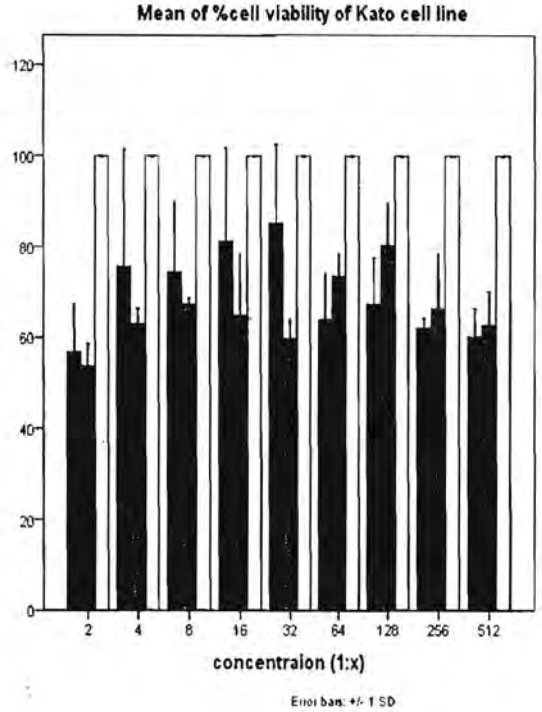
CHE มีน้ำหนัก 13.49 g ปริมาตร 9 ml ดังนั้น CHE มีความเข้มข้น 1.49 g/ml, สารสกัดดังกล่าวมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองใส ส่วน CHW มีน้ำหนัก 11.09 g ปริมาตร 7.5 ml ดังนั้น CHW มีความเข้มข้น 1.48 g/ml สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองใสเช่นเดียวกัน แต่มีความหนืดมากกว่า CHE

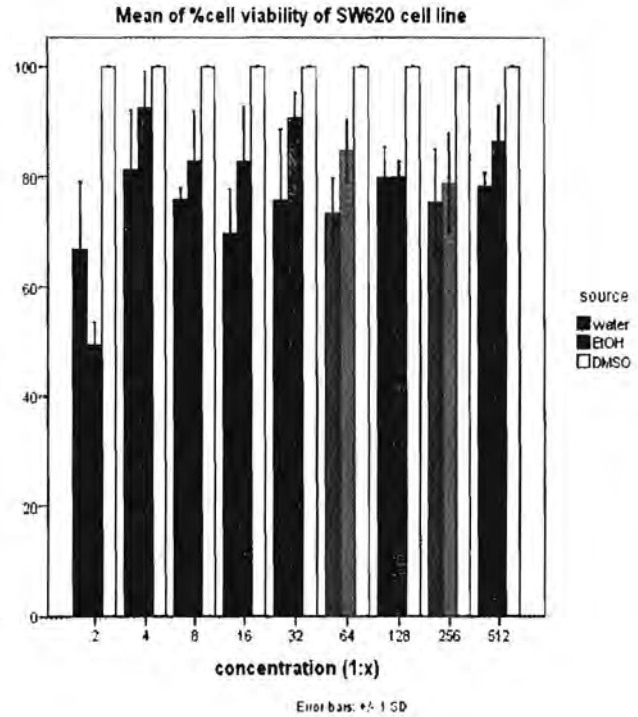
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของสารสกัดน้ำผึ้งอย่างหยาบ (MTT Test#1)

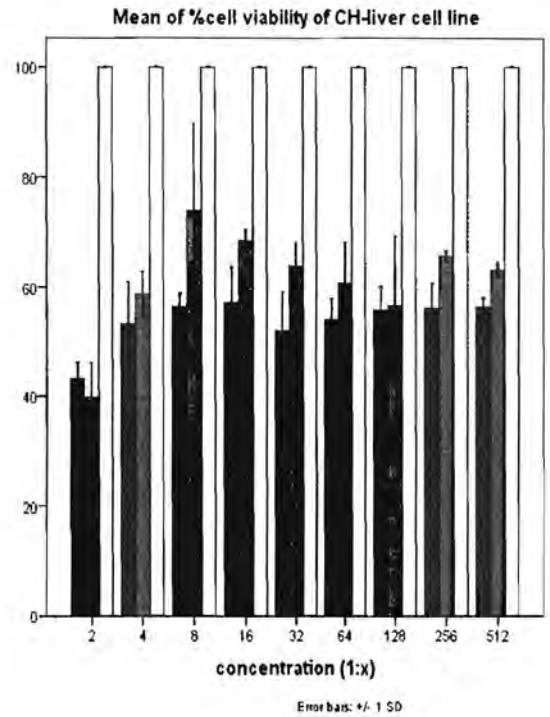
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด และความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติแสดงในรูปของกราฟแท่งของค่าเฉลี่ย % cell viability ดังภาพที่ 4




Mean of %cell viability of HEP-G2 cell line
100
80
60
40
20
0
2
4
8
16
32
64
128
256
512
concentration (1:x)
Error bars: +/- 1 SD
source
Water
EtOH
DMSO


Mean of %cell viability of Kato cell line
120
100
80
60
40
20
0
2
4
8
16
32
64
128
256
512
concentraion (1:x)
Error bars: +/- 1 SD


Mean of %cell viability of SW620 cell line
100
80
60
40
20
0
2
4
8
16
32
64
128
256
512
concentration (1:x)
Error bars: +/- 1 SD
source
water
EtOH
DMSO


Mean of %cell viability of CH-liver cell line
100
80
60
40
20
0
2
4
8
16
32
64
128
256
512
concentration (1:x)
Error bars: +/- 1 SD

ภาพที่ 4. กราฟค่าเฉลี่ย % cell viability ของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ ที่ทดสอบด้วยสารสกัดน้ำผึ้งอย่างหยาบ

ผลการแยกกลุ่มสารที่อยู่ในน้ำผึ้งที่สกัดอย่างหยาบตามความมีขั้วโดยวิธีการทำ Partition ด้วยกรวยแยก

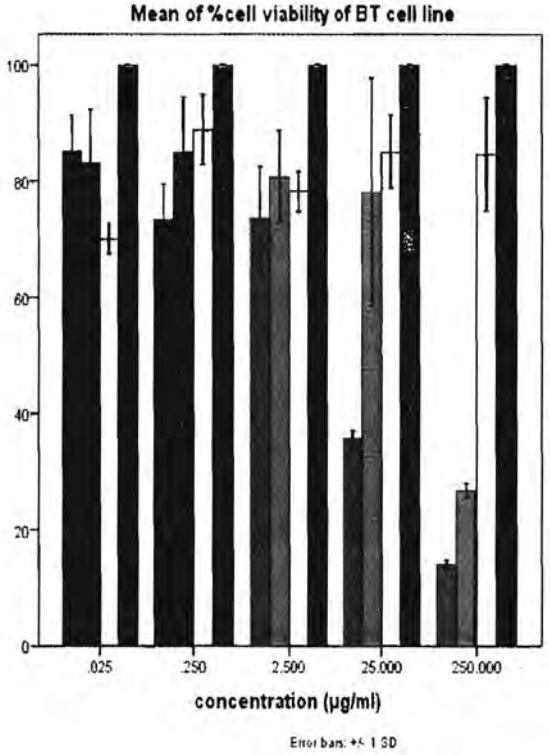
การแยกสารเบื้องต้นตามความมีขั้วของสารโดยการทำ Partition ด้วยกรวยแยกสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1 ลักษณะของสารที่แยกได้จากการทำ partition ด้วยกรวยแยก

