



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากรากต้นกระทิง
Chemical Constituents and Cytotoxicity from the Roots of
Calophyllum innophyllum

ชื่อนิสิต นางสาวมิ่งมุก สุทธิกิตติพงศ์

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากรากต้นกระทิง
Chemical Constituents and Cytotoxicity from the Roots of
Calophyllum innophyllum

โดย

นางสาวมิ่งมุก สุทธิกิตติพงศ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

โครงการ
โดย
.....

ได้รับอนุมัติให้.....
.....

นายกรรมการสภโครงการ

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บรรณ พินิจเนาวิน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไล วิทยากร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โรจน์ ไชยรัตน์ผู้ช่วย)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยสภโครงการ.....

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุวิชัย พากุล)

วันที่..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๖๖

คุณภาพของการนำเสนอรายงานฉบับนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

Project Title Chemical Constituents and Cytotoxicity from the Roots of
Calophyllum innophyllum

Student Name Miss Mingmook Suttikittipong Stucent ID 5633130323

Advisor Name Associate Professor Dr.Santi Tip-pyang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Academic Year
2016

Abstract

The roots of *Calophyllum innophyllum* were extracted with methanol (MeOH). The MeOH crude extract was purified by chromatographic techniques which led to the isolation of ten xanthones, 4-hydroxyxanthone (**1**), 2-hydroxyxanthone (**2**), 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (**3**), 3-hydroxy-2-methoxyxanthone (**4**), 2,3-dimethoxyxanthone (**5**), 1,6-dihydroxyxanthone (**6**), 1,7-dihydroxyxanthone (**7**), 1,3,5-trihydroxyxanthone (**8**), tovyprifolin (**9**) and macluraxanthone (**10**) together with two flavonoids, 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (**11**) and 5,7,4'-trimethoxyflavone (**12**). Their structures were determined by spectroscopic methods as well as comparison with previous reports in the literature. Moreover, all compounds were evaluated for their cytotoxicity against cancer cell lines (KB and HeLaS-3). Compounds **1**, **2**, **3**, **6** and **8** showed low inhibitory activity toward KB cell line with the IC_{50} value in the range of 65.0-93.3 μ M while none of the tested compounds showed significant inhibitory activity toward HeLaS-3 cell line ($IC_{50} > 100 \mu$ M). In addition, all compounds were evaluated for their α -glucosidase inhibitory activity (maltase and sucrase). All isolated compounds showed no activity against α -glucosidase (maltase and sucrase) ($IC_{50} > 3,000 \mu$ M).

Keywords: *Calophyllum innophyllum*, xanthones, flavonoids, cytotoxicity, α -glucosidase inhibitory activity

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย รวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุมนาวิน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสภณวี ไชยอนันต์สุจริต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคนในหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คอยให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในระหว่างการทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.จิราพัทธ์ สีแจ่ม ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2559 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง



สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอำนวยการ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ญ
สารบัญแผนภาพ	ฎ
สารบัญภาคผนวก	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นกระทิง	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	9
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	10
2.1 พืชตัวอย่าง	10
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	10
2.3 สารเคมี	11
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	11
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	11
2.5.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)	11

2.5.2	ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	12
2.5.3	Preparative thin layer chromatography (PTLC)	13
2.5.4	Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron [®])	14
2.5.5	High-performance liquid chromatography (HPLC)	15
2.6	การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	16
2.6.1	การสกัดด้วยตัวทำละลาย	16
2.6.2	ขั้นตอนการแยกสารประกอบ	17
2.7	การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	21
2.7.1	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method	21
2.7.2	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้หนู	21
บทที่ 3	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้	23
3.1	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 1	23
3.2	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 2	24
3.3	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 3	26
3.4	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 4	27
3.5	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 5	28
3.6	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 6	29
3.7	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7	30
3.8	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 8	31
3.9	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 9	32
3.10	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 10	33
3.11	การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 11	35

	หน้า
3.12 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 12	36
3.13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	37
3.14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้	38
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	39
ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	44
ประวัติผู้วิจัย	55



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3. 1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 1	23
ตารางที่ 3. 2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 2	24
ตารางที่ 3. 3 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 3	26
ตารางที่ 3. 4 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 4	27
ตารางที่ 3. 5 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 5	28
ตารางที่ 3. 6 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 6	29
ตารางที่ 3. 7 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 7	30
ตารางที่ 3. 8 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 8	31
ตารางที่ 3. 9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 9	32
ตารางที่ 3.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR และ ¹³ C-NMR ของสาร 10	33
ตารางที่ 3. 11 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 11	35
ตารางที่ 3. 12 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 12	36
ตารางที่ 3. 13 ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (1-12) และสารมาตรฐาน adriamycin	37

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 ลักษณะของใบ, ดอก, ผลและลำต้นของต้นกระทิง	2
รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากใบของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	2
รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	3
รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	3
รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากรากของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	4
รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากเมล็ดของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	4
รูปที่ 1.7 สารที่สกัดได้จากใบของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	5
รูปที่ 1.8 สารที่สกัดได้จากรากของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	5
รูปที่ 1.9 สารที่สกัดได้จากเมล็ดของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	6
รูปที่ 1.10 สารที่สกัดได้จากกิ่งของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	6
รูปที่ 1.11 สารที่สกัดได้จากใบของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	7
รูปที่ 1.12 สารที่สกัดได้จากกิ่งของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	7
รูปที่ 1.13 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	8
รูปที่ 1.14 สารที่สกัดได้จากใบของต้น <i>Calophyllum inophyllum</i>	8
รูปที่ 3.1 โครงสร้างสาร 1	23
รูปที่ 3.2 โครงสร้างสาร 2	24
รูปที่ 3.3 โครงสร้างสาร 3	26
รูปที่ 3.4 โครงสร้างสาร 4	27
รูปที่ 3.5 โครงสร้างสาร 5	28
รูปที่ 3.6 โครงสร้างสาร 6	29
รูปที่ 3.7 โครงสร้างสาร 7	30
รูปที่ 3.8 โครงสร้างสาร 8	31
รูปที่ 3.9 โครงสร้างสาร 9	32
รูปที่ 3.10 โครงสร้างสาร 10	33
รูปที่ 3.11 โครงสร้างสาร 11	35
รูปที่ 3.12 โครงสร้างสาร 12	36
รูปที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 1-12	39

สารบัญแผนภาพ

หน้า


แผนภาพที่ 2.6.1	ขั้นตอนการสกัดรากต้นกระทิง	16
แผนภาพที่ 2.6.2	ขั้นตอนการแยกสารประกอบของรากต้นกระทิง	20



สารบัญภาคผนวก

	หน้า
รูปที่ 1 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 4-hydroxyxanthone (1) ใน DMSO	45
รูปที่ 2 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 4-hydroxyxanthone (1) ใน DMSO	45
รูปที่ 3 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 2-hydroxyxanthone (2) ใน DMSO	46
รูปที่ 4 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 2-hydroxyxanthone (2) ใน DMSO	46
รูปที่ 5 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (3) ใน DMSO	47
รูปที่ 6 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (3) ใน DMSO	47
รูปที่ 7 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone (4) ใน CDCl_3	48
รูปที่ 8 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone (4) ใน CDCl_3	48
รูปที่ 9 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 2,3-dimethoxyxanthone (5) ใน CDCl_3	49
รูปที่ 10 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,6-dihydroxyxanthone (6) ใน CDCl_3	49
รูปที่ 11 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,7-dihydroxyxanthone (7) ใน CDCl_3	50
รูปที่ 12 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,3,5-trihydroxyxanthone (8) ใน DMSO	50
รูปที่ 13 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ tovopyrifolin (9) ใน CDCl_3	51
รูปที่ 14 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ tovopyrifolin (9) ใน CDCl_3	51
รูปที่ 15 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ macluraxanthone (10) ใน CDCl_3	52
รูปที่ 16 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ macluraxanthone (10) ใน CDCl_3	52
รูปที่ 17 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (11) ใน CDCl_3	53
รูปที่ 18 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (11) ใน CDCl_3	53
รูปที่ 19 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 5,7,4'-trimethoxyflavone (12) ใน CDCl_3	54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ



NMR	nuclear magnetic resonance
HPLC	high-performance liquid chromatography
PTLC	preparative thin layer chromatography
TLC	thin layer chromatography
IC ₅₀	the half maximal inhibitory concentration
<i>J</i>	coupling constant (Hz)
s	singlet
d	doublet
t	triplet
dd	doublet of doublets
ddd	doublet of doublets of doublets
m	multiplet
brs	broad signal

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันนี้มีผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปีโดยมีสาเหตุหลักๆเกิดจาก 2 ปัจจัย คือปัจจัยภายในและภายนอกร่างกาย โดยปัจจัยภายในร่างกายเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ จึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อที่มีความผิดปกติ เช่น มีการแบ่งตัวของเซลล์มากขึ้นจนไม่สามารถควบคุมได้ หรือทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น เนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยง ส่วนปัจจัยภายนอกร่างกายเกิดจาก สารเคมี รังสี ไวรัส และพยาธิบางชนิด ตลอดจนความไม่สมดุลทางภาวะโภชนาการ ปัจจุบันมียารักษาโรคมะเร็งหลายชนิดแต่ละชนิดจะมีผลข้างเคียง และไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ 100% ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากรากต้นกระติงเนื่องจากเซลล์มะเร็งนั้นเป็นเซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว และมากกว่าปกติ ดังนั้นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งจึงทำให้สามารถชะลอการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเซลล์ที่อาจทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติได้

1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นกระติง

ต้นกระติง (*Calophyllum inophyllum*) เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Calophyllum* จัดอยู่ในวงศ์มังคุด (*Clusiaceae*) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่สูงประมาณ 20 – 25 เมตร เปลือกนอกเรียบสีเทาอ่อนหรือน้ำตาลปนเหลือง ส่วนเปลือกในสีชมพูมีเนื้อไม้สีน้ำตาลปนแดง ใบเป็นใบเดี่ยวและไม้ผลัดใบ เรือนยอดเป็นพุ่มกลมสีเขียวเข้ม กิ่งอ่อนเกลี้ยงยอดอ่อนเรียวยาวเล็กปลายทู่ ออกดอกเป็นช่อสั้นที่ซอกใบบริเวณปลายกิ่งและมีดอกย่อยกลีบดอกสีขาว เกสรเพศผู้สีเหลืองจะมีกลิ่นหอมและออกดอกช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม ผลเป็นทรงกลมปลายผลเป็นติ่งแหลม เมื่อสุกจะมีสีเหลือง¹ เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบอินโดจีน สำหรับประเทศไทยมีต้นกระติงอยู่ 2 ชนิด คือชนิดใบสีเขียว (*Calophyllum inophyllum* Linn.) และชนิดใบสีแดง (*Calophyllum polyanthum* Wall. ex Choisy) ซึ่งในประเทศไทยมักนิยมใช้ต้นกระติงชนิดใบสีเขียวมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพร เนื่องจากต้นกระติงเป็นพืชมีสรรพคุณมากมาย เช่น ส่วนดอกมีรสหอมเย็น ใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้อาการการเต้นของหัวใจผิดปกติ และใช้ปรุงเป็นยาหอม ส่วนใบมีรสเมาเย็น ช่วยแก้อาการตาแดง ตาฝ้า ตามัว และใช้ล้างตา ยางจากต้นและเปลือกต้นใช้เป็นยาพอกทรวงอกแก้วัณโรคปอด น้ำมันจากเมล็ดที่ทำให้บริสุทธิ์ใช้กินแก้โรคหนองใน ส่วนเปลือกต้นใช้ต้มเป็นยาขับปัสสาวะ และส่วนรากใช้เป็นยาแก้อาการปวดบวมเคล็ดขัดยอก ช่วยแก้อาการปวดข้อ ปวดกระดูก²



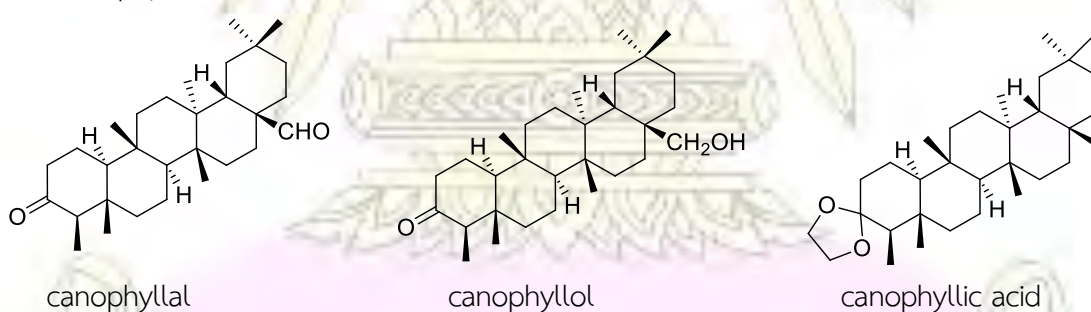
รูปที่ 1.1 ลักษณะของใบ, ดอก, ผลและลำต้นของต้นกระทิง²

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของพืชสกุล *Calophyllum* ส่วนใหญ่จะพบสารในกลุ่ม flavonoids, triterpenoids, xanthenes, coumarines และ steroid เป็นต้น

Yimdjo และคณะ³ (2004) ทดสอบฤทธิ์ต่อต้านเซลล์แบคทีเรียและเนื้องอก พบว่า สารสกัดจากรากของต้น *Calophyllum inophyllum* มีฤทธิ์ต่อต้านเนื้องอก

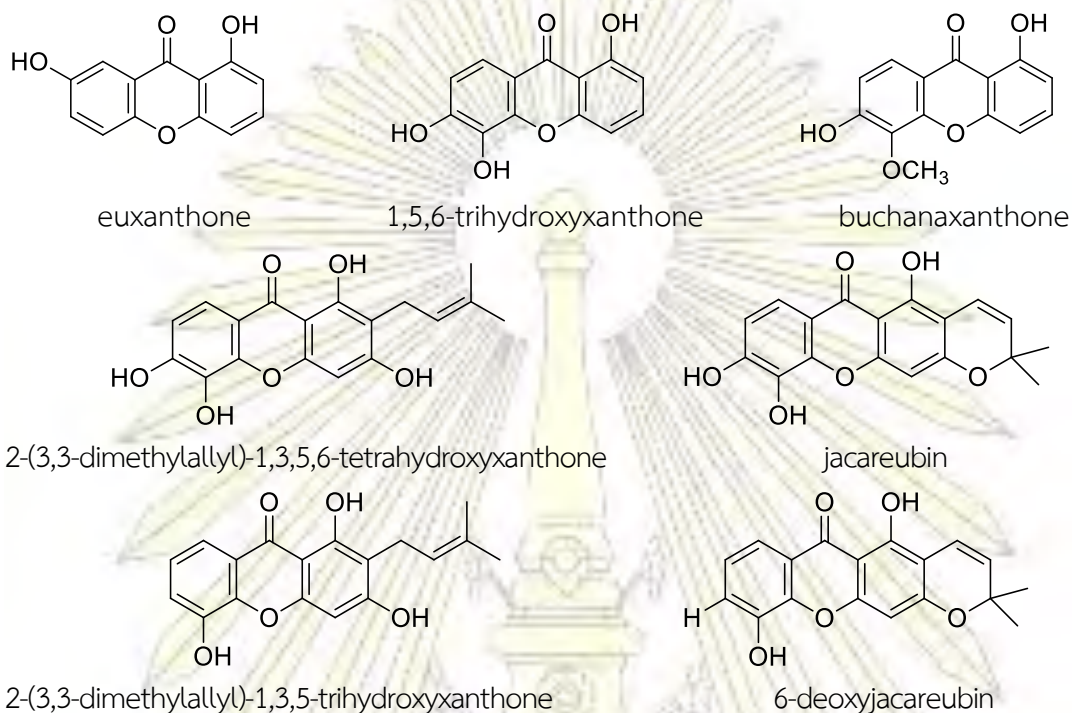
Govindachari และคณะ⁴ (1967) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนจากใบของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่กลุ่ม triterpenoides ทั้งหมด 3 ชนิด คือ canophyllal, canophyllol และ canophyllic acid



รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากใบของต้น *Calophyllum inophyllum*

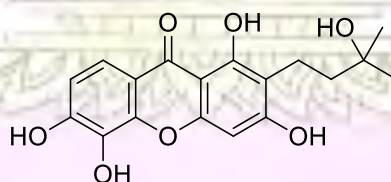
Falk และคณะ⁵ (1971) แยกสารจากสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม และอะซิโตนจากเนื้อไม้ของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารในกลุ่ม xanthenes ที่ได้รับการรายงานแล้ว ดังนี้ euxanthere,

1,5,6-trihydroxyxanthone, buchanaxanthone, 2-(3,3-dimethylallyl)-1,3,5-trihydroxyxanthone, 2-(3,3-dimethylallyl)-1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone, jacareubin และ 6-deoxyjacareubin



รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Calophyllum inophyllum*

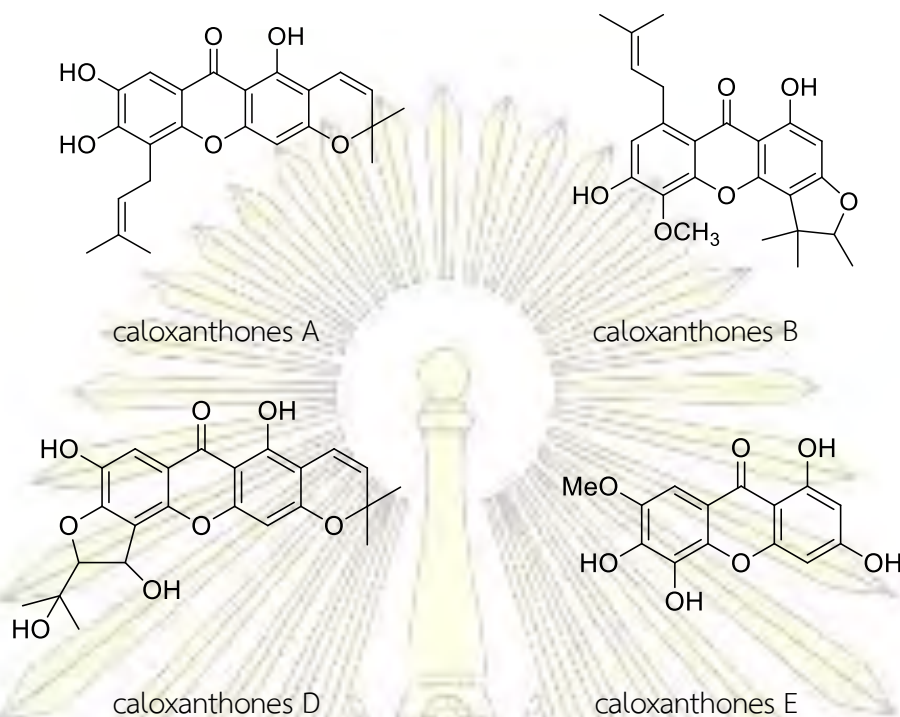
Goh และคณะ⁶ (1990) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอลจากเนื้อไม้ของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม xanthones 1 ชนิด คือ 2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone



2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone

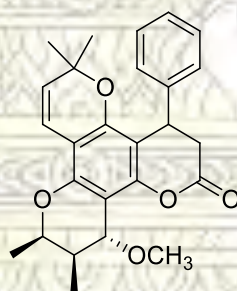
รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Calophyllum inophyllum*

linuma และคณะ⁷ (1994) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, อะซิโตน และเมทานอลจากรากของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม xanthones 4 ชนิด คือ caloxanthones A, B, D และ E พร้อมกับสารที่มีรายงานแล้วอีก 4 ชนิด



รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Calophyllum inophyllum*

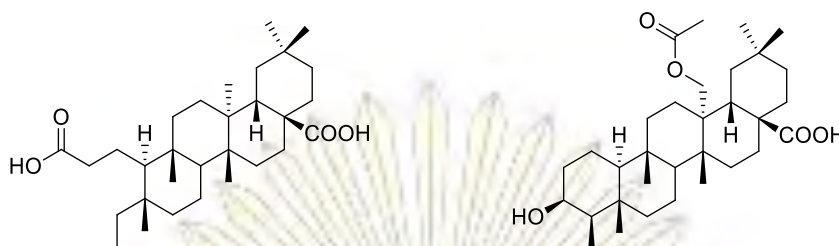
Joshi และคณะ^๘ (2000) ทำการแยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอลจากเมล็ดของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม coumarins 1 ชนิด คือ 12-methoxyinophyllum-D พร้อมกับสารที่มีรายงานมาแล้วทั้งหมด 7 ชนิด คือ inophyllums A, B, C, D, P และ calophyllolide



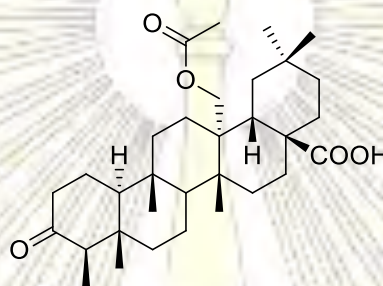
12-methoxyinophyllum-D

รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากเมล็ดของต้น *Calophyllum inophyllum*

Laure และคณะ^๙ (2005) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล จากใบของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม friedelane-type triterpenoids คือ 3,4-secofriedelan-3,28-dioic acid, 27-hydroxyacetate canophyllic acid และ 3-oxo-27-hydroxyacetate friedelan-28- oic acid



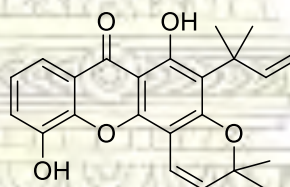
3,4-secofriedelan-3,28-dioic acid 27-hydroxyacetate canophylllic acid



3-oxo-27-hydroxyacetate friedelan-28-oic acid

รูปที่ 1.7 สารที่สกัดได้จากใบของต้น *Calophyllum inophyllum*

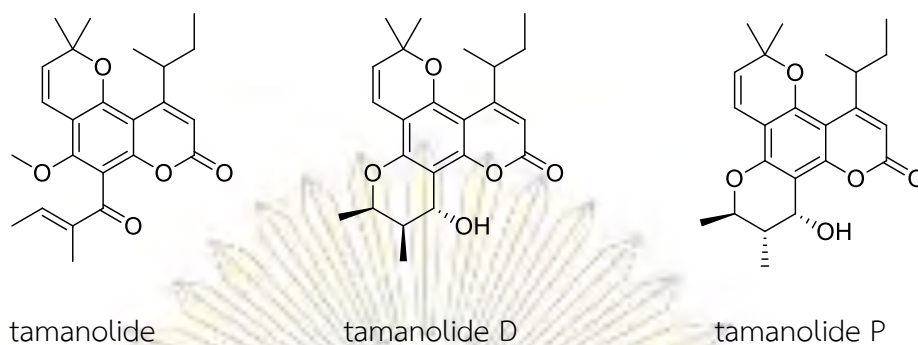
Ee และคณะ¹⁰ (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และเมทานอลจากรากของต้น *Calophyllum inophyllum* พบว่าได้สารชนิดใหม่ในกลุ่ม prenylated pyranoxanthenes 1 ชนิด คือ inophyllin A ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไขเลือดออกได้ นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม triterpenoides ที่มีรายงานแล้วอีก 2 ชนิด คือ friedelin และ stigmasterol



inophyllin A

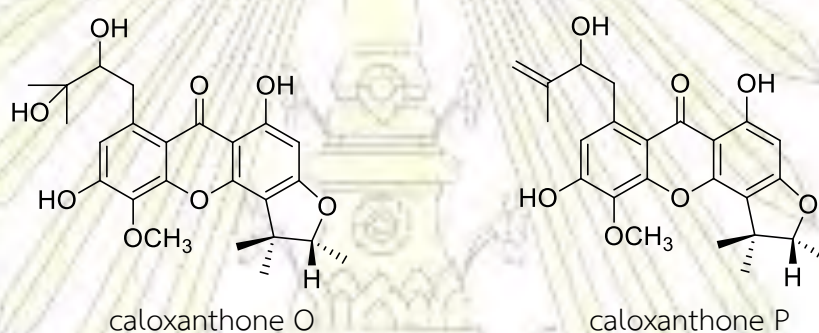
รูปที่ 1.8 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Calophyllum inophyllum*

Leu และคณะ¹¹ (2009) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนจากเมล็ดของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารใหม่ 3 ชนิด ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่ม pyranocoumarins คือ tamanolide, tamanolide D และ tamanolide P



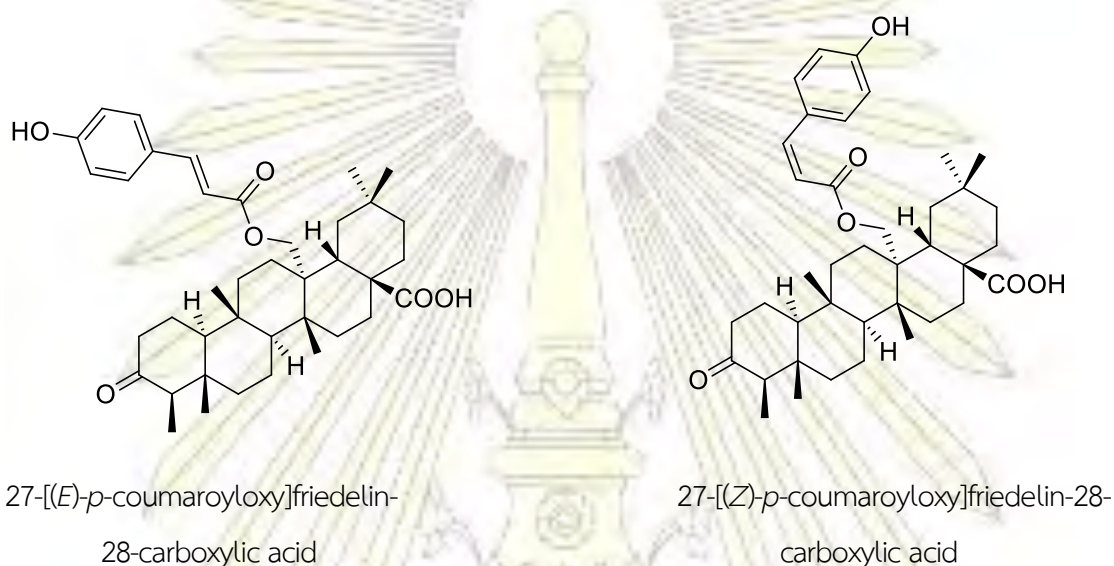
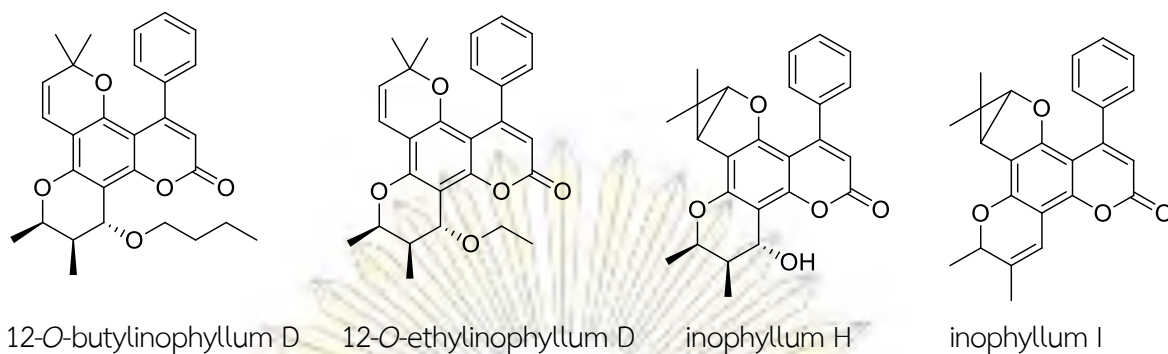
รูปที่ 1.9 สารที่สกัดได้จากเมล็ดของต้น *Calophyllum inophyllum*

Dai และคณะ¹² (2010) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทานอลจากกิ่งของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม prenylated xanthenes 2 ชนิด คือ caloxanthone O และ caloxanthone P โดย caloxanthone O ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งในกระเพาะอาหารได้ดี



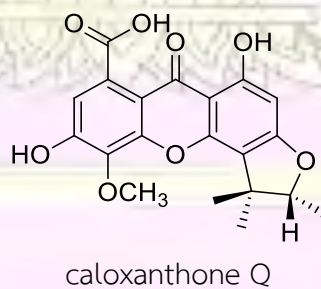
รูปที่ 1.10 สารที่สกัดได้จากกิ่งของต้น *Calophyllum inophyllum*

Zou และคณะ¹³ (2010) แยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอลและคลอโรฟอร์มจากใบของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม coumarins ทั้งหมด 4 ชนิดคือ 12-*O*-butylinophyllum D, 12-*O*-ethylinophyllum D, inophyllum H และ inophyllum I นอกจากนี้ยังพบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม triterpenoides อีก 2 ชนิด คือ 27-[(*E*)-*p*-coumaroyloxy]friedelin-28-carboxylic acid และ 27-[(*Z*)-*p*-coumaroyloxy]friedelin-28-carboxylic acid พร้อมกับสารที่มีการรายงานแล้วอีก 9 ชนิด



รูปที่ 1.11 สารที่สกัดได้จากใบของต้น *Calophyllum inophyllum*

Wei และคณะ¹⁴ (2011) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทานอลจากกิ่งของต้น *Calophyllum inophyllum* พบสารชนิดใหม่ในกลุ่ม prenylated xanthenes 1 ชนิด คือ caloxanthone Q และสารในกลุ่มเดียวกันที่มีการรายงานมาแล้วอีก 3 ชนิด คือ jacareubin, 2-deprenylrheediaxanthone B, และ 6-deoxyjacareubin



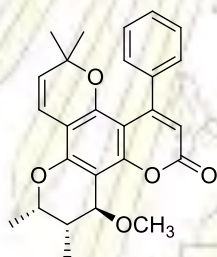
รูปที่ 1.12 สารที่สกัดได้จากกิ่งของต้น *Calophyllum inophyllum*

Ee และคณะ¹⁵ (2011) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต และ เมทานอล จากเปลือกของต้น *Calophyllum inophyllum* สามารถแยกสารชนิดใหม่ในกลุ่ม furanoxanthenes 1 ชนิด ได้แก่ inophinnin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ และพบสารกลุ่ม xanthenes ที่มีรายงานแล้ว คือ inophyllin A, macluraxanthone, pyranojacareubin และ 4-hydroxyxanthone และสารในกลุ่ม triterpenenoides อีก 3 ชนิด คือ friedelin, stigmasterol และ betulinic acid

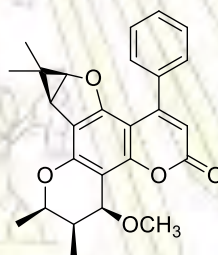


รูปที่ 1.13 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Calophyllum inophyllum*

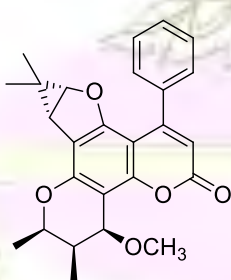
Li และคณะ¹⁶ (2016) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทานอลจากใบของต้น *Calophyllum inophyllum* สามารถแยกสารได้ทั้งหมด 6 ชนิด โดยเป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่ม coumarins 4 ชนิดคือ (-)-12-methoxyinophyllumA, (+)-12-methoxyinophyllumH-1, (-)-12-methoxyinophyllum H-2 และ inophyllum J



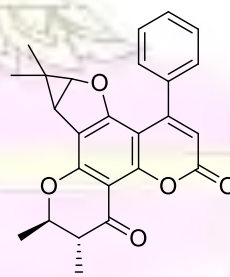
(-)-12-methoxyinophyllumA



(+)-12-methoxyinophyllumH-1



(-)-12-methoxyinophyllum H-2



inophyllum J

รูปที่ 1.14 สารที่สกัดได้จากใบของต้น *Calophyllum inophyllum*

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากของต้นกระทิงโดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์โครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของรากต้นกระทิงด้วยข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโตรเมตรี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เป็นต้น รวมถึงนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าต้นกระทิงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และมักมีการรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ อีกทั้งในรายงานที่ผ่านมาพบว่าส่วนรากของต้นกระทิงยังมีงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ มาก ทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดที่จะแยกองค์ประกอบทางเคมีจากรากต้นกระทิง และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของพืชชนิดนี้

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดแยกองค์ประกอบทางเคมีจากรากต้นกระทิง
2. พิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากต้นกระทิงด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากต้นกระทิง

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

2.1 พี่ตัวอย่าง

รากต้นกระดังงาที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ เก็บมาจากจังหวัดมหาสารคาม เมื่อเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. ปีกเกอร์ (beaker)
4. กระดาษกรอง (filter paper)
5. กรวยแก้ว (glass funnel)
6. แท่งแก้วคนสาร (glass rod)
7. หลอดหยดสาร (dropper)
8. หลอดคะปิลลารี (capillary tube)
9. หลอดทดลอง (test tube)
10. ขวดกำหนดปริมาตร (volumetric flask)
11. ไมโครปิเปต (micropipette)
12. เครื่อง hotplate stirrer
13. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง
14. เครื่อง Mass Spectrometer รุ่น Trio 2000
15. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer
16. UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ Short wave length = 254 nm และ Long wave length = 365 nm
17. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
18. เครื่อง radical chromatograph ยี่ห้อ โครมาโททรอน (Chromatotron[®])
19. เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

