

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากต้นประตู่บ้าน

Chemical Constituents and their Cytotoxicity from *Pterocarpus indicus*

ชื่อนิสิต นายธนากร กุนแสง

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2558

ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากต้นประดู่บ้าน

Chemical Constituents and their Cytotoxicity from *Pterocarpus indicus*



โดย

นายธนากร กุณแสง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากต้นประตูบ้าน

โดย นายธนากร กุนแสง

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ พันธุนาวิน)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 15 เดือน ค.ศ. ๒๕๖๘

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ

ดีมาก ดี พอใช้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งจากต้นประดู่บ้าน
ชื่อนิสิตในโครงการ นายธนกร กุณแสง เลขประจำตัว 5533093723
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ทิพยางค์
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

จากการนำสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตของเปลือกและต้นประดู่บ้านมาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มคูมาริน ได้ 1 ชนิด คือ (+)-murracarpin (7) และสารที่มีรายงานแล้วอีก 12 ชนิด โดยแบ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ 1 ชนิด คือ lupeol (1) และสารในกลุ่มคูมาริน อีก 11 ชนิด คือ 7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one (2), phebalosin (3), minumicrolin (4), murrangatin-2'-acetate (5), (-)-murracarpin (6), murranganon (8), 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl) coumarin (9), meranzin hydrate (10), mexoticin (11), murralongin (12) และ microminutin (13) โดยโครงสร้างทั้งหมดได้พิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB และ HeLa พบว่า สาร 1-8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 28.75-94.94 mg/mL ส่วนสาร 1-3, 5-6, 9-10 และ 12 ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด HeLa ได้ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 36.87-93.48 mg/mL

คำสำคัญ : คูมาริน, ต้นประดู่บ้าน, ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง, (+)murracarpin

Title Chemical Constituents and their Cytotoxicity from *Pterocarpus indicus*

Student name Mr. Tanakon Koonsang ID : 5533093723

Advisor Assoc. Prof. Dr. Santi Tip-pyang

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Academic Year 2015

Abstract

The isolation and purification of the EtOAc crude extract from the stems and bark of *Pterocarpus indicus* using chromatographic techniques yielded one new coumarin, (+)murracarpin (7) together with 12 known compounds, including a triterpenoid, lupeol (1) and eleven known coumarins, 7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one (2), phebalosin (3), minumicrolin (4), murrangatin-2'-acetate (5), (-)-murracarpin (6), murranganon (8), 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin (9), meranzin hydrate (10), mexoticin (11), murralongin (12) and microminutin (13).

The cytotoxicity of all isolated compounds (1-13) against KB and HeLa cells lines were evaluated. Compounds 1-8 showed weak cytotoxicity toward KB cells with the IC₅₀ values of 28.75-94.94 mg/mL. In addition, compounds 1-3, 5-6, 9-10 and 12 exhibited weak cytotoxicity against HeLa cells with the IC₅₀ values of 36.87-93.48 mg/mL.

Keyword : *Pterocarpus indicus*, coumarin, cytotoxicity, (+)murracarpin



กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดที่ทำการวิจัย รวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรวรรณ พันธุนาวิน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่ชอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณพี่ๆ ทุกคนในหน่วยวิจัย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่คอยให้คำแนะนำและให้ยืมอุปกรณ์ในระหว่างการทำวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.จีราพัทธ์ สีแจ่ม ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้ ลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2558 ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอุนุมัติ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฉ
สารบัญแผนภาพ	ญ
สารบัญภาคผนวก	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นประดู่บ้าน	1
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	6
2.1 พืชตัวอย่าง	6
2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	6
2.3 สารเคมี	7
2.4 ขั้นตอนการทดลอง	7
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	8
2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด	9
2.7 วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method	13

	หน้า
บทที่ 3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้	14
3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 1	14
3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 2	15
3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 3	16
3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 4	17
3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 5	18
3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 6	19
3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7	20
3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 8	21
3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 9	22
3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 10	23
3.11 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 11	24
3.12 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 12	25
3.13 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 13	26
3.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT Colorimetric method	27
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	43

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 1	14
3.2	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 2	15
3.3	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 3	16
3.4	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 4	17
3.5	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 5	18
3.6	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 6	29
3.7	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 7	20
3.8	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 8	21
3.9	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 9	22
3.10	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 10	23
3.11	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 11	24
3.12	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 12	25
3.13	ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร 13	26
3.14	ค่า IC ₅₀ ของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3	27

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ลักษณะของใบ ผล ดอก และต้นของประดู่บ้าน	1
1.2	สารที่แยกได้จาก <i>Pterocarpus indicus</i>	2
1.3	สารที่แยกได้จาก <i>Pterocarpus santalinus</i>	3
1.4	สารที่แยกได้จาก <i>Pterocarpus marsupium</i>	3
3.1	โครงสร้างของสาร 1	14
3.2	โครงสร้างของสาร 2	15
3.3	โครงสร้างของสาร 3	16
3.4	โครงสร้างของสาร 4	17
3.5	โครงสร้างของสาร 5	18
3.6	โครงสร้างของสาร 6	19
3.7	โครงสร้างของสาร 7	20
3.8	โครงสร้างของสาร 8	21
3.9	โครงสร้างของสาร 9	22
3.10	โครงสร้างของสาร 10	23
3.11	โครงสร้างของสาร 11	24
3.12	โครงสร้างของสาร 12	25
3.13	โครงสร้างของสาร 13	26

ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่		หน้า
2.6.1	ขั้นตอนการสกัด เปลือกและต้นประดู่บ้าน	10
2.6.2	ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกและต้นประดู่บ้าน	12



ภาควิชาเคมี
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาคผนวก

รูปที่		หน้า
1	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 ใน CDCl_3	33
2	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2 ใน CDCl_3	33
3	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3 ใน CDCl_3	34
4	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 4 ใน CDCl_3	34
5	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 5 ใน CDCl_3	35
6	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 6 ใน CDCl_3	35
7	สเปกตรัม HRESIMS ของสาร 6 ใน CDCl_3	36
8	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 7 ใน CDCl_3	36
9	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 7 ใน CDCl_3	37
10	สเปกตรัม COSY ของสาร 7 ใน CDCl_3	37
11	สเปกตรัม HSQC ของสาร 7 ใน CDCl_3	38
12	สเปกตรัม HMBC ของสาร 7 ใน CDCl_3	38
13	สเปกตรัม HRESIMS ของสาร 7 ใน CDCl_3	39
14	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 8 ใน CDCl_3	39
15	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 9 ใน CDCl_3	40
16	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 10 ใน CDCl_3	40
17	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 11 ใน CDCl_3	41
18	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 12 ใน $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$	41
19	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 13 ใน CDCl_3	42

มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิราวุฒวิทยาลัย
 คณะวิทยาศาสตร์
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1 บทนำ

ลักษณะทางพันธุศาสตร์ของต้นประดู่บ้าน

ประดู่บ้าน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pterocarpus indicus* Wild. เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นมากมาย เช่น ดู่บ้าน (ภาคเหนือ), ประดู่บ้าน ประดู่ลาย ประดู่กิ่งอ่อน อังสนา (ภาคกลาง), สโน (มาเลย์-นราธิวาส), ดู่ และประดู่ไทย เป็นต้น เป็นพืชที่ขึ้นหลายพื้นที่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ต้นประดู่เป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นมีความสูงประมาณ 20-25 เมตร หรืออาจสูงกว่า จะผลัดใบก่อนการออกดอก แตกกิ่งก้านเป็นทรงพุ่มกว้าง และปลายกิ่งห้อยลง เปลือกและลำต้นหนาเป็นสีน้ำตาลเทาแตกหยาบๆเป็นร่องลึก เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุย ต้องการน้ำปานกลางเป็นพรรณไม้กลางแจ้ง ชอบแสงแดดจัดมักพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณทางภาคใต้และสามารถปลูกได้ทั่วไป^[1]

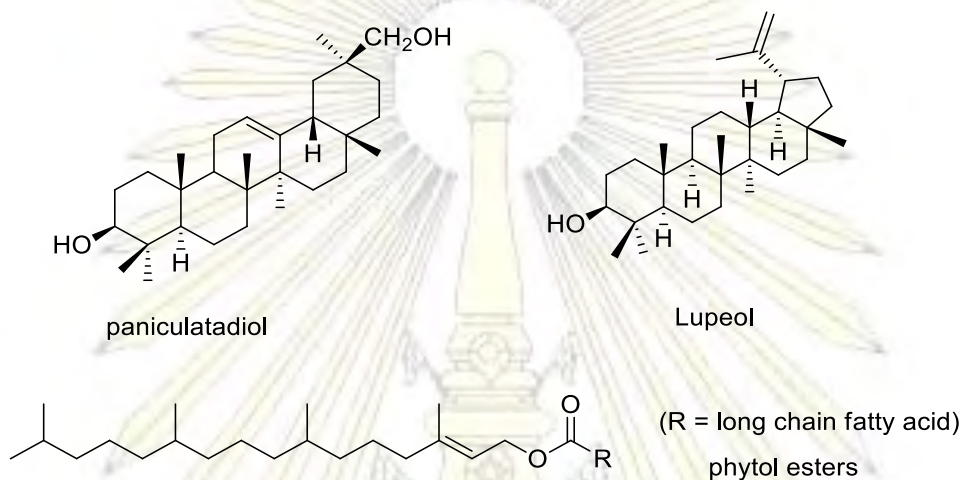


รูปที่ 1.1 ลักษณะของใบ ผล ดอก และต้นของประดู่บ้าน

จากผลงานวิจัยทางการแพทย์ที่ผ่านมา พบว่า ประดู่ ถือเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้รักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็งเรื้อรัง ท้องร่วง โรคบิด และยังใช้เป็นยาถ่าย นอกจากนี้ยังนำมาใช้รักษาอาการเจ็บคอ และบาดแผลขนาดเล็กอีกด้วย^[2]

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในปี 2004 Ragasa และคณะ สามารถแยกองค์ประกอบทางเคมีของใบ, เปลือก และลำต้นประดับบ้าน พบสารทั้งหมด 3 ชนิด คือ paniculadiol, lupeol และ phytol esters^[3]



รูปที่ 1.2 สารที่แยกได้จาก *Pterocarpus indicus*

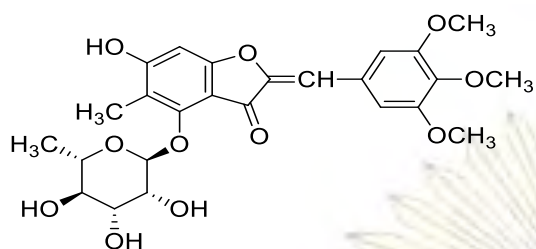
นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Pterocarpus* พบว่า

ปี 2000 Krishnaveni และคณะสามารถแยกสารใหม่จาก *Pterocarpus santalinus* ได้ 1 ชนิด คือ 6-hydroxy-7,2',4',5'- tetramethoxyisoavone^[4]

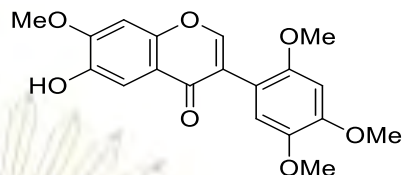
ปี 2004 Kerari และคณะสามารถแยกสารใหม่จาก *Pterocarpus santalinus* ได้ 2 ชนิด คือ 6-hydroxy-5-methyl-3',4',5'- trimethoxy aurone 4-O- α -L-rhamnopyranoside และ 6,4'-dihydroxy aurone-4-O-rutinoside^[5]

ปี 2004 Maurya และคณะสามารถแยกสารใหม่จาก *Pterocarpus marsupium* ได้ 5 ชนิด คือ 6-hydroxy-2-(4-hydroxybenzyl)-benzofuran-7-C- β -D-glucopyranoside, 3-(α -methoxy-4-hydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzo-2(3H)-furanone-7-C- β -D-glucopyranoside, 2-hydroxy-2-*p*-hydroxybenzyl-3(2H)-6-hydroxybenzofuranone-7-C- β -D-glucopyranoside-8-(C- β -D-glucopyranosyl)-7,3',4'-trihydro xyflavone และ 1,2-bis(2,4-dihydroxy,3-C-glucopyranosyl)-ethanedione^[6]

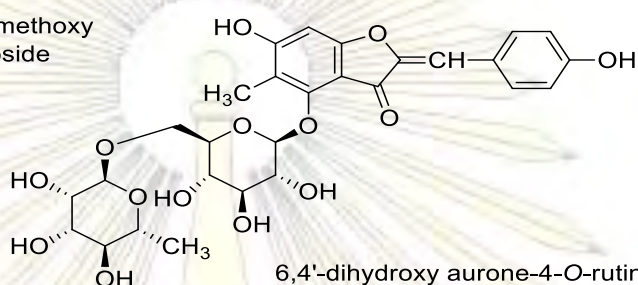
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



6-hydroxy-5-methyl-3',4',5'-trimethoxy aurone 4-O- α -L-rhamnopyranoside

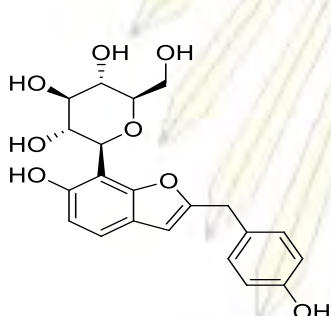


6-hydroxy-7,2',4',5'-tetramethoxyisoavone

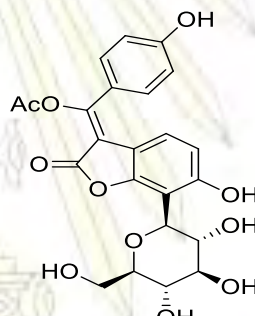


6,4'-dihydroxy aurone-4-O-rutinoside

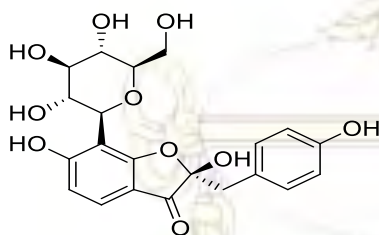
รูปที่ 1.3 สารที่แยกได้จาก *Pterocarpus santalinus*



