โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปลือกติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*)
Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Cratoxylum cochinchinense*

ชื่อนิสิต นางสาวจีรนันท์ อ่องรัก
ภาควิชา เคมี
ปีการศึกษา 2560

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปลือกติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*)

Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Cratoxylum cochinchinense*

โดย

นางสาวจีรนันท์ อ่องรัก

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560

โครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปลือกติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*)

โดย นางสาวจิรนันท์ อ่องรัก

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสมวดี ไชยอนันต์สุจริต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ดวงกมล ตุงคะสมิต)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

..... หัวหน้าภาควิชาเคมี
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)

วันที่ ..... เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ☑ ดีมาก ☐ ดี ☐ พอใช้

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากเปลือกติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*)
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวจีรนันท์ อ่องรัก เลขประจำตัว 5733068223
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2560

บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกต้นติ้วเกลี้ยงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า แยกได้สารในกลุ่มแซนโทน 5 ชนิด คือ Pruniflorone K (**1**), Formoxanthone B (**2**), Pruniflorone G (**3**), Macluraxanthone (**4**), และ Jacareubin (**5**) สารในกลุ่มแอนทราคิวโนน 5 ชนิด คือ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone (**6**), Madagascin (**7**), Vismiaquinone (**8**), 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione (**9**), และ Physcion (**10**) โดยได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารทั้งหมดด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 เซลล์ ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าสาร **4** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB และ HeLa S-3 เซลล์ ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.45 และ 1.62 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, และ **10** พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 เนื่องจากมีค่า IC_{50} มากกว่า 30 μM

คำสำคัญ: ต้นติ้วเกลี้ยง, แซนโทน, แอนทราคิวโนน, ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Project Title Chemical constituents and cytotoxicity from the bark of *Cratoxylum cochinchinense*

Student Name Miss Jeeranan Ongrak Student ID 5733068223

Advisor Name Associate Professor Dr.Santi Tip-pyang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2017

Abstract

The bark of *Cratoxylum cochinchinense* was extracted with dichloromethane (CH_2Cl_2). The CH_2Cl_2 crude extract was purified by chromatographic techniques which led to the isolation of five xanthones, Pruniflorone K (**1**), Formoxanthone B (**2**), Pruniflorone G (**3**), Macluraxanthone (**4**), and Jacareubin (**5**) together with five anthraquinones, 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone (**6**), Madagascin (**7**), Vismiaquinone (**8**), 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione (**9**), and Physcion (**10**). 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 HeLa S-3). Compound **4** showed high inhibitory activity toward KB and HeLa S-3 cell lines with the IC_{50} values of 1.45 and 1.62 μM. Compounds **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, and **10** were inactive to KB and HeLa S-3 cell lines with the IC_{50} values more than 30 μM.

Keywords: *Cratoxylum cochinchinense*, xanthones, anthraquinones, cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย รวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โสมวดี ไชยอนันต์สุจริต และอาจารย์ ดร.ดวงกมล ตุงคะสมิต ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณพี่ๆทุกคนในหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คอยให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในระหว่างการทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.สุทิน แก่นนาคำ ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วเกลี้ยง	1
1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 2 การทดลอง	8
2.1 พืชตัวอย่าง	8
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	8
2.3 สารเคมี	8
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	9
2.5 เทคนิคที่ในการทดลอง	9
2.5.1 ทิน-เลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)	9
2.5.2 ซิลิก้าคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Column Chromatography)	10
2.5.3 Sephadex Column Chromatrography	11
2.5.4 Preparative thin layer chromatography (PTLC)	11
2.5.5 โครมาโทตรอน (Radial chromatograph)	12
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	12
2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย	12
2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ	13
2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	17
2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method	17
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	18

หน้า

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 18
3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **1** 18
3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **2** 19
3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **3** 21
3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **4** 23
3.1.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **5** 24
3.1.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **6** 25
3.1.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **7** 27
3.1.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **8** 28
3.1.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **9** 29
3.1.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **10** 30
3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ 31
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 33
ข้อเสนอแนะ 34
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 37
ประวัติผู้วิจัย 43

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **1** เปรียบเทียบกับสาร Pruniflorone K 18

ตารางที่ 3.1.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **2** เปรียบเทียบกับสาร Formoxanthone B 20

ตารางที่ 3.1.3 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **3** เปรียบเทียบกับสาร Pruniflorone G 21

ตารางที่ 3.1.4 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **4** เปรียบเทียบกับสาร Macluraxanthone 23

ตารางที่ 3.1.5 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **5** เปรียบเทียบกับสาร Jacareubin 24

ตารางที่ 3.1.6 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **6** เปรียบเทียบกับสาร 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone 25

ตารางที่ 3.1.7 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **7** เปรียบเทียบกับสาร Madagascin 27

ตารางที่ 3.1.8 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **8** เปรียบเทียบกับสาร Vismiaquinone 28

ตารางที่ 3.1.9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **9** เปรียบเทียบกับสาร 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione 29

ตารางที่ 3.1.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **10** เปรียบเทียบกับสาร Physcion 30

ตารางที่ 3.2 ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**1**-**10**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin 31

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1.1 ลักษณะของใบ, ดอก, ผลและลำต้นของต้นกระทิง 1

รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 2

รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 3

รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 3

รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 4

รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 5

รูปที่ 1.7 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 5

รูปที่ 1.8 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 6

รูปที่ 1.9 สารที่สกัดได้จากกิ่งและก้านของต้น *Cratoxylum cochinchinense* 7

รูปที่ 3.1.1 โครงสร้างสาร **1** 18

รูปที่ 3.1.2 โครงสร้างสาร **2** 19

รูปที่ 3.1.3 โครงสร้างสาร **3** 21

รูปที่ 3.1.4 โครงสร้างสาร **4** 23

รูปที่ 3.1.5 โครงสร้างสาร **5** 24

รูปที่ 3.1.6 โครงสร้างสาร **6** 25

รูปที่ 3.1.7 โครงสร้างสาร **7** 27

รูปที่ 3.1.8 โครงสร้างสาร **8** 28

รูปที่ 3.1.9 โครงสร้างสาร **9** 29

รูปที่ 3.1.10 โครงสร้างสาร **10** 30

รูปที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ **1-10** 33

สารบัญแผนภาพ

หน้า

แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกต้นติ้วเกลี้ยง 13

แผนภาพที่ 2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกต้นติ้วเกลี้ยง 16

สารบัญภาคผนวก

หน้า

รูปที่ 1 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Pruniflorone K (**1**) ใน $CDCl_3$ 38
รูปที่ 2 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Formoxanthone B (**2**) ใน $CDCl_3$ 38
รูปที่ 3 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Pruniflorone G (**3**) ใน $CDCl_3$ 39
รูปที่ 4 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Macluraxanthone (**4**) ใน $CDCl_3$ 39
รูปที่ 5 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Jacareubin (**5**) ใน $CDCl_3$ 40
รูปที่ 6 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone (**6**) ใน $CDCl_3$ 40
รูปที่ 7 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Madagascin (**7**) ใน $CDCl_3$ 41
รูปที่ 8 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Vismiaquinone (**8**) ใน $CDCl_3$ 41
รูปที่ 9 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione (**9**) ใน $CDCl_3$ 42
รูปที่ 10 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Physcion (**10**) ใน $CDCl_3$ 42

สัญลักษณ์และคำย่อ

NMR	nuclear magnetic resonance
MS	mass spectrometry
IR	infrared spectrometry
TLC	thin layer chromatography
PTLC	preparative thin layer chromatography
IC_{50}	the half maximal inhibitory concentration
s	singlet
d	doublet
t	triplet
dd	doublet of doublets
m	multiplet
brs	broad signal

บทที่ 1
บทนำ

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้ถูกนำมาใช้เป็นยารักษาโรคอย่างแพร่หลาย ซึ่งการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาตินี้ ทำให้เราได้ค้นพบและได้เรียนรู้สิ่งที่น่าสนใจมากมายจากธรรมชาติ โดยเฉพาะในเรื่องของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสารเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงน้อยมากต่อร่างกายเมื่อเทียบกับสารที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี สำหรับการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต้องอาศัยวิธีการทดสอบฤทธิ์ และเทคนิคในการแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อที่จะได้รู้ว่าองค์ประกอบใดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนั้นอาจต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างของสารเพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีขึ้น จะเห็นได้ว่าการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาความก้าวหน้าทางยารักษาโรคในปัจจุบัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากพืชและนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB และ HeLa S-3) หรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่เหมาะสม โดยพืชที่เลือก ได้แก่ ติ้วเกลี้ยง

1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นติ้วเกลี้ยง

ติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Hypericaceae สกุล *Cratoxylum* มีลักษณะทั่วไปเป็น**ไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้น** ขนาดเล็กถึงใหญ่ ผลัดใบสูงได้ถึง 30 เมตร เปลือกเรียบหรือแตกเป็นสะเก็ด สีเทาอมน้ำตาล เปลือกต้นด้านในสีเหลืองอ่อน ลำต้นเปลาตรง มีน้ำยางสีเหลืองแกมแดง มีหนามแหลมยาวแข็งเป็นเนื้อไม้ออกตามลำต้น **ใบ**เดี่ยวเรียงตรงรูปไข่กลับปลายแหลมพบบ้างที่ทู่หรือกลมโคนสอบหรือมน ขอบเรียบเกลี้ยงทั้งสองด้านเชื่อมกันก่อนถึงขอบใบ **ดอก**เป็นดอกเดี่ยว หรือออกเป็นกระจุก 2-5 ดอก ที่ซอกใบหรือปลายกิ่ง มีกลิ่นหอม สีส้ม หรือส้มแดง **ผล**แบบผลแห้งแตก รูปวงรี แข็ง เกลี้ยงเป็นมัน ผลแก่แตกตามรอยประสาน เมล็ดมีปีกแบนและบางใส ออกดอกและเป็นผลระหว่างเดือนมกราคมถึงสิงหาคม พบได้ในป่าเต็งรัง ป่าเบญจพรรณในประเทศพม่า จีน กัมพูชา ลาว เวียดนาม และทั่วทุกภาคของประเทศไทย[1] ซึ่งติ้วเกลี้ยงนี้นำมาใช้ประโยชน์ทางยาได้หลายส่วน เช่น ต้นหรือรากใช้ต้มกับน้ำดื่มเป็นยาแก้กระษัยเส้น ยาระบาย ใบอ่อนและยอดอ่อนใช้รับประทาน มีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ เปลือกต้นช่วยรักษาอาการเสียดท้องหรืออาการที่เกี่ยวกับลำไส้ และน้ำยางจากเปลือกที่เปลี่ยนเป็นสีแดงใช้เป็นยารักษาโรคหิด[2]

รูปที่ 1.1 ลักษณะของใบ, ดอก, ผลและลำต้นของต้นติ้วเกลี้ยง

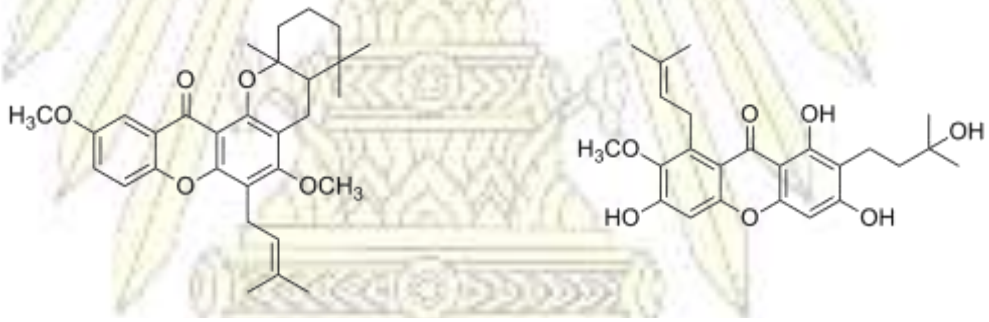
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกของติ้วเกลี้ยงให้บริสุทธิ์
2. เพื่อพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยข้อมูลทางกายภาพ และทางสเปกโทรสโกปี
3. เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB และ HeLa S-3) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาวิจัยของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) ที่ผ่านมาส่วนใหญ่พบองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสารกลุ่ม xanthones, anthraquinones, triterpenoids, และ tocotrienols โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

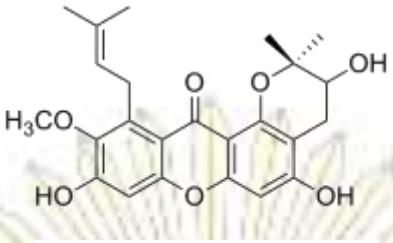
Bennett และคณะ[3] (1993) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตจากเปลือกของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 7 ชนิดประกอบด้วยกลุ่ม triterpenoids ที่เคยมีการรายงานแล้ว คือ friedelin และกลุ่ม xanthones ที่เคยมีการรายงานแล้ว 4 ชนิด ดังนี้ mangostin, ***β***-mangostin, garcinone D, และ tovophyllin A พร้อมกับสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานอีก 2 ชนิด คือ 2-geranyl-1,3,6-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone, และcratoxylone (1,3,6-trihydroxy-2-(3-hydroxy-3-methylbutyl)-7-methoxy-8-(3,3-dimethylallyl)-xanthone)