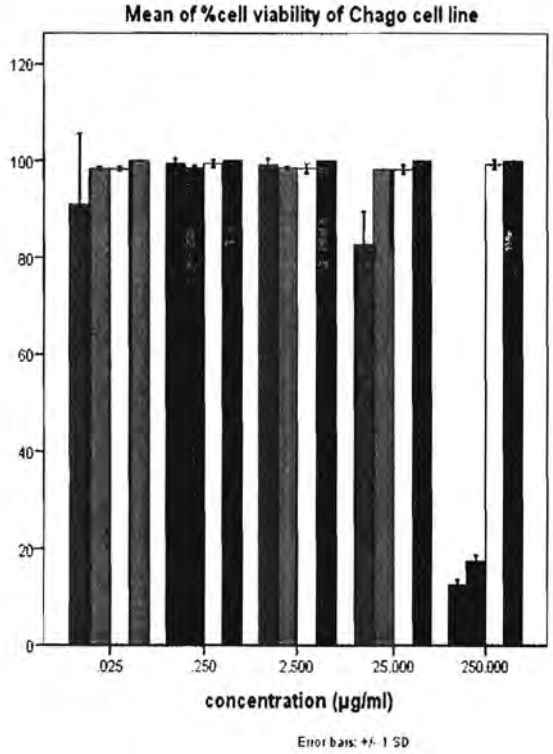
ตัวทำละลาย	ระดับความมีขั้ว	ลักษณะของสารที่ได้
Hexane	ต่ำ	ของเหลวสีเหลืองใส
CH_2Cl_2	ปานกลาง	ของเหลวใส
40% MeOH	สูง	ของเหลวใส

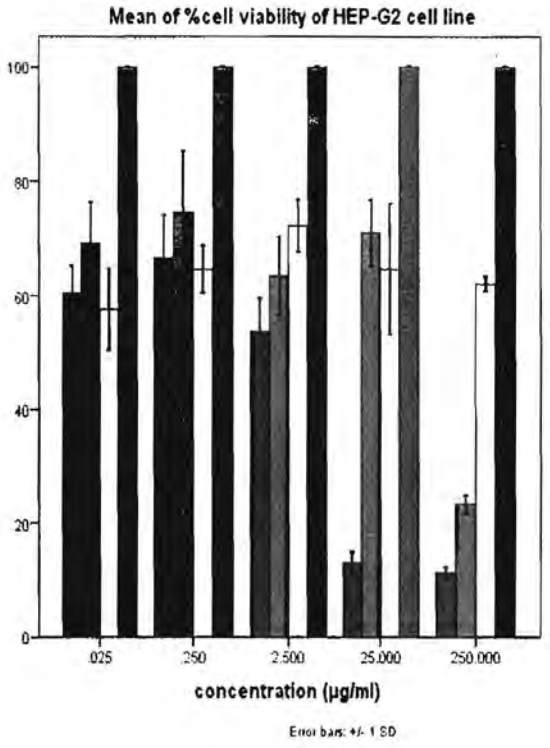
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้ในชั้น Hexane, CH_2Cl_2 และ 40% MeOH (MTT Test#2)

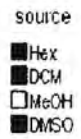
ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดของสารที่แยกได้ในชั้น Hexane, CH_2Cl_2 และ 40% MeOH ดังแสดงในภาพที่ 5

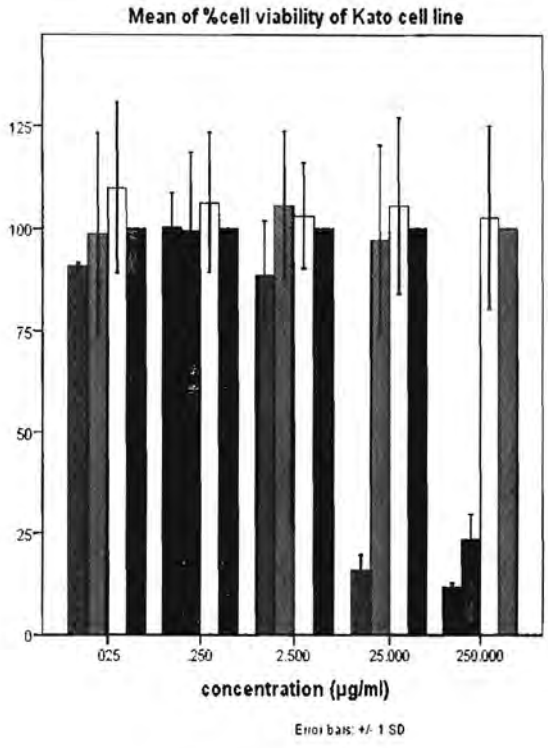

Mean of %cell viability of BT cell line
100
80
60
40
20
0
.025
.250
2.500
25.000
250.000
concentration (µg/ml)
Error bars: +/- 1 SD