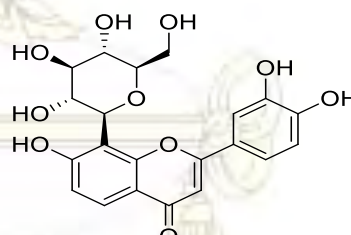
6-hydroxy-2-(4-hydroxybenzyl)-benzofuran-7-C- β -D-glucopyranoside



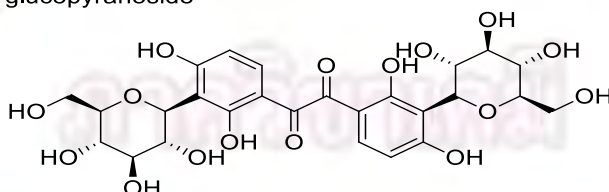
3-(α -methoxy-4-hydroxybenzylidene)-6-hydroxy benzo-2(3H)-furanone-7-C- β -D-glucopyranoside



2-hydroxy-2-p-hydroxybenzyl-3(2H)-6-hydroxy benzofuranone-7-C- β -D-glucopyranoside



8-(C- β -D-glucopyranosyl)-7,3',4'-trihydroxyflavone



1,2-bis(2,4-dihydroxy,3-C-glucopyranosyl)-ethanedione

รูปที่ 1.4 สารที่แยกได้จาก *Pterocarpus marsupium*

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าพืชในสกุล *Pterocarpus* และต้นประดู่บ้าน มีสารที่น่าสนใจอยู่หลายชนิด ประกอบกับต้นประดู่บ้าน ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะค้นคว้าและวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของประดู่บ้าน เพื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากประดู่บ้าน มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยา ทางการแพทย์ และอื่นๆ สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกส่วนของเปลือกและต้นมาศึกษา



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. แยกสารจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตต จากเปลือกและต้นของต้นประดู่บ้าน
2. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยข้อมูลทางกายภาพและทางสเปกโทรสโกปี
3. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ชนิด KB และ Hela S-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

2.1 พิษตัวอย่าง

เปลือกและต้นของประดู่บ้านที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ เก็บมาจากจังหวัดมหาสารคาม เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2558

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. คอลัมน์ (column)
2. ขวดรูปชมพู่ (flask)
3. ปีกเกอร์ (beaker)
4. หลอดหยดสาร (dropper)
5. หลอดทดลอง (test tube)
6. ขวดกำหนดปริมาตร (volumetric flask)
7. ไมโครปิเปต (micropipette)
8. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporation)
9. เครื่อง Mass Spectrometer รุ่น Trio 2000
10. เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer
11. UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC ช่วงความยาวคลื่นที่ใช้ Short wave length = 254 nm และ Long wave length = 365 nm
12. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)
13. เครื่องชั่งไฟฟ้า
14. เครื่อง radical chromatograph ยี่ห้อ โครมาโททรอน (Chromatotron[®])

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 สารเคมี

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

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
2. เก็บเปลือกและลำต้นประดู่บ้าน จากนั้นสกัดและระเหยสารออกเป็นส่วนๆ ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้แก่ ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล เป็นต้น
3. แยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น silica gel, sephadex LH-20 column chromatography, และ chromatotron เป็นต้น
4. พิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี เช่น 1D NMR, 2D NMR, mass spectrometry และ IR เป็นต้น
5. ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ชนิด KB และ Hela S-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
6. วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนโครงงานวิจัย

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

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

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดที่เหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยอัตราส่วนของตัวดูดซับต่อสารที่แยกประมาณ 20 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) บรรจุคอลัมน์โดยวิธีแบบเปียก กล่าวคือ ในตอนแรกต้องทำการเขย่าของผสมระหว่างซิลิกาเจล กับตัวทำละลายให้เข้ากันเป็นอย่างดีในภาชนะที่ปิดสนิทแล้วจึงค่อยๆ เทของผสมนี้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีสอดตรงปลาย และมีตัวทำละลายอยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ขณะที่เทซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ ควรเปิดวาล์วคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้าๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลอัดตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ ทำเช่นนี้จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลในระดับที่ต้องการ และระดับซิลิกาเจลไม่ลดลงอีก จากนั้นจึงปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงระดับเดียวกับซิลิกาเจล แล้วปิดคอลัมน์ บรรจุสารที่ต้องการแยกลงไป โดยสารที่ต้องการแยกหรือสิ่งสกัตกควรระเหยตัวทำละลายให้เกือบแห้ง แล้วนำไปผสมกับซิลิกาเจลเบอร์ 7734 โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาณน้อยที่สุด นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรง เพื่อให้เป็นผงละเอียดขนาดเท่ากัน จากนั้นบรรจุสารที่ผสมกับซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ ที่เตรียมไว้ ในการคลุกกับสารที่ต้องการแยก นำไประเหยตัวทำละลายอีกครั้งเพื่อให้ของผสมแห้งใส่คอลัมน์ แล้วใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อยล้างผิวด้านข้างในคอลัมน์ เติมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 เล็กน้อย เพื่อป้องกันการกระแทกกระเทือนผิวหน้าของของผสมขณะเติมตัวทำละลาย และเปิดให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ จนตัวทำละลาย ด้านบนใส จากนั้นจึงเริ่มเปลี่ยนตัวทำละลายชนิดใหม่ต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ตัวทำละลายแห้งในคอลัมน์ เพราะอาจทำให้ประสิทธิภาพในการแยกไม่ดีได้

2.5.2 ทิน-เลเยอร์ โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography: TLC)

เป็นเทคนิคอย่างง่ายที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสาร โดยใช้ TLC aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วทำการระบุงระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ แต่มีสารละลายของสารที่ต้องการตรวจสอบบนจุดเริ่มต้นด้วยหลอดคะปิลารีขนาดเล็กให้มีระยะห่างระหว่างจุดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ไปจุ่มในภาชนะปิดที่บุด้วยกระดาษกรองและมีตัวทำละลายที่เหมาะสมบรรจุอยู่ 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 ใช้ขวดแก้วทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าพร้อมฝาปิด ที่สะอาดและมีขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่น TLC ใส่กระดาษกรองที่มีความสูงและความกว้างพอดีกับขนาดของภาชนะ ให้แนบติดกับผิวด้านใน รินตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปให้สูงจากก้นภาชนะประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาภาชนะ ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในภาชนะอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

ข. การแต้มสาร นำแผ่น TLC มาขีดเส้นด้วยดินสอ เพื่อกำหนดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปด้านบน และขีดกำหนดระดับด้านล่างตรงตำแหน่งที่ต้องการแต้มสาร จากนั้นใช้หลอดคະປີ ลารี่จุ่มลงไปในการละลายที่ต้องการทดสอบ แล้วแต้มสารนั้นบนแผ่น TLC ที่ระดับเริ่มต้นที่ใช้ดินสอขีดไว้ ให้เป็นจุดวงกลมเล็กๆ เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 มิลลิเมตร และแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร หลังจากที่ได้จุดสารที่แต้มแห่งสนิทแล้ว จึงนำไป develop ในขั้นต่อไป

ค. การ develop นำแผ่น TLC ที่แต้มสารเรียบร้อยแล้ว จุ่มในภาชนะแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในภาชนะนั้นต้องอิมมัวด้วยไอของตัวทำละลายเรียบร้อยแล้ว ทั้งนี้ระดับของจุดสารบน TLC ควรอยู่เหนือระดับสารละลายในภาชนะเล็กน้อย จากนั้นปิดฝาภาชนะแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ใช้ดินสอขีดไว้ แล้วจึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะและปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่น TLC แห้ง

ง. การตรวจหาตำแหน่งของสาร

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

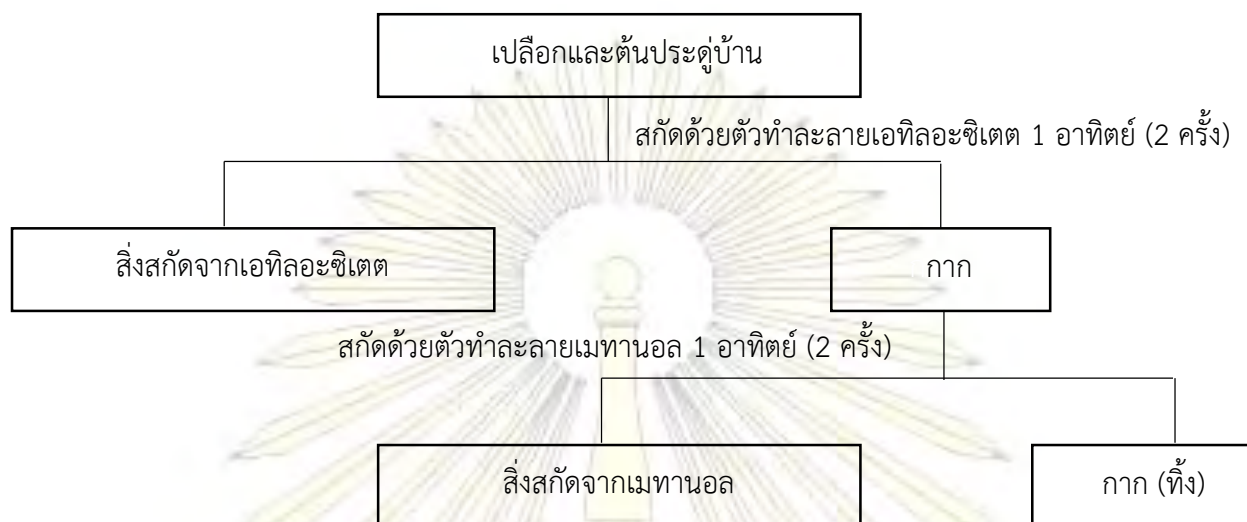
2.5.3 เทคนิค radical chromatograph

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารโดยอาศัยแรงเหวี่ยง (centrifugal force) ซึ่งจะมีหลักการทำงานคือ นำสารละลายของสารที่ต้องการแยก หยดลงไปบนกกลางแผ่นแก้วทรงกลม ที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล หนาประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ใช้ตัวทำละลายที่บรรจุอยู่ในกรวยแยก แล้วจึงเปิดเครื่อง โดยแผ่นแก้วทรงกลมจะเกิดการหมุน สารจะเคลื่อนที่จากกึ่งกลางแผ่นพร้อมกับการแยกเป็นแถบสารขึ้น ซึ่งจะมองเห็นได้โดยนำ UV Lamp มาส่องบนแผ่นแก้วทรงกลม แล้วทำการเก็บแฟรกชัน (fraction) ตามแถบสารที่แยกได้ ดังนั้นข้อดีสำหรับเทคนิคนี้คือ ลดระยะเวลาในการทำโครมาโทกราฟี กล่าวคือใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เนื่องจากแรงจากการหมุนเหวี่ยงจะช่วยให้เกิดการแยกได้ดีและเร็วขึ้น เมื่อเทียบกับเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และนอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาตำแหน่งของสารแยกได้ทันทีโดยใช้ UV Lamp ทำให้ง่ายต่อการเก็บแฟรกชัน

2.6 การเตรียมวัตถุดิบและการสกัด

2.6.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำเปลือกและต้นประดู่บ้านที่ตากแห้ง (1 กิโลกรัม) นำมาบดให้ได้ผงละเอียด จากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต ได้สิ่งสกัดเอทิลอะซิเตต มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำกากที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอลอีกครั้ง ได้สิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีแดงอิฐ ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.6.1



แผนภาพที่ 2.6.1 ขั้นตอนการสกัด เลือกและต้นประดู่บ้าน

2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบ

1. นำสิ่งสกัดเลือกและต้นประดู่บ้านที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary Vacuum evaporation) ได้สิ่งสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตหนัก 20.08 กรัม

2. จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้หนัก 26 กรัม นำมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Silica gel column chromatography) โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 5% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน, 5% เอทิลอะซิเตต-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต และ 5% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 5 แฟรงชัน (A-E)

3. นำสารแต่ละแฟรงชัน (A-E) มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporation)

4. นำสารสกัดแต่ละแฟรงชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสมของ 20% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน และ 30% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน เป็นวิธภาคเคลื่อนที่พบว่าแฟรงชัน C และ E น่าจะมีสารที่น่าสนใจอยู่มาก

5. นำแฟรงชัน C มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 5% ไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน และ 5% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 6 แฟรงชัน (C_1 - C_6) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรงชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 30% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน เป็นวิธภาคเคลื่อนที่ พบว่าแฟรงชัน C_1 และ C_3 น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

6. นำแฟรกชัน C_1 มาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลาย 20% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต (ตามแผนภาพที่ 2.6.2) พบว่าที่แฟรกชันนี้สามารถแยกสารที่มีความบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปี ได้เป็นสาร 1

7. นำแฟรกชัน C_2 มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต พบว่าที่แฟรกชันนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิด คือ สาร 2 และ 3 จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปีต่อไป