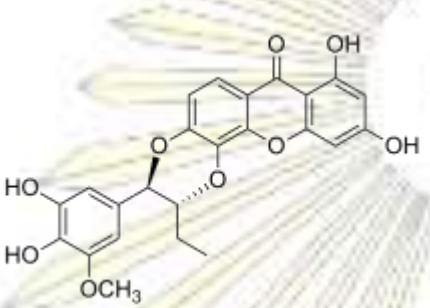
2-geranyl-1,3,6-trihydroxy-4-(3,3-dimethylallyl)-xanthone cratoxylone

รูปที่ 1.2 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

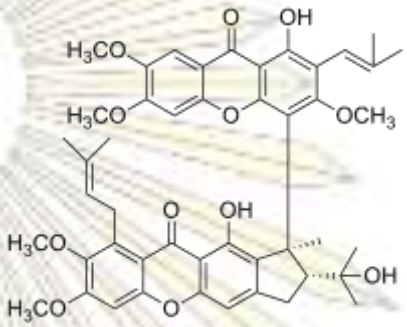
Sia และคณะ[4] (1995) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตจากเปลือกของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 4 ชนิดประกอบด้วยกลุ่ม xanthones ที่เคยมีการรายงานแล้ว คือ 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone พร้อมกับสารที่ยังไม่เคยมีการรายงานอีก 3 ชนิด คือ 11-hydroxy-1-isomangostin, xanthonolignoid (5′-demethoxycadensin G), และ bisxanthon



11-hydroxy-1-isomangostin



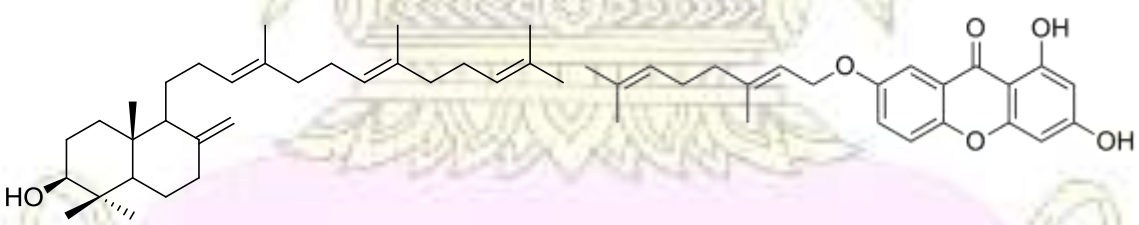
Xanthonolignoid



bisxanthone

รูปที่ 1.3 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

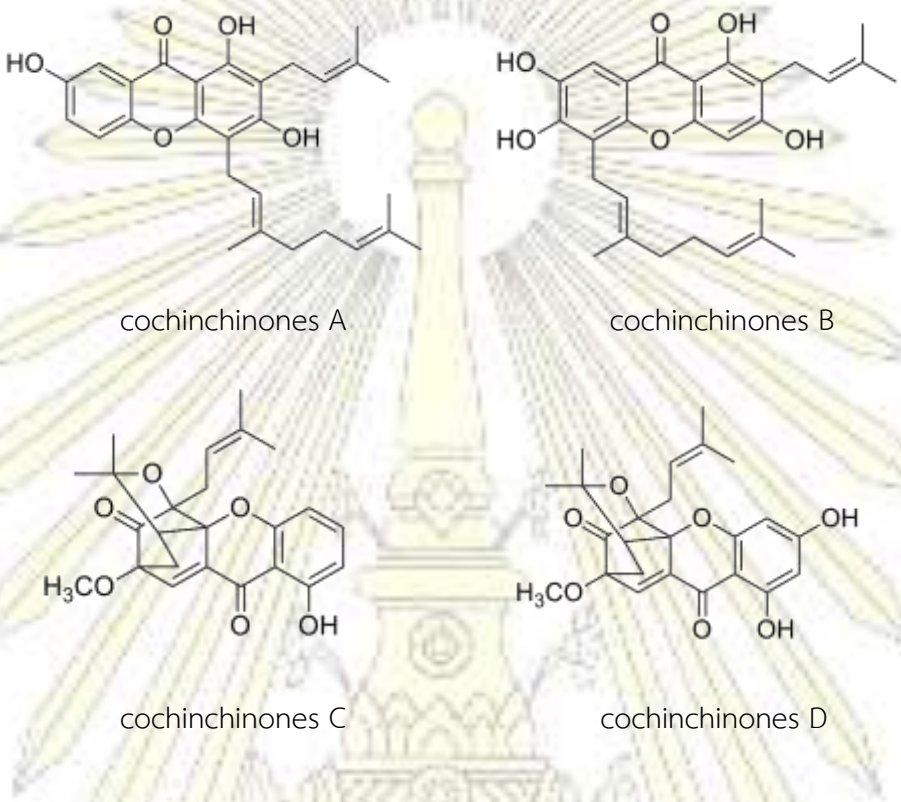
Lien และคณะ[5] (1999) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนจากเปลือกของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 6 ชนิดประกอบด้วยกลุ่ม triterpenoid ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ (13*E*,17*E*)-polypoda-7,13,17,21-tetraen-3***β***-ol กลุ่ม xanthones ที่ยังไม่เคยมีการรายงาน 1 ชนิด คือ *E*-7-geranyloxy-1,3,7-trihydroxyxanthone พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 4 ชนิด คือ lupeol, ***β***-mangostin, 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3-methylbut-2-enyl)xanthone, และ 1,3,7-trihydroxy-2,4-di(3-methylbut-2-enyl)xanthone



(13*E*,17*E*)-polypoda-7,13,17,21-tetraen-3***β***-ol *E*-7-geranyloxy-1,3,7-trihydroxyxanthone

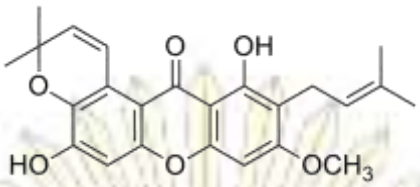
รูปที่ 1.4 สารที่สกัดได้จากเปลือกของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

Mahabusarakum และคณะ[6] (2005) แยกสารจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 11 ชนิดในกลุ่ม xanthones ประกอบด้วยชนิดใหม่ 4 ชนิด คือ cochinchinones A, B, C, และ D พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 7 ชนิด โดยสารที่สกัดได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 1.5 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

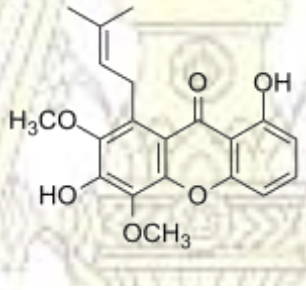
Phuwapraisirisan และคณะ[7] (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากเนื้อไม้ของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 6 ชนิดในกลุ่ม xanthones ประกอบด้วยชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ cratoxylumxanthone A พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 5 ชนิด คือ dulcisxanthone B, α-mangostin, β-mangostin, 2-geranyl-1,3,7-trihydroxy-4-(3-methylbut-2-enyl), และ tectochrystin โดยสารประกอบที่แยกได้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation



cratoxylumxanthone A

รูปที่ 1.6 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

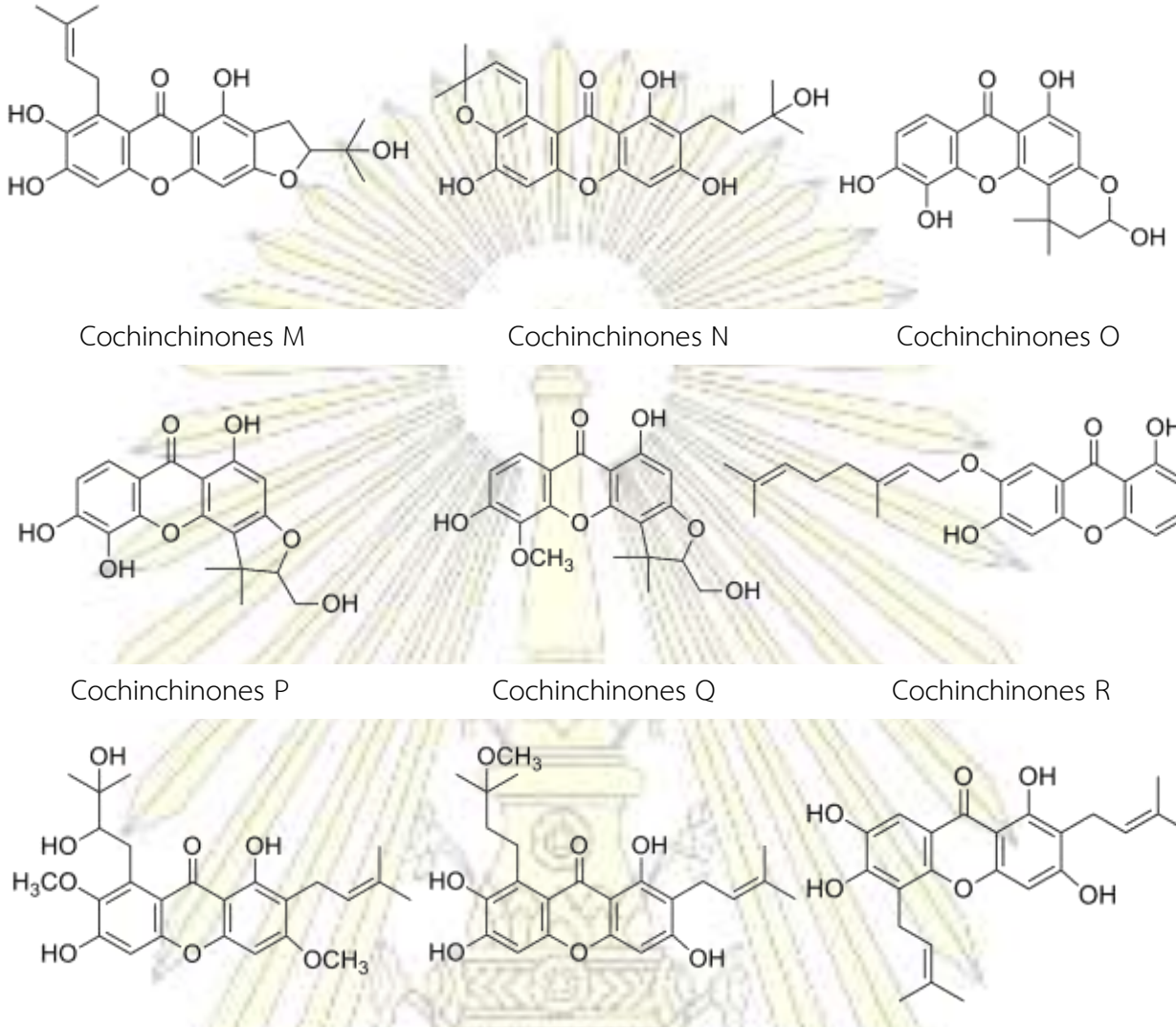
Laphookhieo และคณะ[8] (2006) แยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน และเมทิลีนคลอไรด์จากรากของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 7 ชนิดในกลุ่ม xanthones ประกอบด้วยชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ 5-O-methylcelebixanthone พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 6 ชนิด คือ celebixanthone, 1,3,7-trihydroxy-2,4-di(3-methylbut-2-enyl) xanthone, cochinchinone A, ***α***-mangostin, ***β***-mangostin, และ cochinchinone C โดยสารประกอบที่แยกได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) และมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Plasmodium falciparum



5-O-methylcelebixanthone

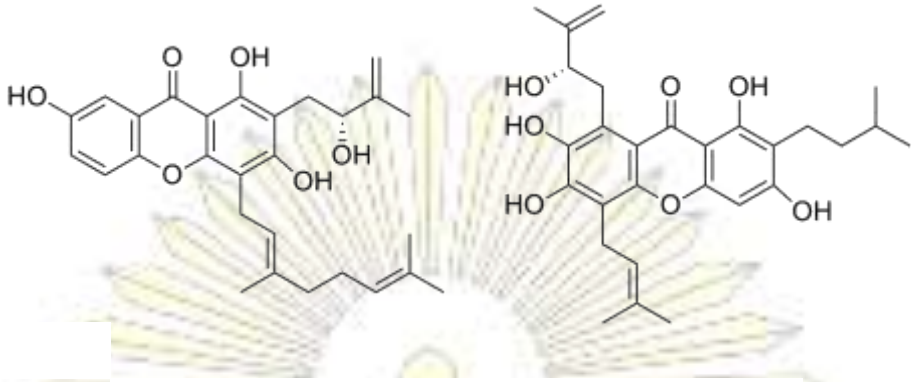
รูปที่ 1.7 สารที่สกัดได้จากรากของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

Duan และคณะ[9] (2015) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทานอลจากเนื้อไม้ของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 21 ชนิดในกลุ่ม xanthones ประกอบด้วยชนิดใหม่ 9 ชนิด คือ Cochinchinones M, N, O, P, Q, R, S, T, และ U พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 12 ชนิด

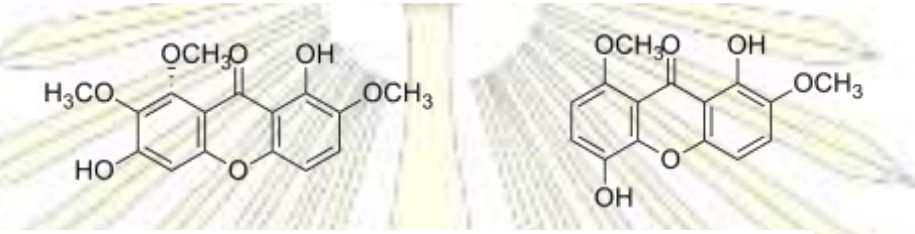


รูปที่ 1.8 สารที่สกัดได้จากเนื้อไม้ของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