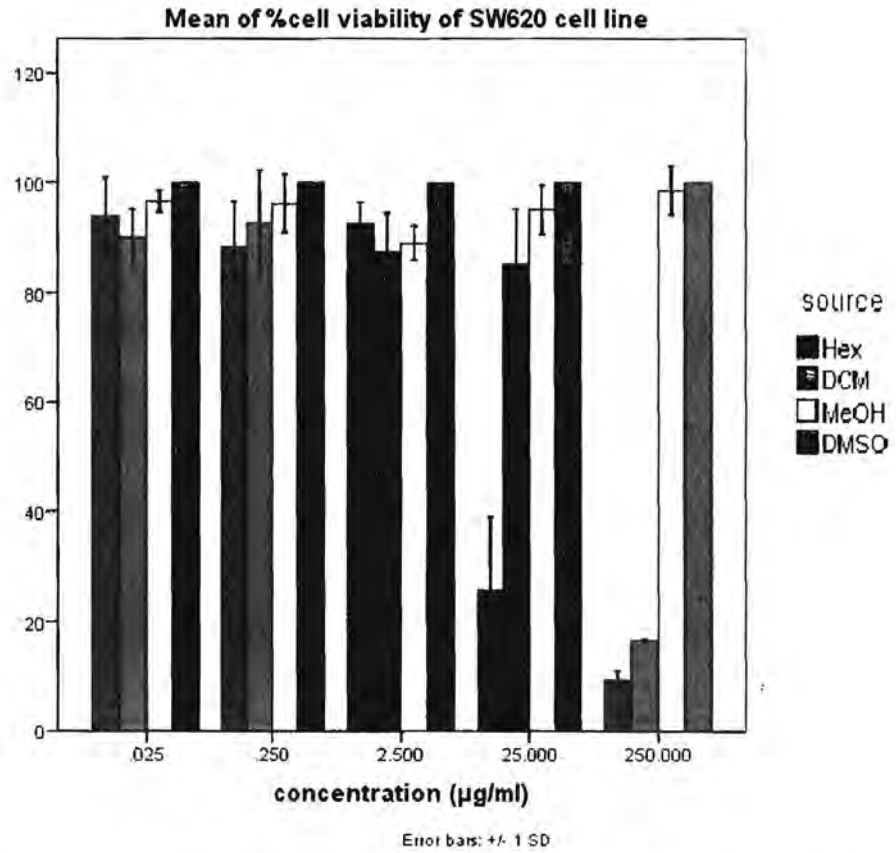
partition
Hex
DCM
MeOH
DMSO


Mean of %cell viability of Chago cell line
120
100
80
60
40
20
0
.025
.250
2.500
25.000
250.000
concentration (µg/ml)
Error bars: +/- 1 SD


Mean of %cell viability of HEP-G2 cell line
100
80
60
40
20
0
.025
.250
2.500
25.000
250.000
concentration (µg/ml)
Error bars: +/- 1 SD


source
Hex
DCM
MeOH
DMSO


Mean of %cell viability of Kato cell line
125
100
75
50
25
0
.025
.250
2.500
25.000
250.000
concentration (µg/ml)
Error bars: +/- 1 SD



ภาพที่ 5 กราฟค่าเฉลี่ย % cell viability ของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ที่ทดสอบด้วยสารที่แยกได้หลังการทำ Partition

<u>ผลการแยกสารจาก Fraction ของ Hexane โดยวิธีการทำ Quick column chromatography</u>

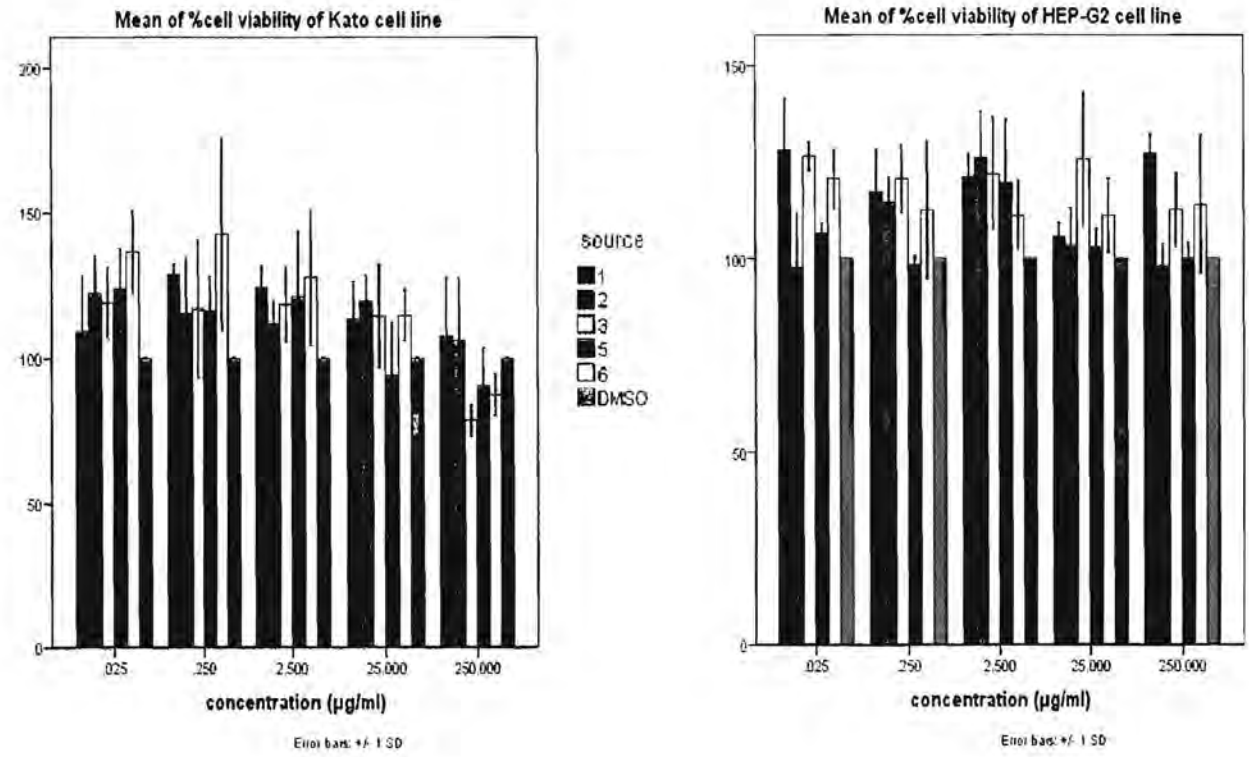
การแยกสารจาก Fraction ของ Hexane ซึ่งเป็น Fraction ที่ให้ผลดีที่สุดในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด โดยการทำ Quick column chromatography สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.

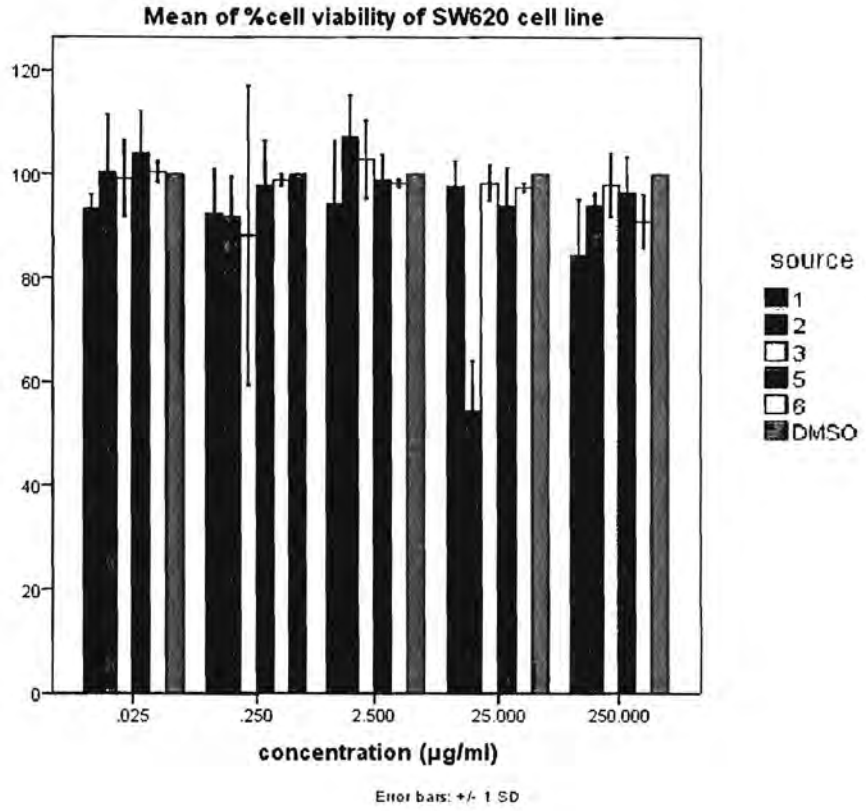
ตารางที่ 2 ลักษณะของสารที่แยกได้จากการทำ Quick column chromatography