8. นำแฟรกชัน E มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 10% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต และ 5% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน จนถึง 100% เมทานอล โดยเก็บสารละลายจากคอลัมน์ได้สารสกัดทั้งหมด 12 แฟรกชัน (E_1-E_{12}) จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก นำสารละลายแต่ละแฟรกชันมาตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ตัวทำละลายผสมของ 40% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พบว่า แฟรกชัน E_5 , E_8 และ E_{10} น่าจะมีสารที่น่าสนใจ

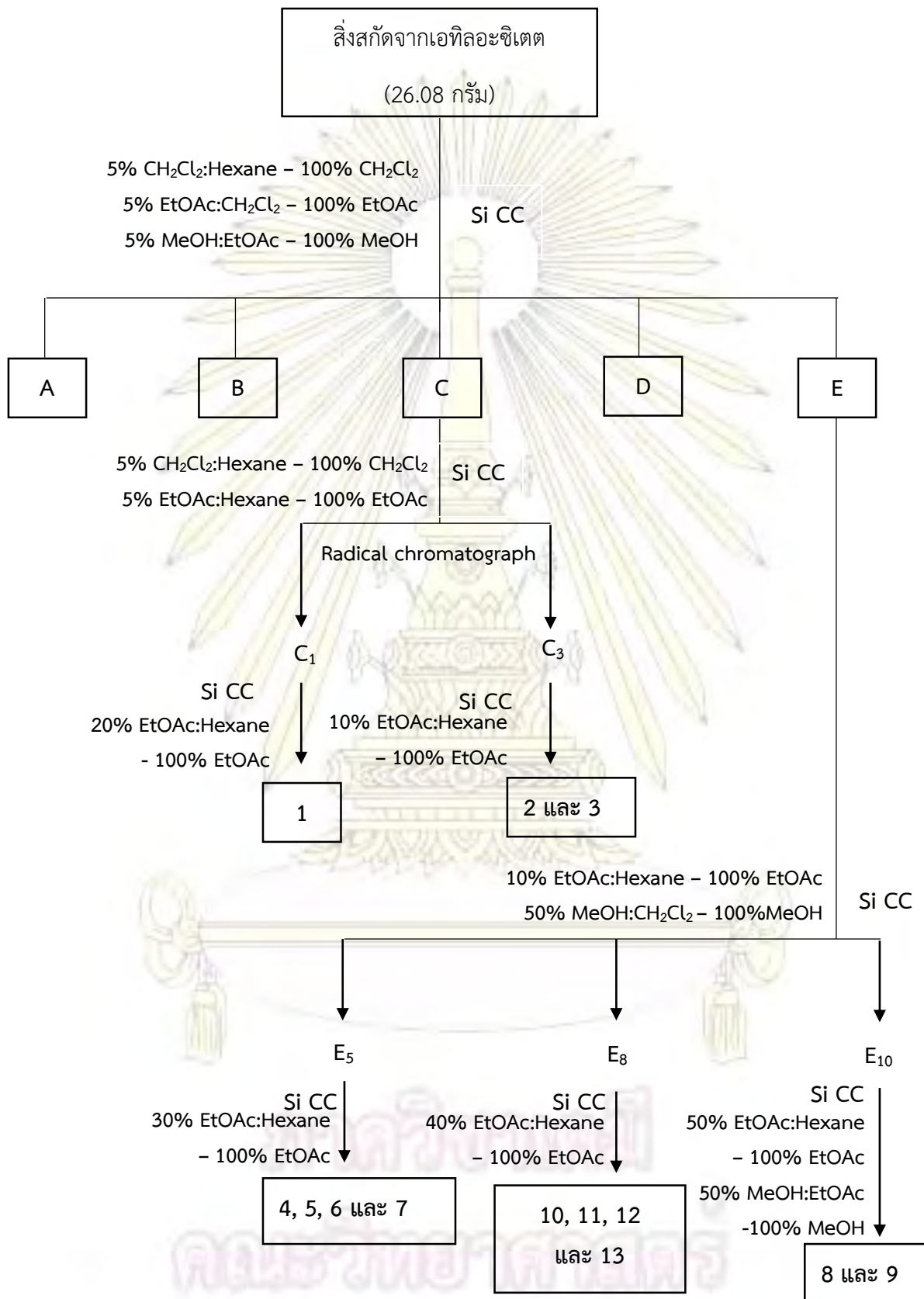
9. นำแฟรกชัน E_5 มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 30% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต พบว่าที่แฟรกชันนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 4 ชนิด คือ สาร 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปีต่อไป

10. นำแฟรกชัน E_8 มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 40% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต พบว่าที่แฟรกชันนี้สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ สาร 10, 11, 12 และ 13 ตามลำดับ จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปีต่อไป

11. นำแฟรกชัน E_{10} มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม 50% เอทิลอะซิเตต-เฮกเซน จนถึง 100% เอทิลอะซิเตต และ 50% เมทานอล-เอทิลอะซิเตต จนถึง 100% เมทานอล พบว่าที่แฟรกชันนี้ได้สาร 2 ชนิด คือ สาร 8 และ 9 ตามลำดับ จึงนำไปหาสูตรโครงสร้างของสารที่ได้จากข้อมูลสเปกโตรสโกปีต่อไป

12. นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method* สำหรับขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกและต้นประดู่บ้าน ได้แสดงไว้ดังแผนภาพที่ 2.6.2

* โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการทำการทดสอบที่ กลุ่มงานวิจัย หน่วยปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ



แผนภาพที่ 2.6.2 ขั้นตอนการแยกสารประกอบของเปลือกและต้นประดู่บ้าน

2.7 วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ชนิด KB และ HeLa S-3 ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธี MTT colorimetric method^[6] โดยมีสาร adriamycin เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีและขั้นตอนในการทำดังนี้ เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งให้ได้ความเข้มข้น 3×10^3 เซลล์ ใน 200 ไมโครลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ RPMI 1640 ซึ่งมี 5% (v/v) fetal calf serum เป็นองค์ประกอบ จากนั้นเติมเซลล์มะเร็งที่ทำการเพาะเลี้ยงลงไป ใน 96-well culture plate นำเซลล์มะเร็งที่อยู่ใน 96-well culture plate มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เติมน้ำสารบริสุทธิ์ที่ต้องการจะทดสอบลงไปที่มีความเข้มข้นต่างๆ 2 ไมโครลิตร ต่อ 1 หลุม บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาพบรรยากาศที่มี 5% แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นเติม 10 ไมโครลิตร ของสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ลงไปบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แยกเอาส่วนใสออก แล้วนำตะกอนที่เหลือมาละลายด้วย DMSO 150 ไมโครลิตร และเติม 0.1 โมลาร์ glycine ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไป จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยจะทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณค่า IC_{50}



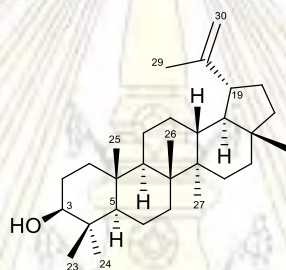
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างและผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

จากการทดลองพบว่าแยกสารได้ 13 ชนิด จากสารสกัดแฟรงชัน C และ E ของสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตของเปลือกและต้นประดู่บ้าน โดยได้มีการพิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้ ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (1D NMR, 2D NMR และ HRESIMS) ร่วมกับการเปรียบเทียบข้อมูลกับรายงานที่ผ่านมาก่อนหน้านี้

3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 1



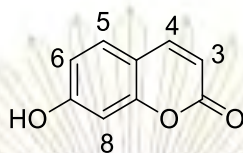
รูปที่ 3.1 โครงสร้างของสาร 1

ตารางที่ 3.1 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 1		lupeol ^[7]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
3	3.16 (s)	-	3.18 (dd)	-
5	0.66 (d)	9.1	0.69 (t)	-
19	2.35 (d)	9.1	2.38 (dt)	-
23	0.94 (s)	-	0.76 (s)	-
24	0.73 (s)	-	0.78 (s)	-
25	0.80 (s)	-	0.82 (s)	-
26	1.00 (s)	-	0.94 (s)	-
27	0.92 (s)	-	0.96 (s)	-
29	1.65 (s)	-	1.68 (s)	-
30	4.55 (s), 4.65 (s)	-	4.57 (d), 4.55 (d)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 กับ lupeol พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 1 คือ lupeol

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 2



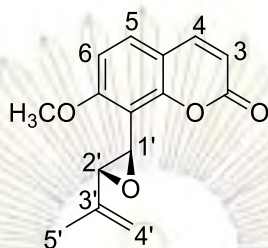
รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสาร 2

ตารางที่ 3.2 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2

ตำแหน่งของ โปรตอน	สาร 2		7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one ^[8]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.23 (d)	9.6	6.19 (d)	9.4
H-4	7.63 (d)	9.2	7.94 (d)	9.5
H-5	7.42 (d)	9.2	7.53 (d)	8.5
H-6	6.91 (d)	8.4	6.88 (d)	8.5
H-8	6.70 (d)	9.6	6.72 (d)	2.1

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2 กับ 7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 2 คือ 7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one

3.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 3



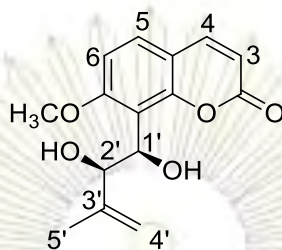
รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร 3

ตารางที่ 3.3 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3

ตำแหน่งของ โปรตอน	สาร 3		phebalosin ^[9]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.26 (d)	9.5	6.26 (d)	9.4
H-4	7.61 (d)	9.5	7.61 (d)	9.4
H-5	7.41 (d)	8.8	7.41 (d)	8.7
H-6	6.87 (d)	8.8	6.87 (d)	8.7
1'	3.99 (d)	2.2	3.99 (d)	2.0
2'	3.91 (d)	2.2	3.92 (d)	2.0
5'	1.87 (s)	-	1.87 (s)	-
4'	5.30 (s), 5.08 (s)	-	5.30 (s), 5.08 (s)	-
OCH ₃	3.96 (s)	-	3.97 (s)	-

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

3.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 4



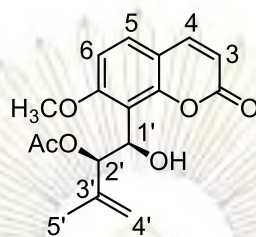
รูปที่ 3.4 โครงสร้างของสาร 4

ตารางที่ 3.4 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 4

ตำแหน่งของ โปรตอน	สาร 4		minumicrolin ^[9]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.26 (d)	9.4	6.25 (d)	9.4
H-4	7.61 (d)	9.4	7.62 (d)	9.4
H-5	7.39 (d)	8.8	7.39 (d)	8.7
H-6	6.87 (d)	8.8	6.87 (d)	8.7
1'	5.30 (d)	8.8	5.30 (t)	8.7
1'-HO	-	-	3.74	-
2'	4.51 (d)	8.8	4.51 (d)	8.7
2'-OH	-	-	3.19	-
H-4'	4.65 (s), 4.58 (s)	-	4.65 (s), 4.58 (s)	-
5'	1.78 (s)	-	1.78 (s)	-
OCH ₃	3.97 (s)	-	3.97 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 4 กับ minumicrolin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 4 คือ minumicrolin

3.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 5



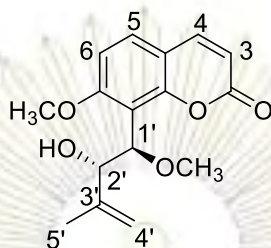
รูปที่ 3.5 โครงสร้างของสาร 5

ตารางที่ 3.5 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 5

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 5		murrangatin-2'-acetate ^[10]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.26 (d)	9.4	6.25 (d)	9.8
H-4	7.61 (d)	9.4	7.60 (d)	9.8
H-5	7.40 (d)	8.6	7.35 (d)	8.6
H-6	6.87 (d)	8.6	6.87 (d)	8.6
OCH ₃	4.00 (s)	-	4.00 (s)	-
H-1'	5.53 (d)	8.0	5.54 (t)	8.5
1'-OH	-	-	3.59 (d)	8.5
H-2'	5.74 (d)	7.6	5.74 (d)	8.5
2'-OAc	2.14 (s)	-	2.14 (s)	-
3'-CH ₃	1.75 (s)	-	1.75 (s)	-
4'	4.75 (d)	10.8	4.77 (s)	-

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

3.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 6



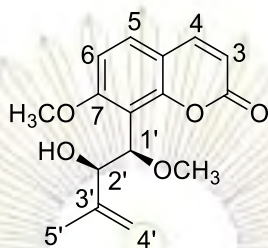
รูปที่ 3.6 โครงสร้างของสาร 6

ตารางที่ 3.6 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 6

ตำแหน่งของ โปรตอน	สาร 6		(-)-murracarpin ^[11]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.27 (d)	9.6	6.26 (d)	9.5
H-4	7.63 (d)	9.6	7.63 (d)	9.5
H-5	7.42 (d)	8.8	7.42 (d)	8.7
H-6	6.91 (d)	8.8	6.90 (d)	8.7
OCH ₃	3.95 (s)	-	3.95 (s)	-
1'	5.18 (d)	6.2	5.19 (d)	6.7
1'-OCH ₃	3.29 (s)	-	3.30 (s)	-
2'	4.80 (d)	6.2	4.80 (d)	6.7
2'-OH	-	-	2.25 (s)	-
4'	4.87 (s), 4.97 (s)	-	4.87 (s), 4.97 (s)	-
5'	1.87 (s)	-	1.87 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$, HRESIMS และค่า Optical rotation ของสาร 6 กับ (-)-murracarpin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 6 คือ (-)-murracarpin