Ito และคณะ[10] (2017) แยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตจากกิ่งและก้านของต้นติ้วเกลี้ยง (*Cratoxylum cochinchinense*) พบสารทั้งหมด 10 ชนิดในกลุ่ม xanthones ประกอบด้วยชนิดใหม่ 4 ชนิด คือ cratoxanthone A, B, C, และ D พร้อมกับสารที่เคยมีการรายงานแล้วอีก 6 ชนิด โดยสารประกอบที่แยกได้แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ KB, NALM-6 และบางชนิดลดการแพร่กระจายของเซลล์ A549



cratoxanthone A cratoxanthone B



cratoxanthone C cratoxanthone D

รูปที่ 1.9 สารที่สกัดได้จากกิ่งและก้านของต้น *Cratoxylum cochinchinense*

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเปลือกติ้วเกลี้ยงโดยสกัดสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และพิสูจน์ทราบเอกลักษณ์ทางโครงสร้างขององค์ประกอบทางเคมีของเปลือกติ้วเกลี้ยงด้วยข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี ได้แก่ นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) แมสสเปกโทรเมตรี (MS) และอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (IR) เป็นต้น รวมถึงนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าติ้วเกลี้ยงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและมักมีการรายงานสารชนิดใหม่อยู่เสมอ อีกทั้งเปลือกของต้นติ้วเกลี้ยงที่เก็บจากทางภาคเหนือของประเทศไทยยังไม่เคยมีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพมาก่อน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนของเปลือกจากพืชชนิดนี้ โดยผู้วิจัยคาดว่าจะพบสารชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยา และทางการแพทย์ต่อไป

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

เปลือกต้นติ้วเกลี้ยงที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ เก็บมาจากตำบลใหม่พัฒนา อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง เมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ.2560

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. บีกเกอร์ (beaker)
4. กระดาษกรอง (filter papaer)
5. กรวยแก้ว (glass funnel)
6. แท่งแก้วคนสาร (glass rod)
7. หลอดหยดสาร (dropper)
8. หลอดคะปิลลารี (capillary tube)
9. หลอดทดลอง (test tube)
10. ขวดเล็ก (vial)
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 radial chromatograph ยี่ห้อ โครมาโททรอน (Chromatotron®)

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. Sephadex LH-20 สำหรับทำ Gel Filtration Chromatography

5. แผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) ชนิด PF254 ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้อง จัดหาอุปกรณ์ และสารเคมี

2. เก็บเปลือกติ้วเกลี้ยง ตากให้แห้ง บดให้มีขนาดเล็กลง สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนเป็นเวลา 4 วัน นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้ง (นำตัวทำละลายออก) แล้วตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีที่สกัดได้ด้วย thin layer chromatography (TLC)

3. แยกสารบริสุทธิ์จากสิ่งสกัดด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น silica column chromatrography, Sephadex, และ chromatotron เป็นต้น ศึกษาหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยแผ่น TLC หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ทำการทดสอบซ้ำโดยการเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่

4. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D NMR, 2D NMR, MS, และ IR เป็นต้น

5. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB และ HeLa S-3) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงาน

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

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

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets sillica gel 60 F_{254} ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการระบุระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต้มสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะปิลลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรองและมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายชะสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC จนถึงจุดสูงสุด (solvent front) ที่ขีดไว้ ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยส่องด้วย UV Lamp ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หรือนำไปจุ่มในสารละลาย anisaldehyde/H_2SO_4 แล้วอบที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที แล้วบันทึกตำแหน่งของจุดดังกล่าว

ก. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตรปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

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

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

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสารนำแผ่น TLC ไปส่องกับแสง UV เพื่อวิเคราะห์การดูดกลืนแสง UV ของสารในกรณีที่สารไม่สามารถดูดกลืนแสง UV ให้นำแผ่น TLC ไปจุ่มลงใน anisaldehydeใน conc. H_2SO_4 แล้วเป่าด้วยลมร้อนให้แห้งตำแหน่งที่มีสารจะปรากฏให้เห็น

2.5.2 ซิลิกาคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica Column Chromatography)

ใช้ตัวดูดซับ (Stationary Phase) คือ ซิลิกาเจล ชนิด 60G Art. 7734 ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือ ในตอนแรกต้องทำการเขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจล กับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกาเจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัดควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้ง แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงเพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ในการคลุกกับสารที่ต้องการแยก ให้นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งก่อนใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลายด้านบนใส จากนั้นจึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.3 Sephadex Column Chromatrography

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยมี Sephadex LH-20 เป็นเจลฟิลเตอร์ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ แล้วชะด้วยตัวทำละลายผสมของไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 1:1 ข้อดีของวิธีการแยกนี้คือ สามารถกำจัดองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่ต้องการออกได้ เช่น สเตียรอยด์ เทอพีนอยด์ และไขมัน เป็นต้น อีกทั้งยังทำให้สูญเสียสารน้อยมากจนแทบไม่สูญเสียเลยในขณะทำการแยก ข้อเสียคือ ใช้เวลานานมากในการแยกสาร

ก. ปล่อยตัวทำละลายลดลงจนถึงระดับเดียวกับ Sephadex LH-20 แล้วปิดคอลัมน์

ข. บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกจะต้องละลายด้วยตัวทำละลายผสมชนิดเดียวกันให้มีปริมาตรที่เหมาะสมกับขนาดของคอลัมน์ที่ใช้

ค. เปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกช้าๆ จนสารที่ต้องการแยกอยู่ระดับเดียวกับ เดียวกับ Sephadex LH-20 แล้วเติมตัวทำละลายลงไปทีละนิดจนใส

ง. รอจนสารที่ต้องการลงมาจนเกือบถึงปลายคอลัมน์แล้วทำการเก็บแฟรกชันสารที่แยกได้

2.5.4 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 หรือนำไปอบที่อุณหภูมิ100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชม.

ข. การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิดที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะเพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ค. การแต้มสารนำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลมาขีดเส้นด้วยดินสอเพื่อกำหนดขอบด้านข้างทั้งซ้ายและขวาให้ห่างจากขอบประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นใช้หลอดหยดสารดูดสารที่ต้องการแยกโดยหลอดหยดสารนั้นหุ้มด้วยสำลีที่ปลาย แล้วปล่อยสารนั้นบนแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่ที่ระดับเริ่มต้นสูงจากขอบล่างประมาณ 2 เซนติเมตร ให้ปล่อยสารแล้วลากเป็นเส้นตรงจากขอบด้านซ้ายไปด้านขวาหรือตามความถนัดหลังจากสารที่แต้มแห้งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ง. การ develop นำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่แต้มสารเรียบร้อยแล้ว จุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้วทั้งนี้ระดับของสารบนแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อย จากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดห่างจากขอบบนประมาณ 1 เซนติเมตรแล้ว จึงนำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนซิลิ

กาเจลที่เคลือบบนกระจกแห้ง หากทำการ develop มากกว่า 1 แผ่นในครั้งเดียวควรระวังไม่ให้แผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วซ้อนทับหรือแนบสนิทติดกัน

จ. การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลไปส่องกับสาร UV จากนั้นลากเส้นขอบของแถบสารที่แยกด้วยดินสอ แล้วขูดแถบสารนั้นลงในขวดรูปชมพู่

ฉ. การสกัดสารออกจากซิลิกาเจล นำแถบสารที่ขูดออกมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้วนำไป stir 10 นาที จากนั้นนำไปกรองแยกซิลิกาเจลออก จะได้สารที่ต้องการแล้วนำสารที่ได้นั้นไประเหยตัวทำละลายออก

2.5.5 โครมาโทตรอน (Radial chromatograph)

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

ก. การเตรียมวัฏภาคนิ่ง ชั่งซิลิกาเจล หนัก 30.0 กรัม ผสมน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวจากนั้นนำไปเคลือบด้านบนแผ่นแก้วทรงกลม

ข. รอให้แผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลแห้งแล้วมาปรับความหนาของซิลิกาให้มีขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร

ค. เปิดเครื่องโครมาโทตรอนแล้วหยดสารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไปบนกลางแผ่นแก้วทรงกลมที่เคลือบด้านบนด้วยซิลิกาเจลที่เตรียมไว้ขณะกำลังหมุน

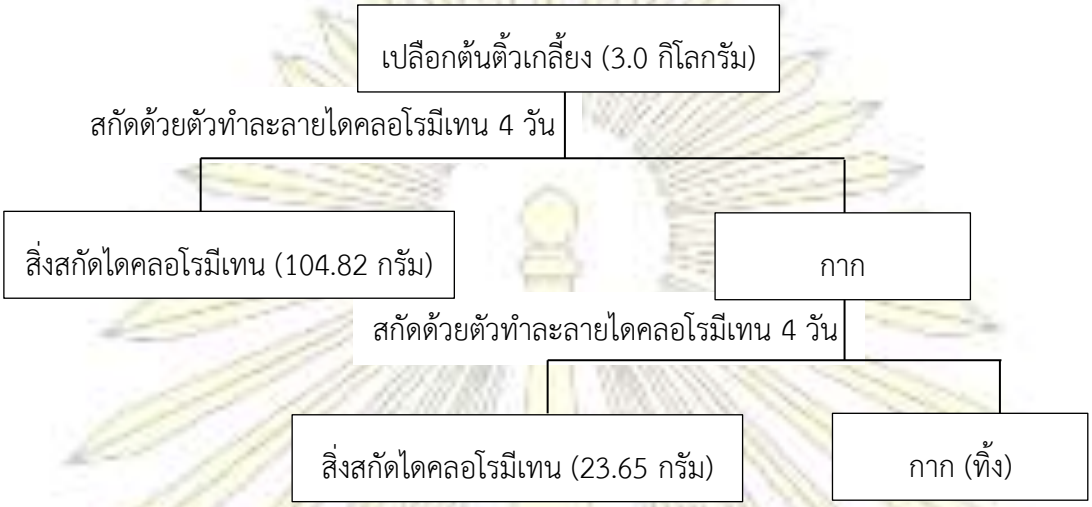
ง. ปล่อยตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในเครื่องโครมาโทตรอน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับเกิดการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นแถบสารที่แยกได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลมและทำการเก็บแฟรกชันตามแถบสารที่แยกได้

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำเปลือกแห้งของต้นติ้วเกลี้ยง 3.0 กิโลกรัมมาบดให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนจำนวน 2 รอบ โดยแช่ค้างคืนไว้ 4 วันหลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหย

สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) จากนั้นจะได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.6.1



แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัดเปลือกต้นติ้วเกลี้ยง

2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดเปลือกต้นติ้วเกลี้ยงที่สกัดด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนที่มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation) ได้สิ่งที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทนหนัก 128.47 กรัม

2. นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล (silica gel column chromatography) ชะด้วยตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทน–เฮกเซนจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน และ100% เอทิลอะซเตต โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 5 แฟรกชัน (A-E)

3. นำสารแต่ละแฟรกชัน (A-E) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม 0% ไดคลอโรมีเทน–เฮกเซนจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน

5. นำแฟรกชัน A มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจล ชะด้วยตัวทำละลายผสม 30% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (A1-A2) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 30% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน A2 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน A2 มาทำการแยกด้วยเทคนิค Sephadex ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **10** (3.2 มิลลิกรัม) และแฟรกชัน A2.2 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน A2.2 มาทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **7** (2.0 มิลลิกรัม)

6. นำแฟรกชัน B มาทำการแยกด้วยเทคนิค Sephadex ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (B1-B2) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 50% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน B1 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน B1 มาทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **8** (2.5 มิลลิกรัม)

7. นำแฟรกชัน C มาทำการแยกด้วยเทคนิค Sephadex ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (C1-C2) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 60% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าทั้ง 2 แฟรกชันน่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน C1 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 60% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **6** (6.5 มิลลิกรัม)

- นำแฟรกชัน C2 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 3 แฟรกชัน (C2.1-C2.3) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน C2.1 และ C2.2 ได้สารที่มีความบริสุทธิ์จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **1** (2.5 มิลลิกรัม) และ **9** (4.5 มิลลิกรัม) ตามลำดับส่วนแฟรกชัน C2.3น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน C2.3 มาทำการแยกด้วยเทคนิค PTLC โดยระบบตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 2 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **2** (3.0 มิลลิกรัม) และ **3** (2.0 มิลลิกรัม)

8. นำแฟรกชัน D มาทำการแยกด้วยเทคนิค Sephadex ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (D1-D2) จากนั้นนำไป