2.3 สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล
2. ซิลิกาเจลเบอร์ 7743 สำหรับทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (open column chromatography)
3. ซิลิกาเจลเบอร์ 7749 สำหรับทำ Preparative thin layer chromatography (PTLC)
4. แผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) ชนิด PF254 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง และจัดหารากต้นกระทิง อุปรกรณ์ และสารเคมี
2. เตรียมสารสกัดจากรากต้นกระทิงด้วยตัวทำละลายเมทานอล ศึกษาหาอัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสม เวลาที่ใช้ในการสกัด 3 วัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้ง (ระเหยตัวทำละลายออก) ตรวจสอบจำนวนองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดด้วย thin layer chromatography (TLC)
3. แยกสารสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ศึกษาหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ทำการสกัดซ้ำโดยการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่
4. พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์ด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ แมสสเปกโตรเมตรี (MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของสารที่ทราบสูตรโครงสร้างแล้ว
5. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้ตัวดูดซับ (Stationary Phase) คือ ซิลิกาเจล ชนิด 60G Art. 7734

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือ ในตอน

แรกต้องทำการเขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจล กับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกาเจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้ง แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ในการคลุกกับสารที่ต้องการแยก ให้นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งก่อนใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระแทกกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลาย ด้านบนในคอลัมน์ จากนั้นจึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ได้

2.5.2 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการระบุระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่มีสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคอปิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรอง และมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยส่องด้วย UV Lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H₂SO₄ แล้วอบที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตรปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสารจากนั้นใช้หลอดคะปิลารีจุ่มลงไปในการละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็กๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตรและแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากที่ได้จุดสารที่แต้มแห้งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิมตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้วทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อยจากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร

- นำแผ่น TLC ไปส่องกับแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV ของสาร
- ในกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสง UV ให้นำแผ่น TLC ไปจุ่มลงใน anisaldehyde ใน conc. H_2SO_4 แล้วเป่าด้วยลมร้อนให้แห้งตำแหน่งที่มีสารจะปรากฏให้เห็น

2.5.3 Preparative thin layer chromatography (PTLC)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต่างชนิดกันจะเคลื่อนที่ในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน วิธีการคล้ายกับเทคนิค TLC ข้อดีของวิธีการแยกนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี ข้อเสียคือ ใช้สารปริมาณมากและสูญเสียสารในขณะทำการแยก

ก. การเตรียมวัฏภาคนิ่ง นำกระจกไปเคลือบด้วยซิลิกาเจลหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จากนั้นรอให้ซิลิกาเจลที่เคลือบนั้นแห้ง หรือนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชม.

ข. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิมตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ค. การแต้มสารนำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลมาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดขอบด้านข้างทั้งซ้ายและขวาให้ห่างจากขอบประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นใช้หลอดหยดสาร

ดูดสารที่ต้องการแยกโดยหลอดหยดสารนั้นหุ้มด้วยสำลีที่ปลาย แล้วปล่อยสารนั้นบนแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่ที่ระดับเริ่มต้นสูงจากขอบล่างประมาณ 2 เซนติเมตร ปล่อยให้สารแล้วลากเป็นเส้นตรงจากขอบด้านซ้ายไปด้านขวาหรือตามความถนัดหลังจากสารที่แต้มแห้งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ง. การ develop นำแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่แต้มสารเรียบร้อยแล้ว จุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิมมิดด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้วทั้งนี้ระดับของสารบนแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อย จากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตรแล้ว จึงนำแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนซิลิกาเจลที่เคลือบบนกระดาษแห้ง หากทำการ develop มากกว่า 1 แผ่นในครั้งเดียวควรระวังไม่ให้แผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วซ้อนทับหรือแนบสนิทติดกัน

จ. การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่นกระดาษที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลไปส่องกับสาร UV จากนั้นลากเส้นขอบของแถบสารที่แยกด้วยดินสอ แล้วขีดแถบสารนั้นลงในขวดรูปชมพู่

ฉ. การสกัดสารออกจากซิลิกาเจล นำแถบสารที่ขีดออกมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วนำไป stir 10 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกซิลิกาเจลออก จะได้สารที่ต้องการแล้วนำสารที่ได้นั้นไประเหยตัวทำละลายออก

2.5.4 Radical chromatograph โครมาโททรอน (Chromatotron[®])

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยกหยดลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลหนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ใสตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่อง โดยแผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมขณะทำการแยก แล้วทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาทีเนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยให้เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้นเมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟีและนอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารที่แยกได้ทันทีโดยใช้ UV Lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

- ก. การเตรียมวัตถุดิบ ซังซิลิกาเจล หนัก 37.0 กรัม ผสมน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียว จากนั้นนำไปเคลือบด้านบนแผ่นแก้วทรงกลม
- ข. รอให้แผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลแห้งแล้วมาปรับความหนาของซิลิกาให้มีขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร
- ค. เปิดเครื่องโครมาโทรอนแล้วหยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ขณะกำลังหมุน
- ง. ปล่อยให้ตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในเครื่องโครมาโทรอน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นแถบสารที่แยกได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมและทำการเก็บแฟรงชันตามแถบสารที่แยกได้

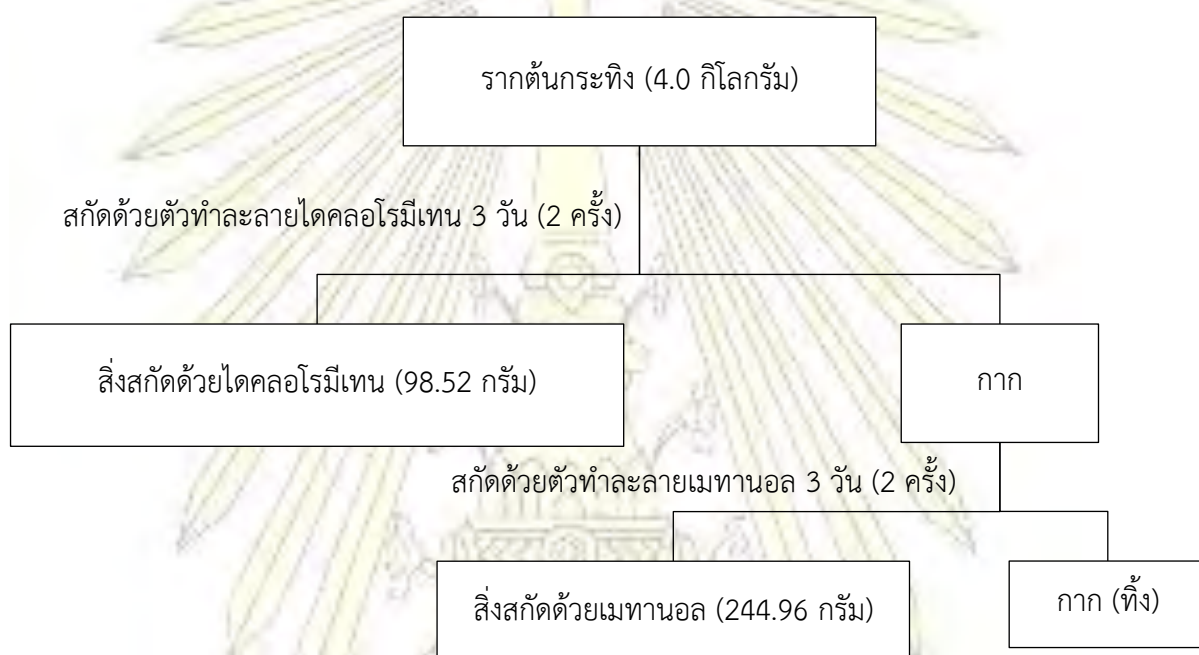
2.5.5 High-performance liquid chromatography (HPLC)

เทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) สำหรับเครื่อง HPLC เฟสคงที่ คือ สารที่อยู่ภายในคอลัมน์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง HPLC สารดังกล่าวจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์โดยตัวทำละลายอินทรีย์ผสม เพื่อให้เกิดการแยกสาร โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ (Stationary phase) และความสามารถในการละลายของสารผสม ใช้สำหรับวิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย (Non-Volatile Organic Compounds) หรือ กลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ปานกลาง (Semi-Volatile Organic Compounds) ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการวิเคราะห์กับตัวทำละลายอินทรีย์ผสมที่ใช้ก่อน เพื่อป้องกันการไม่ละลายเข้าด้วยกัน หรือการตกตะกอนของตัวทำละลายผสม และไม่ให้เกิดการอุดตันในระบบ รวมถึงพิจารณาค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของตัวทำละลายอินทรีย์

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำรากต้นกระทิงที่ตากแห้ง (4.0 กิโลกรัม) นำมาบดให้ได้ผงละเอียด จากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ได้สิ่งสกัดเอทิลอะซิเตต มีลักษณะเป็นเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำกากที่เหลือมาสกัดต่อด้วยเมทานอลอีกครั้ง ได้สิ่งสกัดเมทานอล มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.6.1



แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดรากต้นกระทิง

2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดรากต้นกระทิงที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลที่มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดด้วยเมทานอลหนัก 244.96 กรัม

2. นำสิ่งสกัดด้วยเมทานอลมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 6 แฟรงชัน (A-F)

3. นำสารแต่ละแฟรงชัน (A-F) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละ แฟรงชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของ 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่

5. นำแฟรงชัน B มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายผสม 20% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต แล้วชะต่อด้วย 50% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 5 แฟรงชัน (B_1 - B_5) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรงชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรงชัน B_1 , B_3 และ B_5 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแฟรงชัน B_1 มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 12 แฟรงชัน ($B_{1.1}$ - $B_{1.12}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรงชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 5% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรงชัน $B_{1.3}$, $B_{1.5}$ และ $B_{1.10}$ มีสารที่น่าสนใจ

-นำแฟรงชัน $B_{1.3}$ มาทำการแยกต่อด้วย PTLC โดยระบบตัวทำละลายผสม 15% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน พบว่าที่แฟรงชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 1 และสาร 2

-นำแฟรงชัน $B_{1.5}$ มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยตัวทำละลาย 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน แล้วแยกตะกอนออก พบว่าที่แฟรงชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 6

-นำแฟรงชัน $B_{1.10}$ มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยตัวทำละลาย 30% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน แล้วแยกตะกอนออก พบว่าที่แฟรงชันนี้ได้สารที่มีความ

บริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 7

7. นำแฟรกชัน B₃ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 10

8. นำแฟรกชัน B₅ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล เก็บสารละลายจากโครมาโทรอน สารสกัดทั้งหมด 4 แฟรกชัน (B_{5.1} - B_{5.4}) นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน B_{5.1} มีสารที่น่าสนใจ

-นำแฟรกชัน B_{5.1} มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิค HPLC ด้วย Reverse phase column โดยชะด้วยตัวทำละลาย 70% เมทานอล-น้ำ เก็บสารละลายจากคอลัมน์ สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน ที่เวลา 16 นาที และ 24 นาที พบว่าทั้ง 2 แฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 11 และสาร 12 ตามลำดับ

9. นำแฟรกชัน C มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลชะด้วยตัวทำละลายผสม 20% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต แล้วชะต่อด้วย 50% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 4 แฟรกชัน (C₁-C₄) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 15% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน C₂ และ C₃ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน C₂ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 5

- นำแฟรกชัน C₃ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทรอน โดยชะด้วยตัวทำละลาย 10% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 3 และสาร 4

10. นำแฟรกชัน E มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีนำแฟรกชัน E มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลชะด้วยตัวทำละลายผสม 20% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต จนถึง 100% เมทานอลโดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (E₁-E₂) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบ

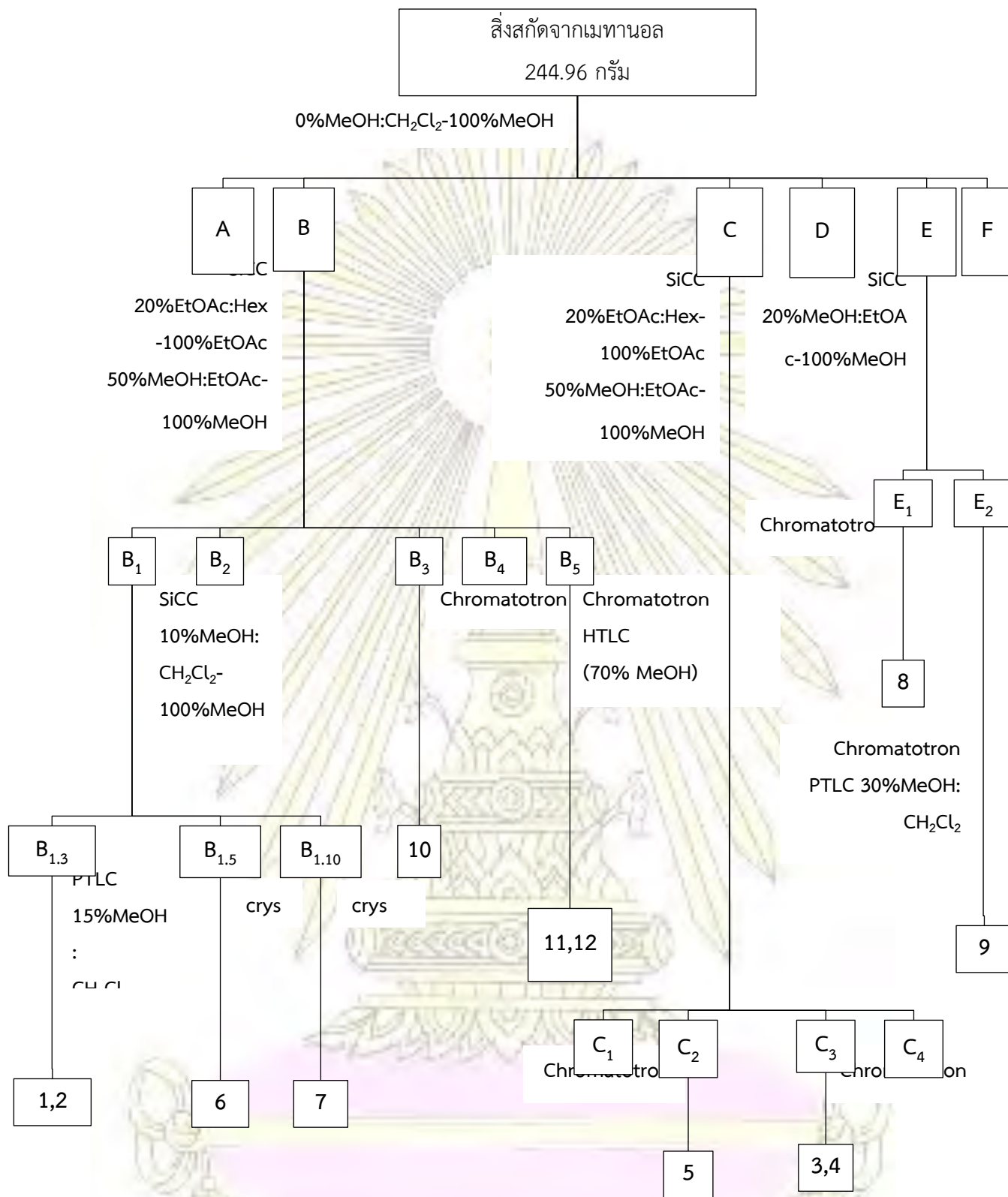
ด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน E_1 และ E_2 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

11. นำแฟรกชัน E_1 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 8

12. นำแฟรกชัน E_2 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 12 แฟรกชัน ($E_{2.1}$ - $E_{2.12}$) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 20% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน $E_{2.2}$ น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

-นำแฟรกชัน $E_{2.2}$ มาทำการแยกต่อด้วย PTLC โดยระบบตัวทำละลายผสม 30% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน พบว่าที่แฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 9

13. นำสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้หนู



แผนภาพที่ 2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของรากต้นกระทิง

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method

1. เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLaS-3 ให้ได้ความเข้มข้น 3×10^3 เซลล์ ใน 200 μL ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งมี 5% ปริมาตรต่อปริมาตร fetal calf serum เป็นองค์ประกอบ

2. เติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไป ใน 96-well culture plate

3. นำเซลล์มะเร็งที่อยู่ใน 96-well culture plate มาบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. เติมสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐาน adriamycin ลงไปที่ความเข้มข้นต่างๆ 2 μL ต่อ 1 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

5. เติม 10 μL ของสารละลาย 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml ลงไป บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C แยกเอาส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่เหลือมาละลายด้วย DMSO 150 μL และเติม 0.1 M glycine ปริมาตร 25 μL ลงไป

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่า IC_{50}

2.7.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้หนู

1. เตรียมสารละลาย α -glucosidase (0.4 U/mL) และ substrate (1 mM-p-nitrophenyl-(α -D-glucopyranoside) ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9