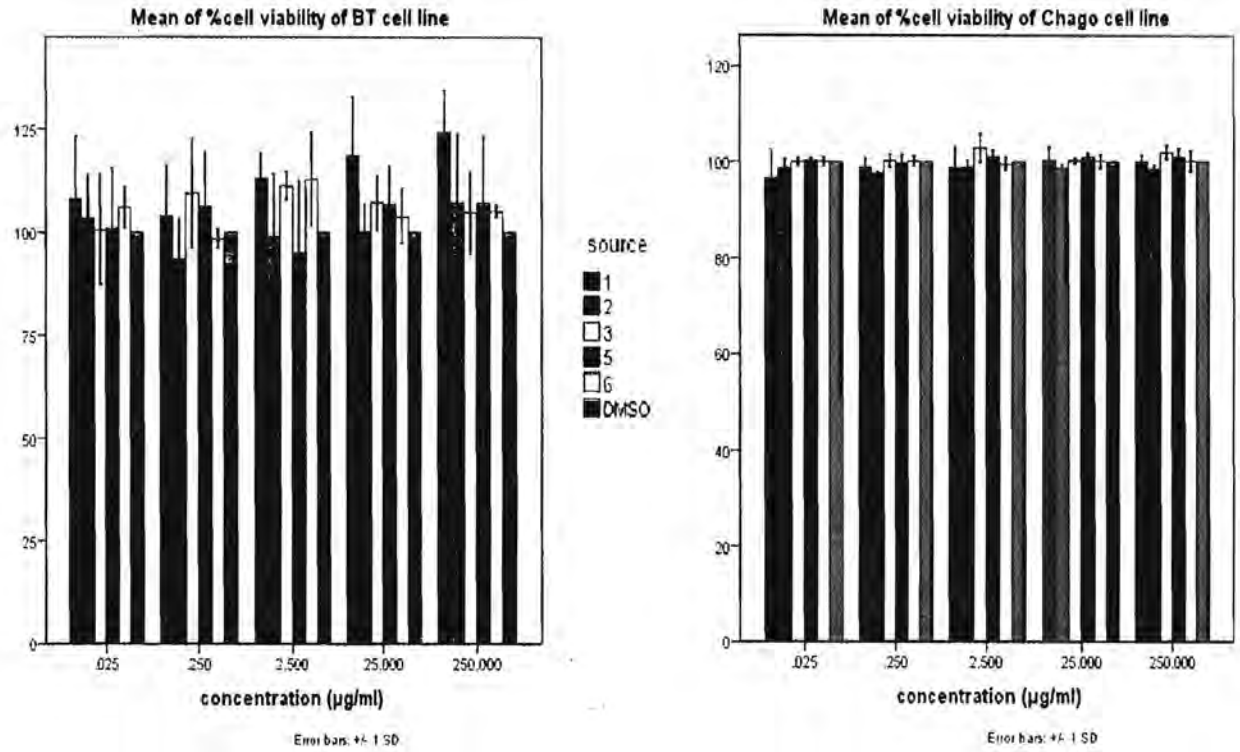
กลุ่มสาร	ลักษณะของสารที่แยกได้
1. 100% hexane	ของเหลวใส
2. 75% hexane – 25% CH_2Cl_2	ของเหลวใส
3. 50% hexane – 50% CH_2Cl_2	ของเหลวใสสีเหลืองจางๆ
4. 50% hexane – 50% CH_2Cl_2	ของเหลวใสสีเหลืองจางๆ
5. 25% hexane – 75% CH_2Cl_2	ของเหลวใส
6. 25% hexane – 75% CH_2Cl_2	ของเหลวใส

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จาก Fraction ของ Hexane ทั้งหมด 5 fractions (MTT test#3)

ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดของสารที่แยกได้จาก fraction hexane ทั้งหมด 5 fractions ทั้งนี้กลุ่มสารกลุ่มที่ 4 ในตารางที่ 2. ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นได้ทางผู้ทำการทดลองจึงตัดออกจากการทดสอบและทดสอบเพียง 5 fractions ดังแสดงในภาพที่ 6



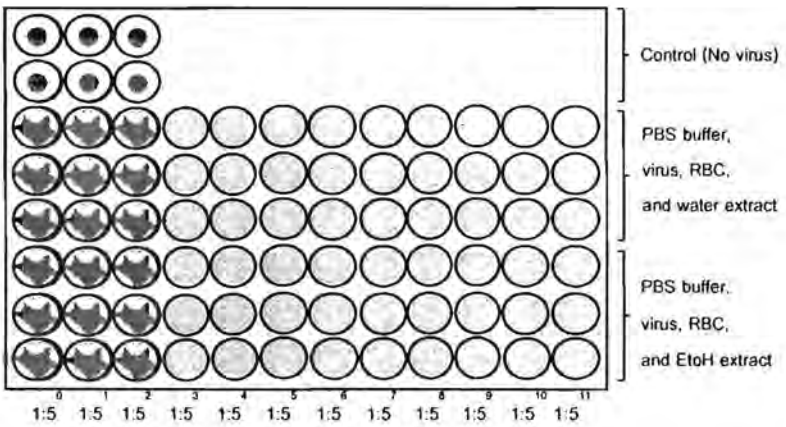

Mean of %cell viability of SW620 cell line
120
100
80
60
40
20
0
.025
.250
2.500
25.000
250.000
concentration (µg/ml)
Error bars: +/- 1 SD
source
1
2
3
5
6
DMSO



ภาพที่ 6 กราฟค่าเฉลี่ย % cell viability ของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ที่ทดสอบด้วยสารที่แยกได้จาก Fraction ของ Hexane

<u>ผลแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไวรัส H1N1</u>

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 พบว่าส่วนหลุมทดลองควบคุมจะเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเป็นจุดสีแดงอยู่ที่ก้นหลุม เนื่องจากในหลุมควบคุมไม่มีเชื้อไวรัสเข้าไปจับกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ในส่วนของการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัด 3 ความเข้มข้นแรกของทุกแถว จะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากจนทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกและที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เจือจางลงมาเป็นลำดับ พบว่าเม็ดเลือดแดงเกิด Agglutination เนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถเข้าจับกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและสร้างเป็นร่างแหของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่กระจายอยู่ทั่วหลุม ดังในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงอย่างหยาบ