3.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7



รูปที่ 3.7 โครงสร้างของสาร 7

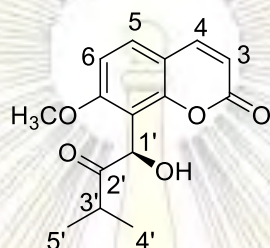
ตารางที่ 3.7 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 7

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 7		murracarpin ^[10]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.26 (d)	9.6	6.26 (d)	9.5
H-4	7.64 (d)	9.6	7.63 (d)	9.5
H-5	7.40 (d)	8.8	7.41 (d)	8.6
H-6	6.86 (d)	8.8	6.87 (d)	8.6
OCH ₃	3.93 (s)	-	3.93 (s)	-
1'	5.05 (s)	8.8	5.05 (s)	8.8
1'-OCH ₃	3.33 (s)	-	3.33 (s)	-
2'	4.93 (s)	8.8	4.93 (s)	8.8
2'-HO	-	-	3.05 (s)	-
4'	4.70 (s), 4.63 (s)	-	4.67 (s), 4.63 (s)	-
5'	1.69 (s)	-	1.69 (s)	-

สาร 7 มีลักษณะเป็นผงสีขาว จากการเทียบข้อมูลสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 7 พบว่ามีลักษณะของ 7-methoxy-8-disubstitued coumarin จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 7 พบสัญญาณของโปรตรอน ดังนี้ คือ olefinic proton ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 6.26 (d, H-3) และ 7.64 (d, H-4) ซึ่งมีค่า $J = 9.6$ Hz, *ortho* proton ของวงอะโรมาติก ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 7.40 (d, H-5) และ 6.86 (d, H-6) ซึ่งมีค่า $J = 8.5$ Hz, หมู่เมทอกซีสองตำแหน่ง ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 3.93 (s, 7-OCH₃) และ 3.33 (s, 1'-OCH₃), หมู่เมทิลที่ค่า chemical shift เท่ากับ 1.69 (s, 5'-CH₃), เมทิลีนโปรตรอน ที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.70, 4.63 (s, 4'), มีไบนารีโปรตรอนที่ค่า chemical shift เท่ากับ 4.93 (d, H-2) และ 5.05 (d, H-1') ด้วยค่า $J = 8.8$ Hz โดยค่า coupling constant (J) เท่ากับ 8.8 Hz นี้ เป็นลักษณะของสารที่มีโครงสร้างเป็นแบบ threose จากพิจารณาข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโตรสโกปีที่ได้ (1D และ 2D NMR) ดังรูปที่ 8 (ภาคผนวก) เมื่อนำมาเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่าโครงสร้างของสาร 7 มีความคล้ายคลึงกับสาร 6 มาก แต่มีค่า specific rotation ที่แตกต่างกัน โดยสาร 7 มีค่า $[\alpha]^{25}_D$ เท่ากับ +4.5

($c=0.40$, MeOH) ส่วนสาร (-) murrucarpin (**6**) ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้มีค่า $[\alpha]_D^{25}$ เท่ากับ -15.6 ($c=0.063$, CHCl_3)^[12] ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารใหม่ (**7**) ที่แยกได้นี้คือ (+)-murrucarpin

3.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ **8**



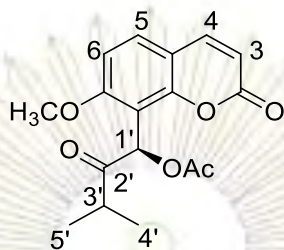
รูปที่ 3.8 โครงสร้างของสาร **8**

ตารางที่ 3.8 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร **8**

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 8		murranganon ^[9]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.29 (d)	9.2	6.29 (d)	9.4
H-4	7.65 (d)	9.2	7.65 (d)	9.4
H-5	7.46 (d)	8.6	7.46 (d)	8.7
H-6	6.86 (d)	8.6	6.86 (d)	8.7
OCH_3	3.87 (s)	-	3.87 (s)	-
1'	5.90 (s)	-	5.90 (d)	5.7
1'-OH	-	-	4.23 (d)	5.7
3'	2.61 (quintet)	6.8	2.61 (quintet)	6.7
4'	1.13 (d)	6.8	1.13 (d)	6.7
5'	0.98 (d)	6.8	0.98 (d)	6.7

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

3.9 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 9



รูปที่ 3.9 โครงสร้างของสาร 9

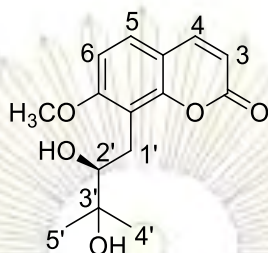
ตารางที่ 3.9 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 9		7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin ^[10]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.28 (d)	9.6	6.28 (d)	9.5
H-4	7.63 (d)	9.6	7.63 (d)	9.5
H-5	7.49 (d)	8.6	7.49 (d)	8.6
H-6	6.88 (d)	8.6	6.88 (d)	8.6
OCH ₃	3.91 (s)	-	3.91 (s)	-
1'	6.96 (s)	-	6.96 (s)	-
1'-OAc	2.16 (s)	-	2.16 (s)	-
3'	2.85 (Heptaplet)	6.8	2.85 (Heptaplet)	6.5
4'	1.03 (s)	7.0	1.08 (s)	6.5
5'	1.18 (s)	7.0	1.18 (s)	6.5

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 9 กับ 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 5 คือ 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 10



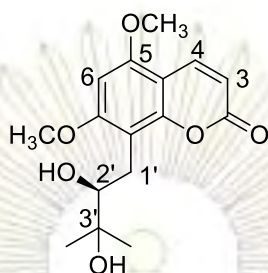
รูปที่ 3.10 โครงสร้างของสาร 10

ตารางที่ 3.10 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 10

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 10		meranzin Hydrate ^[10]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	2.26 (d)	9.6	6.25 (d)	9.4
H-4	7.64 (d)	9.6	7.64 (d)	9.4
H-5	7.36 (d)	8.8	7.36 (d)	8.7
H-6	6.88 (d)	8.8	6.88 (d)	8.7
OCH ₃	3.94 (s)	-	3.94 (s)	
H-1'	3.65 (dd)	2.4, 10	3.65 (dd)	2.7, 10
H-1'	3.11 (dd)	2.4, 11.2	3.11 (dd)	2.7, 13.8
2'	3.00 (dd)	10, 11.2z	3.00 (dd)	10, 13.8
3'-OH	-	-	2.14 (s)	-
4'	1.34 (s)	-	1.34 (s)	-
5'	1.34 (s)	-	1.34 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 10 กับ meranzin Hydrate พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 10 คือ meranzin Hydrate

3.11 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 11



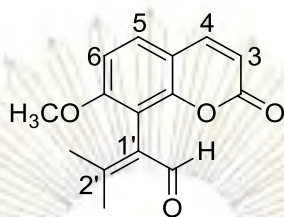
รูปที่ 3.11 โครงสร้างของสาร 11

ตารางที่ 3.11 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 11

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 11		Mexoticin ^[13]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.16 (d)	9.8	6.13 (d)	9.5
H-4	8.00 (d)	9.8	7.98 (d)	9.5
5-OCH ₃	3.94 (s)	-	3.92 (s)	-
H-6	6.35 (s)	-	6.34 (s)	-
1'	2.87 (dd)	10.4, 14.2	2.82 (dd)	9.9, 14.0
1'	3.00 (dd)	2.4, 14.2	3.00 (dd)	2.7, 14.0
2'	3.59 (dd)	2.4, 10.4	3.58 (dd)	2.7, 9.9
3'-CH ₃	1.32 (s)	-	1.30 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 11 กับ mexoticin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 11 คือ mexoticin

3.12 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 12



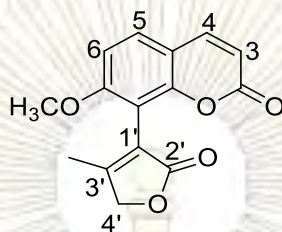
รูปที่ 3.12 โครงสร้างของสาร 12

ตารางที่ 3.12 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 12

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 12		murralongin ^[9]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.19 (d)	9.6	6.23 (d)	9.4
H-4	7.92 (d)	9.6	7.65 (d)	9.4
H-5	7.66 (d)	8.8	7.45 (d)	8.7
H-6	7.09 (d)	8.8	6.90 (d)	8.7
OCH ₃	3.85 (s)	-	3.83 (s)	-
CHO	10.23 (s)	-	10.22 (s)	-
2'	1.77 (s), 2.44 (s)	-	1.79 (s), 2.43 (s)	-

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลด้วยค่า chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 12 กับ murralongin พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก จึงสรุปว่า สาร 12 คือ murralongin

3.13 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 13



รูปที่ 3.13 โครงสร้างของสาร 13

ตารางที่ 3.13 ค่า Chemical shift (ppm) จากสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 13

ตำแหน่งของโปรตอน	สาร 13		microminutin ^[14]	
	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)	Chemical shift (ppm)	ค่า J (Hz)
H-3	6.27 (d)	9.4	6.26 (d)	9.5
H-4	7.63 (d)	9.4	7.68 (d)	9.5
H-5	7.42 (d)	8.8	7.51 (d)	8.5
H-6	6.91 (d)	8.8	6.94 (d)	8.5
OCH ₃	3.95 (s)	-	3.90 (s)	-
3'-CH ₃	1.87 (s)	-	2.02 (s)	-
4'	4.87 (dd)	0.4, 17.2	4.87 (dd)	17.3, 0.6
5'	4.97 (dd)	0.4, 17.2	4.96 (dd)	17.3, 0.6

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

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT colorimetric method

จากการนำสารทั้งหมด (1-13) ที่แยกได้ ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี มาทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 พบว่าได้ผลตามตารางที่ 3.15

ตารางที่ 3.14 ค่า IC₅₀ ของความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 ของสาร 1-13

สาร	ค่า IC ₅₀ (mg/mL) ของการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	
	KB	Hela S-3
1	28.75	36.87
2	41.88	79.65
3	40.66	62.13
4	69.81	>100
5	88.25	93.48
6	60.32	84.37
7	79.65	>100
8	94.93	>100
9	36.70	48.46
10	60.32	78.43
11	>100	>100
12	>100	64.70
13	>100	>100
Adriamycin	0.12	0.071

KB : Human epidermoid carcinoma

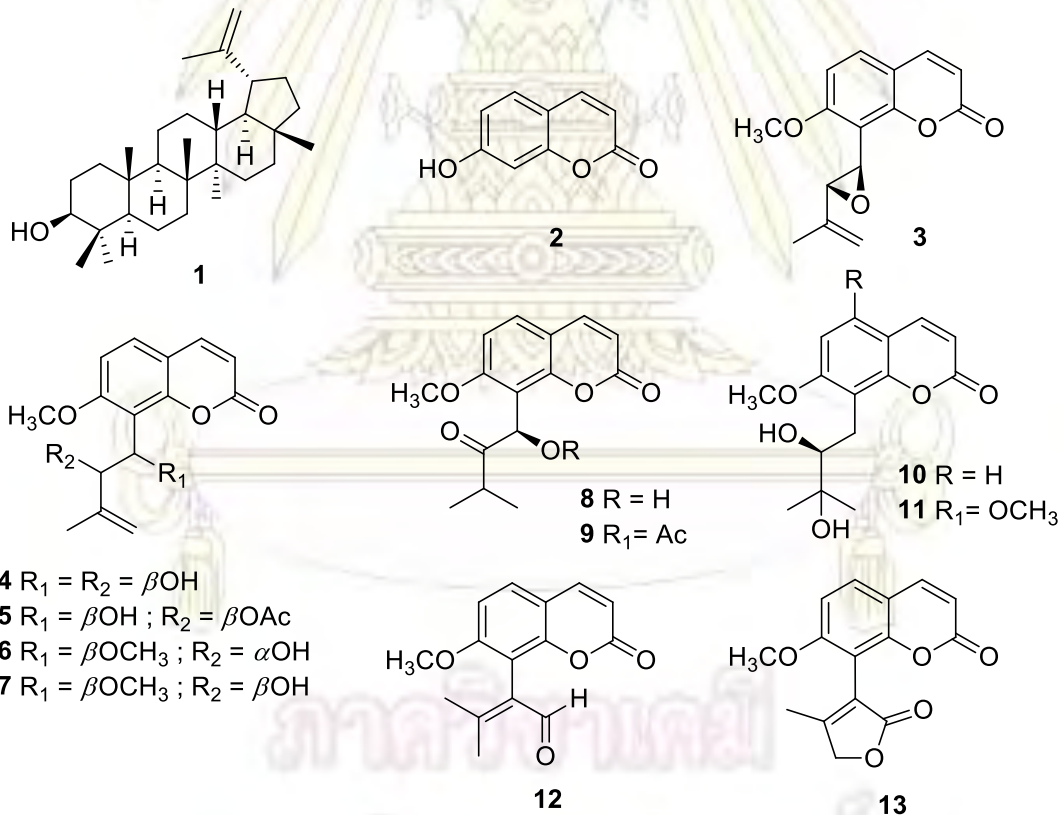
Hela S-3 : Human cervix adenocarcinoma (ATCC cat no. CCL-2.2)

จากผลทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 ของสาร (1-13) พบว่า สาร 1-8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ได้ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 28.75-94.94 mg/mL ส่วนสาร 9-13 พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB เนื่องจากมีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 mg/mL ส่วนเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 สาร 1-3, 5-6, 9-10 และ 12 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ได้ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 36.87-93.48 mg/mL ส่วนสาร 4, 7-8, 11 และ 13 พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 เนื่องจากมีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 mg/mL