2. จากนั้นเติมสารตัวอย่างที่จะทดสอบ (1 mg/mL ใน DMSO) ปริมาตร 10 μL L ใน 96 well plate แล้วเติมสารละลาย α -glucosidase ปริมาตร 20 μL จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ

3. เติมสารละลาย substrate (glucose kit) ปริมาตร 80 μL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

4. นำ 96 well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm (Bio-Rad 3550 microplate reader)

5. นำผลที่ได้ไปคำนวณ %การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

โดย
$$\% \text{inhibition} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยมีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม
 A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยไม่มีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม
ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับ ความเข้มข้นซึ่งความเข้มข้นที่ 50% inhibition จะมีค่าเป็น IC_{50}

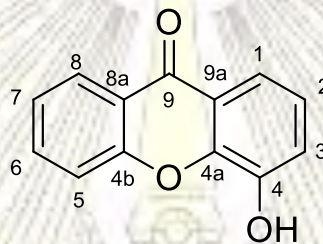


บทที่ 3

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการทดลองพบว่าการสกัดสารจากแฟรกชัน A-F ของสิ่งสกัดเมทานอลจากรากต้นกระทิง พบว่าสามารถแยกสารได้ 12 ชนิด โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยข้อมูลสเปกตรัมจากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคโปรตรอน- และ คาร์บอน 13- นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลกับรายงานที่ผ่านมาหน้านี้

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 1



รูปที่ 3.1 โครงสร้างสาร 1

ตารางที่ 3. 1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 1

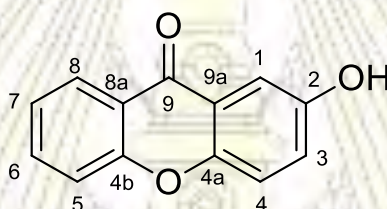
ตำแหน่ง	สาร 1 (CDCl ₃)			4-hydroxyxanthone ¹⁷ (DMSO)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	7.88 (dd)	8.0,1.6	117.9	7.61 (dd)	7.8,1.8	115.2
2	7.29 (t)	7.6	124.8	7.26 (t)	7.8	124.1
3	7.35 (dd)	7.6,1.6	120.5	7.34 (dd)	7.8,1.8	120.2
4-OH	-	-	146.7	10.51 (s)	-	146.7
4a	-	-	145.2	-	-	145.2
4b	-	-	155.4	-	-	155.4
5	7.56 (d)	8.0	118.2	7.73 (dd)	8.0,0.8	118.3
6	7.76 (ddd)	8.0,7.2,1.6	135.5	7.88 (ddd)	8.0,7.6,1.6	135.4
7	7.43 (ddd)	8.0,7.6,0.4	124.6	7.48 (ddd)	8.0,7.6,0.8	124.3

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร 1 (CDCl ₃)			4-hydroxyxanthone ¹⁷ (DMSO)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
8	8.37 (dd)	8.0,2.0	127.3	8.19 (dd)	7.8,1.6	126.0
8a	-	-	120.9	-	-	120.9
9a	-	-	122.2	-	-	122.2
9	-	-	176.9	-	-	176.2

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 1 กับ 4-hydroxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 1 คือ 4-hydroxyxanthone

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 2



รูปที่ 3.2 โครงสร้างสาร 2

ตารางที่ 3. 2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 2

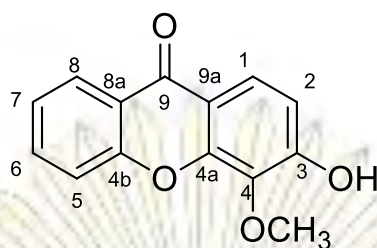
ตำแหน่ง	สาร 2 (DMSO)			2-hydroxyxanthone ¹⁷ (DMSO)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	7.50 (d)	3.2	108.5	7.48 (d)	3.0	108.5
2	-	-	153.9	-	-	153.9
2-OH	9.97 (s)	-	-	10.00 (s)	-	-
3	7.35 (dd)	9.2,3.2	124.5	7.32 (dd)	9.0,3.0	124.5
4	7.58 (d)	8.8	119.4	7.56 (d)	9.0	119.4

ตารางที่ 3.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 2 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร 2 (DMSO)			2-hydroxyxanthone ¹⁷ (DMSO)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
4b	-	-	155.6	-	-	155.5
5	7.70 (d)	8.8	118.1	7.63 (dd)	8.2,0.9	118.1
6	7.87 (t)	7.9	135.2	7.85 (ddd)	8.2,7.6,1.7	135.1
7	7.46 (t)	7.6	123.9	7.45 (ddd)	8.0,7.6,0.9	123.9
8	8.20 (dd)	7.2,0.8	125.9	8.19 (dd)	8.0,1.7	125.9
8a	-	-	120.9	-	-	120.4
9	-	-	175.2	-	-	175.8
9a	-	-	121.3	-	-	121.7

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 2 กับ 2-hydroxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 2 คือ 2-hydroxyxanthone

3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 3



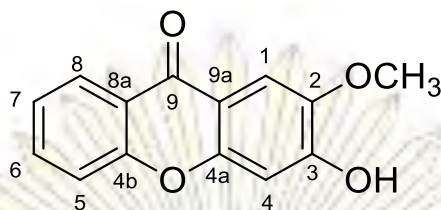
รูปที่ 3.3 โครงสร้างสาร 3

ตารางที่ 3.3 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 3

ตำแหน่ง	สาร 3 (CDCl ₃)			3-hydroxy-4-methoxyxanthone ¹⁸ (DMSO)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	7.40 (d)	9.2	122.4	7.80 (d)	8.9	121.6
2	7.24 (d)	9.2	114.3	7.00 (d)	8.3	114.1
4-OH	-	-	156.3	10.79 (s)	-	156.3
4a	-	-	150.7	-	-	150.7
4b	-	-	155.2	-	-	155.5
5	7.44 (d)	8.0	117.7	7.69 (d)	8.1	118.2
6	7.70 (td)	8.0,1.6	135.2	7.84 (ddd)	8.1,7.5,1.7	135.0
7	7.36 (t)	8.0	123.8	7.46 (ddd)	7.7,7.6,1.0	124.3
8	8.31 (dd)	7.6,1.6	126.7	8.16 (dd)	7.7,1.7	125.9
8a	-	-	120.9	-	-	120.9
9	-	-	175.0	-	-	175.0
9a	-	-	114.5	-	-	114.8
3-OCH ₃	4.05 (s)	-	62.8	3.96 (s)	-	62.8

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 3 กับ 3-hydroxy-4-methoxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร 3 คือ 3-methoxy-4-hydroxyxanthone

3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 4



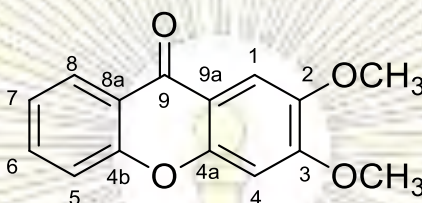
รูปที่ 3.4 โครงสร้างสาร 4

ตารางที่ 3. 4 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 4

ตำแหน่ง	สาร 4 (CDCl ₃)			3-hydroxy-2-methoxyxanthone ¹⁹ (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	7.47 (s)	-	105.6	7.46 (brs)	-	107.9
2	-	-	152.6	-	-	155.1
3	-	-	144.7	-	-	144.4
3-OH	-	-	-	9.74 (s)	-	-
4	7.01 (s)	-	102.9	7.19 (brs)	-	100.0
4a	-	-	155.1	-	-	155.1
4b	-	-	150.8	-	-	150.8
5	7.70 (d)	8.4	117.9	7.60 (d)	8.4	117.5
6	7.69 (ddd)	8.8,7.6,1.6	134.2	7.81 (ddd)	8.4,7.2,1.8	134.2
7	7.37 (dd)	8.0,7.2	123.9	7.44 (dd)	7.8,7.2	123.6
8	8.34 (dd)	7.8,1.6	126.7	8.15 (dd)	7.8,1.8	125.3
8a	-	-	120.6	-	-	120.6
9	-	-	174.7	-	-	174.7
9a	-	-	114.8	-	-	114.2
2-OCH ₃	3.95 (s)	-	56.7	3.95 (s)	-	56.0

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 4 กับ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 4 คือ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone

3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 5



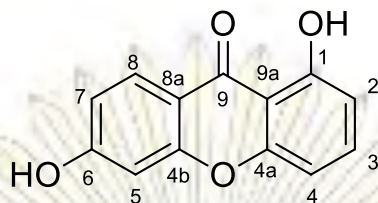
รูปที่ 3.5 โครงสร้างสาร 5

ตารางที่ 3. 5 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 5

ตำแหน่ง	สาร 5 (CDCl_3)		2,3-dimethoxyxanthone ²⁰ (CDCl_3)	
	^1H (δ , ppm)	J (Hz)	^1H (δ , ppm)	J (Hz)
4	6.94 (s)	-	6.90 (s)	-
5	7.47 (d)	8.0	7.49 (d)	8.3
6	7.70 (m)	-	7.67 (m)	-
7	7.38 (t)	8.0	7.36 (t)	7.6
8	8.35 (dd)	8.0, 1.4	8.32 (m)	-
2-OCH ₃	4.03 (s)	-	4.01 (s)	-
3-OCH ₃	4.01 (s)	-	3.99 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 5 กับ 2,3-dimethoxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 5 คือ 2,3-dimethoxyxanthone

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 6



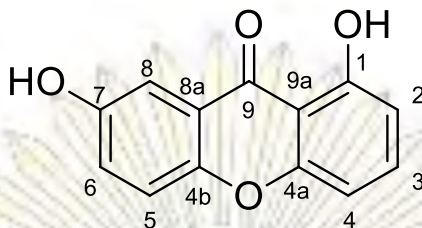
รูปที่ 3. 6 โครงสร้างสาร 6

ตารางที่ 3. 6 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR ของสาร 6

ตำแหน่ง	สาร 6 (CDCl ₃)		1,6-dihydroxyxanthone ²¹ (CDCl ₃)	
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)
1-OH	12.65 (s)	-	12.74 (s)	-
2	-	-	6.66 (d)	8.2
3	7.61 (d)	8.0	7.51 (d)	8.2
4	6.83 (d)	8.0	6.83 (d)	8.2
5	-	-	6.71 (d)	2.1
7	6.85 (dd)	8.0,1.6	6.81 (dd)	8.2,2.1
8	7.82 (dd)	8.0,1.2	7.97 (d)	8.2

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR ของสาร 6 กับ 1,6-hydroxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 6 คือ 1,6-hydroxyxanthone

3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7



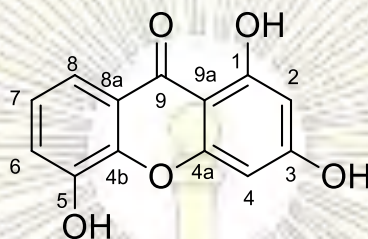
รูปที่ 3. 7 โครงสร้างสาร 7

ตารางที่ 3. 7 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 7

ตำแหน่ง	สาร 7 (CDCl ₃)			1,7-dihydroxyxanthone ²² (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	-	-	163.6	-	-	163.6
1-OH	5.70 (s)	-	-	5.01 (s)	-	-
2	6.79 (dd)	8.0,0.4	110.2	6.77 (dd)	8.4,0.5	110.4
3	7.59 (t)	8.4	138.0	7.59 (t)	8.8	138.0
4	6.93 (dd)	8.4,0.8	107.1	6.95 (dd)	8.4,0.5	107.0
4a	-	-	157.0	-	-	157.0
4b	-	-	131.0	-	-	131.0
5	7.41 (d)	9.2	119.6	7.41 (d)	9.3	119.5
6	7.33 (dd)	9.2,2.8	126.0	7.33 (dd)	9.3,2.9	126.0
7	-	-	154.7	-	-	154.7
7-OH	12.62 (s)	-	-	12.62 (s)	-	-
8	7.62 (dd)	2.8	108.0	7.63 (d)	2.9	108.0
8a	-	-	120.9	-	-	121.0
9	-	-	179.9	-	-	181.5
9a	-	-	109.0	-	-	109.0

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 7 กับ 1,7-dihydroxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 7 คือ 1,7-dihydroxyxanthone

3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 8



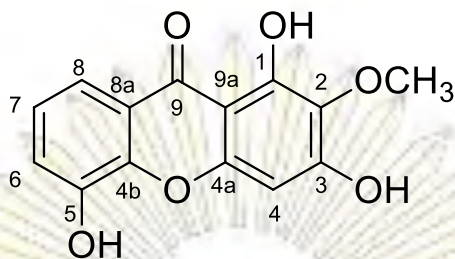
รูปที่ 3. 8 โครงสร้างสาร 8

ตารางที่ 3. 8 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 8

ตำแหน่ง	สาร 8 (DMSO)		1,3,5-trihydroxyxanthone ²³ (DMSO)	
	^1H (δ , ppm)	J (Hz)	^1H (δ , ppm)	J (Hz)
1-OH	12.89 (s)	-	12.87 (s)	-
2	6.10 (d)	2.0	6.19 (d)	2.1
4	6.32 (d)	2.0	6.41 (d)	2.1
6	7.27 (dd)	7.6,1.6	7.29 (dd)	7.7,1.7
7	7.20 (t)	7.6	7.23 (t)	7.8
8	7.50 (dd)	7.6,1.6	7.53 (dd)	7.8,1.7

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 8 กับ 1,3,5-trihydroxyxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 8 คือ 1,3,5-trihydroxyxanthone

3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 9



รูปที่ 3. 9 โครงสร้างสาร 9

ตารางที่ 3. 9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ¹³C-NMR ของสาร 9

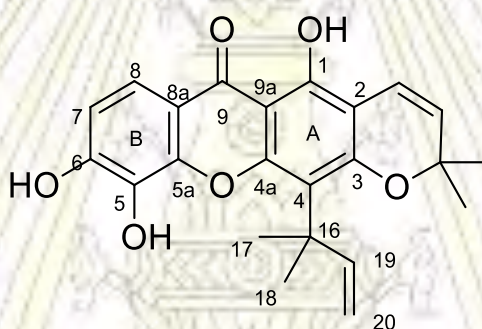
ตำแหน่ง	สาร 9 (CDCl ₃)			Tovopyrifolin ²⁴ (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1	-	-	155.8	-	-	155.3
1-OH	12.52 (s)	-	-	13.11 (s)	-	-
2	-	-	130.9	-	-	131.5
2-OCH ₃	3.76 (s)	-	-	3.86 (s)	-	-
3	-	-	160.2	-	-	159.2
3-OH	-	-	-	9.48 (s)	-	-
4	6.51 (s)	-	94.4	6.52 (s)	-	94.7
4a	-	-	153.9	-	-	153.8
4b	-	-	-	-	-	-
5	-	-	146.2	-	-	146.9
5-OH	-	-	-	9.62 (s)	-	-
6	7.34 (d)	8.0	120.8	7.34 (dd)	8.2,1.8	121.3
7	7.24 (t)	8.0	124.8	7.28 (t)	7.5	124.8
8	7.54 (d)	8.0	114.8	7.64 (dd)	7.5,1.8	116.1
8a	-	-	121.7	-	-	121.7
9	-	-	180.2	-	-	182.1

ตารางที่ 3.9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ¹³C-NMR ของสาร 9 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร 9 (CDCl ₃)			Tovopyrifolin ²⁴ (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
9a	-	-	104.0	-	-	104.0
10a	-	-	146.2	-	-	146.1
OCH ₃	-	-	59.4	-	-	60.7

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR และ¹³C-NMR ของสาร 9 กับ tovopyrifolin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 9 คือ tovopyrifolin

3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 10



รูปที่ 3.10 โครงสร้างสาร 10

ตารางที่ 3.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 10

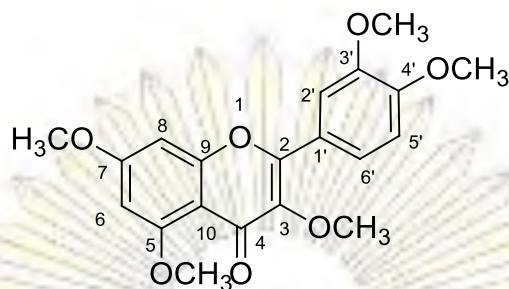
ตำแหน่ง	สาร 10 (CDCl ₃)			Macluraxanthone ²⁵ (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
1-OH	13.54 (s)	-	-	13.52 (s)	-	-
1'	5.61 (d)	9.6	116.4	5.60 (d)	9.9	116.4

ตารางที่ 3.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 10 (ต่อ)