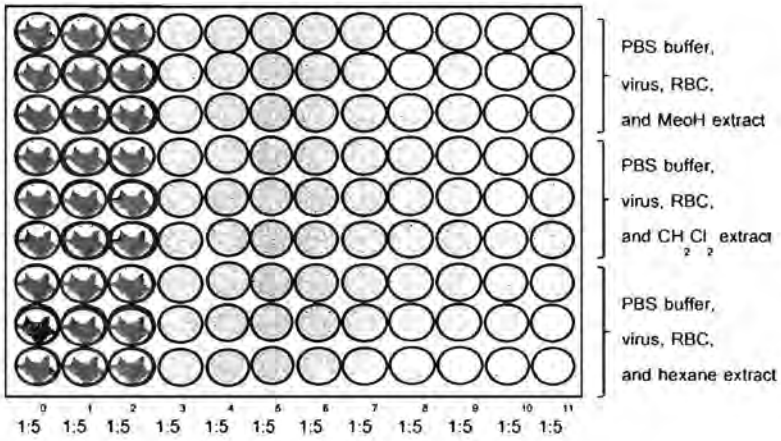
จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งชันโรงในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1สามารถสรุปได้ว่า CHW และ CHE ไม่สามารถยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธ์ H1N1

ผลการแยกกลุ่มสารที่อยู่ในน้ำผึ้งชันโรงที่สกัดอย่างหยาบตามความมีขั้วโดยวิธีการทำ Partition ด้วยกรวยแยก จากการแยกสารเบื้องต้นตามความมีขั้วของสารโดยการทำ Partition ด้วยกรวยแยกสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของสารที่แยกได้จากการทำ Partition ด้วยกรวยแยก

ตัวทำละลาย	**ระดับความมีขั้วของตัวทำละลาย**	**ลักษณะของสารที่แยกได้**
Hexane	ต่ำ	ของเหลวใส
CH_2Cl_2	ปานกลาง	ของเหลวสีเหลืองใส
40% MeOH	สูง	ของเหลวเหนียวสีเหลืองใส

ผลแสดงฤทธิ์ของสารสกัดที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ดังในภาพที่ 8

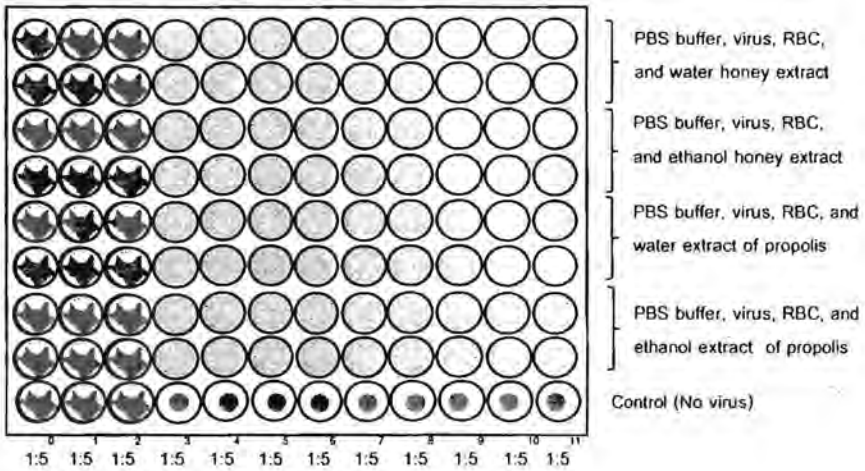


ภาพที่ 8 ผลการทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดน้ำผึ้งชันโรงที่มีสภาพขั้วแตกต่างกัน

พบว่าในส่วนของการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัด 3 ความเข้มข้นแรกของทุกแถว จะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากจนทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกและที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เจือจางลงมาเป็นลำดับ พบว่าเม็ดเลือดแดงเกิด Agglutination เนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถเข้าจับกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและสร้างเป็นร่างแหของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่กระจายอยู่ทั่วหลุม

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันของน้ำผึ้งชันโรงในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดของน้ำผึ้งชันโรงมีสภาพขั้วแตกต่างกันไม่สามารถยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

ผลแสดงฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจากชันโรงในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบของสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งชันโรง ดังในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลการทดสอบ Hemagglutination inhibition ของสารสกัดอย่างหยาบน้ำผึ้งชันโรงและพรอพอลิส

จากการทดลองหาฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจากชันโรงในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งชันโรง พบว่าส่วนหลุมทดลองควบคุมจะเห็นเซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอนเป็นจุดสีแดงอยู่ที่ก้นหลุม เนื่องจากในหลุมควบคุมไม่มีเชื้อไวรัสเข้าไปจับกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ในส่วนของการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัด 3 ความเข้มข้นแรกของทุกแถว จะเป็นความเข้มข้นที่สูงมากจนทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกและที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่เจือจางลงมาเป็นลำดับ พบว่าเม็ดเลือดแดงเกิด Agglutination เนื่องจากเชื้อไวรัสสามารถเข้าจับกับโปรตีนที่ผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงและสร้างเป็นร่างแหของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่กระจายอยู่ทั่วหลุม

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจากชันโรงในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบของสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งชันโรงสรุปได้ว่า CPW และ CPE ไม่สามารถยับยั้งการเกิด

Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธ์ H1N1เช่นเดียวกับสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งซันโรง

วิจารณ์ผลการทดลอง

เลือกทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากน้ำผึ้งซันโรง *T. laeviceps* เพราะว่า 1) ซันโรงเป็นผึ้งที่ไม่มีเหล็กไน ทำให้ไม่มีอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง 2) เป็นผึ้งที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วไป จึงสะดวกต่อการเก็บตัวอย่างและสามารถนำมาเลี้ยงในกล่องไม้หรือขอนไม้เจาะรูได้ง่าย ไม่มีพฤติกรรมทิ้งรัง และ 3) มีการนำน้ำผึ้งและพรอพอลิส จากซันโรงมาใช้ทางด้านยาแผนโบราณมานาน ส่วนการเลือกเก็บในช่วงเมษายนนั้นเป็นช่วงที่น้ำผึ้งจะมีเปอร์เซนต์ของความชื้นน้อย น้ำผึ้งจะมีความเข้มข้นสูง

ในขั้นตอนของการสกัดอย่างหยาบนั้น เลือกใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเป็นรูปแบบที่นิยมใช้ในชีวิตประจำวัน เช่น ในการทำขนม ใช้ในยาหม้อ ใช้ผสมในเครื่องดื่ม เป็นต้น และน้ำผึ้งมีลักษณะเป็นของเหลวที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้นองค์ประกอบที่ออกฤทธิ์จึงน่าจะเป็นพวกที่มีขั้วบ้างไม่มากก็น้อย

ในงานวิจัย ทำการค้นหาฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 อย่างคือ

1. ฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง

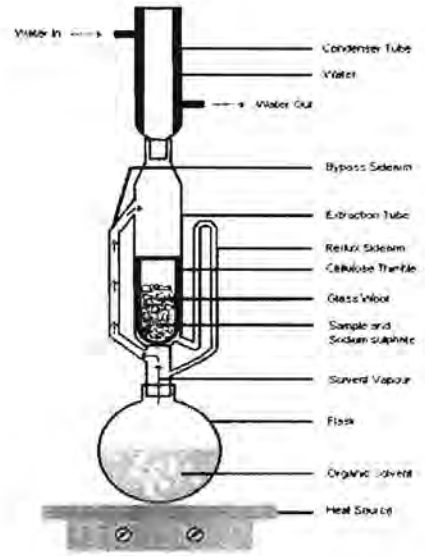
จากผลการทดลองเมื่อสังเกตจากกราฟและนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0 โดยใช้ One-way ANOVA และทำ Post hoc แบบ Tukey HSD เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็ง จะเห็นได้ว่า CHE และ CHW และสารที่แยกตามความมีขั้วจากการทำ Partition ด้วยกรวยแยกมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งที่ต่ำกว่า 100% หรือเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วจะต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในสารที่แยกตามความมีขั้วจากการทำ Partition ด้วยกรวยแยกในกลุ่มตัวทำละลาย Hexane แสดงถึงการมีสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในกลุ่มสารที่มีขั้วน้อย ผลการทดลองที่ได้ในส่วนนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในหลายๆ งานที่ว่าองค์ประกอบทางเคมีในน้ำผึ้งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายๆ ชนิด เช่น ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ มักเป็นสารในกลุ่ม Flavonoids ซึ่งเป็นพวกที่มีขั้วน้อย (Bruni et al., 2009; Kupeli and Yesilada, 2007)

แต่เมื่อทำให้สารในกลุ่มดังกล่าวนั้นบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการทำ Quick column chromatography ซึ่งจัดเป็นโครมาโตกราฟีที่ใช้แยกสารตามความมีขั้วของสารแล้วนั้นกลับให้ผลในทางตรงกันข้าม กล่าวคือค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตอยู่ของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดนั้น มีค่าที่สูงขึ้น และสูงกว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากกลุ่ม

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองดังกล่าวอาจกล่าวได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญมีผลในรูปของ Synergistic effect ซึ่งเมื่อมีการทำให้สารออกฤทธิ์นั้นบริสุทธิ์มากขึ้นจะทำให้สารไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้

2) ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

สารสกัดอย่างหยาบของผลิตภัณฑ์จากชันโรงทั้งน้ำผึ้งและพรอพอลิส โดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลายนั้น ยังมีสารที่อยู่ในสภาวะเฉื่อย (Inert compound) ปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีผลไปยับยั้งการทำงานของสารตัวอื่นๆ ที่อาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธ์ H1N1 และอาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ดังนั้นการสกัดด้วยวิธี Partition ที่แยกสภาพความมีขั้วของสารสกัด โดยใช้ตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันโดยใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกันได้แก่ 40% เมทานอล (ตัวทำละลายที่มีขั้วมาก) ไดคลอโรมีเทน (ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง) และ Hexane (ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุด) อาจจะเป็นวิธีที่ยังไม่เหมาะสม จึงควรจะสกัดสารจากผลิตภัณฑ์ของชันโรงด้วยวิธีอื่น ตัวอย่างเช่น Soxhlet extraction ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกสารที่มีสภาพเฉื่อยออกจากสารอื่นๆ โดยการระเหยออกให้เป็นไอก่อนจะควบแน่นกลับมาเป็นของเหลวอีกครั้งหนึ่ง โดยเทคนิคนี้เหมาะสำหรับแยกสารอินทรีย์ที่ไม่เสถียรที่ความร้อนสูงออกจากสารผสมที่เป็นของแข็ง ลักษณะของเครื่องมือมีลักษณะดังภาพที่ 10

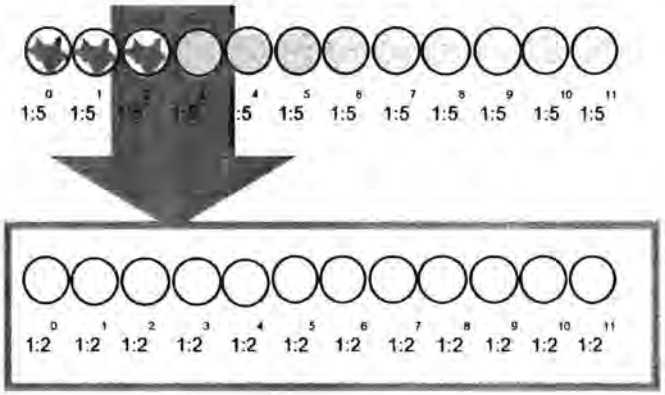


ภาพที่ 10 ตัวอย่างการสกัดสารด้วยวิธี Soxhlet extraction

หลักการของ Soxhlet extraction จะใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย เนื่องจากตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารแล้วจะถูกทำให้ระเหยและควบแน่นกลับมาเมื่อเจอระบบหล่อเย็น ทำให้สกัดได้อีกเป็นลักษณะหมุนเวียน โดยตัวทำละลายที่ใส่ลงไปในเครื่องมือจะหมุนเวียนผ่านสารที่เราต้องการสกัดหลายๆ ครั้งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด จนกระทั่งสารที่ต้องการสกัดออกมามีปริมาณเข้มข้นมากพอ

นอกจากนี้ในการทดลองสกัดพรอพอลิสจากชันโรงพบว่า พรอพอลิสเป็นสารที่มีสารจำพวกไขมันสะสมอยู่มาก ซึ่งสารจำพวกไขมันจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วน้อย แต่ในการทดลองการสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจากชันโรงโดยใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย ซึ่งตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้ต่างก็เป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง ส่งผลให้พรอพอลิสละลายได้ไม่ค่อยดีและสารบางชนิดที่อาจจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัสยังไม่ละลายออกมาในตัวทำละลายได้ จึงควรจะเปลี่ยนตัวทำละลายให้มีสภาพขั้วต่ำหรือไม่มีขั้ว ยกตัวอย่างเช่น Hexane เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้ยังเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกใช้ตัวทำละลายและวิธีการสกัดสารให้เหมาะสมมากยิ่งขึ้นในครั้งต่อไป

ในการทดลอง Hemagglutination inhibition assay ซึ่งทำการทดลองโดยอาศัยเม็ดเลือดแดงที่มีความเข้มข้น 0.75% ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีปริมาณ 8 HAU (Hemagglutination unit) และทำปฏิกริยากับสารสกัดอย่างหยาบของน้ำผึ้งจากทั้งเอทานอลและน้ำที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยใช้วิธี Serial dilution ทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นในแต่ละหลุมเจือจางลงมาเรื่อยๆ หลุมละ 5 เท่า ได้แก่ สารสกัดที่มีความเข้มข้น 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:525, 1:3,125, 1:15,625, 1:78,125 ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้นระหว่าง 1:25 และ 1:125 เป็นความเข้มข้นที่มีการเปลี่ยนแปลง โดยที่สารสกัดที่มีความเข้มข้น 1:25 เป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก และที่สารสกัดที่มีความเข้มข้น 1:125 เป็นความเข้มข้นแรกที่ทำให้เกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดง ดังในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Hemagglutination inhibition

ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างสารสกัดที่มีความเข้มข้น 1:25 และ 1:125 นั้น ควรจะมีการเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดในช่วงนั้นโดยใช้ 2-fold dilution คือเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดลงหลุมละ 2 เท่า เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงความเข้มข้นนั้น

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

การสกัดอย่างหยาบในน้ำผึ้งด้วย 96% EtOH และน้ำนั้น สารสกัดที่ได้สามารถต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้ แต่ในขณะเดียวกันสารสกัดดังกล่าวก็ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะมีสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติปนอยู่ในปริมาณที่มาก ดังนั้นจึงต้องอาศัยการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

การแยกสารสกัดน้ำผึ้งตามความมีขั้วโดยการทำ Partition ด้วยกรวยแยก ทำให้ได้กลุ่มของสารสกัด 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ไม่มีขั้ว (Hexane) มีขั้วปานกลาง (CH_2Cl_2) และมีขั้วมาก (MeOH) โดยกลุ่มที่ให้ผลการทดสอบในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งที่ดีสุดเป็นสารกลุ่มที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Hexane) สารสกัดที่แยกได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองใสซึ่งแตกต่างจากสารสกัดที่แยกได้อีก 2 กลุ่มที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี อาจเป็นไปได้ว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านการแบ่งของเซลล์มะเร็งอยู่ในปริมาณที่มาก แต่อย่างไรก็ดีความสามารถในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่มนี้ยังคงอยู่ในระดับที่สูง คือ 250 และ 25 µg/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

การทำ Quick column chromatography ของสารที่แยกได้ในกลุ่ม Hexane ทำให้ได้สารสกัดทั้งหมด 5 fractions แต่เมื่อนำสารสกัดทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งกลับให้ผลที่ตรงกันข้าม กล่าวคือสารสกัดที่แยกได้ทั้ง 5 fractions กลับไม่สามารถต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งนั้นจะอยู่ในรูปแบบของ Synergistic effect ดังนั้นเมื่อสารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นความสามารถในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งจะน้อยลงไป

ส่วนในกรณีของฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 สรุปได้ว่าสารสกัดอย่างหยาบของผลิตภัณฑ์จากซันโรง (*Trigona laeviceps*) ทั้งน้ำผึ้งและพรอพอลิส โดยใช้น้ำและ 96% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 เมื่อทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition assay ผลพบว่าสารสกัดอย่างหยาบทั้งจากน้ำและเอทานอลทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 จากนั้นนำสารสกัดอย่างหยาบมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยแยกกลุ่มของสารเบื้องต้นตามสภาพขั้ว โดยทำการละลายใน 40% MeOH (ตัวทำละลายที่มีขั้วมาก) ไดคลอโรมีเทน (ตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง) และ Hexane (ตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยที่สุด) จากนั้นนำแต่ละส่วนของตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 พบว่าสารสกัดจากน้ำผึ้งในแต่ละตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 แต่จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากพรอพอลิสจากผึ้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของไวรัส จึงทำการทดลองสกัดอย่างหยาบของพรอพอลิสจาก *T. laeviceps* ด้วย 96% เอทานอลและน้ำ จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 พบว่าสารสกัดอย่างหยาบทั้งจากพรอพอลิสและน้ำผึ้งชันโรงไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ดังนั้นสามารถสรุปการทดลองได้ว่าสารสกัดจากผลิตภัณฑ์จาก *T. laeviceps* ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิด Agglutination ของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนเมื่อติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1

บรรณานุกรม

กลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสารและสารสนเทศสุขภาพ สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์, กระทรวงสาธารณสุข. จำนวนและอัตราตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2548 - 2552. http://bps.ops.moph.go.th/Statistic/2.3.4-52.pdf (2553).

จุฬาลงกรณ์, มหาวิทยาลัย. คณะแพทยศาสตร์. *รู้ทันมะเร็ง โรคที่ป้องกันและรักษาได้* (บริษัทสรรพสาร จำกัด, 2550).

สมนึก บุญเกิดและธนานิธ เสือวรรณศรี. *ผึ้ง* (สำนักพิมพ์มติชน, 2544).

วัลยา อุทัยสางและไพศาล ขาวสัก. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากต้นบานบุรีเหลือง แก้วเจ้าจอม และการเวก. *วารสารการแพทย์และวิทยาศาสตร์สุขภาพ*. 12 (2548).

อัญชลี สวาสดิ์ธรรม, พิลาณี ไวถนอมสัตย์และสุคันธรส ธาดากิตติสาร. การเปรียบเทียบองค์ประกอบของน้ำผึ้งซันโรงและน้ำผึ้งจากผึ้งพันธุ์ *(Apis mellifera* L.*)*. (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2552)

Awale, S. *et al.* Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 181-189 (2008).

Blair, S.E. & Cater, D.A. The potential for honey in the management of wounds and infection. *Aust. Infect. Con.* **10**, 24-30. (2005).

Bogdanov, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**, 748-753. (1997).

Bruni, R. *et al.* Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chem.* **114**, 1413–1420 (2009).

Chanchao, C., Sintara, K. & Wongsiri, S. Comparison of antibiotic and organoleptic properties of honey from various plant sources in Thailand. *J. Api. Sci.* **50**, 59-64 (2006).

Cheng, P.K.C. *et al.* Oseltamivir- and Amantadine-resistant influenza virus A (H1N1). *Emerg. Infec. Dis.* **15**, 966-968. (2009).

Chinou, I. *et al.* Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: profile analysis of extracts. *Food Chem.* **116**, 702–708 (2009).

Dias, G. L., Estevinho, L., Moreira, L., Pereira, P. A. & Pereira, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compound extracts of northeast Portugal honey. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3774-3779 (2008).

Estevinho, L., Pereira, P.A., Moreira, L., Dias, G.L., & Pereira, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3774-3779. (2008).

Hayden, F. Developing new antiviral agents for influenza treatment, what does the future hold? *Clin. Infec. Dis.* **48**,

S3-S13. (2009).

Jaganathan, S.K. & Mandal, M. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J. Biomed. Biotechnol.* doi 10.1155/2009/830616 (2009).

Jefferson, T. *et al.* Inactivated influenza vaccine, method, policies, and politics. *J. Clin. Epidemiol.* **62**, 677-686. (2009).

Kujumgiev, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 235-240. (1999).

Kupeli, E. & Yesilada, E. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* **112**, 524–530 (2007).

Lackenby, A., Thompson, C.I. & Democratis, J. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Curr. Op. Infec. Dis.* **21**, 626-638. (2009).