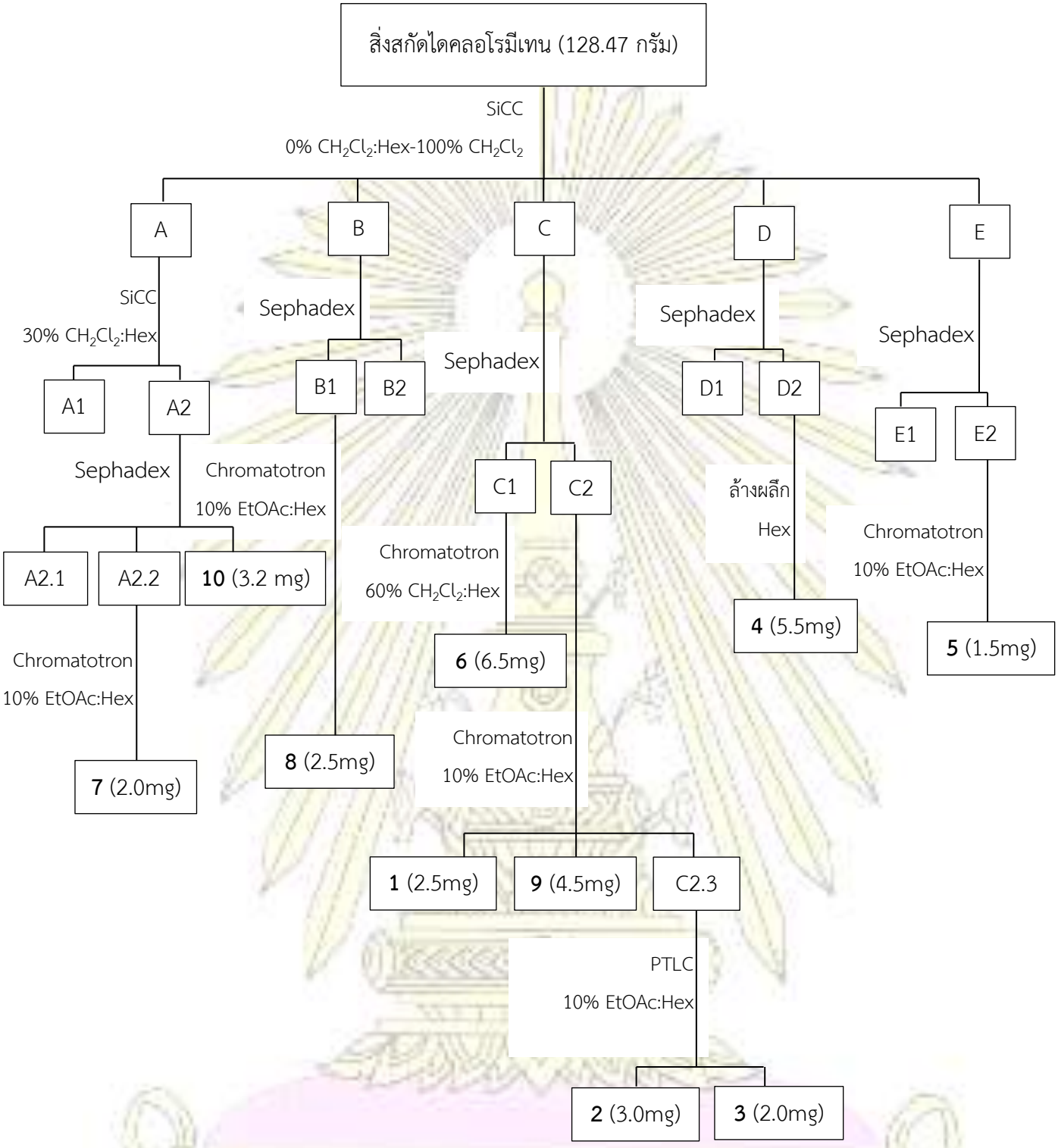
ระเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 70% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน D2 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน D2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างผลึกด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **4** (5.5 มิลลิกรัม)

9. นำแฟรกชัน E มาทำการแยกด้วยเทคนิค Sephadex ชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 2 แฟรกชัน (E1-E2) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 80% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรกชัน E2 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

- นำแฟรกชัน E2 มาทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทตรอน โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน พบว่าแฟรกชันนี้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างจากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสารหมายเลข **5** (1.5 มิลลิกรัม)

10. นำสารบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (KB และ HeLa S-3)



แผนภาพที่ 2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกต้นติ้วเกลี้ยง

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method

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

2. เติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไปใน 96-well culture plate

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

4. เติมสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบและสารมาตรฐาน Doxorubicin 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 บ่มต่ออีก 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C แยกเอาส่วนใสออกแล้วนำตะกอนที่เหลือมาละลายด้วย DMSO 150 μL และเติม 0.1 M glycine ปริมาตร 25 μL ลงไป

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

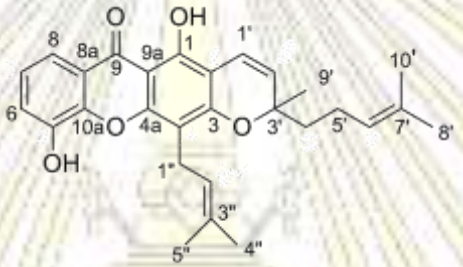
บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการทดลองการแยกสารจากแฟรกชัน A-E ของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากเปลือกต้นติ้วเกลี้ยง พบว่าสามารถแยกสารได้ทั้งหมด 10 ชนิด โดยพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการเปรียบเทียบข้อมูลทาง NMR ของสารที่เคยมีการรายงานก่อนหน้านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลจาก ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ซึ่งได้เปรียบเทียบข้อมูลดังแสดงในตาราง

3.1.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **1**



รูปที่ 3.1.1 โครงสร้างสาร **1**

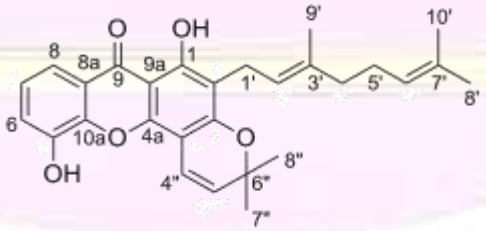
ตารางที่ 3.1.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **1** เปรียบเทียบกับสาร Pruniflorone K[11]

ตำแหน่ง	สาร **1** ($CDCl_3$)		Pruniflorone K ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	156.0	-	156.1
2	-	104.5	-	104.5
3	-	158.6	-	158.4
4	-	106.5	-	106.7
5	-	144.5	-	144.5
6	7.30 (d, 7.5)	119.6	7.30 (d, 7.8)	119.8
7	7.24 (t, 7.9)	124.3	7.23 (t, 7.8)	124.0
8	7.75 (d, 7.8)	116.8	7.75 (d, 7.5)	116.8
9	-	181.5	-	181.5
4a	-	154.5	-	154.7
8a	-	144.6	-	144.4

9a	-	121.3	-	121.0
10a	-	103.3	-	103.3
1′	6.80 (d, 10.1)	116.1	6.79 (d, 10.2)	116.2
2′	5.56 (d, 10.1)	126.4	5.56 (d, 10.2)	126.2
3′	-	80.8	-	80.9
4′	1.78 (m)	41.8	1.78 (m)	41.8
5′	2.11 (m)	22.7	2.12 (m)	22.7
6′	5.09 (t, 7.0)	123.6	5.09 (t, 6.9)	123.7
7′	-	132.0	-	131.9
8′	1.66 (s)	25.6	1.68 (s)	25.6
9′	1.45 (s)	27.4	1.45 (s)	27.2
10′	1.45 (s)	17.7	1.45 (s)	17.6
1″	3.50 (d, 6.5)	21.7	3.50 (d, 6.9)	21.7
2″	5.24 (t, 7.1)	122.6	5.23 (t, 6.9)	122.7
3″	-	131.4	-	131.7
4″	1.72 (s)	25.7	1.72 (s)	25.5
5″	1.87 (s)	17.6	1.84 (s)	17.9
1-OH	13.08 (s)	-	13.08 (s)	-
5-OH	5.70 (s)	-	5.73 (brs)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **1** กับ Pruniflorone K พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **1** คือ Pruniflorone K

3.1.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **2**



รูปที่ 3.1.2 โครงสร้างสาร **2**

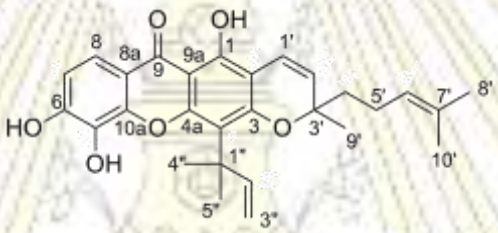
ตารางที่ 3.1.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **2** เปรียบเทียบกับสาร Formoxanthone B[12]

ตำแหน่ง	สาร **2** ($CDCl_3$)		Formoxanthone B ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	158.7	-	158.7
2	-	112.3	-	112.3
3	-	160.3	-	160.6
4	-	100.5	-	100.6
5	-	144.5	-	144.3
6	7.31 (dd, 7.3, 1.5)	120.1	7.30 (dd, 7.8, 1.5)	120.1
7	7.23 (t, 7.7)	123.7	7.23 (t, 7.8)	123.9
8	7.78 (dd, 7.8, 1.5)	117.4	7.78 (dd, 7.8, 1.5)	117.2
9	-	180.7	-	180.8
4a	-	149.3	-	149.2
8a	-	144.2	-	144.1
9a	-	121.4	-	121.2
10a	-	103.1	-	103.2
1′	3.37 (d, 7.2)	21.2	3.37 (d, 7.5)	21.1
2′	5.26 (m)	121.4	5.25 (m)	121.7
3′	-	135.3	-	135.2
4′	1.98 (m)	39.9	2.00 (m)	39.8
5′	2.05 (m)	26.8	2.05 (m)	26.7
6′	5.08 (m)	124.1	5.08 (m)	124.4
7′	-	131.5	-	131.3
8′	1.64 (s)	25.6	1.64 (brs)	25.7
9′	1.82 (s)	16.1	1.82 (s)	16.3
10′	1.57 (s)	17.7	1.57 (brs)	17.7
1″	-	-	-	-
2″	-	-	-	-
3″	-	-	-	-

4 ″	6.79 (d, 9.9)	115.0	6.79 (d, 9.9)	115.0
5 ″	5.65 (d, 9.6)	127.6	5.64 (d, 9.9)	127.4
6 ″	-	78.2	-	78.1
7 ″	1.50 (s)	28.0	1.49 (s)	28.2
8 ″	1.49 (s)	28.0	1.49 (s)	28.2
1-OH	13.20 (s)	-	13.20 (s)	-
5-OH	5.70 (s)	-	5.71 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **2** กับ Formoxanthone B พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **2** คือ Formoxanthone B

3.1.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **3**



รูปที่ 3.1.3 โครงสร้างสาร **3**

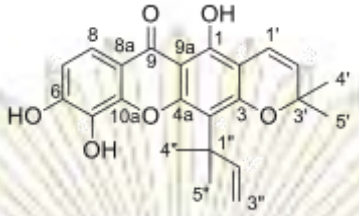
ตารางที่ 3.1.3 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **3** เปรียบเทียบกับสาร Pruniflorone G[13]

ตำแหน่ง	สาร **3** ($CDCl_3$)		Pruniflorone G ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	156.8	-	156.8
2	-	105.4	-	105.2
3	-	159.5	-	159.2
4	-	112.7	-	112.7
5	-	131.0	-	131.0
6	-	149.2	-	149.0
7	6.98 (d, 8.9)	112.7	6.96 (d, 9.0)	112.8
8	7.76 (d, 8.9)	117.8	7.69 (d, 9.0)	117.5

9	-	180.3	-	180.7
4a	-	154.3	-	154.1
8a	-	144.4	-	144.5
9a	-	113.5	-	113.7
10a	-	102.9	-	102.9
1′	6.78 (d, 9.9)	116.8	6.83 (d, 9.9)	116.7
2′	5.63 (d, 9.9)	125.5	5.58 (d, 9.9)	125.6
3′	-	81.3	-	81.1
4′	1.91 (m), 1.70 (m)	41.8	1.91 (m), 1.72 (m)	41.8
5′	2.13 (m)	23.3	2.14 (m)	23.2
6′	5.13 (t, 7.2)	123.5	5.13 (t, 7.2)	123.7
7′	-	132.1	-	132.1
8′	1.59 (s)	17.6	1.60 (s)	17.6
9′	1.52 (s)	26.8	1.47 (s)	26.9
10′	1.69 (s)	25.7	1.69 (s)	25.7
1″	-	41.5	-	41.4
2″	6.67 (dd, 10.6, 17.6)	156.7	6.75 (dd, 10.8, 17.7)	156.7
3″	5.06 (dd, 1.2, 10.6) 5.30 (dd, 1.2, 17.7)	103.3	5.05 (dd, 1.2, 10.8) 5.23 (dd, 1.2, 17.7)	103.3
4″	1.66 (s)	28.4	1.66 (s)	28.0
5″	1.66 (s)	28.4	1.66 (s)	28.4
1-OH	13.55 (s)	-	13.50 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **3** กับ Pruniflorone G พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **3** คือ Pruniflorone G

3.1.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **4**



รูปที่ 3.1.4 โครงสร้างสาร **4**

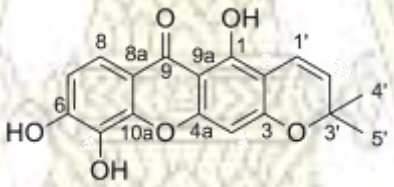
ตารางที่ 3.1.4 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **4** เปรียบเทียบกับสาร Macluraxanthone[14]