ตำแหน่ง	สาร 10 (CDCl ₃)			Macluraxanthone ²⁵ (CDCl ₃)		
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹³ C (δ, ppm)
2'	6.77 (d)	10.0	128.2	6.78 (d)	9.9	128.2
2''	6.73 (dd)	17.2,10.4	146.2	6.75 (dd)	17.6,10.5	146.7
3a''	5.22 (d)	17.6	-	5.22 (d)	17.7	-
3b''	5.05 (d)	10.8	-	5.04 (d)	10.5	-
4'	1.51 (s)	-	28.9	1.51 (s)	-	28.0
4''	1.63 (s)	-	29.9	1.64 (s)	-	29.9
5'	1.51 (s)	-	28.9	1.51 (s)	-	28.0
5''	1.63 (s)	-	29.9	1.64 (s)	-	29.9
7	6.96 (d)	8.8	113.7	6.92 (d)	9.0	113.7
8	7.69 (d)	8.8	117.2	7.68 (d)	9.0	117.2

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR และ ¹³C-NMR ของสาร 10 กับ macluraxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 10 คือ macluraxanthone

3.11 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 11



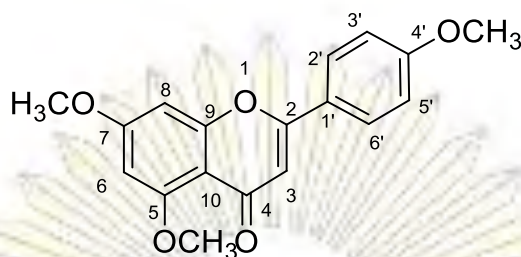
รูปที่ 3.11 โครงสร้างสาร 11

ตารางที่ 3. 11 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR ของสาร 11

ตำแหน่ง	สาร 11 (CDCl ₃)		3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone ²⁶ (CDCl ₃)	
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)
H-6	6.35 (d)	2.0	6.35 (d)	2.5
H-8	6.51 (d)	2.4	6.51 (d)	3.0
H-2'	7.72 (s)	-	7.72 (s)	-
H-5'	6.98 (d)	8.8	6.94 (d)	9.0
H-6'	7.70 (d)	8.8	7.70 (d)	9.0
5xOCH ₃	3.90 (s)	-	3.92 (m)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR ของสาร 11 กับ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 11 คือ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone

3.12 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 12



รูปที่ 3.12 โครงสร้างสาร 12

ตารางที่ 3. 12 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม¹H-NMR ของสาร 12

ตำแหน่ง	สาร 12 (CDCl ₃)		5,7,4'-trimethoxyflavone ²⁷ (DMSO)	
	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)	¹ H (δ, ppm)	J (Hz)
H-3	6.59 (s)	-	6.86 (s)	-
H-6	6.56 (d)	2.0	6.51 (s)	-
H-8	6.37 (d)	2.0	6.68 (s)	-
H-2'	7.72 (s)	-	7.72 (s)	-
H-5'	7.00 (d)	9.2	7.10 (d)	8.9
H-6'	7.83 (d)	9.2	8.0 (d)	8.9
5-OCH ₃	3.88 (s)	-	3.83 (s)	-
7-OCH ₃	3.91 (s)	-	3.85 (s)	-
4'-OCH ₃	3.96 (s)	-	3.90 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹H-NMR ของสาร 12 กับ 5,7,4'-trimethoxyflavone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 12 คือ 5,7,4'-trimethoxyflavone

3.13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการนำสารทั้งหมด (1-12) ที่แยกได้โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ KB และ HeLaS-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.13

ตารางที่ 3. 13 ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (1-12) และสารมาตรฐาน adriamycin

สาร	ค่า IC ₅₀ (μM)	
	KB	HeLaS-3
1	65.0±1.69	>100
2	93.3±1.50	>100
3	66.9±1.72	>100
4	>100	>100
5	>100	>100
6	71.9±0.49	>100
7	>100	>100
8	70.4±0.55	>100
9	>100	>100
10	>100	>100
11	>100	>100
12	>100	>100
adriamycin	0.23±0.44	0.12±0.01

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB พบว่า สาร 1, 2, 3, 6 และ 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ต่ำ โดยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 65.0-93.3 μM เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน adriamycin IC₅₀ = 0.23 μM ส่วนสารอื่น ๆ นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB เนื่องจากมีค่า IC₅₀ > 100 μM

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLaS-3 พบว่า สารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 14 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HeLaS-3 เนื่องจากมีค่า IC₅₀ > 100 μM เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน adriamycin IC₅₀ = 0.12 μM

3.14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

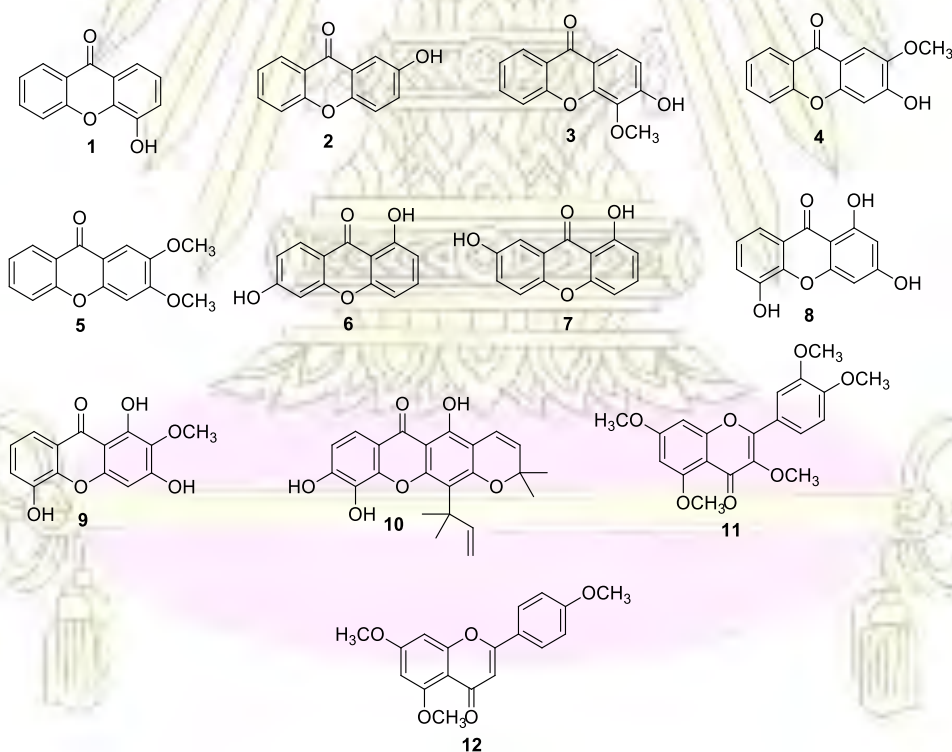
จากการนำสารทั้งหมด (1-12) ที่แยกได้โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากไส้หนู (มอลเทส และซูเครส) พบว่าสารทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากไส้หนู (มอลเทส และซูเครส) เนื่องจากมีค่า $IC_{50} > 3,000 \mu M$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน acarbose ซึ่งมีค่า IC_{50} 7.9 และ 10.9 μM ตามลำดับ



บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งสกัดเมทานอลของรากต้นกระเทียมมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีพบว่า แยกได้สารในกลุ่มแซนโทน 10 ชนิด คือ 4-hydroxyxanthone (1), 2-hydroxyxanthone (2), 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (3), 3 - hydroxy-2 - methoxyxanthone (4), 2,3-dimethoxyxanthone (5), 1,6-dihydroxyxanthone (6), 1,7-dihydroxyxanthone (7), 1,3,5-trihydroxyxanthone (8), tocopyrifolin (9), macluraxanthone (10) สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ 2 ชนิด คือ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (11) และ 5,7,4'-trimethoxyflavone (12) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB, ชนิด HeLaS-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าสาร 1, 2, 3, 6 และ 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ต่ำ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 65.0-93.3 μM และสารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 12 ชนิดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HeLaS-3 เนื่องจากมีค่า $IC_{50} > 100 \mu M$ นอกจากนี้ยังมีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไ้หนุ (มอลเทศ และซูเครส) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่าสารทั้งหมดไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไ้หนุ (มอลเทศ และซูเครส) เนื่องจากมีค่า $IC_{50} > 3,000 \mu M$



รูปที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 1-12

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB พบว่า สาร 1, 2, 3, 6 และ 8 มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ต่ำ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 65.0-93.3 μM เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน adriamycin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 μM ส่วนสารอื่น ๆ นั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB เนื่องจากมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM

การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง HeLaS-3 พบว่า สารสกัดบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 12 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HeLaS-3 เนื่องจากมีค่า IC_{50} มากกว่า 100 μM เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน adriamycin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 μM

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไ้หนูไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (มอลทอส และ ซูเครส) เนื่องจากมีค่า $IC_{50} > 3,000 \mu M$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน acarbose ซึ่งมีค่า IC_{50} 7.9 และ 10.9 μM ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ในสิ่งสกัดเมทานอลมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาจำกัด ดังนั้นควรแยกในส่วนนี้ต่อไป
2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดเมทานอลเพียงชนิดเดียว เพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัด เช่น เอทิลอะเซเตต, เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน เป็นต้น
3. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากรากเท่านั้น อาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนอื่นอีกที่น่าสนใจ เช่น ต้น, ใบ และผล เป็นต้น
4. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจ

เอกสารอ้างอิง

1. wikipedia. [online] กระทั่ง (พรรณไม้).
[https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8%87_\(%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%93%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%89\)](https://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8%87_(%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B8%A3%E0%B8%93%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%89)) (accessed 17 January 2016).
2. medthai. [online] กระทั่ง.
<https://medthai.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8%87/> (accessed 17 January 2017).
3. Yimdjo, M. C.;Azebaze, A. G.;Nkengfack, A. E.;Meyer, A. M.;Bodo, B.;Fomum, Z. T., Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **2004**, *65* (20), 2789-2795.
4. Govindachari, T. R. V., N.; Pai, B. R.; Rao, U. R.; Srinivasan, M., Triterpenes of *calophyllum inophyllum* linn. *Tetrahedron* **1967**, *23* (4), 1901-1910.
5. Falk, S. L., H.D. , Xanthones in the Heartwood of *Calophyllum inophyllum*: A Geographical Survey. *Phytochemistry*. **1971**, *10*, 603-606.
6. Goh, S.;Jantan, I., A xanthone from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **1991**, *30* (1), 366-367.
7. linuma, M.;Tosa, H.;Tanaka, T.;Yonemori, S., Two xanthones from roots of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (3), 725-728.
8. Joshi, S. P.;Deodhar, V. B.;Phalgune, U. D., A new coumarin from the seeds of *Calophyllum inophyllum* Linn. **2000**.
9. Laure, F.;Herbette, G.;Faure, R.;Bianchini, J.;Raharivelomanana, P.;Fogliani, B., Structures of new secofriedelane and friedelane acids from *Calophyllum inophyllum* of French Polynesia. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43* (1), 65-68.
10. Ee, G.;Kua, A.;Lim, C.;Jong, V.;Lee, H., Inophyllin A, a new pyranoxanthone from *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae). *Nat.Prod. Res.* **2006**, *20* (05), 485-491.
11. Leu, T.;Raharivelomanana, P.;Soulet, S.;Bianchini, J.;Herbette, G.;Faure, R., New tricyclic and tetracyclic pyranocoumarins with an unprecedented C-4 substituent. Structure elucidation of tamanolide, tamanolide D and tamanolide P from *Calophyllum inophyllum* of French Polynesia. *Magn Reson Chem* **2009**, *47* (11), 989-993.

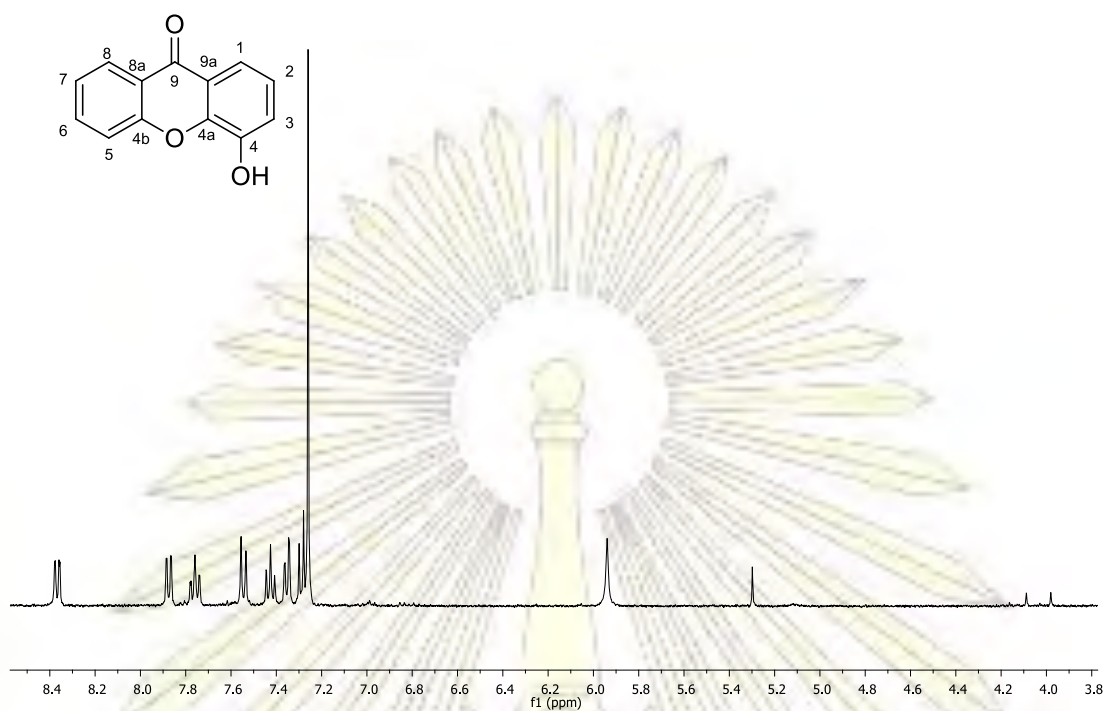
12. Dai, H.-F.;Zeng, Y.-B.;Xiao, Q.;Han, Z.;Zhao, Y.-X.;Mei, W.-L., Caloxanthenes O and P: two new prenylated xanthenes from *Calophyllum inophyllum*. *Molecules* **2010**, *15* (2), 606-612.
13. Zou, J.;Wu, J.;Liu, S. Z.;Zhao, W. M., New coumarins and triterpenes from *Calophyllum inophyllum*. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93* (9), 1812-1821.
14. Wei, D.-J.;Mei, W.-L.;Zhong, H.-M.;Zeng, Y.-B.;Wu, X.-D.;Dai, H.-F., A new prenylated xanthone from the branches of *Calophyllum inophyllum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2011**, *13* (03), 265-269.
15. Ee, G. C. L.;Mah, S. H.;Rahmani, M.;Taufiq-Yap, Y. H.;Teh, S. S.;Lim, Y. M., A new furanoxanthone from the stem bark of *Calophyllum inophyllum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2011**, *13* (10), 956-960.
16. Li, Z.-l.;Li, Y.;Qin, N.-b.;Li, D.-h.;Liu, Z.-g.;Liu, Q.;Hua, H.-m., Four new coumarins from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry Lett.* **2016**, *16*, 203-206.
17. Fernandes, E. G.;Silva, A. M.;Cavaleiro, A.;Silva, F. M.;Borges, J. M. F. M.;Pinto, M. M., and Spectroscopy of Mono-, Di-, Tri-¹H ¹³C NMR and Tetrasubstituted Xanthenes. *Magn Reson Chem* **1998**, *36* (305), 309.
18. Delle Monache, F.;Mac-Quhae, M. M.;Delle Monache, G.;Bettolo, G. M.;De Lima, R. A., Xanthenes, xanthonolignoids and other constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry* **1983**, *22* (1), 227-232.
19. Nielsen, H.;Arends, P., Xanthone constituents of *Hypericum* and *rosaemum*. *J. Nat. Prod.* **1979**.
20. Dubrovskiy, A. V.;Larock, R. C., Intermolecular C–O addition of carboxylic acids to arynes: synthesis of o-hydroxyaryl ketones, xanthenes, 4-chromanones, and flavones. *Tetrahedron* **2013**, *69* (13), 2789-2798.
21. YEE, B. J. CHEMICAL SYNTHESIS OF 1,6-DIOXYGENATED XANTHONES AND THEIR CYTOTOXIC ACTIVITIES[thesis]. UNIVERSITI TUNKU ABDUL RAHMAN, Kuala Lumpur, **2011**.
22. Nagem, T. J.;Oliveira, F. F. d., Xanthenes and other constituents of *Vismia parviflora*. *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8* (5), 505-508.
23. Purev, O.;Oyun, K.;Odontuya, G.;Tankhaeva, A.;Nikolaeva, G.;Khan, K. M.;Ali Shah, S. T.;Voelter, W., Isolation and structure elucidation of two new

- xanthenes from *Gentiana azurium Bunge* (Fam. Gentianaceae). *Z. Naturforsch. (B)* **2002**, *57* (3), 331-334.
24. Ee, G.;Jong, V.;Sukari, M.;Rahmani, M.;Kua, A., Xanthenes from *Calophyllum inophyllum*. *Pertanika J. Sci. & Technol.* **2009**, *17* (2), 307-312.
25. Laphookhieo, S.;Maneerat, W.;Koyomboon, S., Antimalarial and cytotoxic phenolic compounds from *Cratoxylum maingayi* and *Cratoxylum cochinchinense*. *Molecules* **2009**, *14* (4), 1389-1395.
26. Chen, L.;He, T.;Han, Y.;Sheng, J.-Z.;Jin, S.;Jin, M.-W., Pentamethylquercetin improves adiponectin expression in differentiated 3T3-L1 cells via a mechanism that implicates PPAR γ together with TNF- α and IL-6. *Molecules* **2011**, *16* (7), 5754-5768.
27. Kim, J.;Park, K.;Lee, C.;Chong, Y., Synthesis of a complete series of O-methyl analogues of naringenin and apigenin. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28* (12), 2527.

