

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกไซด์ส
จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb.
จากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย

นางสาวสุธินี แสงอรุณ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0317-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

120249903

CHEMICAL CONSTITUENTS AND XANTHINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY
FROM STEM BARK OF *Croton oblongifolius* Roxb.
FROM AMPHOE PHURUA, LOEI PROVINCE

Miss Sutinee Saengaroon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Sciences

Chulalongkorn University

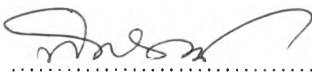
Academic Year 2001

ISBN 974-17-0317-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกไซด์สจากเปลือก
ต้นเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb. จากอำเภอภูเรือ จังหวัด
เลย


โดย นางสาวสุธินี แสงอรุณ
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เริงสำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิชณน์ การเที่ยง)

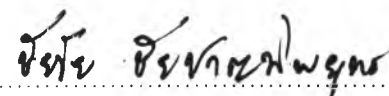
รองคณบดีฝ่ายบริหาร
รักษาราชการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

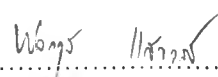
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เริงสำราญ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

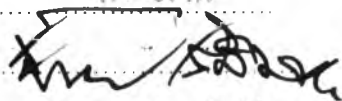


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

สุธินี แสงอรุณ : องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ออกซิเดสจากเปลือกต้นเปลือก
 ใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb. จากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย (CHEMICAL
 CONSTITUENTS AND XANTHINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY FROM STEM
 BARK OF *Croton oblongifolius* Roxb. FROM AMPHOE PHURUA, LOEI
 PROVINCE) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. โสภณ เรืองสำราญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. อมร
 เพชรสม; 79 หน้า. ISBN 974-17-0317-1

นำเปลือกต้นเปลือกใหญ่ (*Croton oblongifolius* Roxb) จากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย มา
 สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน, เอธิลเอซีเตต และเมทานอล ตามลำดับ และแยกสาร
 บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีบนซิลิกาเจลได้สาร 4 ชนิด ได้แก่ ของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด
 คือ stigmasterol, β -sitosterol และ campesterol (1), สารประกอบเคอโรไดเอนไดเทอร์ปีนอยด์ 2
 ชนิด คือ (-)-hardwickiic acid (2) และ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (3) และสารประกอบ
 แลปเดน คือ (-)-Nidorellol (4) การหาสูตรโครงสร้างของสารต่างๆที่แยกได้ ทำได้โดยอาศัยสมบัติ
 ทางกายภาพและทางสเปกโตรสโกปี และนำสารที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แซน
 ทิน ออกซิเดส พบว่าสาร 1 มีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC₅₀ 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารที่มีฤทธิ์
 ยับยั้งรองลงมาคือ สาร 3 สาร 4 และสาร 2 โดยมีค่า IC₅₀ 140, 155 และ 190 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 ตามลำดับ

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
 หลักสูตร เทคโนโลยีทางชีวภาพ
 ปีการศึกษา 2544

ลายมือชื่อนิสิต..... สุธินี แสงอรุณ
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4272436123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : XANTHINE OXIDASE, *Croton oblongifolius* ROXB., CHEMICAL
CONSTITUENTS, INHIBITION
SUTINEE SAENGAROON: CHEMICAL CONSTITUENTS AND
XANTHINE OXIDASE INHIBITORY ACTIVITY FROM STEM BARK OF
Croton oblongifolius Roxb. FROM AMPHOE PHURUA, LOEI
PROVINCE THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOPHON
ROENGSUMRAN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.
AMORN PETSOM, Ph.D. 79 pp. ISBN 974-17-0317-1

The stem barks of *Croton oblongifolius* Roxb. were extracted with hexane, ethylacetate and methanol, respectively. The extracts were separated by column chromatography on silica gel. Four compounds were isolated and identified, namely, a mixed steroid of stigmasterol, β -sitosterol และ campesterol (1), two clerodane diterpenoids which were (-)-hardwickiic acid (2), (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (3) and a labdane diterpenoid which was (-)-Nidorellol (4). The structures of the isolate compounds were identified using their physical properties and spectroscopic data. They were tested for xanthine oxidase inhibition and it was found that Compound 1 showed strong inhibitory activity on xanthine oxidase with IC_{50} 90 μ g/ml while Compound 3, Compound 4 and Compound 2 showed only weak activity with IC_{50} 140, 155 และ 190 μ g/ml, respectively.