ตำแหน่ง	สาร **4** ($CDCl_3$)		Macluraxanthone ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	157.2	-	157.3
2	-	105.7	-	105.7
3	-	159.9	-	159.6
4	-	114.0	-	114.2
5	-	133.7	-	133.6
6	-	151.6	-	151.6
7	6.94 (d, 8.7)	113.7	6.97 (d, 9.0)	113.7
8	7.68 (d, 8.8)	117.2	7.75 (d, 9.0)	117.2
9	-	181.3	-	181.8
4a	-	155.8	-	155.9
8a	-	103.7	-	103.6
9a	-	114.4	-	114.4
10a	-	146.7	-	146.7
1′	6.77 (d, 9.9)	116.7	6.78 (d, 9.9)	116.4
2′	5.61 (d, 9.9)	128.4	5.62 (d, 9.9)	128.2
3′	-	79.0	-	79.0
4′	1.51 (s)	28.5	1.52 (s)	28.0
5′	-	28.5	-	28.0
6′	-	-	-	-
7′	-	-	-	-

8′	-	-	-	-
9′	1.51 (s)	-	1.52 (s)	-
10′	-	-	-	-
1″	-	41.7	-	41.8
2″	6.67 (dd, 17.7, 10.6)	29.9	6.67 (dd, 17.7, 10.6)	29.9
3″	5.22 (d, 17.6) 5.05 (d, 10.6)	29.9	5.20 (d, 17.7) 5.06 (d, 10.6)	29.9
4″	1.65 (s)	152.5	1.68 (s)	152.9
5″	1.65 (s)	107.5	1.68 (s)	107.2
1-OH	13.52 (s)	-	13.57 (s)	-
5-OH	6.27 (s)	-	6.24 (brs)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **4** กับ Macluraxanthone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **4** คือ Macluraxanthone

3.1.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **5**



รูปที่ 3.1.5 โครงสร้างสาร **5**

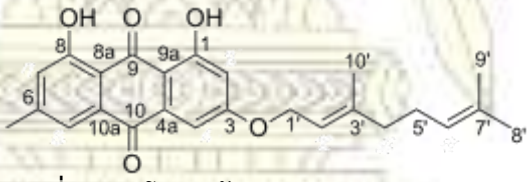
ตารางที่ 3.1.5 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **5** เปรียบเทียบกับสาร Jacareubin[15]

ตำแหน่ง	สาร **5** ($CDCl_3$)		Jacareubin ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	116.8	-	116.8
2	-	113.5	-	113.2
3	-	151.1	-	151.6
4	-	132.3	-	132.6
5	-	94.4	-	94.9

6	-	160.4	-	160.4
7	7.57 (d, 8.4)	104.5	7.61 (d, 8.4)	104.5
8	6.98 (d, 8.4)	158.2	6.98 (d, 8.4)	158.1
9	-	180.3	-	180.7
4a	-	146.4	-	146.2
8a	-	157.1	-	157.2
9a	-	102.6	-	102.9
10a	-	114.6	-	114.0
1′	6.73 (d, 10.2)	115.3	6.66 (d, 9.6)	115.1
2′	5.60 (d, 10.3)	127.9	5.72 (d, 9.6)	128.0
3′	-	78.4	-	78.3
4′	1.48 (s)	27.6	1.45 (s)	27.8
5′	1.48 (s)	27.6	1.45 (s)	27.8
1-OH	13.12 (s)	-	13.5 (s)	-
5-OH	6.33 (s)	-	6.33 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **5** กับ Jacareubin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **5** คือ Jacareubin

3.1.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **6**



รูปที่ 3.1.6 โครงสร้างสาร **6**

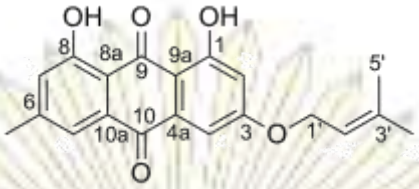
ตารางที่ 3.1.6 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **6** เปรียบเทียบกับสาร 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone[16]

ตำแหน่ง	สาร **6** ($CDCl_3$)		3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	164.9	-	164.9

2	6.64 (d, 2.4)	107.3	6.64 (d, 2.4)	107.7
3	-	165.8	-	165.8
4	7.33 (d, 2.4)	108.6	7.35 (d, 2.4)	108.6
5	7.58 (s)	121.0	7.55 (s)	121.0
6	-	148.1	-	148.4
7	7.04 (s)	124.2	7.02 (s)	124.4
8	-	162.3	-	162.5
9	-	190.5	-	190.1
10	-	181.8	-	181.2
4a	-	134.9	-	134.6
8a	-	113.5	-	113.4
9a	-	109.9	-	109.9
10a	-	146.5	-	145.6
1′	4.66 (d, 6.5)	65.7	4.66 (d, 6.5)	65.0
2′	5.57 (t, 6.3)	117.8	5.55 (t, 6.3)	117.8
3′	-	142.6	-	142.6
4′	2.11 (m)	39.5	2.10 (m)	39.5
5′	2.11 (m)	26.1	2.10 (m)	26.6
6′	5.08 (t, 5.9)	124.2	5.09 (t, 5.8)	124.1
7′	-	131.8	-	131.5
8′	1.67 (s)	25.5	1.66 (s)	25.5
9′	1.67 (s)	16.6	1.66 (s)	16.6
10′	1.78 (s)	17.5	1.78 (s)	17.5
1-OH	12.25 (s)	-	12.28 (s)	-
8-OH	12.05 (s)	-	12.05 (s)	-
6-Me	2.43 (s)	22.3	2.41 (s)	22.3

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **6** กับ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **6** คือ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone

3.1.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **7**



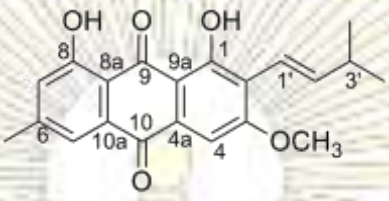
รูปที่ 3.1.7 โครงสร้างสาร **7**

ตารางที่ 3.1.7 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **7** เปรียบเทียบกับสาร Madagascin[17]

ตำแหน่ง	สาร **7** ($CDCl_3$)		Madagascin ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	164.9	-	164.9
2	6.68 (d, 2.4)	107.3	6.63 (d)	107.3
3	-	165.8	-	165.8
4	7.26 (d)	108.6	7.27 (d)	108.6
5	7.62	121.0	7.53	121.1
6	-	148.1	-	147.9
7	7.08 (s)	124.2	7.02	124.5
8	-	162.3	-	162.0
9	-	190.5	-	190.6
10	-	181.8	-	181.9
4a	-	134.9	-	135.0
8a	-	113.5	-	113.3
9a	-	109.9	-	110.0
10a	-	146.5	-	146.5
1′	4.68 (d, 6.6)	65.7	4.67 (d)	65.5
2′	5.51 (d, 6.9)	117.8	5.50 (t)	117.7
3′	1.79 (s)	142.6	1.83 (s)	142.7
1-OH	12.30	-	12.30	-
8-OH	12.53	-	12.53	-
6-Me	2.45 (brs)	22.3	2.45 (brs)	22.3

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **7** กับ Madagascin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **7** คือ Madagascin

3.1.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **8**



รูปที่ 3.1.8 โครงสร้างสาร **8**

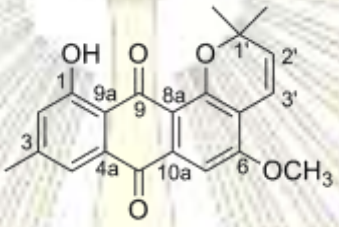
ตารางที่ 3.1.8 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **8** เปรียบเทียบกับสาร Vismiaquinone[18]

ตำแหน่ง	สาร **8** ($CDCl_3$)		Vismiaquinone ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	162.2	-	162.6
2	-	-	-	-
3	-	56.6	-	56.1
4	7.26 (s)	108.6	7.34 (s)	108.6
5	7.61 (s)	121.0	7.56 (s)	121.0
6	-	148.1	-	148.1
7	7.07 (s)	124.4-	7.03 (s)	124.2-
8	-	-	-	-
9	-	191.0	-	190.9
10	-	182.4	-	182.4
4a	-	113.5	-	113.5
8a	-	133.0	-	133.0
9a	-	-	-	-
10a	-	-	-	-
1′	6.66 (d, 16.6)	-	6.60 (d, 16.6)	-
2′	6.92 (dd, 7.2, 16.3)	-	6.95 (dd, 7.2, 16.3)	-
3′	1.14 (d, 6.7), 2.52 (m)	22.1	1.14 (d, 6.8), 2.48 (m)	22.1
1-OH	12.10 (s)	-	12.02 (s)	-

8-OH	12.95 (s)	-	12.84 (s)	-
3-OMe	4.04 (s)	56.8	4.04 (s)	56.8
6-Me	2.45 (s)	22.5	2.42 (s)	22.5

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **8** กับ Vismiaquinone พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **8** คือ Vismiaquinone

3.1.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **9**



รูปที่ 3.1.9 โครงสร้างสาร **9**

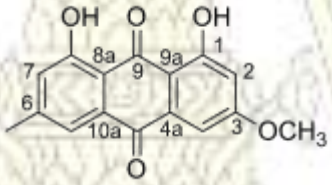
ตารางที่ 3.1.9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **9** เปรียบเทียบกับสาร 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione[19]

ตำแหน่ง	สาร **9** ($CDCl_3$)		11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	162.3	-	162.3
2	7.06 (s)	124.7	7.07 (s)	124.7
3	-	148.1	-	148.4
4	7.56 (s)	119.9	7.56 (s)	120.0
5	7.43 (s)	103.0	7.43 (s)	103.1
6	-	56.4	-	56.4
7	-	100.6	-	100.7
8	-	160.6	-	160.7
9	-	190.5	-	190.5
10	-	181.8	-	181.9
4a	-	134.9	-	135.0
8a	-	109.9	-	109.9
9a	-	113.5	-	113.3

10a	-	146.5	-	146.5
1′	-	124.4	-	124.4
2′	5.83 (d, 10.0)	132.0	5.85 (d, 10.0)	132.0
3′	6.13 (d, 10.0)	116.0	6.13 (d, 10.0)	116.0
4′	1.57 (s)	28.1	1.55 (s)	28.0
5′	1.57 (s)	28.1	1.55 (s)	28.0
1-OH	13.19 (s)	-	13.20 (s)	-
3-Me	2.42 (s)	22.3	2.43 (s)	22.3
6-OMe	4.01 (s)	56.4	4.04 (s)	56.7

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **9** กับ 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **9** คือ 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione

3.1.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร **10**



รูปที่ 3.1.10 โครงสร้างสาร **10**

ตารางที่ 3.1.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **10** เปรียบเทียบกับสาร Physcion[20]

ตำแหน่ง	สาร **10** ($CDCl_3$)		Physcion ($CDCl_3$)	
	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)	^{1}H (δ, ppm)	^{13}C (δ, ppm)
1	-	162.5	-	162.5
2	7.09 (s)	124.5	7.07 (s)	124.5
3	-	148.4	-	148.4
4	7.63 (brs)	121.3	7.62 (brs)	121.2
5	7.37 (d, 2.3)	108.2	7.35 (d, 2.4)	108.2

6	-	166.5	-	166.5
7	6.69 (d, 2.3)	106.7	6.67 (d, 2.4)	106.7
8	-	165.2	-	165.1
9	-	190.8	-	190.8
10	-	182.0	-	182.0
4a	-	135.2	-	135.2
8a	-	110.2	-	110.2
9a	-	113.7	-	113.6
10a	-	133.2	-	133.2
1-OH	12.12 (s)	-	12.11 (s)	-
8-OH	12.32 (s)	-	12.31 (s)	-
3-OMe	3.94 (s)	57.0	3.92 (s)	56.9
6-Me	2.45 (s)	21.7	2.43 (s)	21.5

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR ของสาร **10** กับ Physcion พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่าสาร **10** คือ Physcion

3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

จากการนำสารที่แยกได้ทั้งหมด (**1**-**10**) โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2 ชนิด คือ KB และ Hela S-3 พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ค่าการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ (**1**-**10**) และสารมาตรฐาน Doxorubicin

สาร	**ค่า IC_{50} (μM)**	
	KB	**HeLa S-3**
1	46.86	53.69
2	63.37	92.70
3	94.54	>100
4	1.45	1.62
5	>100	>100
6	>100	>100
7	>100	>100
8	>100	>100