Michaelis, M., Doerr, H.W. & Cinat, J. Novel swine-origin influenza A virus in human, another pandemic knocking at the door. *Med Microbiol Immunol.* **198**, 175-183. (2009).

Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature.* **459**, 931-939. (2009).

Pleschka, S., Stein, M., Schoop, R. & Hudson, B.J. Anti-viral properties and of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). *J. Virol.* **6**, 197. (2009).

Rodriguez, A., Pèrez-Gonzàlez, A. & Nieto, A. Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* **81**, 5315–5324. (2007).

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวจันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
   ชื่อ – นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Chanpen Chanchao

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1403 00209 37 5

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพญาไท ปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 02-218-5380 โทรสาร 02-218-5386
e-mail: chanpen@sc.chula.ac.th และ cchanchao@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สถาบันการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
ปริญญาเอก (Molecular and Cellular Biology)	Virginia Tech, USA	2542
ปริญญาโท (Molecular and Cellular Biology)	Virginia Tech, USA	2539
ปริญญาตรี (ชีววิทยา)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2535

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
ชีววิทยาการเจริญ

7. **งานวิจัยที่กำลังทำ**
หัวหน้าโครงการวิจัย
เรื่อง โรคและสารต้านเชื้อก่อโรคในผึ้งไทย
แหล่งทุน โครงการวิจัยต่อเนื่อง 7 คลัสเตอร์ คลัสเตอร์อาหารและน้ำ
ระยะเวลา 2 ปี ตั้งแต่ 1 สิงหาคม 2556 – 30 กรกฎาคม 2558

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: (5 ปีย้อนหลัง)

Kaewmuangmoon, J. and **Chanchao, C.** (2013) Over-expression and characterization of recombinant alpha – glucosidase I from *Apis cerana indica* in *E. coli*. Journal of Apiculture. 28: 97-111.

Kaewmuangmoon, J., Kilaso, M., Leartsakulpanich, U., Kimura, K., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2013) Expression of a secretory α-glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology*. 13: 16. doi: 10.1186/1472-6750-13-16. **(ISI, IF2012 = 2.35)**

Kaewmuangmoon, J., Yoshiyama, M., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Characterization of some enzymatic properties of recombinant α-glucosidase III from the Thai honeybee, *Apis cerana indica* Fabricus. African Journal of Biotechnology. 11: 16220-16232. (abstract in CAB direct)

Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 45. doi: 10.1186/1472-6882-12-45. **(ISI, IF2012 = 2.24)**

Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and **Chanchao, C.** (2012) *In vitro* antiproliferative / cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12: 27. doi: 10.1186/1472-6882-11-37. **(ISI, IF2012 = 2.24)**

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, and Wongsiri, S. (2012) Geometric morphometric analysis of giant honeybee (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) populations in Thailand. *Journal of Asia Pacific Entomology*. 15: 611-618. doi: 10.1016/j.aspen.2012.07.001.

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2012) No evidence that habitat disturbance affects mating frequency in the giant honey bee *Apis dorsata*. *Apidologie*. doi: 10.1007/s13592-012-0150-0. **(ISI2009, IF = 1.493)**

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, Lim, J., Wongsiri, S., and Oldroyd, B.P. (2012) Genetic structure of a giant honey bee (*Apis dorsata*) population in northern Thailand: implications for conservation. *Insect Conservation and Diversity*. doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00193.x. **(ISI2009, IF = 2.828)**

Kaewmuangmoon, J., Nonthapa, P., Rattanawannee, A., Winayanuwattikun, P., and **Chanchao, C.** (2012) Preliminary screening for various bioactivities in honey and propolis extracts from Thai bees. *European Journal of Medicinal Plants*. 2(2): 74-92.

Almehmadi, R.M., Alghamdi, A.A., Wongsiri, S., **Chanchao, C.**, and Aljedani, D.M. (2011) Histological studies on

ovary differentiation in Yemini queen honeybees, *Apis mellifera jemenitica* (Hymenoptera: Apidae), during post-embryonic development. *The Pan-Pacific Entomologist*. 87(3): 177-187. **(ISI, IF2009 = 0.383)**

Kilaso, M., Kaewmuangmoon, J., Karnchanatat, A., Sangvanich, P., and **Chanchao, C.** (2011) Expression and characterization of *Apis dorsata* α-glucosidase III. *Journal of Asia Pacific Entomology*. 14: 479-488.

Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., and **Chanchao, C.** (2011) *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11: 37. doi: 10.1186/1472-6882-11-37. **(ISI, IF2012 = 2.24)**

Rattanawannee, A., **Chanchao, C.**, and Wongsiri, S. (2010) Gender and species identification of four native honeybees (Apidae: *Apis*) in Thailand based on wing morphometic analysis. *Annals of the Entomological Society of America*. 103(6): 965-970. **(ISI, IF2009 = 0.939)**

Kaewmuangmoon, J., Suwanvijitr, T., Cherdshewasart, W., and **Chanchao, C.** (2010) Leaf morphometric and genetic variation of *Butea superba* in Thailand. *ScienceAsia*. 36: 180-186. **(ISI, no IF, indexed in various international databases, such as CAPlus, SCOPUS and recently was re-listed in Thomson Reuters' Science Index Expanded Edition 2007)**

Suwanvijitr, T., Kaewmuangmoon, J., Cherdshewasart, W., and **Chanchao, C.** (2010) Morphometric and genetic variation in *Pueraria mirifica* cultivars across Thailand. *Pakistan Journal of Botany*. 42(1): 97-109. **(ISI, IF2007 = 0.470)**

Umthong, S., Puthong, S., **Chanchao, C.** (2009) *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *The American Journal of Chinese Medicine*. 37(5): 1-11. **(ISI, IF = 1.058)**

Chanchao, C. (2009) Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (stingless bee) honey From Thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 25(3): 364-369. (Indexed by WHO Index Medicus (IMEMR) for EMRO region, ExtraMed, covered by EXCERPTA MEDICA, Netherlands, CAB Abstract and Global Health of UK)

Chanchao, C. (2009) Properties and antimicrobial activity of *Apis dorsata* honey from Thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 25(2): 313-318. (Indexed by WHO Index Medicus (IMEMR) for EMRO region, ExtraMed, covered by EXCERPTA MEDICA, Netherlands, CAB Abstract and Global Health of UK)

สรุปค่าใช้จ่าย

โครงการ เรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและแอกทิวิตีทางชีวภาพผลิตภัณฑ์ผึ้งจากผึ้งโพรง (Apis cerana) และ ชันโรง (Trigona laveiceps) งวดที่ 1 ปีงบประมาณ 2556

ที่	รายการ	จำนวนเงิน
1	ค่าใช้สอย	-
2	หมวดค่าวัสดุ - วัสดุวิทยาศาสตร์ - วัสดุสำนักงาน	 80,000 -
3	ครุภัณฑ์การศึกษา	-
	รวม	80,000