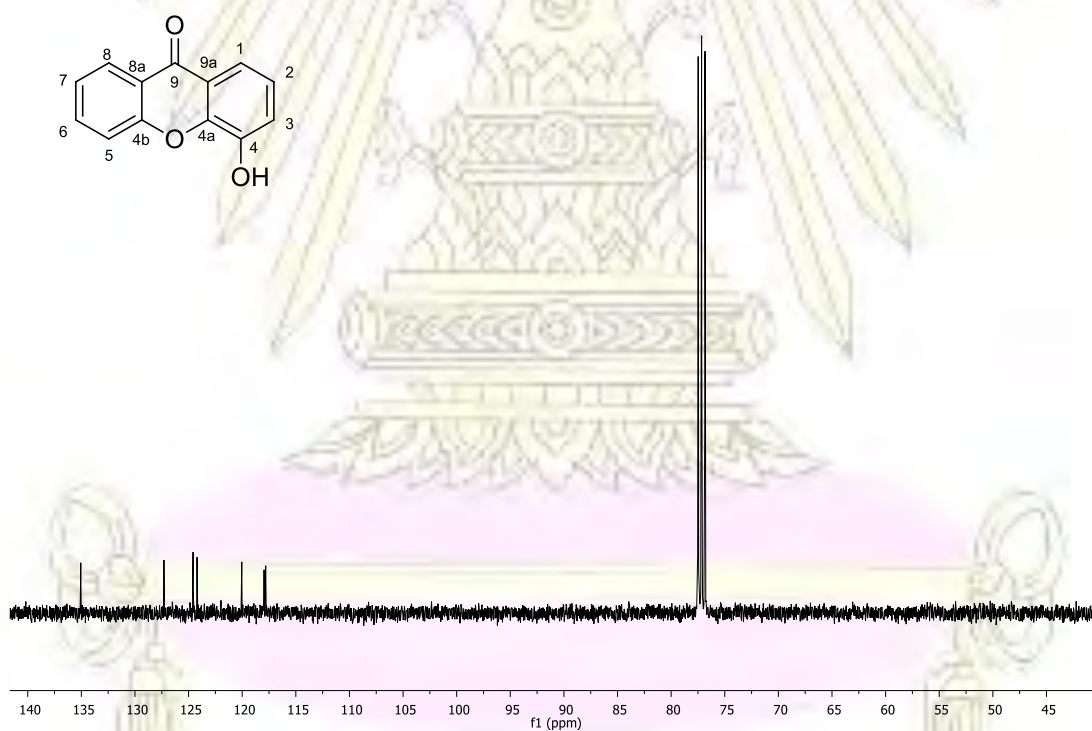




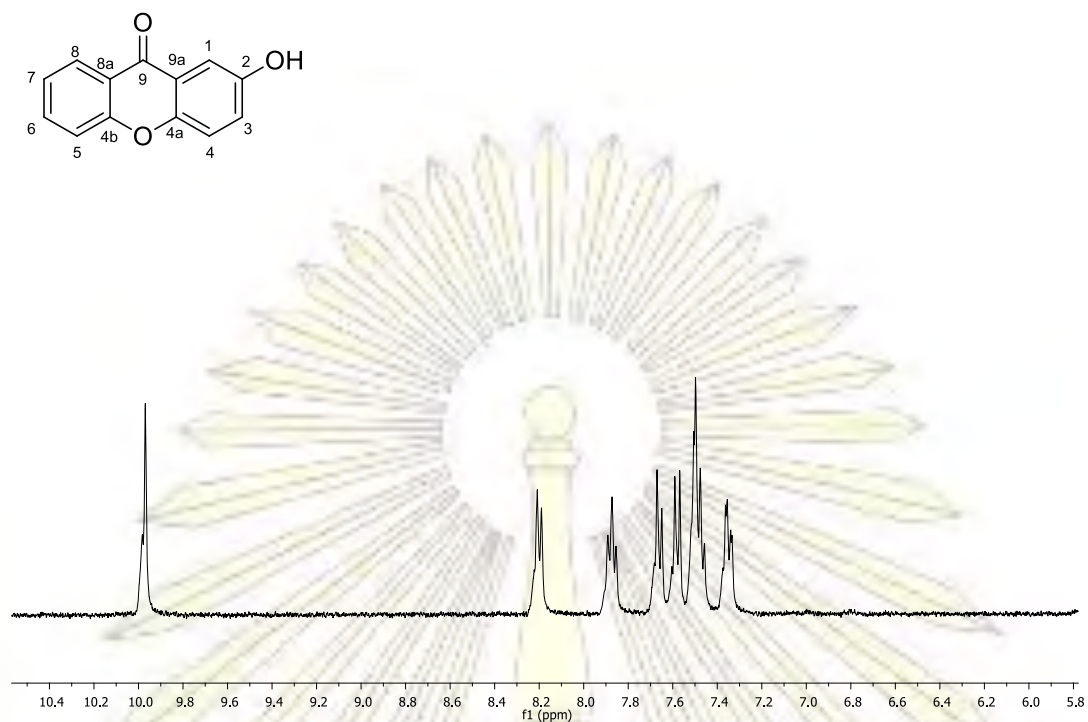
ภาคผนวก



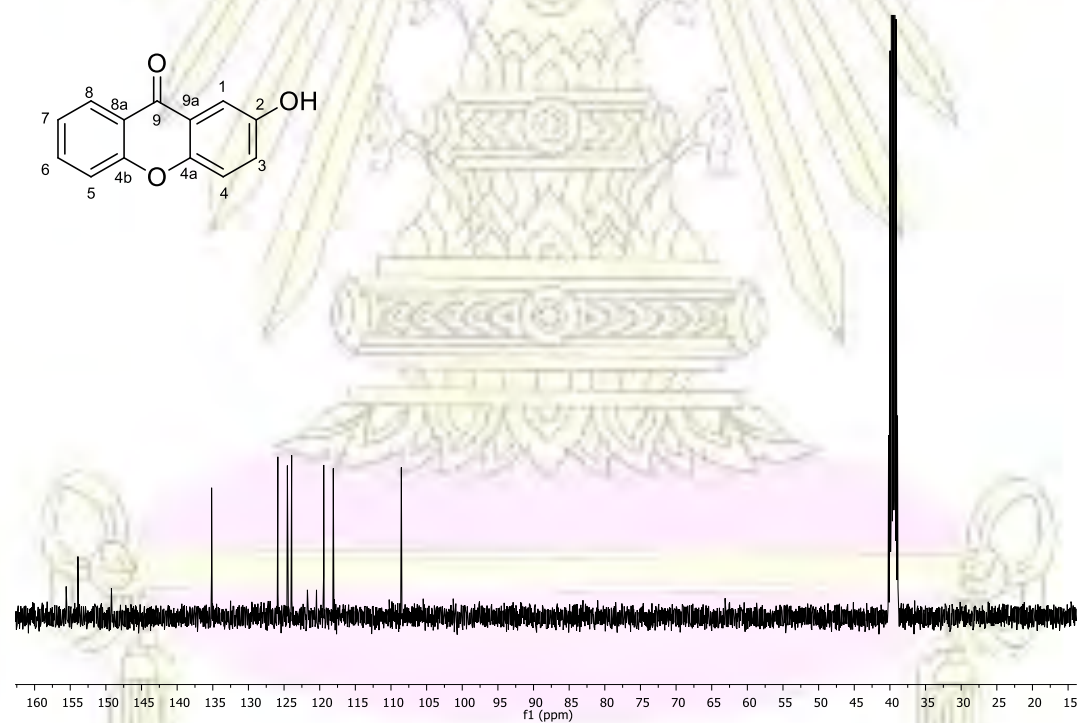
รูปที่ 1 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 4-hydroxyxanthone (1) ใน DMSO



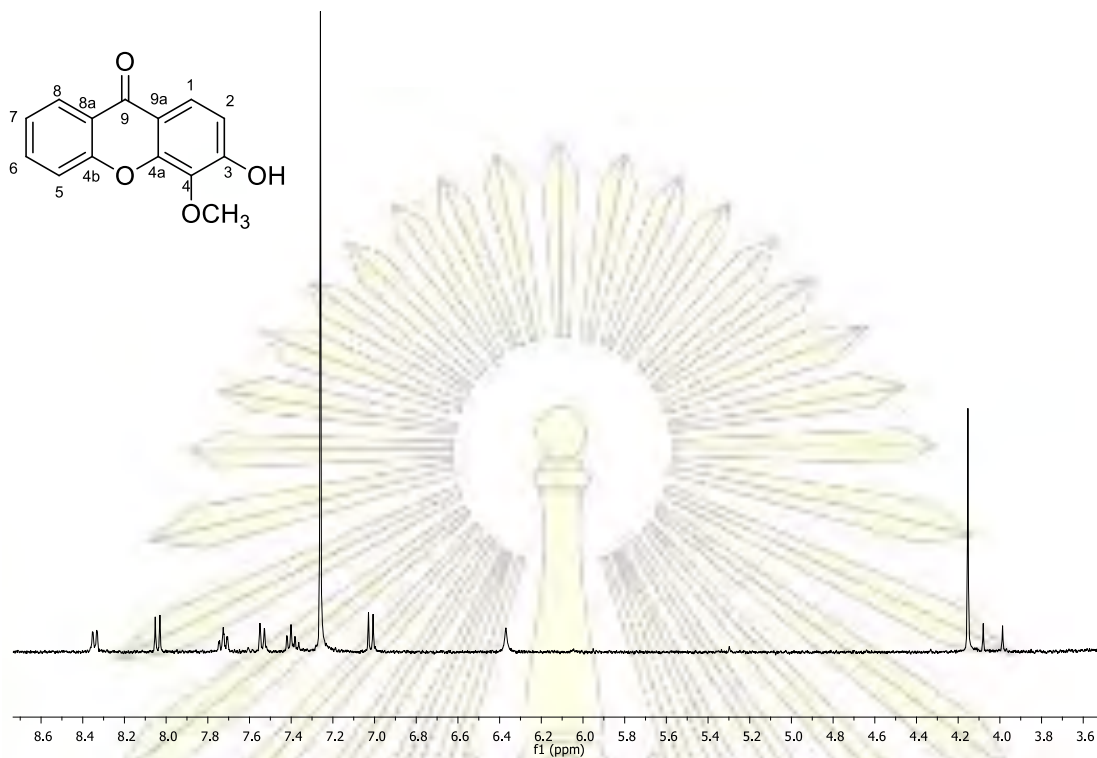
รูปที่ 2 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 4-hydroxyxanthone (1) ใน DMSO



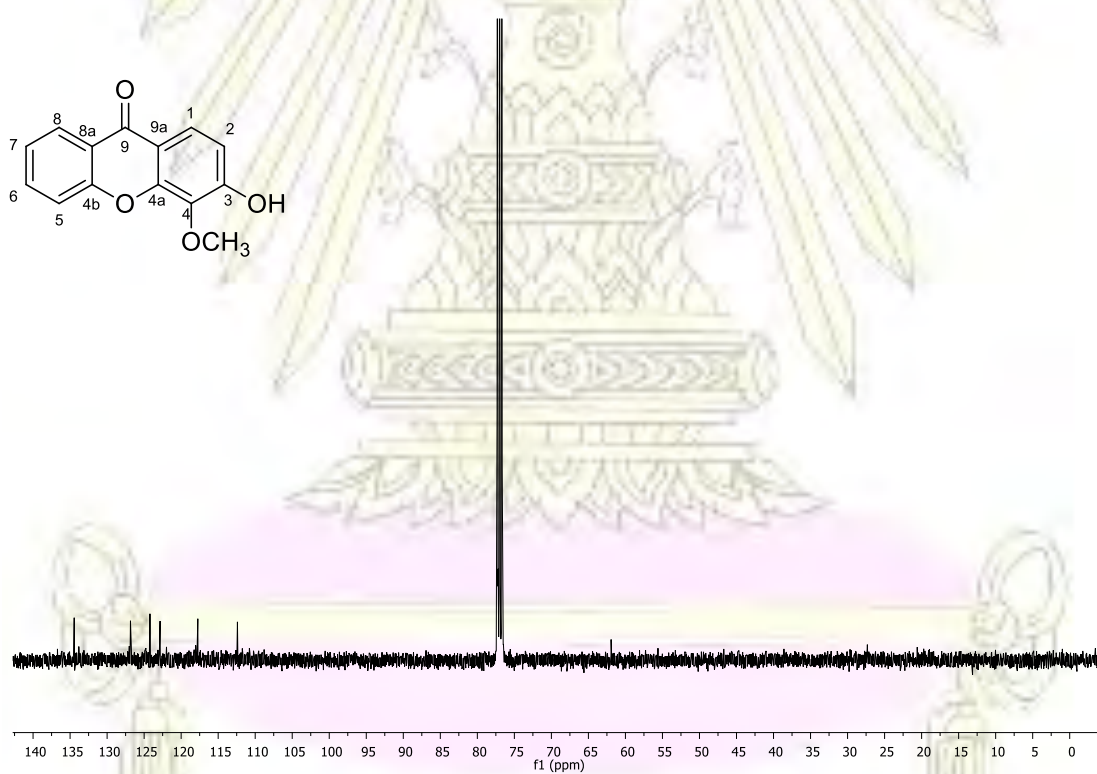
รูปที่ 3 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 2-hydroxyxanthone (2) ใน DMSO



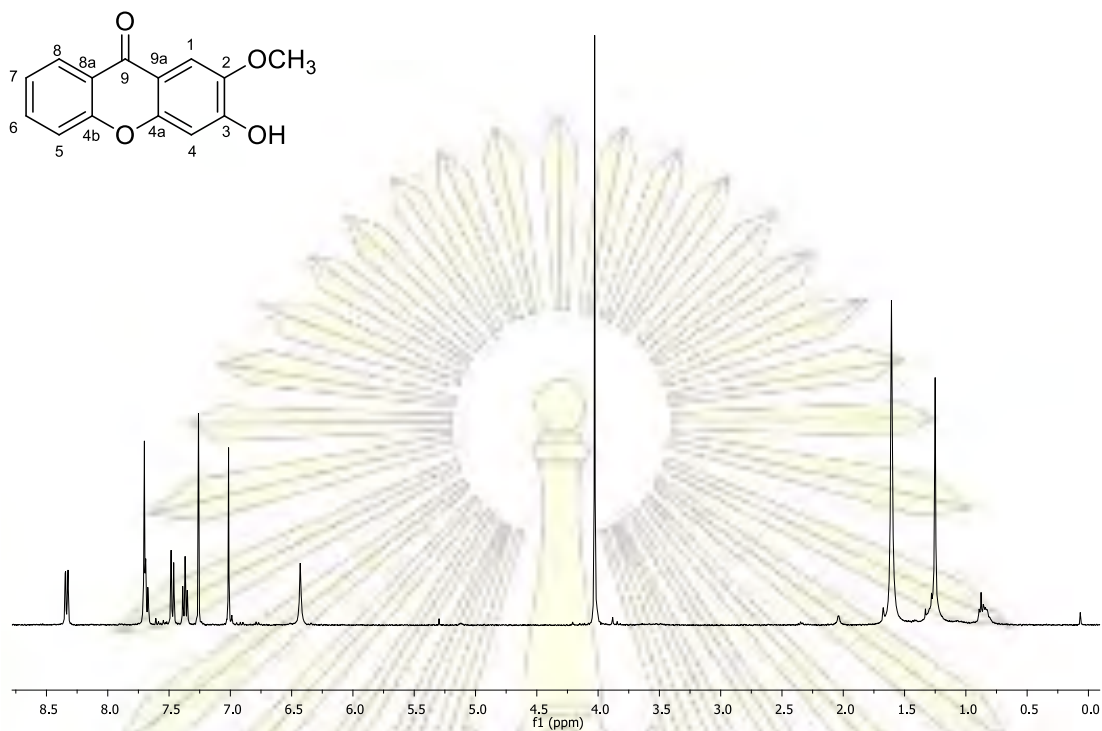
รูปที่ 4 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 2-hydroxyxanthone (2) ใน DMSO