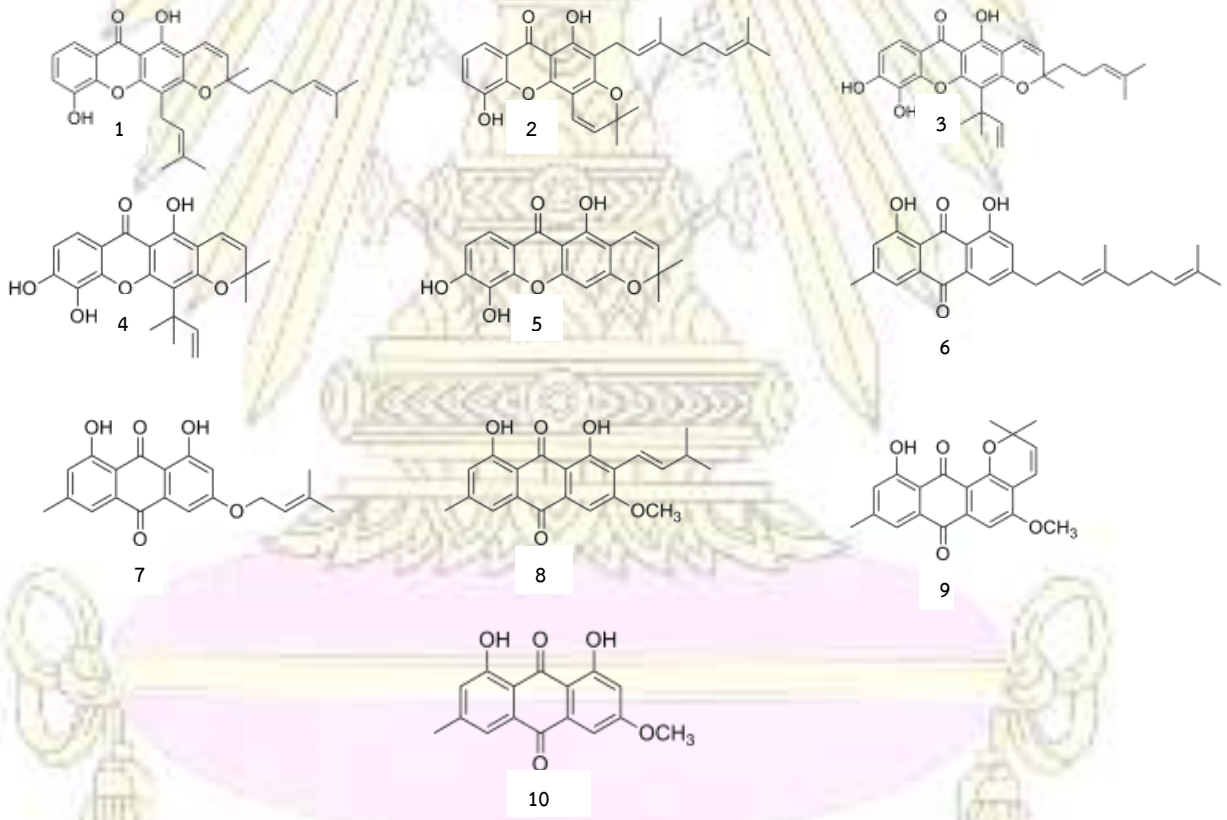
9	92.70	>100
10	40.89	82.51
Doxorubicin	0.13	0.03

จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB และ HeLa S-3 พบว่า สาร **4** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.45 และ 1.62 **μ**M ตามลำดับ ส่วนสาร **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, และ **10** พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 เนื่องจากมีค่า IC_{50} มากกว่า 30 **μ**M

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนของเปลือกต้นติ้วเกลี้ยงมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า แยกได้สารในกลุ่มแซนโทน 5 ชนิด คือ Pruniflorone K (**1**), Formoxanthone B (**2**), Pruniflorone G (**3**), Macluraxanthone (**4**), และ Jacareubin (**5**) สารในกลุ่มแอนทราคิวโนน 5 ชนิด คือ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone (**6**), Madagascin (**7**), Vismiaquinone (**8**), 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione (**9**), และ Physcion (**10**) โดยได้พิสูจน์เอกลักษณ์ทางของสารทั้งหมดด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ จากการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าสาร **4** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งชนิด KB และ HeLa S-3 เซลล์ ในระดับดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.45 และ 1.62 μM ตามลำดับ ส่วนสาร **1**, **2**, **3**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, และ **10** พบว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa S-3 เนื่องจากมีค่า IC_{50} มากกว่า 30 μM



รูปที่ 4.1 แสดงโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ **1-10**

ข้อเสนอแนะ

1. ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาที่จำกัด ดังนั้นควรแยกในส่วนนี้ต่อไป

2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนเพียงชนิดเดียว เพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดอื่นๆ เช่น เมทานอล, เอทิลอะซิเตต และเฮกเซน เป็นต้น

3. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกเท่านั้น อาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนอื่นที่น่าสนใจอีก เช่น ต้น, ใบ, ราก และผล เป็นต้น

4. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆที่น่าสนใจ

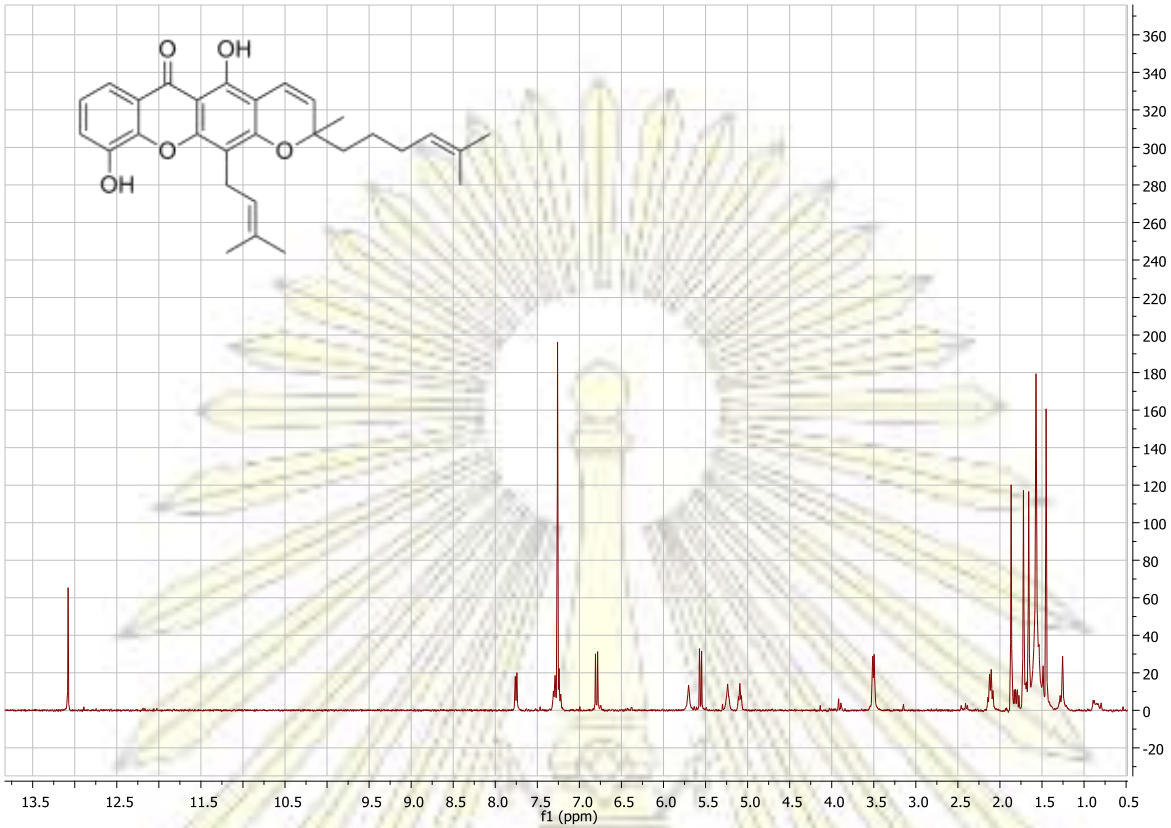
เอกสารอ้างอิง

1. โครงการจัดทำฐานข้อมูลพืชสมุนไพรที่สำรวจและวิจัยใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช “ติ้วเกลี้ยง” https://home.kku.ac.th/orip2/thaiherbs/index.php/2013-05-04-04-14-43/32-2013-05-07-09-39-56 (accessed January 10, 2018)
2. Thu, Z.M.; Aung, H.T.; Sein, M.M.; Maggiolini, M.; Lappano, R.; Vidari, G. Highly cytotoxic xanthones from *Cratoxylum cochinchinense* collected in Myanmar. *Natural Product Communications* **2017,** *12*, 1759-1765.
3. Bennett, G.J.; Harrison, L.J.; Sia, G-L.; Sim, K-Y. Triterpenoids, tocotrienols and xanthones from the bark of *Cratoxylum Cochinchinense*. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1245-1251.
4. Sia, G-L.; Bennett, G.J.; Harrison, L.J.; Sim, K-Y. Minor xanthones from the bark of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1521-1528.
5. Lien, H.D.N.; Harrison, L.J. Triterpenoid and xanthone constituents of *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 471-476.
6. Mahabusarakum, W.; Nuangnaowarat, W.; Taylor, W.C. Xanthone derivatives from *Cratoxylum cochinchinense* roots. *Phytochemistry* **2005**, *67*, 470-474.
7. Phuwapraisirisan, P.; Udomchotphruet, S.; Surapinit, S.; Tip-pyang, S. Antioxidant xanthones from *Cratoxylum cochinchinense*. *Natural Product Research* **2006,** *20*, 1332-1337.
8. Laphookhieo, S.; Maneerat, W.; Narmdorkmai, W.; Koysomboon, S. New Xanthones from the barks and fruits of *Cratoxylum cochinchinense*. *Heterocycles* **2006,** *78*, 1299-1307.
9. Duan, Y-H.; Dai, H.; Wang, G-H.; Chen, L-Y.; Chen, H-F.; Zeng, D-Q.; Li, Y-L.; Yao, X-S. Bioactive prenylated xanthones from the stems of *Cratoxylum cochinchinense*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2015**, *17*, 519-531.
10. Ito, C.; Matsui, T.; Niimi, A.; Tan, H.T.-W.; Itoigawa, M. Four New Xanthones from *Cratoxylum cochinchinense* and their in vitro antiproliferative effects. *Planta Medica* **2017,** *83*, 812-818.
11. Boonnak, N.; Karalai, C.; Chantrapromma, S.; Ponglimanont, C.; Akkharawit, K.; Chantrapromma, K.; Kato, S. Chromene and prenylated xanthones from the roots of

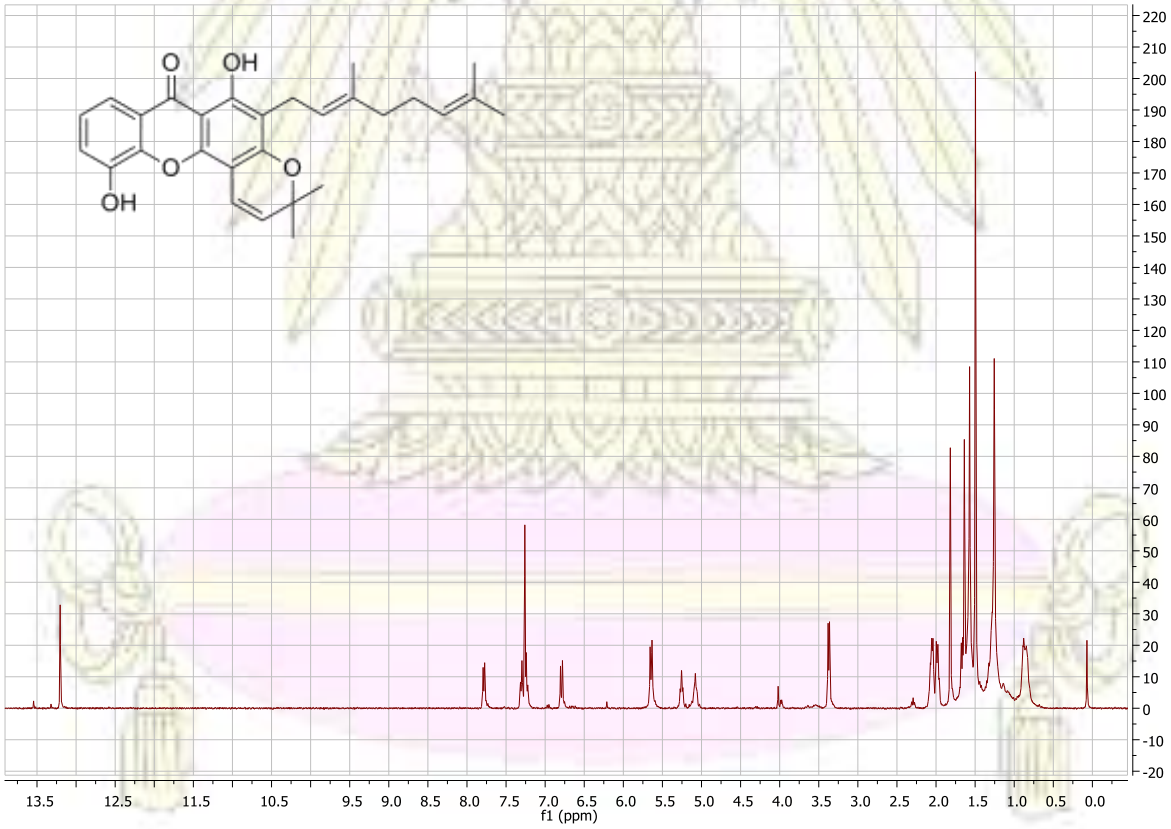
Cratoxylum formosum ssp. pruniflorum. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 386-389.