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการนำสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตของเปลือกและต้นประดู่บ้าน มาแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า สามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มคูมารินได้ 1 ชนิด คือ (+)-murracarpin (7) รวมกับสารที่รายงานแล้วอีก 12 ชนิด โดยแบ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ 1 ชนิด คือ lupeol (1) และสารในกลุ่มคูมาริน อีก 11 ชนิด คือ 7-hydroxy-2H-benzo-1-pyran-2-one (2), phebalosin (3), minumicrolin (4), murrangatin-2'-acetate (5), (-)-murracarpin (6), murranganon (8), 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin (9), meranzin hydrate (10), mexotacin (11), murralongin (12) และ microminutin (13) โดยโครงสร้างทั้งหมดทั้งหมดของสารที่แยกได้สามารถพิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการได้เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้



รูปที่ 4.1 โครงสร้างของสารที่แยกได้ 1-13

และจากผลทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB และ Hela S-3 พบว่า สาร 1-8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด KB ได้ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 28.75-94.94 mg/mL และ สาร 1-3, 5-6, 9-10 และ 12 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิด Hela S-3 ได้ต่ำ เนื่องจากมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 36.87-93.48 mg/mL

ข้อเสนอแนะ

1. ในสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตมีสารอีกหลายชนิดที่ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการแยกองค์ประกอบ พิสูจน์ทราบโครงสร้างและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากเวลาจำกัด ดังนั้นควรแยกในส่วนนี้ต่อไป
2. ในการทดลองนี้ผู้วิจัยเลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสิ่งสกัดเอทิลอะซิเตตเพียงชนิดเดียว เพื่อการทดลองที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และอาจมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัด เมทานอล เป็นต้น
3. อาจนำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ที่น่าสนใจ

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] Perry, L.M. Medical plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. Cambridge, Massachusetts, and London: The MIT Press, **1990**. p. 224.
- [2] Cruickshank, R. 11th ed. Medical microbiology: a guide to diagnosis and control of infection. Edinburgh and London: E. & S. Livingston Ltd, **1968**. p. 888.
- [3] Ragasa, C.Y.; Luna, R.D.D.; Hofilena, J. Antimicrobial terpenoids from *Pterocarpus indicus*. *NAT PROD RES*. **2005**. 19. 405-309.
- [4] Krishnaveni, K.S.; Srinivasa, R.J.V. An isoflavone from *Pterocarpus santalinus*. *PHYTOCHEMISTRY*. **2000**. 53. 605-606.
- [5] Kesari, A.N.; Gupta, R.K.; Watal, G. Two aurone glycosides from heartwood of *Pterocarpus santalinus*. *PHYTOCHEMISTRY*. **2004**. 65. 3125-3129.
- [6] Maurya, R.; Singh, R.; Deepak, M.; Handa, S.S.; Yadav, P.P.; Mishra, P.K.; Constituents of *Pterocarpus marsupium*: an ayurvedic crud drug. *PHYTOCHEMISTRY*. **2004**. 65. 915-920.
- [7] Lutta, K.P.; Christine, B.; Teresa, A.A.; Cornelius, W.W. Antimicrobial Marine Natural Products from the Sponge, *Axinella infundibuliformis*. *Rec. Nat. Prod*. **2008**. 116-127.
- [8] Timonen, J.M.; Nieminen, R.M.; Sareila, O.; Goulas, A.; Moilanen, L.J.; Haukka, M.; Vainiotalo, P.; Moilanen, E.; Aulaskari, P.H. Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. *MED. CHEM*. **2011**. 46. 3845-3850.
- [9] Ito, C.; Furukawa, H. Constituents of *Murraya exotica* L. Structure Elucidation of new Coumarins. *Chem, Pharm. Bull*. **1987**. 35. 4277-4285.
- [10] Quader, M.A.; El-Turbi, J.A.; Armstrong, J.A.; Gray, A.I.; Waterman, P.G. Coumarin and their Taxonomic value in the genus *Phebalium*. *PHYTOCHEMISTRY*. **1992**. 31. 3089-3089.
- [11] Wu, T.S.; Liou, M.J.; Kuoh, C.S.; Coumarins of the flower of *Murra Paniculata*. *PHYTOCHEMISTRY*. **1989**. 28. 293-294.
- [12] Cuong, N.M.; Khanh, P.N.; Duc, H.V.; Huong, T.T.; Tai, B.H.; Binh, N.Q.; Durante, M.; Fusi, F. Vasorelaxing Activity of Two Coumarins from *Murraya paniculata* Leaves. *Biol. Pharm. Bull*. **2014**. 37. 694-697.
- [13] Zakaria, M.B.; Saito, I.; Matsuura, T. COUMARINS OF *MERRILLIA CAOXYLON*. *PHYTOCHEMISTRY*. **1989**. 28. 657-659.

[14] Imai, F.; Kinoshita, T.; Sankawa, U. Constituents of the Leaves of *Murraya paniculata* Collected in Taiwan. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 358-362.

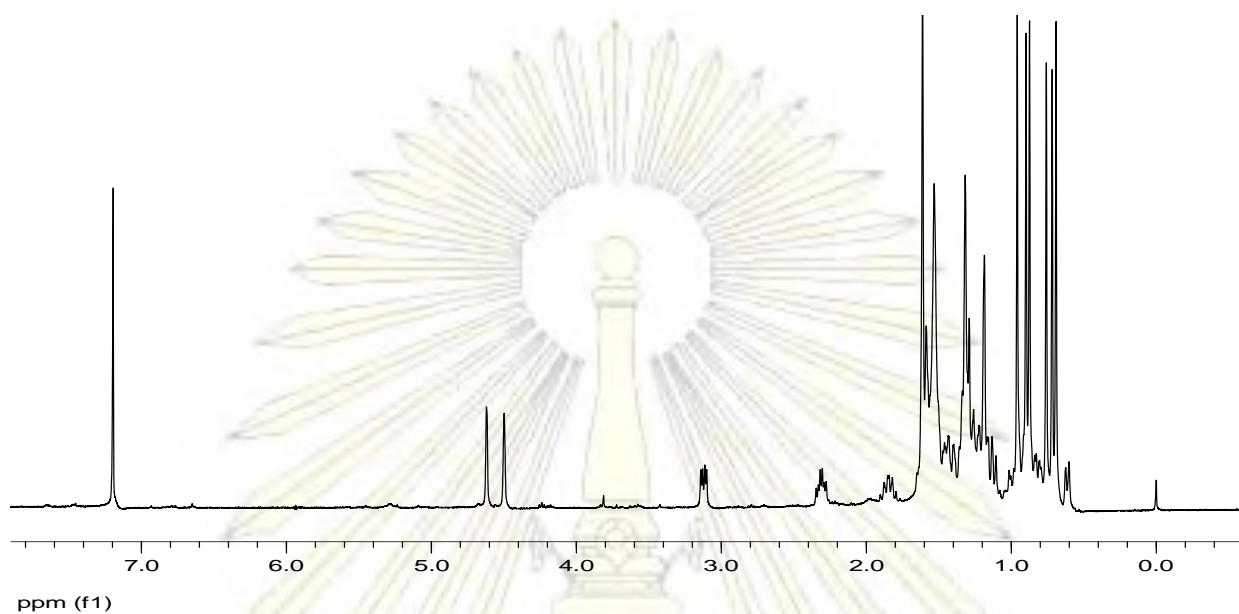


ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

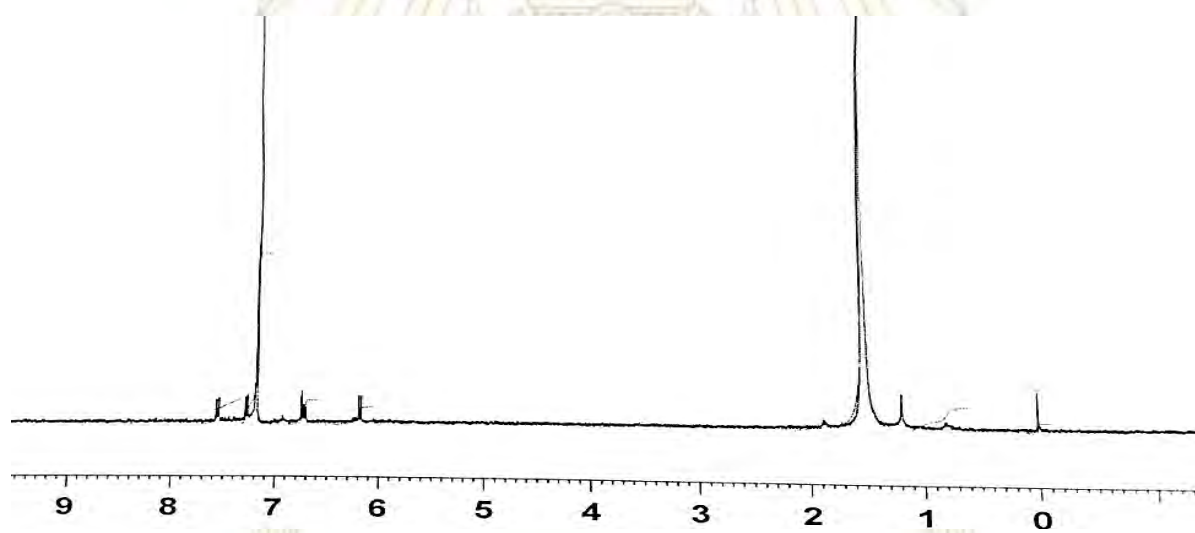


ภาคผนวก

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

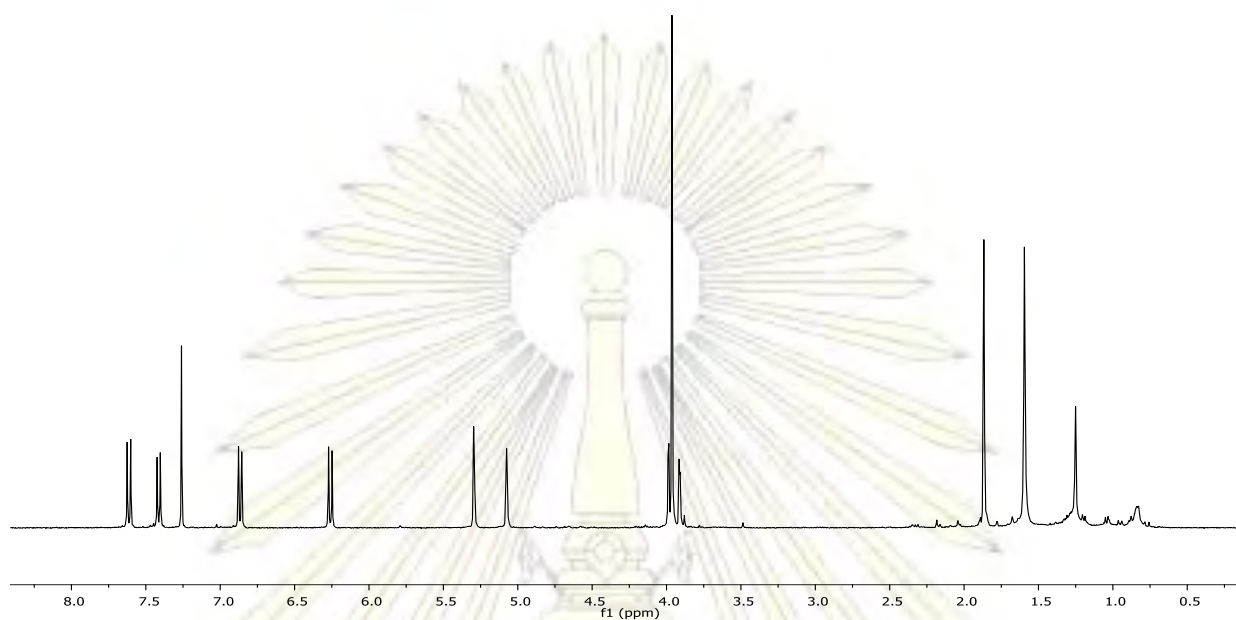


รูปที่ 1 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 ใน CDCl_3

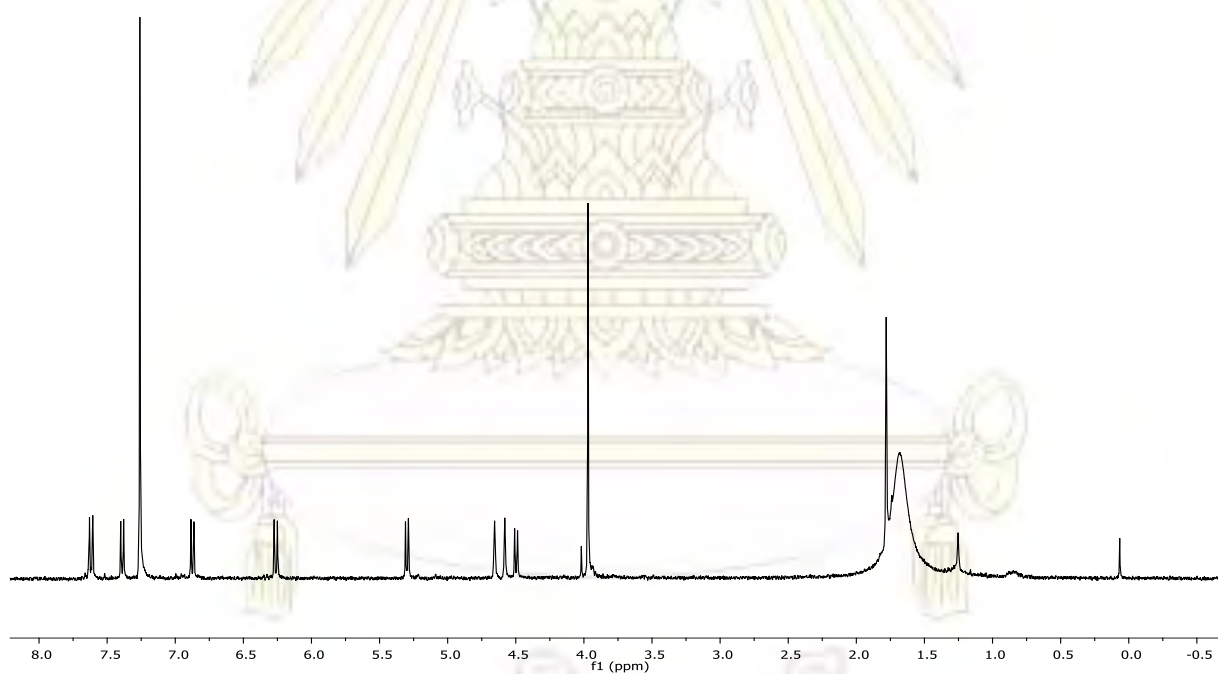


รูปที่ 2 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2 ใน CDCl_3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