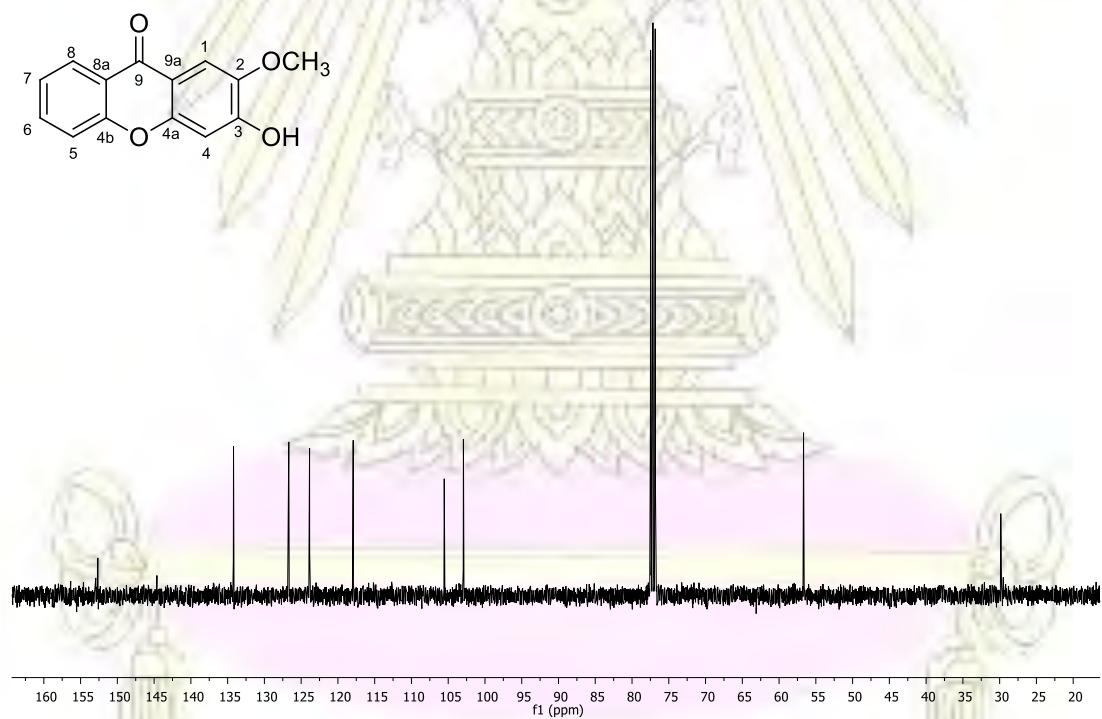
รูปที่ 5 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (3) ใน DMSO



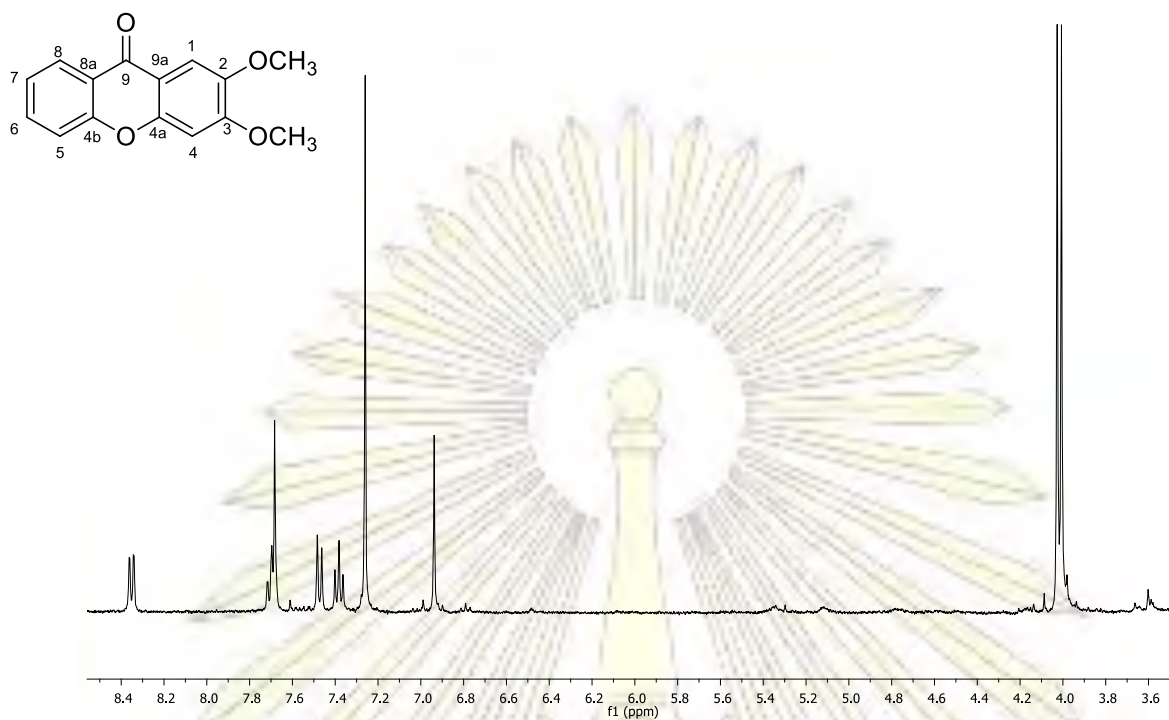
รูปที่ 6 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3-hydroxy-4-methoxyxanthone (3) ใน DMSO



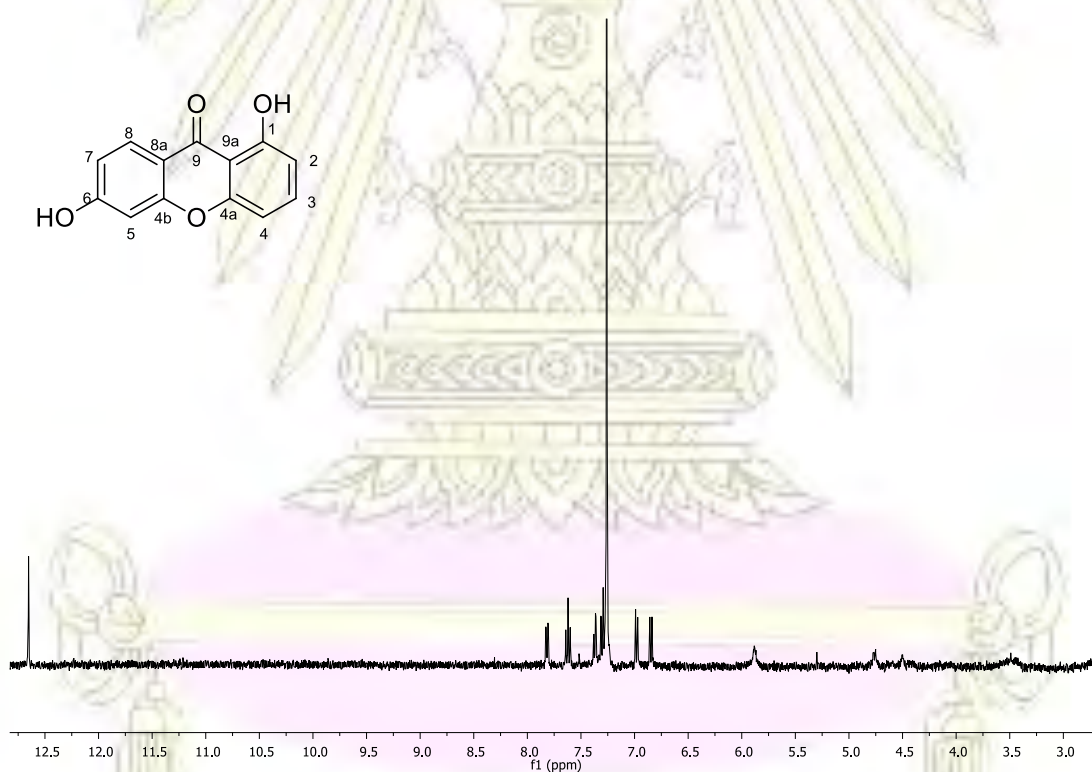
รูปที่ 7 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone (4) ใน CDCl_3



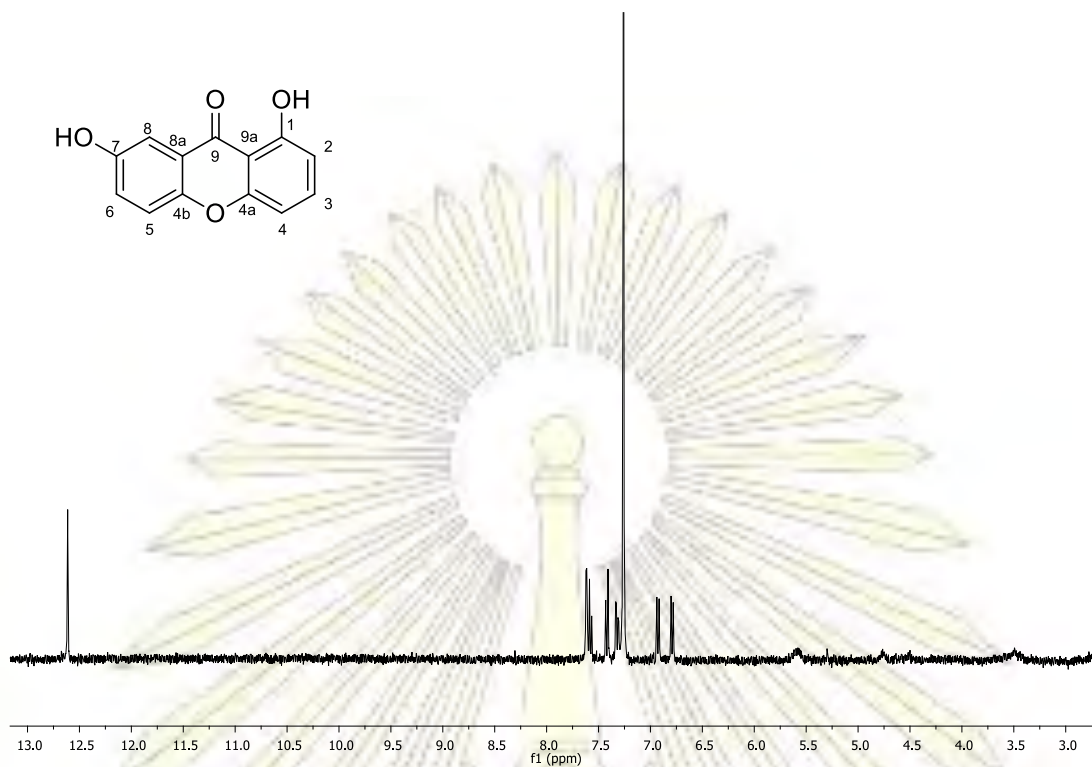
รูปที่ 8 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3-hydroxy-2-methoxyxanthone (4) ใน CDCl_3



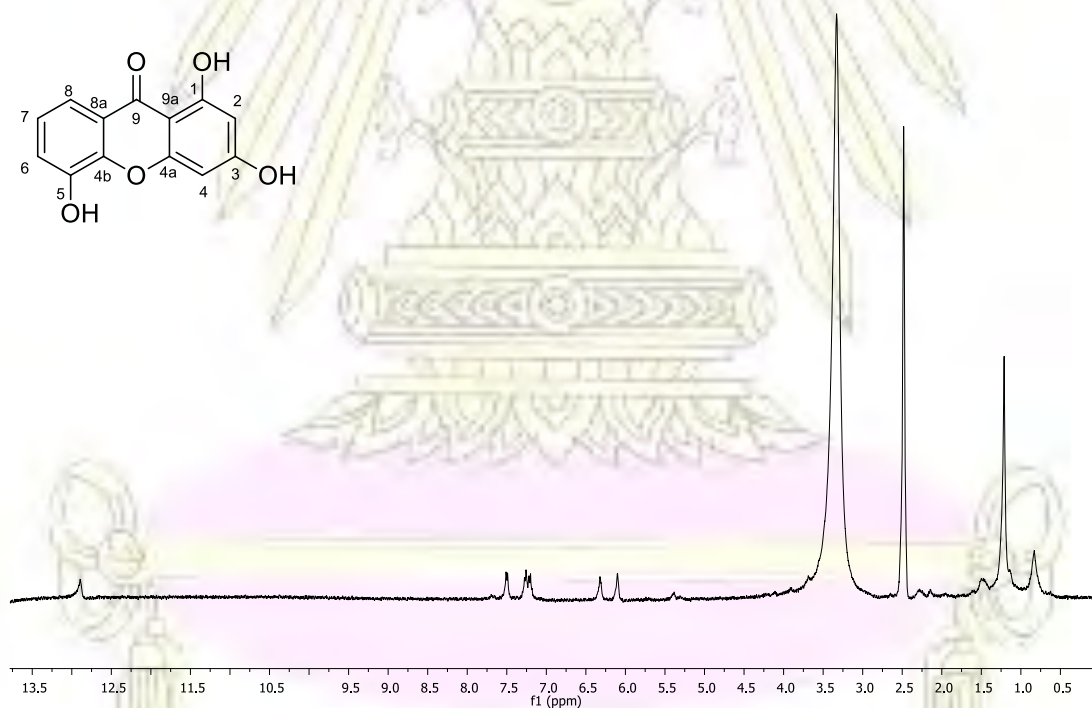
รูปที่ 9 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 2,3-dimethoxyxanthone (5) ใน CDCl_3



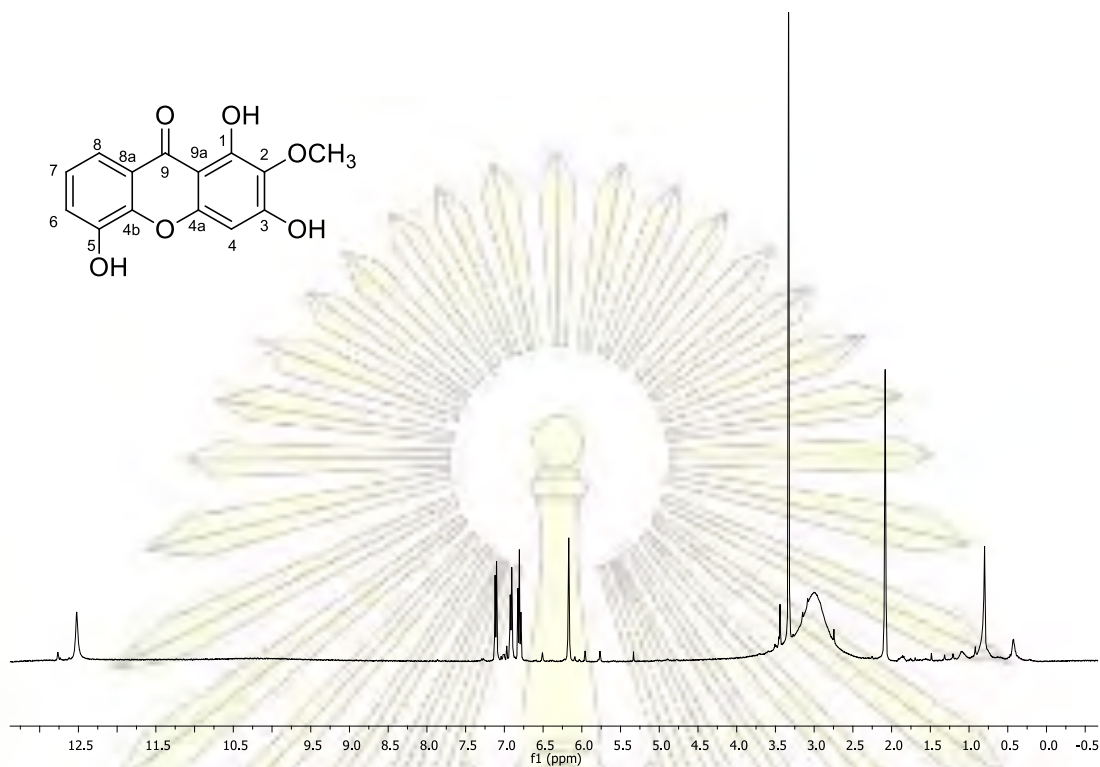
รูปที่ 10 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,6-dihydroxyxanthone (6) ใน CDCl_3