Program Biotechnology ..
Field of study Biotechnology ..
Academic year 2001

Student's signature..... Sutimee Saengaroon
Advisor's signature..... Sophon Roengsumran
Co-advisor's signature..... Amorn Petsom



กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา และ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และ อาจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย ที่กรุณาให้คำแนะนำแก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี, สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ และ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
สารบัญแผนภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล <i>Croton</i>	5
2.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปล้าใหญ่ <i>Croton oblongifolius Roxb.</i>	6
2.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในพืช.....	11
บทที่ 3 การทดลอง	
3.1 พืชตัวอย่าง.....	17
3.2 วัสดุและเครื่องมือ.....	17
3.3 สารเคมี.....	18
3.4 การสกัด.....	18
3.5 การแยกสาร	
3.5.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน.....	19
3.5.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเอธิลเอซิเตต.....	19
3.5.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอล.....	20
3.6 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส.....	20
3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดยูริกและกราฟมาตรฐาน.....	20
3.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแซนทีนออกซิเดสของสารตัวอย่าง.....	21
3.9 การแปรผล.....	23
3.10 การหาค่า IC_{50}	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 สิ่งสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่.....	24
4.2 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี	
4.2.1 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี.....	24
4.2.2 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี.....	25
4.2.3 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี.....	25
4.2.4 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี.....	26
4.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง	
4.3.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1.....	27
4.3.2 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 2.....	32
4.3.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 3.....	36
4.3.4 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 4.....	40
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ออกซิเดสของสารสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่...	44
4.5 ผลการหา IC ₅₀ ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่และ Allopurinol.....	44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	49
รายการอ้างอิง.....	50
ภาคผนวก.....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	79

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารประกอบไดเทอร์ปีนอยด์จากต้นเปล้าใหญ่.....	7
2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	20
3 สิ่งสกัดเปลือกต้นเปล้าใหญ่ในตัวทำละลายต่างๆ.....	24
4 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1.....	27
5 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของ β -sitosterol, Stigmasterol และ สาร 1.....	29
6 Retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐานและสาร 1.....	30
7 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2.....	32
8 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-hardwickiic acid และสาร 2.....	33
9 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-hardwickiic acid และสาร 2.....	34
10 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3.....	36
11 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid และสาร 3.....	37
12 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid และสาร 3.....	38
13 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4.....	40
14 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-Nidorellol และสาร 4.....	41
15 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-Nidorellol และสาร 4.....	42
16 เปอร์เซนต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่.....	44
17 เปอร์เซนต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่.....	45
18 เปอร์เซนต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสของ Allopurinol.....	46
19 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่และ Allopurinol.....	48
20 สารสกัดที่แยกได้จากเปลือกต้นเปล้าใหญ่.....	49

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 รูปต้นเปลือกใหญ่.....	4
2 สูตรโครงสร้างของไดเทอร์ปีนอยด์ที่พบจากต้นเปลือกใหญ่.....	9
3 สูตรโครงสร้างของ Allopurinol.....	14
4 สูตรโครงสร้างของ 11-Hydroxycryptolepine.....	16
5 สูตรโครงสร้างของสาร 1(สเตอรอยด์ 3 ชนิด).....	31
6 สูตรโครงสร้างของสาร 2.....	35
7 สูตรโครงสร้างของสาร 3.....	39
8 สูตรโครงสร้างของสาร 4.....	43
9 กราฟแสดงค่า IC ₅₀ ของสารสกัดจากเปลือกต้นเปลือกใหญ่และ Allopurinol.....	47
10 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1.....	59
11 เปปตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1.....	60
12 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1.....	61
13 แมสสเปกตรัมของสาร 1.....	62
14 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกตรัมของสาร 1.....	63
15 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2.....	64
16 เปปตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2.....	65
17 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2.....	66
18 คาร์บอน-13, DEPT 90, DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2.....	67
19 แมสสเปกตรัมของสาร 2.....	68
20 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3.....	69
21 เปปตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3.....	70
22 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3.....	71
23 คาร์บอน-13, DEPT 90, DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3.....	72
24 แมสสเปกตรัมของสาร 3.....	73
25 อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4.....	74
26 เปปตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4.....	75
27 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4.....	76

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
28	คาร์บอน-13, DEPT 90, DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4.....77
29	แมสสเปกตรัมของสาร 4.....78

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
1	แสดงแหล่งที่มาและการขั้บถ่ายกรดยูริกในคน.....	12
2	แผนภูมิแสดงการออกฤทธิ์ของตัวยับยั้งเอนทีนออกซิเดส.....	14
3	ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกต้นเป๊าะใหญ่.....	19
4	การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนทีนออกซิเดสของสารตัวอย่าง.....	22

คำย่อ

A	=	Absorbance
br	=	Broad (for NMR spectra)
°C	=	Degree Celcius
CDCl ₃	=	Deuterated chloroform
CHCl ₃	=	Chloroform
cm	=	Centimeter
d	=	Doublet (for NMR spectra)
dd	=	Doublet of doublet (for NMR spectra)
ddd	=	Doublet of doublet of doublet (for NMR spectra)
DEPT	=	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
δ	=	Chemical shift
EtOAc	=	Ethyl acetate
g	=	Gram
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
m.p.	=	Melting point
MeOH	=	Methanol
M	=	Molar
m/z	=	Mass to charge ratio
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
ppm	=	Part per million
q	=	Quartet (for NMR spectra)
s	=	Singlet (for NMR spectra)
t	=	Triplet (for NMR spectra)
TLC	=	Thin Layer Chromatography
R _f	=	Retention factor in chromatography
μg	=	Microgram