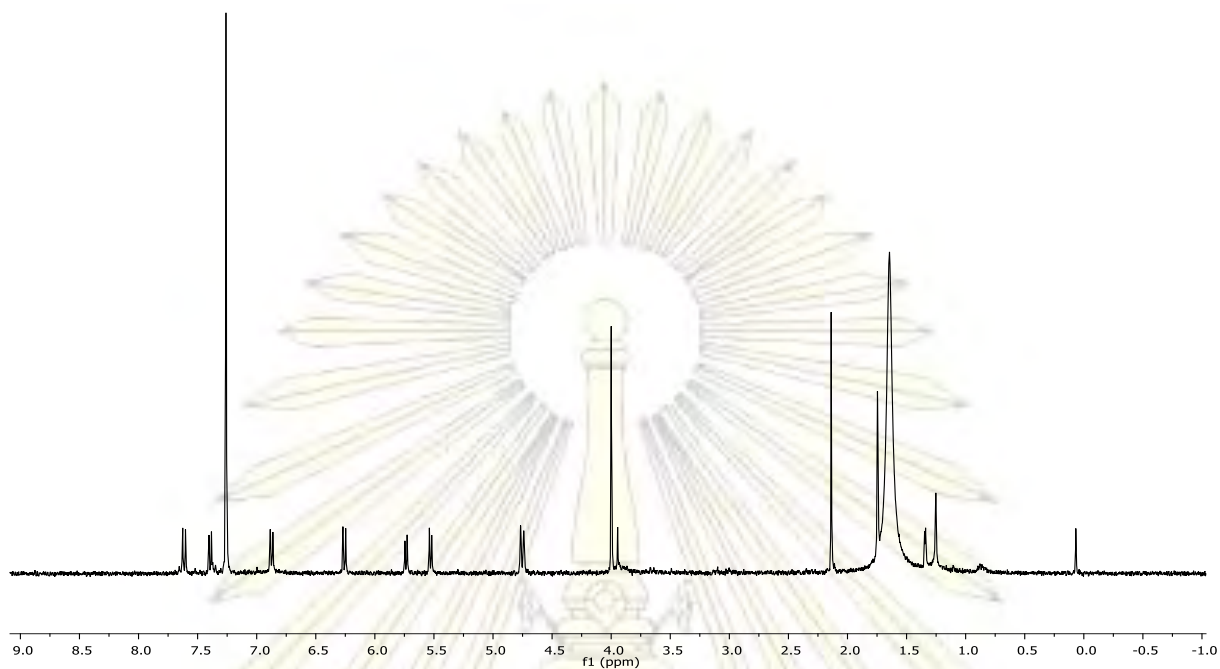


รูปที่ 3 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 3 ใน CDCl_3

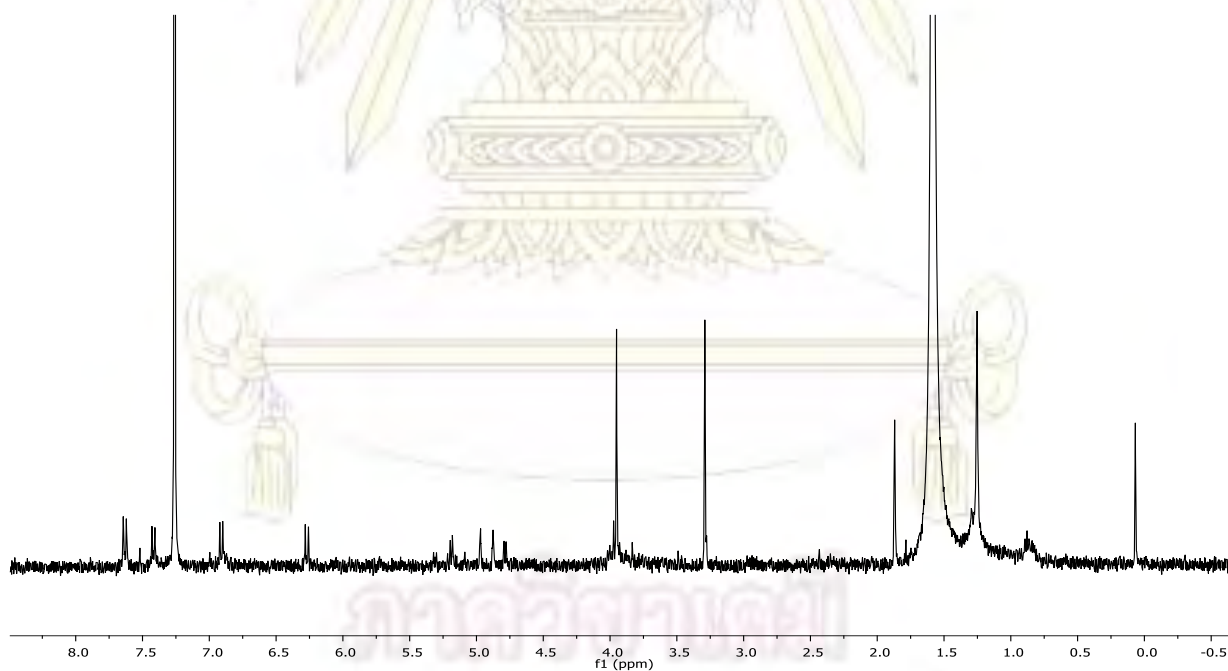


รูปที่ 4 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 4 ใน CDCl_3

คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

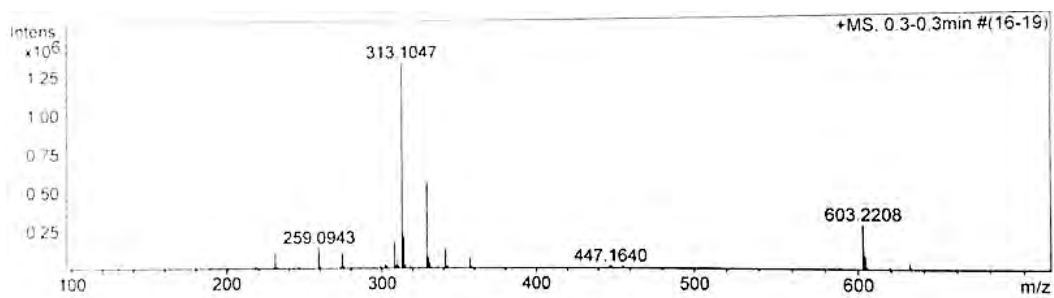


รูปที่ 5 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 5 ใน CDCl_3

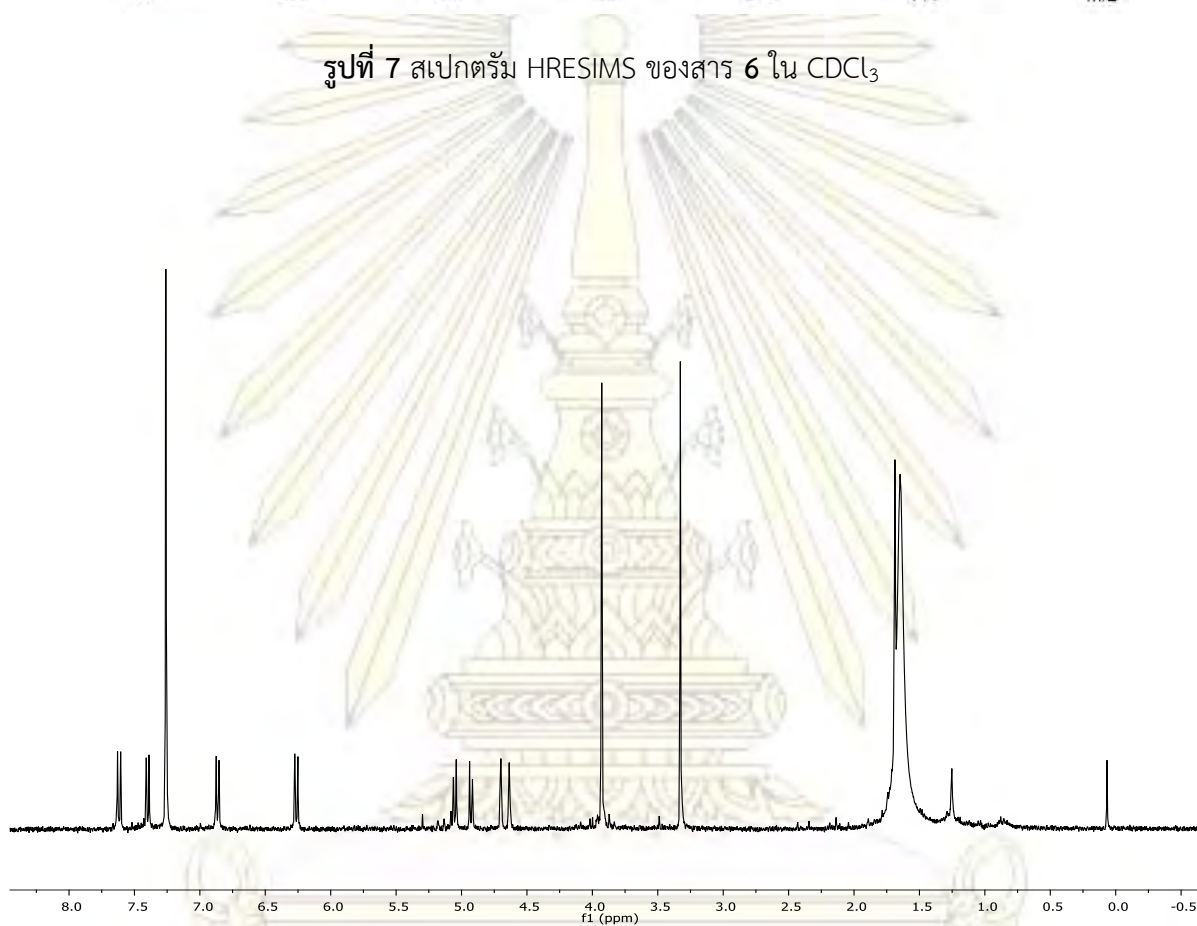


รูปที่ 6 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 6 ใน CDCl_3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