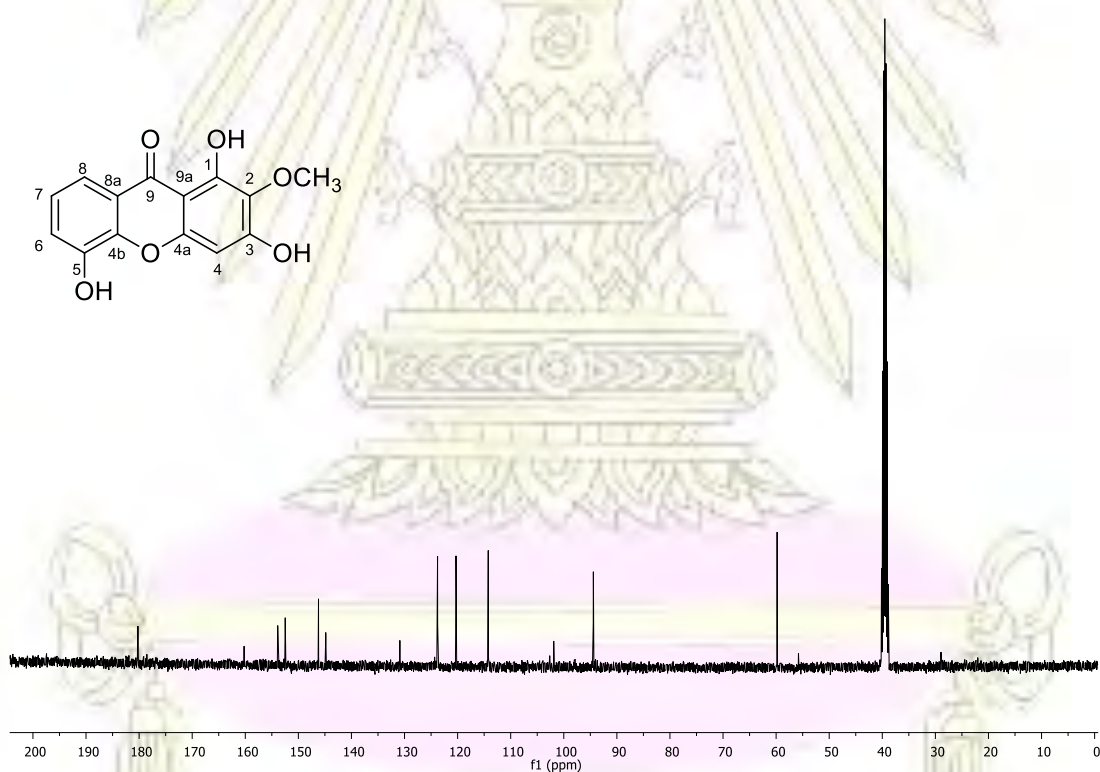
รูปที่ 11 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,7-dihydroxyxanthone (7) ใน CDCl_3



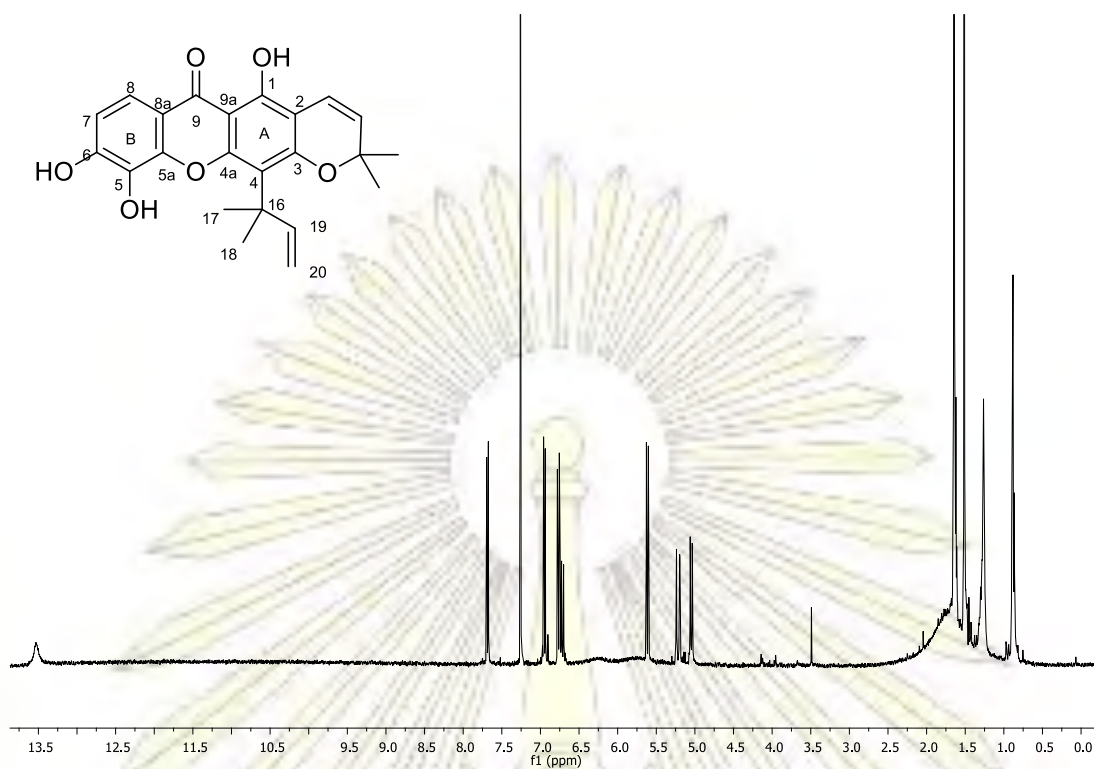
รูปที่ 12 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 1,3,5-trihydroxyxanthone (8) ใน DMSO



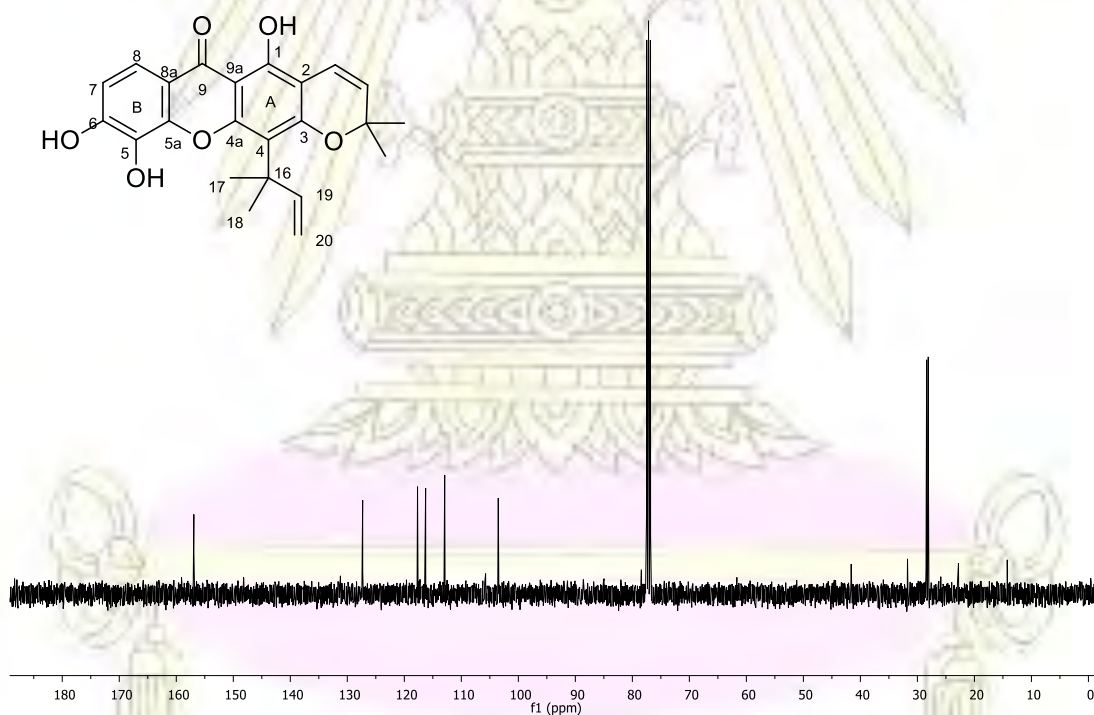
รูปที่ 13 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ tovoxyrifolin (9) ใน CDCl_3



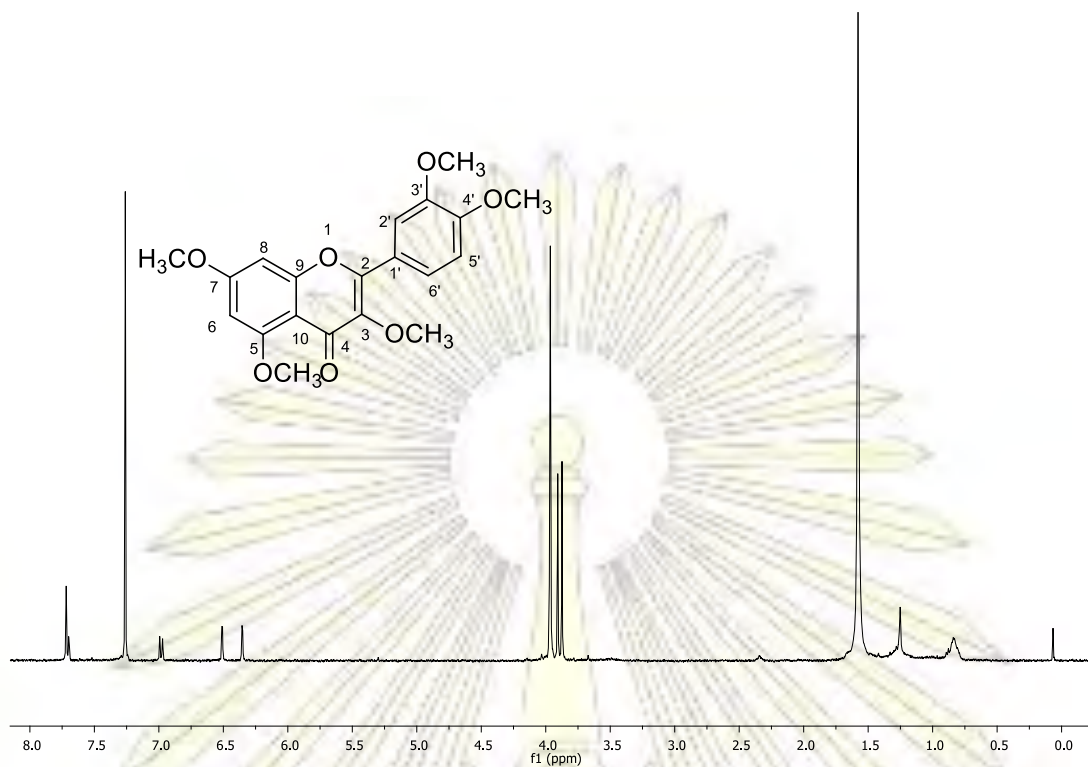
รูปที่ 14 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ tovoxyrifolin (9) ใน CDCl_3



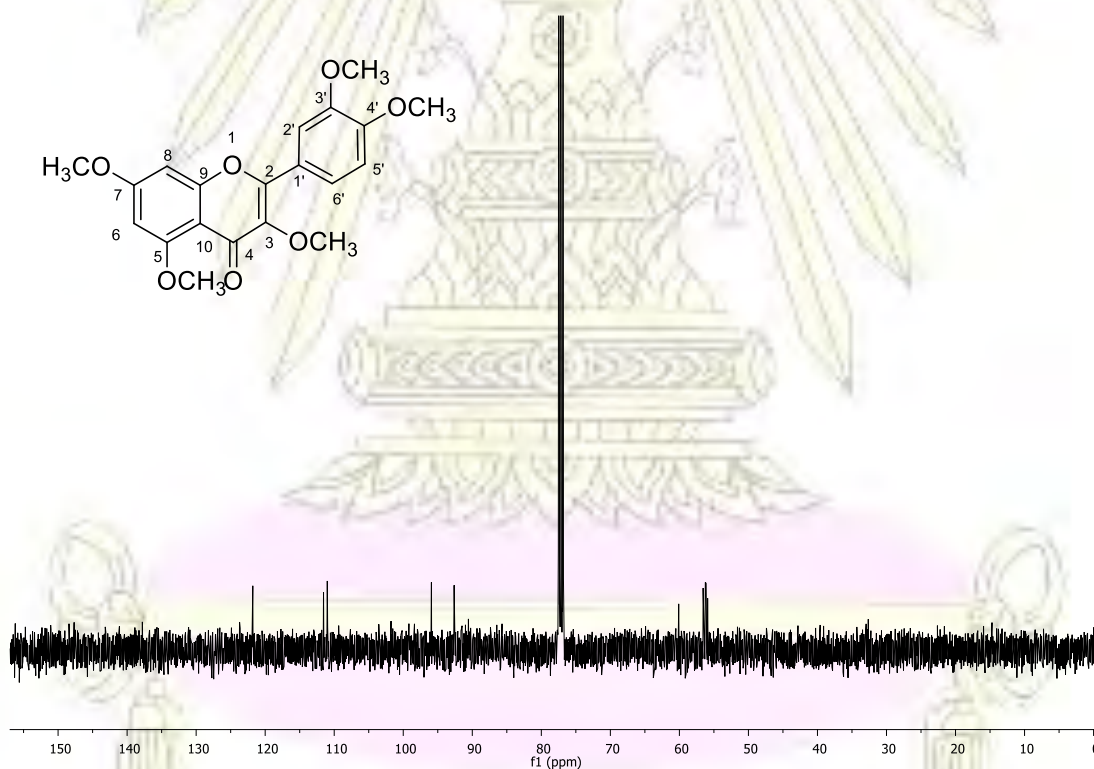
รูปที่ 15 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ macluraxanthone (10) ใน CDCl_3



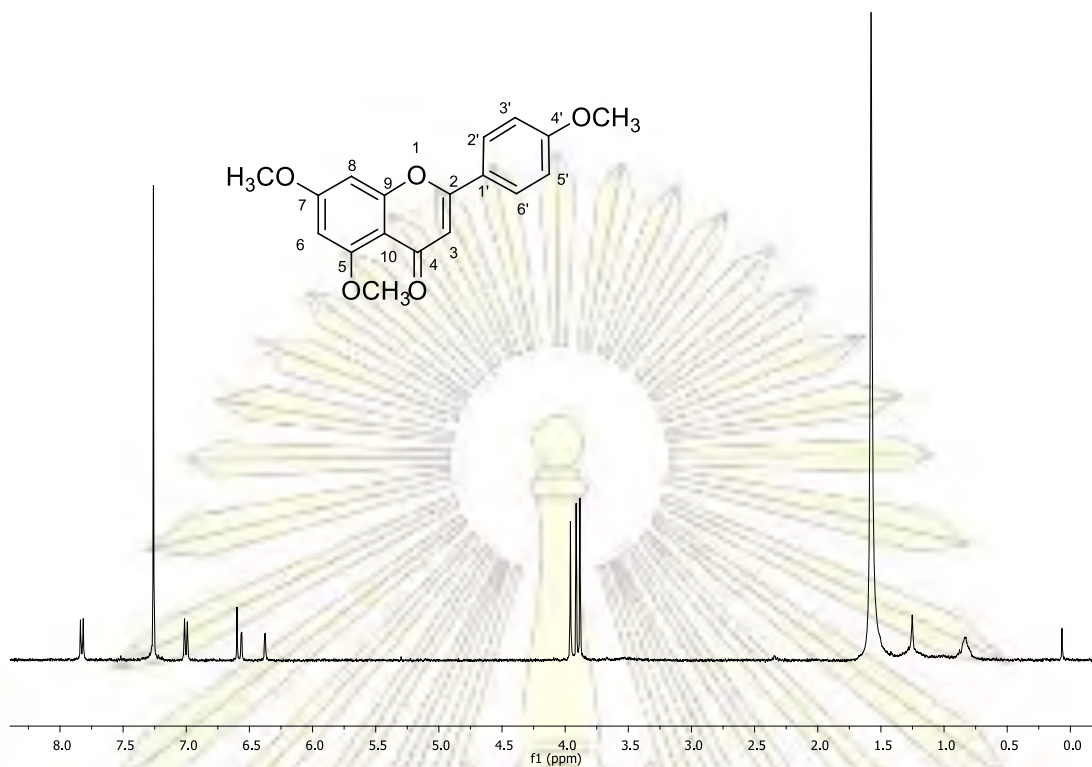
รูปที่ 16 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ macluraxanthone (10) ใน CDCl_3



รูปที่ 17 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (11) ใน CDCl_3



รูปที่ 18 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ 3,3',4',5,7-pentamethoxyflavone (11) ใน CDCl_3



รูปที่ 19 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของ 5,7,4'-trimethoxyflavone (12) ใน CDCl_3

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวมิ่งมุก สุทธิกิตติพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 6 เดือน มกราคม พ.ศ. 2538 ที่จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสภาราชนี จังหวัดตรัง เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 59 หมู่ที่ 5 ถนน ย่านตาขาว-นาโยง ตำบลหนองบ่อ อำเภอย่านตาขาว จังหวัดตรัง รหัสไปรษณีย์ 92140 อีเมลล์ mingmook.s@gmail.com