12. Boonsri, S.; Karalai, C.; Ponglomanont, C.; Akkharawit, K.; Chantrapromma, K. Antibacterial and cytotoxic xanthones from the roots of *Cratoxylum formosum*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 723-727.
13. Boonnak, N.; Karalai, C.; Chantrapromma, S.; Ponglimanont, C.; Fun, H-K.; Akkharawit, K.; Laphookhieo, S. Bioactive prenylated xanthones and anthraquinones from *Cratoxylum formosum ssp. pruniflorum*. Tetrahedron **2006**, *62*, 8850-8859.
14. Pailee, P.; Iinuma, M. Xanthones from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry* **2018**, *147*, 68-79.
15. Zhong, F.; Chen, Y.; Wang, P.; Feng, H.; Yang, G. Xanthones from the bark of *Garcinia xanthochymus* and their 1,1-Diphenyl-2-picrylhrdrazyl radical-scavenging activity. *Chinese Journal of Chemistry* **2009**, *27*, 74-80.
16. Botta, B.; Delle Monache, F.; Mariti Bettolo, G.B.; Oguakwa, J.U. 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxyanthraquinone and vismiones C, D and E from *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 539-542.
17. Ritchie, E.; Taylor, W.C. The constituents of *Harungana madagascarients pori*. *Tetrahedron* **1964**, *23*, 1431-1436.
18. Lourdes, M.; Mors, W.B. Vismiaquinone, A $\triangle^{1}$-isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana*. *Phytichemistry* **1981**, *20*, 1947-1950.
19. Nagem, T.J.; Faria, T.D.J. Quinonoid and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3362-3364.
20. Chang, S.; Park, Y.; Chai, S.; Kim, I.; Seo, Y.; Cho, K.; Shin, J. Anthraquinones and sterols from the Korean Marine Echiura. *Journal of the Korean Chemical Society* **1998**, *42*, 64-69

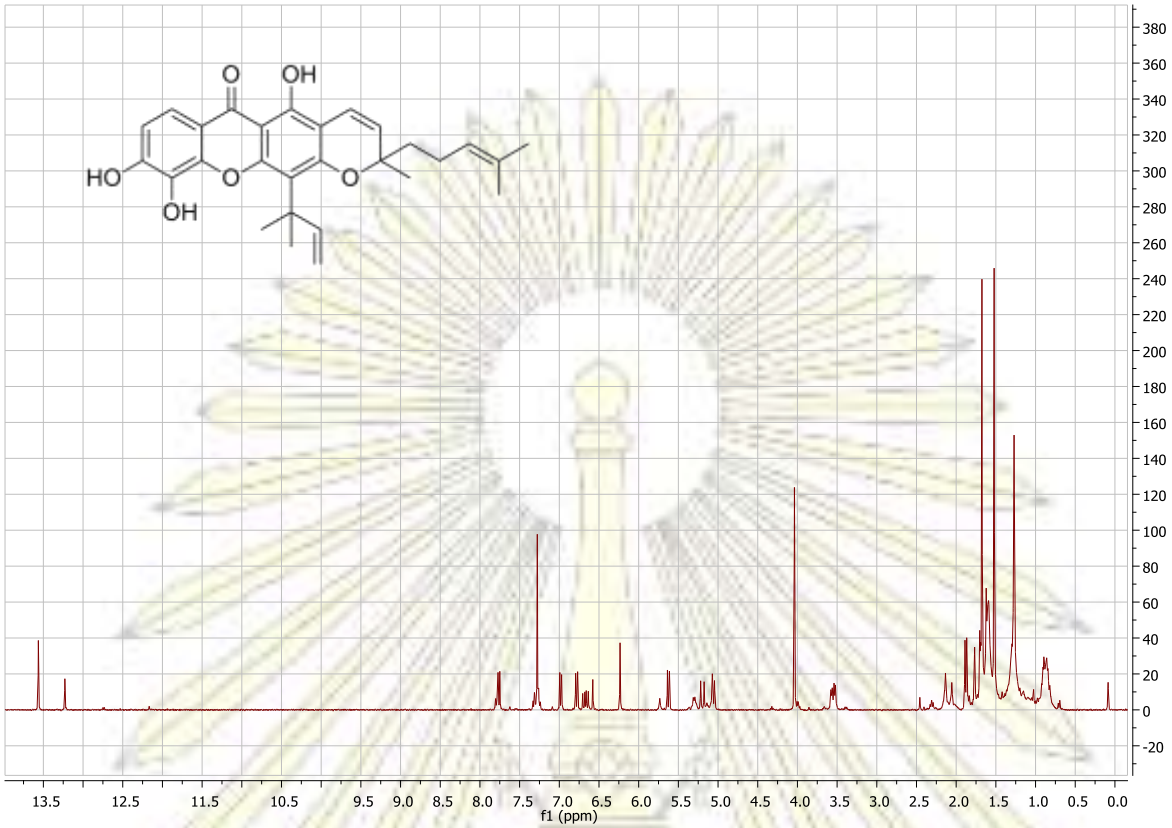
ภาคผนวก



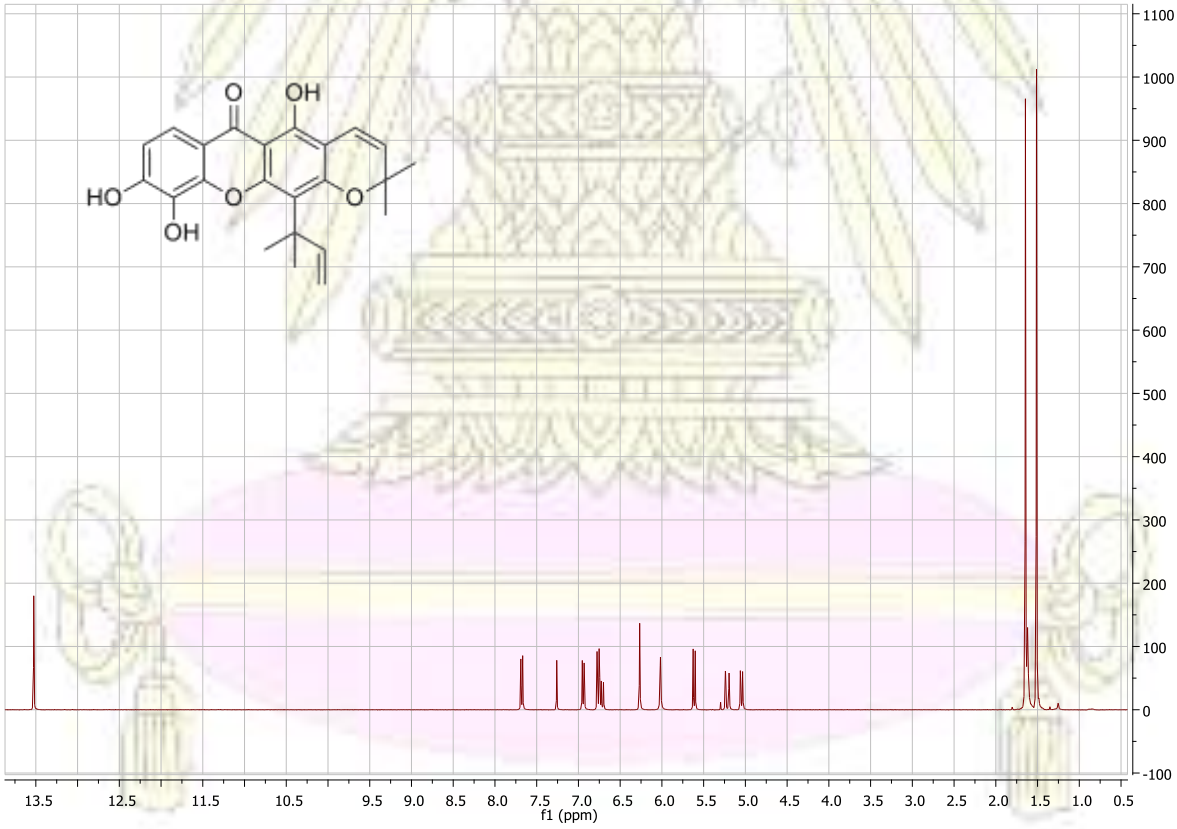
รูปที่ 1 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Pruniflorone K (**1**) ใน $CDCl_3$



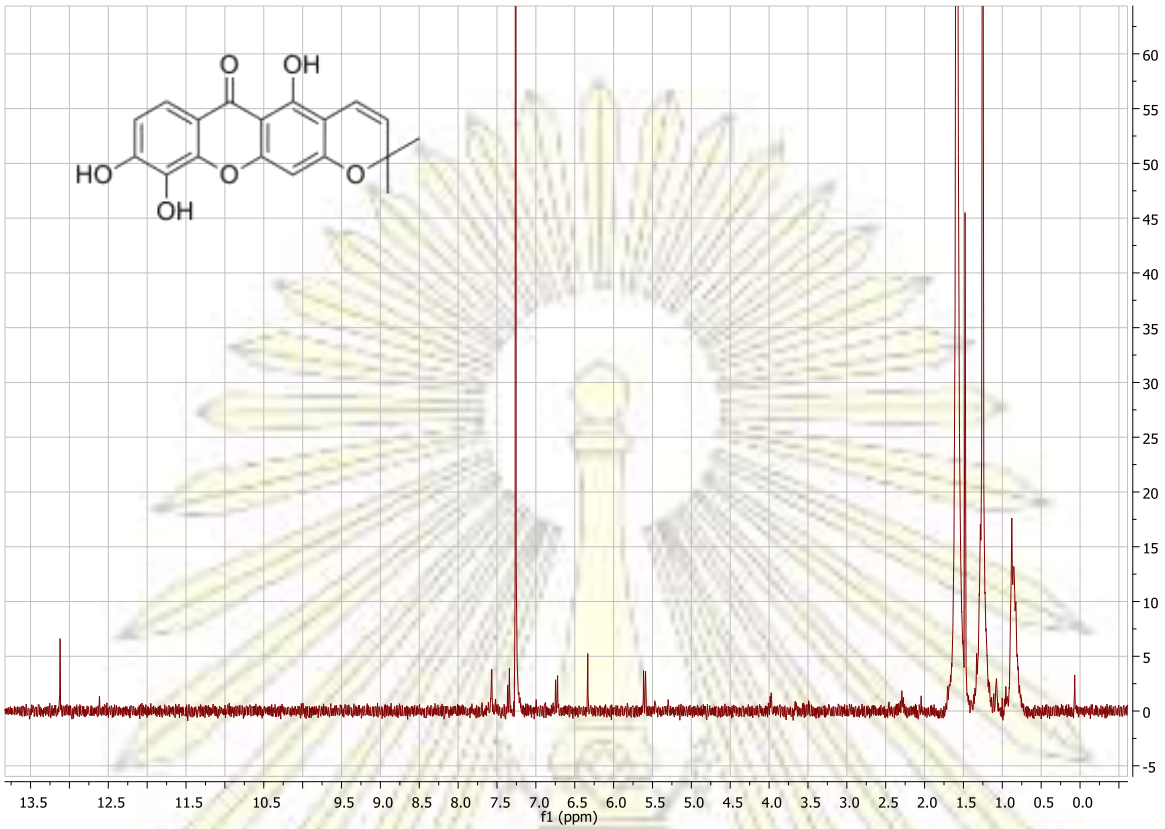
รูปที่ 2 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Formoxanthone B (**2**) ใน $CDCl_3$



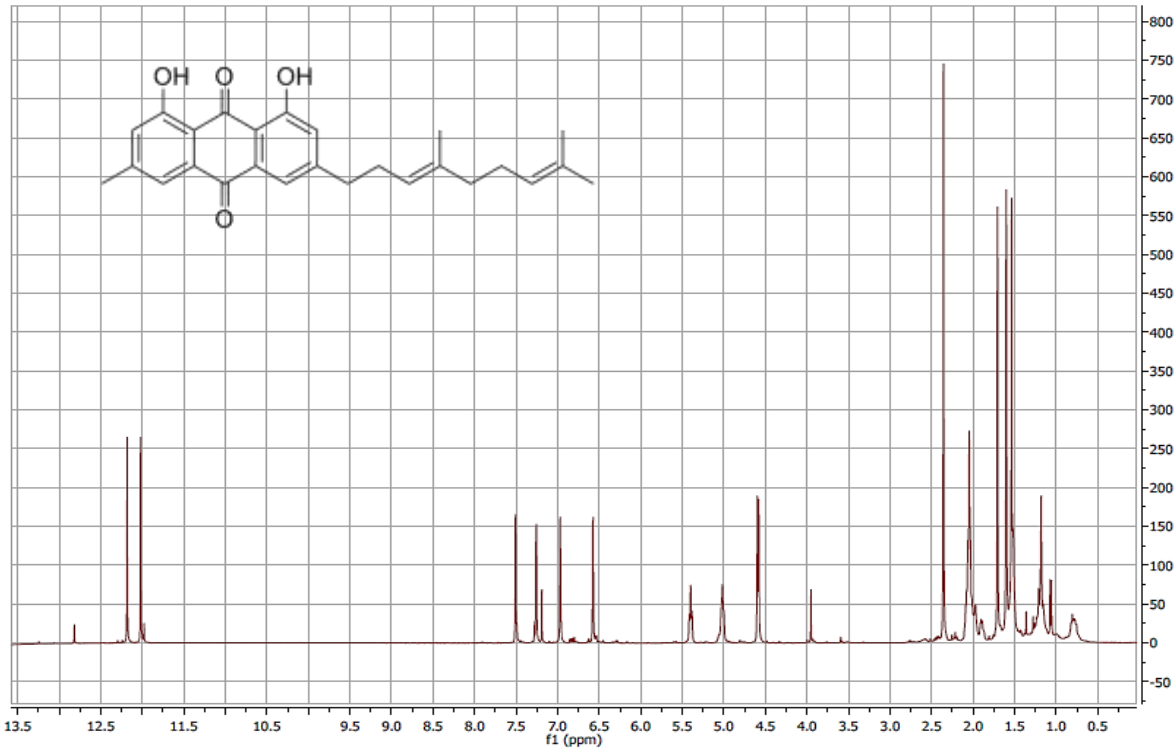
รูปที่ 3 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Pruniflorone G (**3**) ใน $CDCl_3$



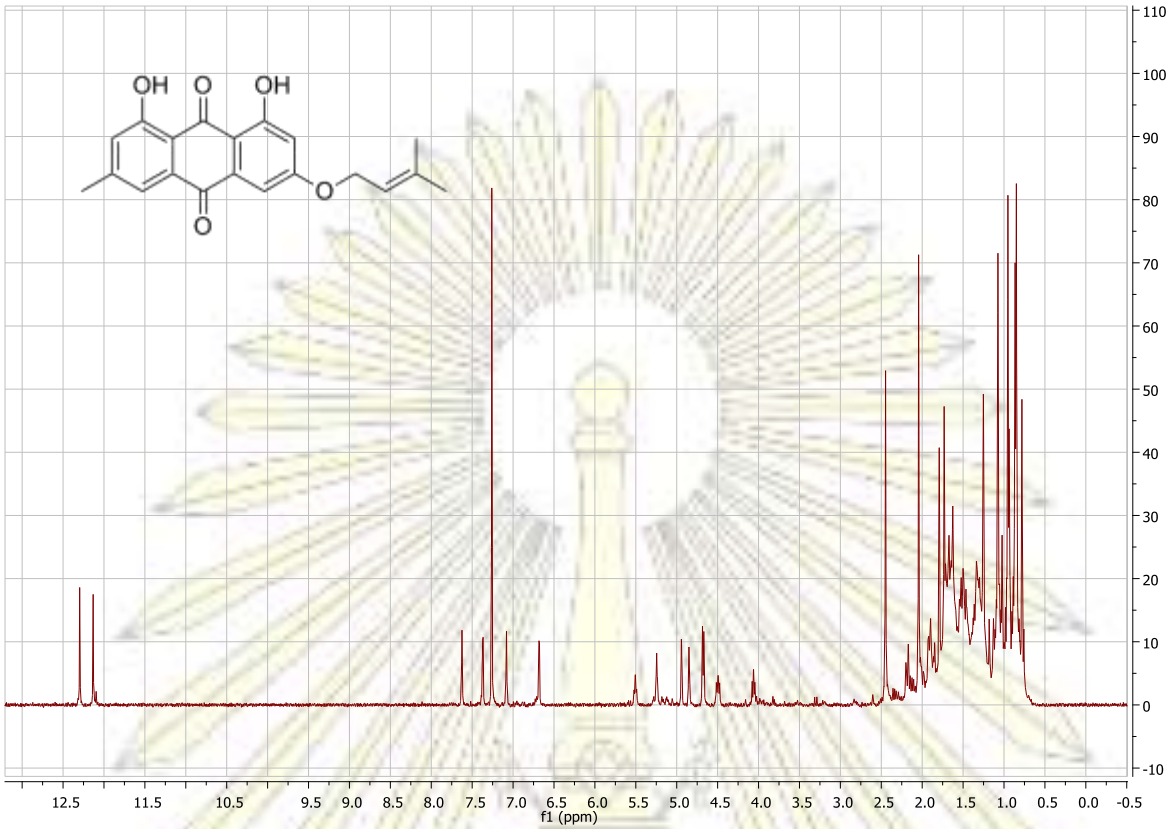
รูปที่ 4 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Macluraxanthone (**4**) ใน $CDCl_3$



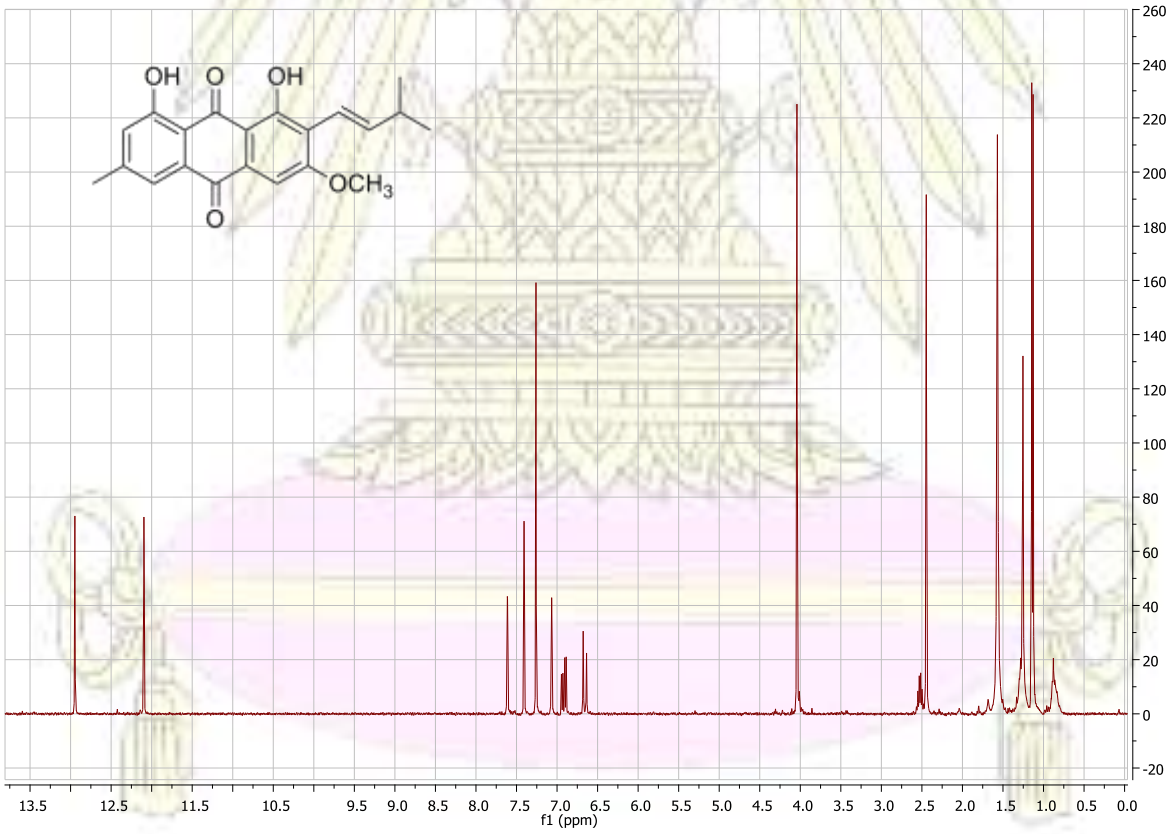
รูปที่ 5 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Jacareubin (**5**) ใน $CDCl_3$



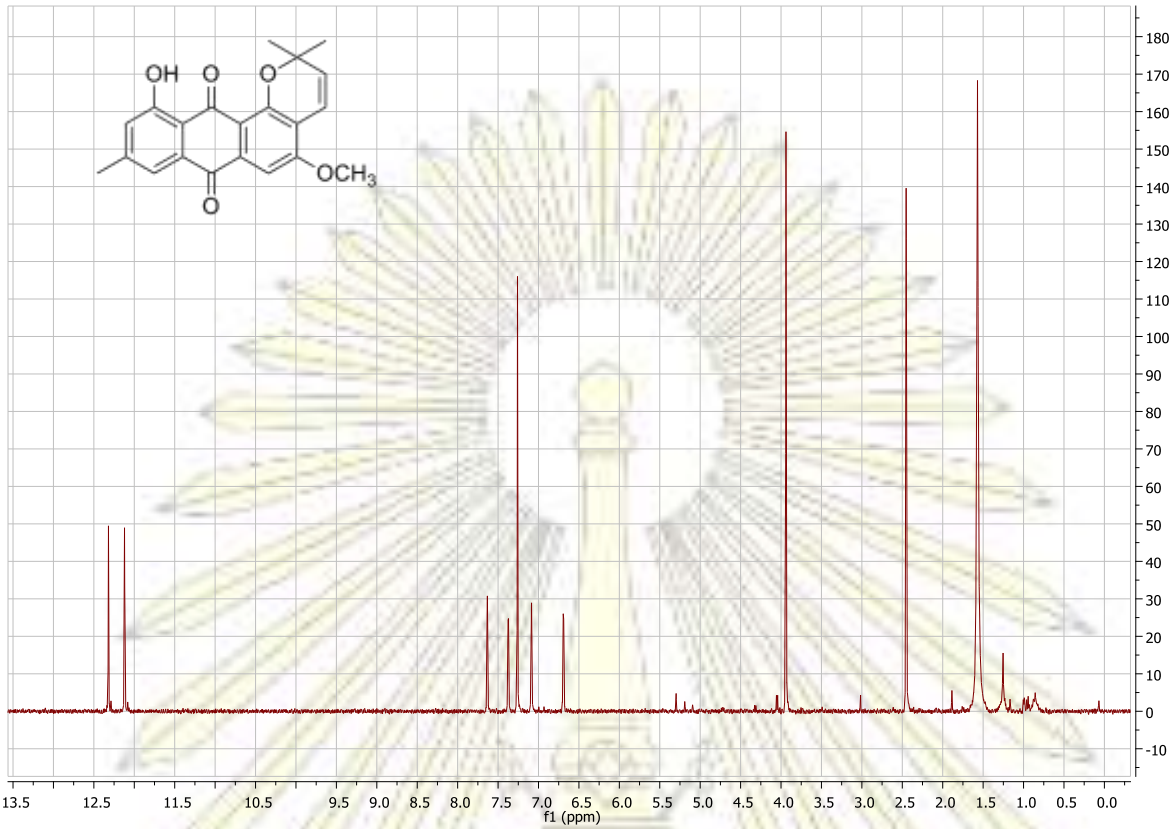
รูปที่ 6 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 3-Geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone (**6**) ใน $CDCl_3$



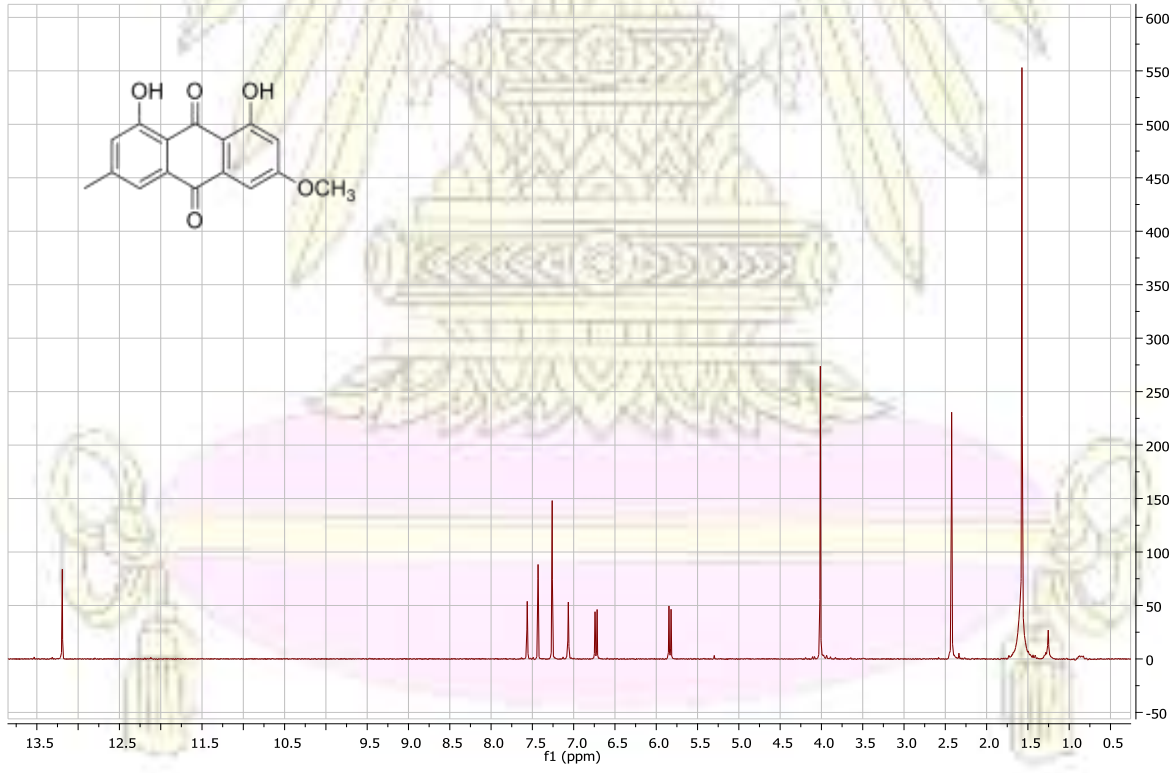
รูปที่ 7 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Madagascin (**7**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 8 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Vismiaquinone (**8**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 9 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ 11-Hydroxy-5-methoxy-2,2,9-trimethyl-2H-anthra[1,2-b]pyran-7,12-dione (**9**) ใน $CDCl_3$



รูปที่ 10 สเปกตรัม ^{1}H-NMR ของ Physcion (**10**) ใน $CDCl_3$

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวจีรนันท์ อ่องรัก เกิดเมื่อวันที่ 25 เดือน เมษายน พ.ศ. 2539 ที่จังหวัด สุโขทัย สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียน อุดมดรุณี จังหวัด สุโขทัย เมื่อปีการศึกษา 2556 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2557 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 312/1 ตำบล/แขวง บ้านสวน อำเภอ/เขต เมืองสุโขทัย จังหวัด สุโขทัย รหัสไปรษณีย์ 64220 อีเมล millikoe.bua@gmail.com