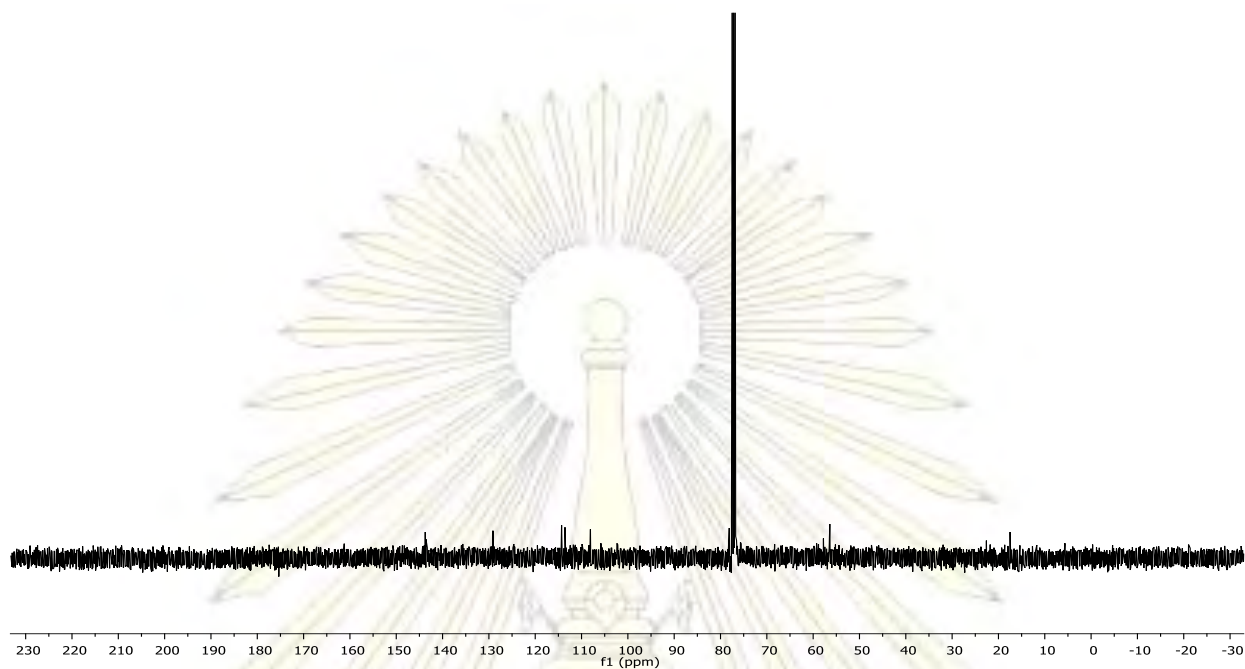


รูปที่ 7 สเปกตรัม HRESIMS ของสาร 6 ใน CDCl_3

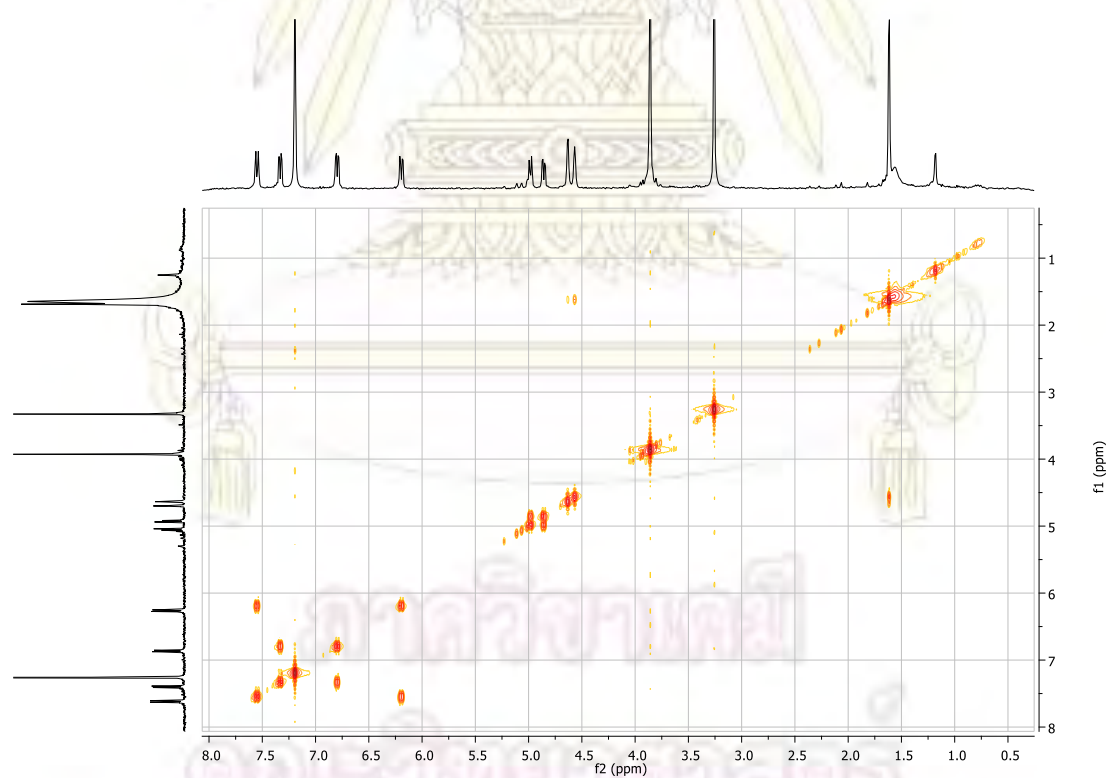


รูปที่ 8 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 7 ใน CDCl_3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

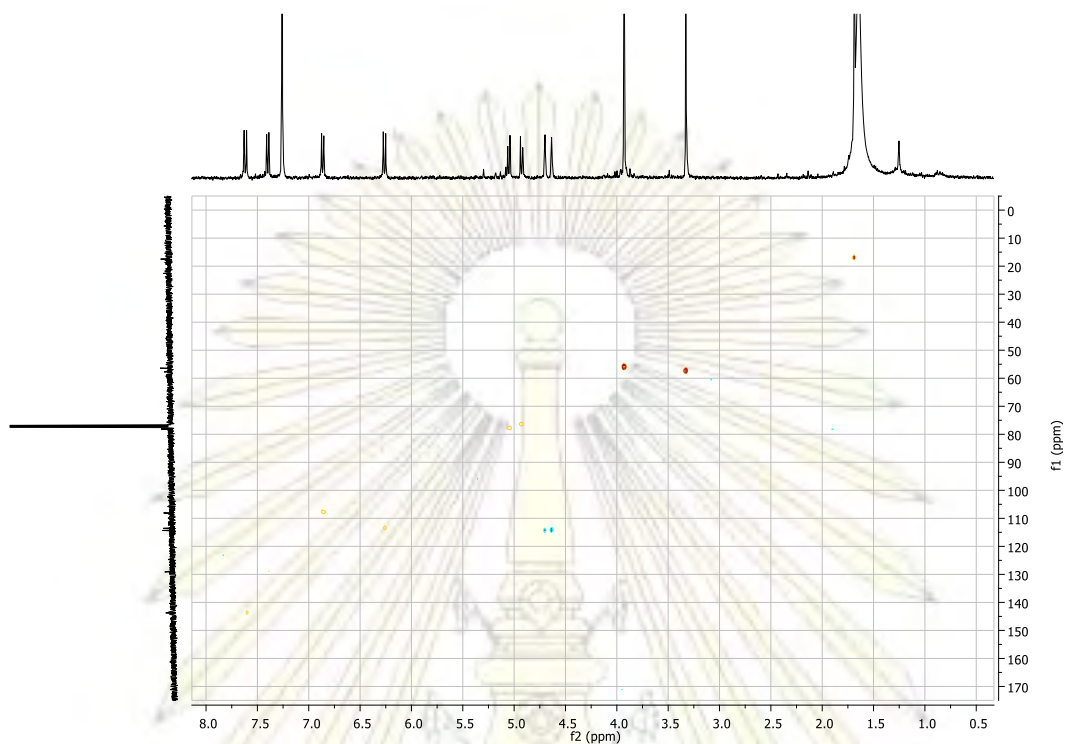
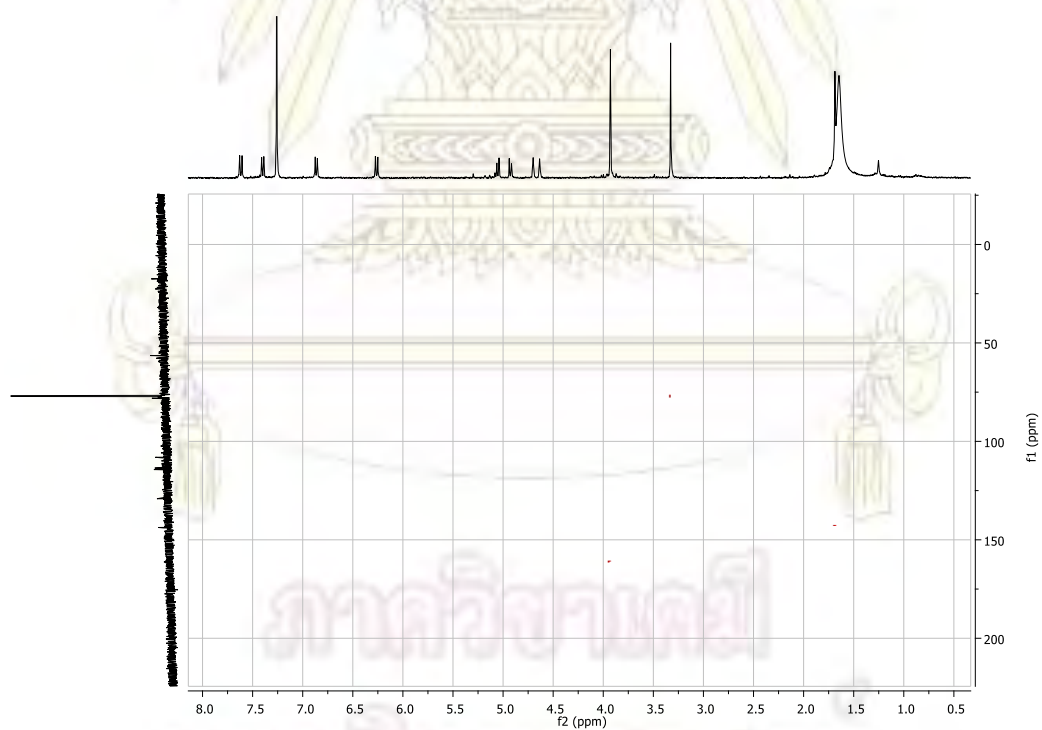


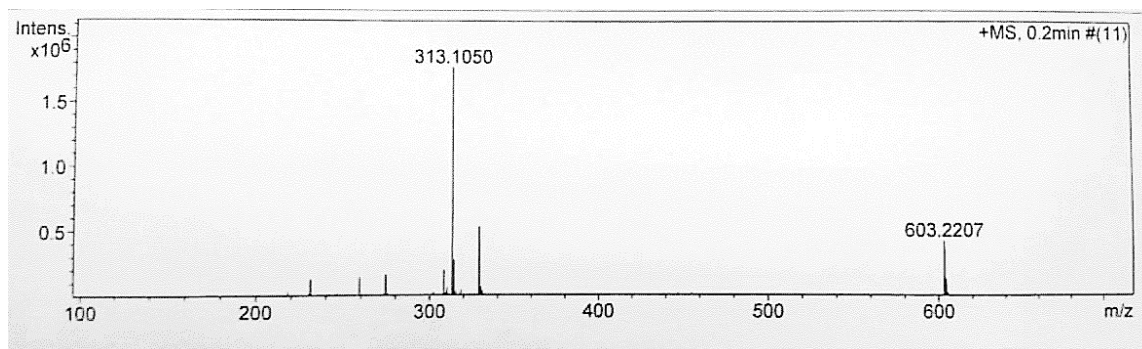
รูปที่ 9 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของสาร 7 ใน CDCl_3



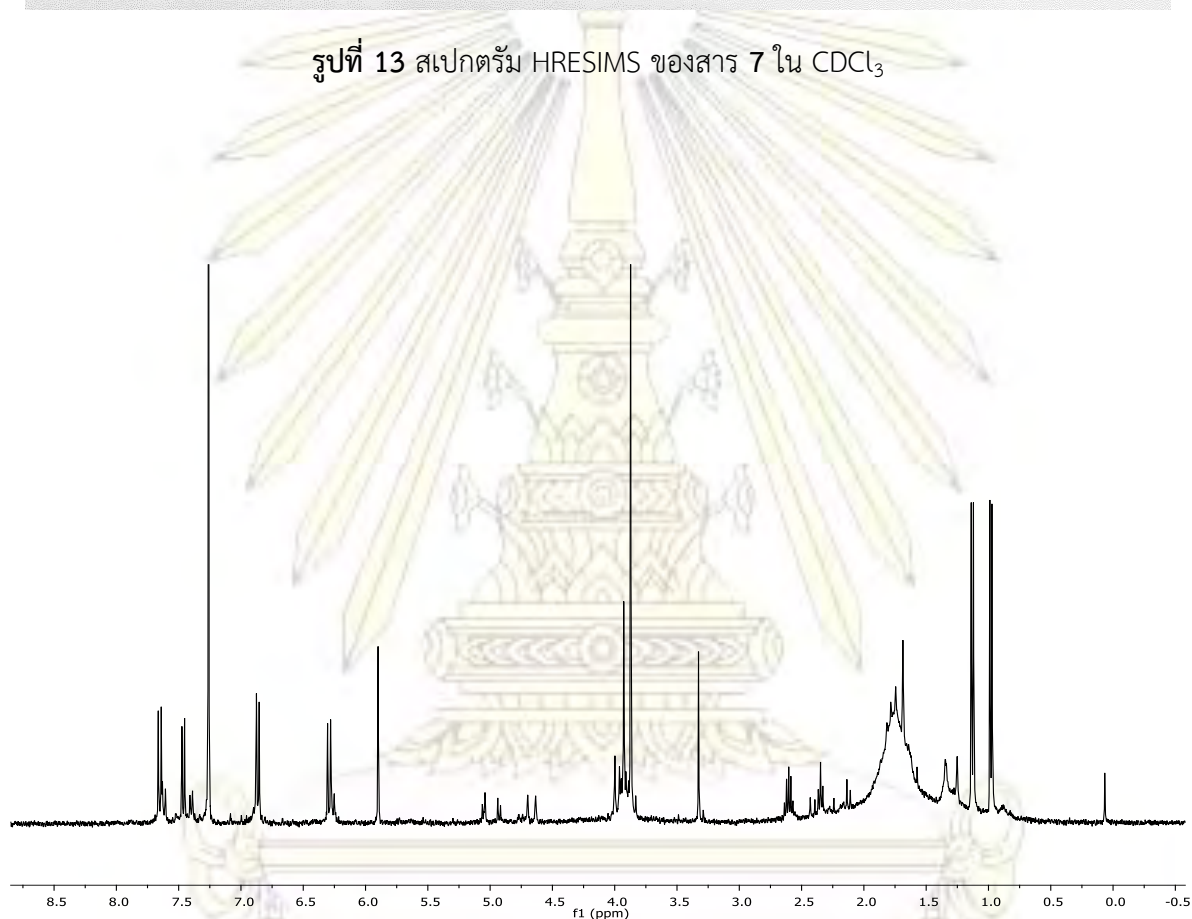
รูปที่ 10 สเปกตรัม COSY ของสาร 7 ใน CDCl_3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 สเปกตรัม HSQC ของสาร 7 ใน CDCl_3 รูปที่ 12 สเปกตรัม HMBC ของสาร 7 ใน CDCl_3

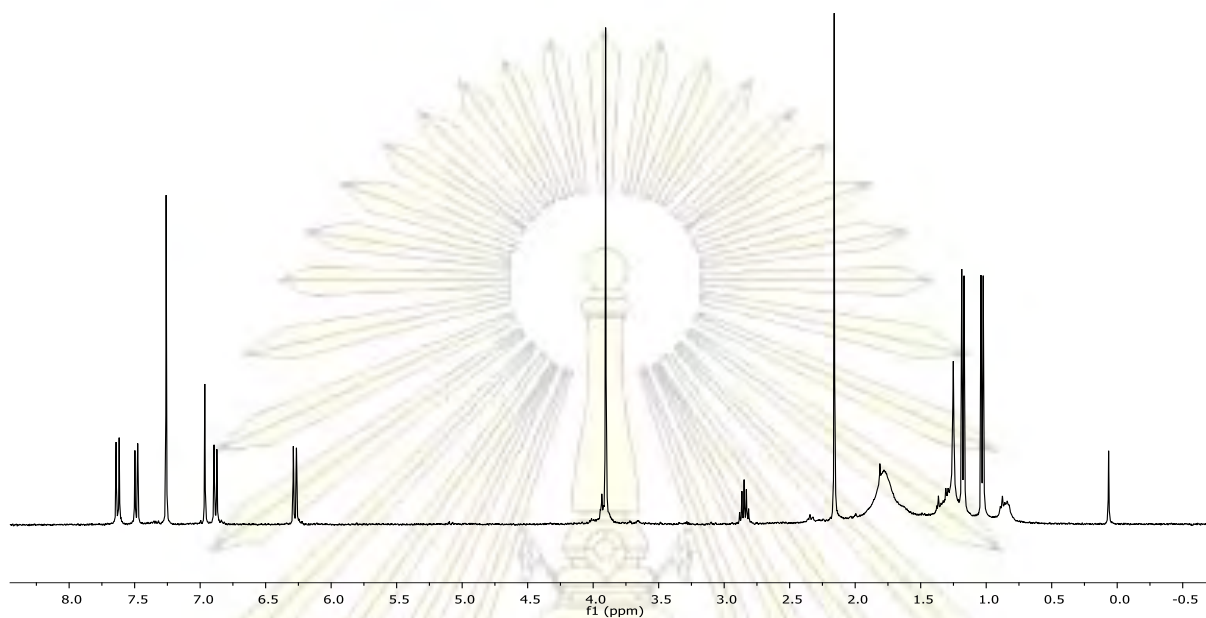


รูปที่ 13 สเปกตรัม HRESIMS ของสาร 7 ใน CDCl_3

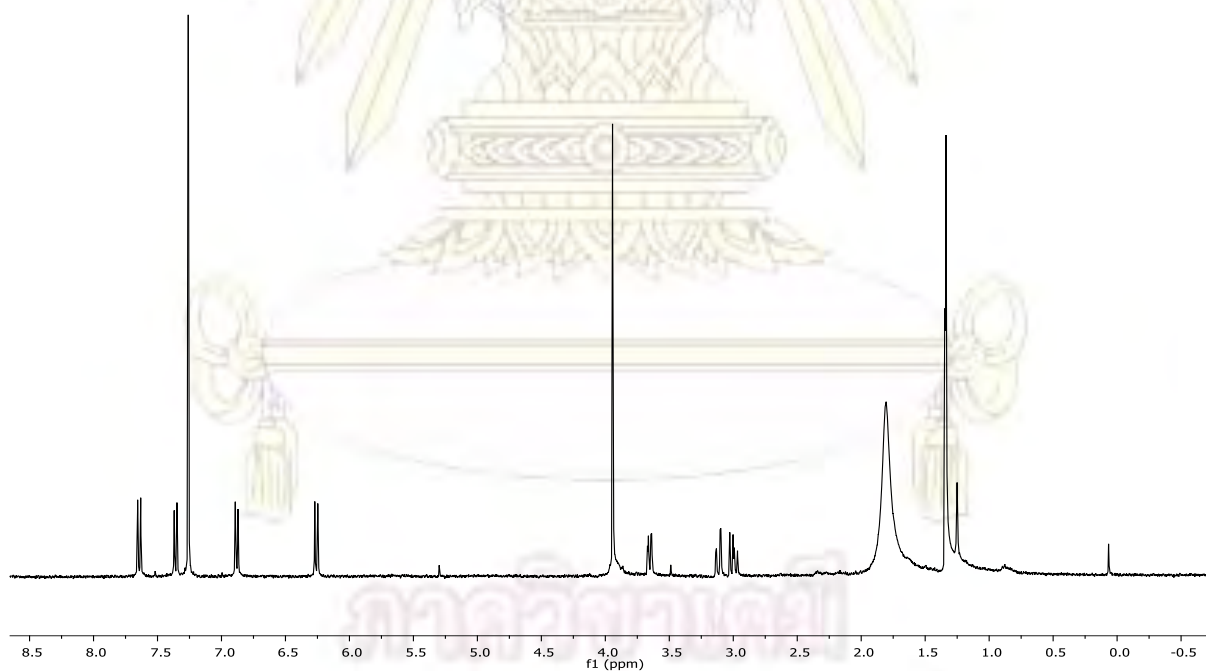


รูปที่ 14 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 8 ใน CDCl_3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

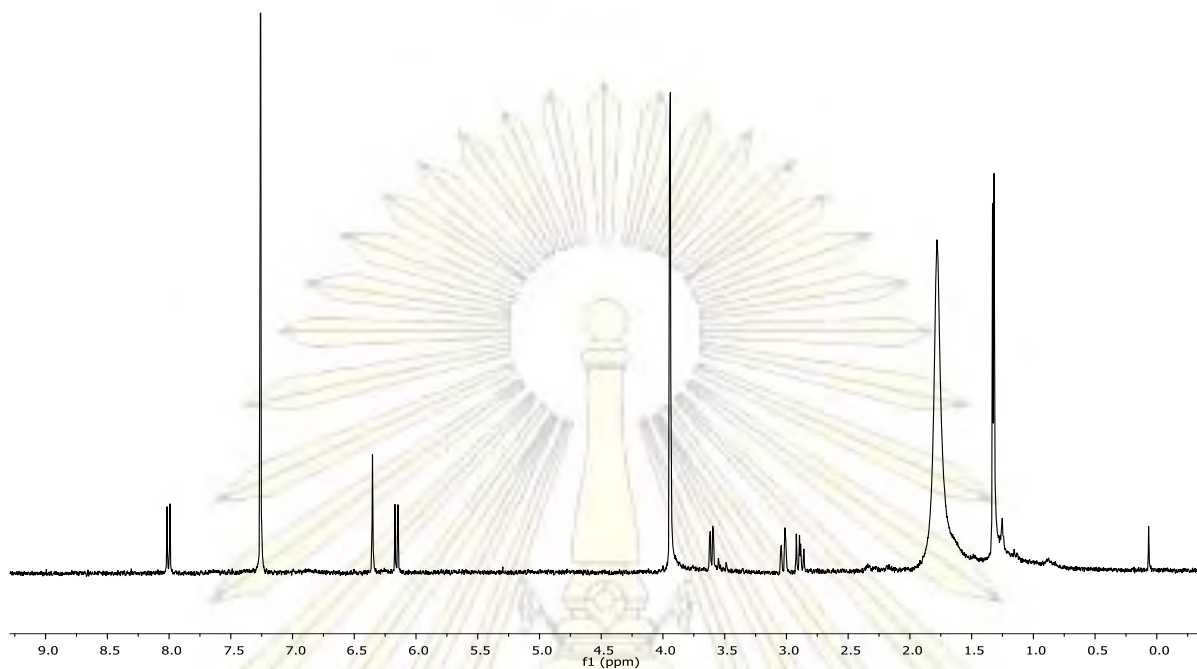


รูปที่ 15 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 9 ใน CDCl_3

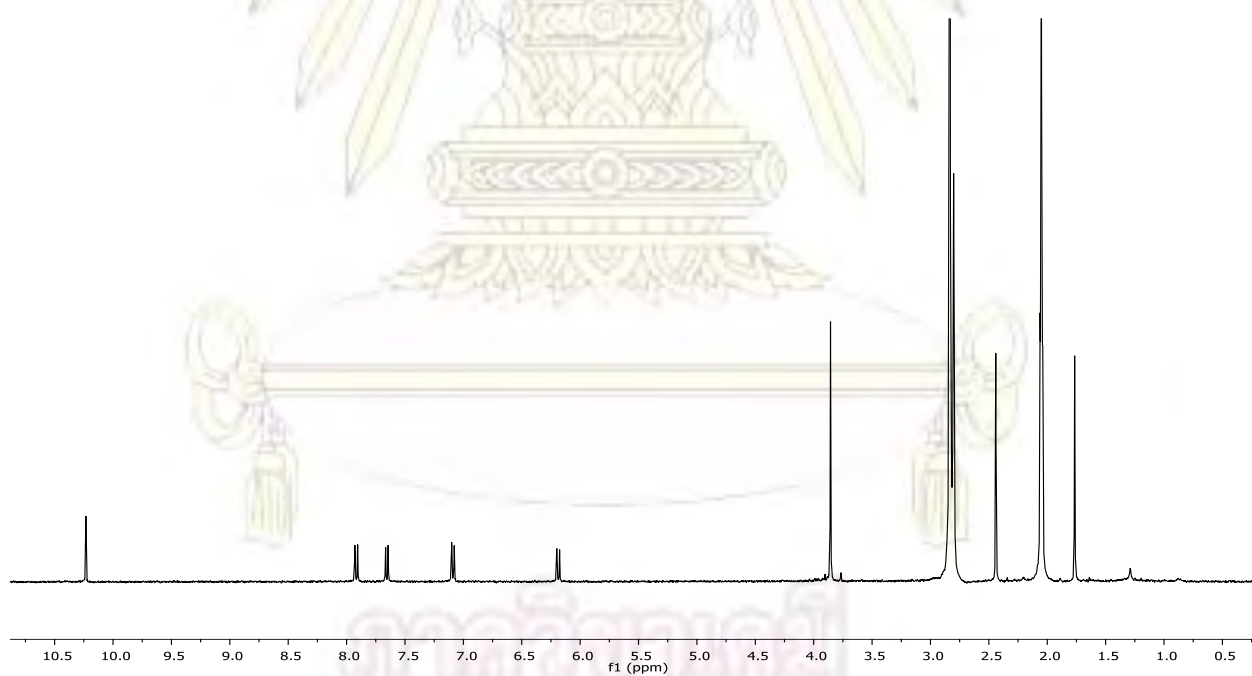


รูปที่ 16 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 10 ใน CDCl_3

คณบดีวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

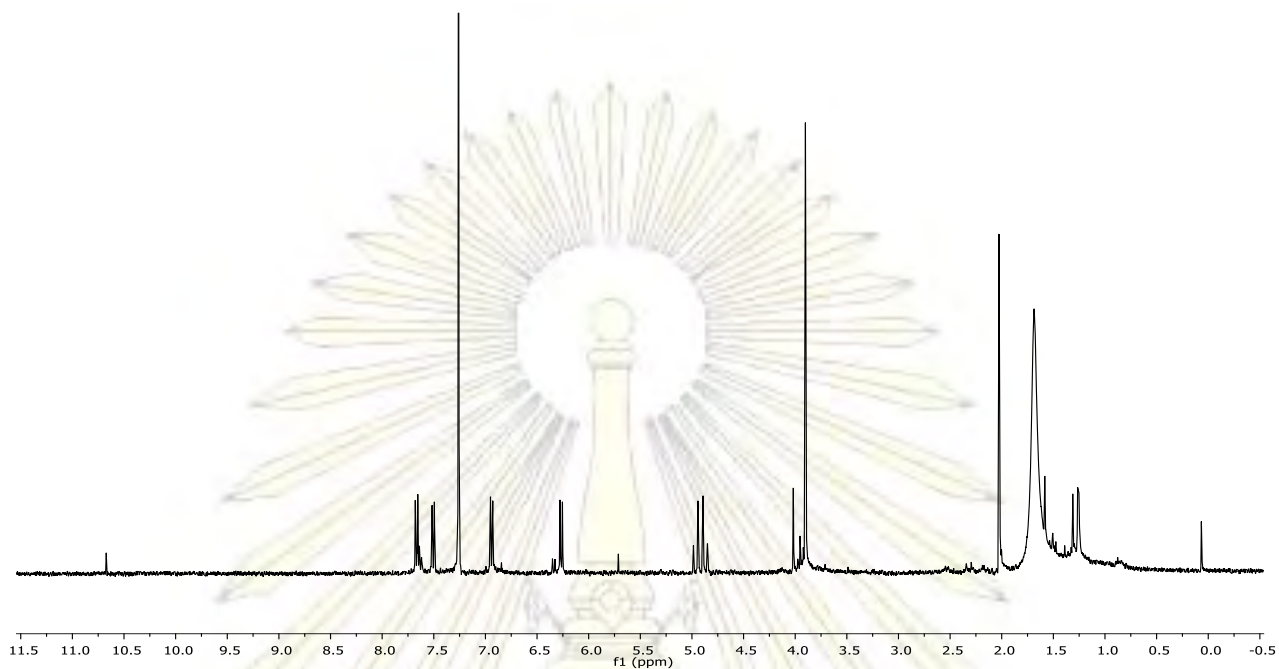


รูปที่ 17 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 11 ใน CDCl_3



รูปที่ 18 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 12 ใน $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 13 ใน CDCl_3

ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นาย ธนากร กุนแสง เกิดเมื่อวันที่ 3 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดพะเยา สำเร็จการศึกษา
ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียน พะเยาพิทยาคม จังหวัดพะเยา เมื่อปีการศึกษา 2554 เข้าศึกษาต่อใน
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 26 ตำบลบ้านต๋อม อำเภอเมืองพะเยา จังหวัดพะเยา รหัสไปรษณีย์ 56000
อีเมลล์ tanakon.chemistry@gmail.com



ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย