



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากโกฐกระดุก

Isolation of Bioactive Compounds from *Saussurea lappa* root

ชื่อนิสิต นายสีบสกุล โทนแจ้

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากโกฐกระดุก
Isolation of Bioactive Compounds from *Saussurea lappa* root

โดย

นายสืบสกุล โทนแจ้ง

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2559


เรื่อง การสกัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากรากโกฐกระดุก


โดย นายสืบสกุล โทนแจ้

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ)

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

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

หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ เดือน..... พ.ศ. 2560

คุณภาพของการเขียนรายงานเล่มนี้อยู่ในระดับ ดีมาก ดี พอใช้

Title Isolation of Bioactive Compounds from *Saussurea lappa* root

Student Name Mr. Suebsakul Tonjang Student ID: 5633155023

Advisor Name Associate Professor Dr. Khanitha Pudhom

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic
Years 2016

Abstract

In this research, the isolation and purification of *Saussurea lappa* root was performed. Three crude extracts, hexane, acetone and methanol, have been prepared, and were subjected to the anti-inflammatory assay by measuring inhibitory activity against nitric oxide (NO) production from LPS-induced macrophage. The hexane extract showed the most potent activity, and was subsequently purified by using chromatographic techniques. Two major compounds, **SL-1** and **SL-2**, were isolated and identified as costunolide and dehydrocostus lactone, respectively. Both compounds are sesquiterpenes and shared the α -methylene- γ -lactone moiety in their structures. It was further found that this functional group is required for the anti-inflammatory activity of **SL-1**. Further, **SL-1** was subjected to ring closure via epoxidation of double bond to yield two eudesmanolide-type sesquiterpenes, **cos-2** and **cos-3**. To extend the compound series, both of them were subjected to acetylation and epoxidation to yield four additional derivatives, **cos-4**, **cos-5**, **cos-6** and **cos-7**. All semi-synthetic derivatives were evaluated for their anti-inflammatory. Surprisingly, all displayed potent anti-inflammatory activity with IC_{50} ranging from 1.81 to 2.17 μ M with no toxicity, as well as more potent than costunolide (**SL-1**). In addition, the cytotoxicity of the compounds against three human cancer cell lines and one non-cancerous cells was assessed. Only costunolide could selectively kill and/or inhibit MCF-7 more than 95% at 20 μ M.

Keywords: *Saussurea lappa* root, anti-inflammatory activity, cytotoxicity, eudesmanolide derivative

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่
กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งในการเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการเคมี เครื่องมือ สารเคมีใน
การทำวิจัย รวมทั้งการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์
ดร.สมใจ เพ็งปรีชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษยรัตน์ ธรรมพัฒน์กิจ ที่กรุณาให้คำแนะนำและ
ตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ นางสาวสุจิตรา หาญทอง นางสาว
ศิวัตรา

ชูเดช และนางสาวญาณิศา มิตรภาพ ที่คอยให้คำแนะนำ และสอนเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยนี้จน
สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

โครงการนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ของคณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2559 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง



สารบัญ

เรื่อง	หน้า
ปกใน	ก
หน้าอำนวยการ	ข
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ค
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตารางประกอบ	ฉ
สารบัญรูปประกอบ	ญ
สารบัญแผนภาพประกอบ	ฎ
สารบัญภาคผนวก	ฏ
คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของรากโกฐกระดุก	2
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	7
2.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง	7
2.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	7
2.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	7
2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	7
2.3 สารเคมี	8

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
2.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการแยกสารบริสุทธิ์	8
2.3.2 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	8
2.3.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย NMR Spectrophotometer	9
2.3.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	9
2.4 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	9
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	9
2.5.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)	9
2.5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)	9
2.6 ขั้นตอนการทดลอง	10
2.6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบเฮกเซน	10
2.6.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดุก	11
2.7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร SL-1 (costunolide)	14
2.7.1 ปฏิกริยาเมทอกซิเลชัน (methoxylation) ของสาร SL-1	14
2.7.2 ปฏิกริยาการปิดวง (ring closure) ของสารประกอบ SL-1 โดยการอีพอกซิเดชัน(epoxidation)	15
2.7.3 ปฏิกริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ cos-2	16
2.7.4 ปฏิกริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ cos-3	17
2.7.5 ปฏิกริยาออกซิเดชันของสารประกอบ cos-2	17
2.7.6 ปฏิกริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ cos-3	18
2.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	18
2.8.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์โดยวิธี Nitric oxide inhibitory assay	18
2.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ โดยวิธี MTT assay	19

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
2.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วย MTT	19
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
3.1 การเตรียมส่วนสกัดของรากโกฐกระดุก	20
3.2 การคัดเลือกส่วนสกัดหยาบด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ	20
3.3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดุก	22
3.3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ SL-1	23
3.3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ SL-2	23
3.4 การเตรียมอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของ costunolide (SL-1)	26
3.4.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ costunolide และอนุพันธ์ cos-1	26
3.4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ eudesmanolide จาก costunolide (SL-1)	28
3.4.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ cos-2 และ cos-3 จาก costunolide	28
3.4.2.2 ปฏิกริยา acetylation ของสาร cos-2 และ cos-3	29
3.4.2.3 ปฏิกริยา oxidation ของสาร cos-2 และ cos-3	31
3.5 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์ eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้	32
3.6 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์	34
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	40
ประวัติผู้วิจัย	50

สารบัญตารางประกอบ

ตารางที่	หน้า	
3.1	แสดงผลผลิตของส่วนสกัดหยาบต่างๆ ของรากโกฐกระดุก	20
3.2	ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ SL-1 และ Costunolide	24
3.3	ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ SL-2 และ Dehydrocostus lactone	25
3.4	แสดงค่า IC_{50} ของอนุพันธ์ eudesmanolide และ costunolide	33
3.5	%ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของ costunolide และอนุพันธ์ eudesmanolide ที่ความเข้มข้น $20\ \mu\text{M}$	34



สารบัญรูปประกอบ

รูปที่	หน้า
1.1 ส่วนรากโกฐกระดูก	2
1.2 ต้นโกฐกระดูก	2
1.3 ผลโกฐกระดูก	3
1.4 Costunoline และ Dehydrocostus lactone	3
1.5 สารเซสควิเทอพินที่พบใหม่	4
1.6 11,13-epoxydehydrocostuslactone, 11,13-epoxyisozaluzanin C และ 11,13-epoxy-3-ketodehydrocostuslactone	4
1.7 lappadilactone	5
1.8 cynaropicrin	5
1.9 สารเซสควิเทอพิน 6 ชนิดที่แยกโดย B. Poornima และคณะ	6
3.1 ผลการยับยั้งการผลิต NO ของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของส่วนสกัดหยาบของรากโกฐกระดูกทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ	22
3.2 โครงสร้างของสารประกอบ SL-1	24
3.3 โครงสร้างของสารประกอบ SL-2	25
3.4 หมู่ α -methylene- γ -lactone ของ costunolide ซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์	26
3.5 ปฏิกิริยา methoxylation ด้วย NaOMe ของ costunolide	27
3.6 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิต NO ของ SL-1 และอนุพันธ์ cos-1 ที่ 10 μ M	27
3.7 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิต NO ของ SL-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	28
3.8 การเปลี่ยนจากสารเซสควิเทอพินกลุ่ม germacranolide เป็นกลุ่ม eudesmanolide	29
3.9 การสังเคราะห์อนุพันธ์ cos-2 และ cos-3 จากสาร SL-1 (costunolide)	30
3.10 ปฏิกิริยา acetylation ของสาร cos-2 (a) และ cos-3 (b)	30
3.11 (a) ^1H NMR สเปกตรัมของสาร cos-2 และ cos-4	30
(b) ^1H NMR สเปกตรัมของสาร cos-3 และ cos-5	

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
3.12	ปฏิกิริยา oxidation ด้วย PDC ของสาร cos-2 (a) และ cos-3 (b)	31
3.13	(a) ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร cos-2 และ cos-6 (b) ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร cos-3 และ cos-7	32
3.14	ฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์ eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้ที่มีความเข้มข้นต่างๆ	33
4.1	สารที่ได้จากการแยกจากรากโกฐกระดุก	35
4.2	สารที่ได้จากการตัดแปรโครงสร้าง	36



สารบัญแผนภาพประกอบ

แผนภาพที่		หน้า
2.1	การเตรียมสารสกัดหยาบเฮกเซนจากรากโกฐกระดุก	11
2.2	การแยกสารสกัดหยาบเฮกเซนจากรากโกฐกระดุก	13
2.3	การสังเคราะห์ cos-1	14
2.4	การสังเคราะห์ cos-2 และ cos-3	15
2.5	การสังเคราะห์ cos-4	16
2.6	การสังเคราะห์ cos-5	17
2.7	การสังเคราะห์ cos-6	17
2.8	การสังเคราะห์ cos-7	18
3.1	แสดงกระบวนการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (A) และการตรวจวัดด้วย Griess reagent (B)	21



สารบัญภาคผนวก

รูปที่		หน้า
A.1	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ SL-1 ใน CDCl_3	41
A.2	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ SL-1 ใน CDCl_3	41
A.3	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ SL-2 ใน CDCl_3	42
A.4	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ SL-2 ใน CDCl_3	42
A.5	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-1 ใน CDCl_3	43
A.6	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-1 ใน CDCl_3	43
A.7	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-2 ใน CDCl_3	44
A.8	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-2 ใน CDCl_3	44
A.9	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-3 ใน CDCl_3	45
A.10	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-3 ใน CDCl_3	45
A.11	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-4 ใน CDCl_3	46
A.12	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-4 ใน CDCl_3	46
A.13	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-5 ใน CDCl_3	47
A.14	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-5 ใน CDCl_3	47
A.15	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-6 ใน CDCl_3	48
A.16	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-6 ใน CDCl_3	48
A.17	สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-7 ใน CDCl_3	49
A.18	สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-7 ใน CDCl_3	49

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$^{13}\text{C-NMR}$	carbon nuclear magnetic resonance
$^1\text{H-NMR}$	proton nuclear magnetic resonance
J	coupling constant
s	singlet (NMR)
d	doublet (NMR)
dd	doublet of doublet (NMR)
t	triplet (NMR)
Hz	hertz
%	percent
TLC	thin layer chromatography
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
μg	ไมโครกรัม
mL	มิลลิลิตร
nm	นาโนเมตร
μM	ไมโครโมลาร์

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมนุษย์ใช้ชีวิตบนความเสี่ยงของโรคต่างๆ มากมาย อัตราการเสียชีวิตและการเจ็บป่วยของประชากรด้วยโรคภัยได้เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลายกรณีมีสาเหตุมาจากสิ่งที่อยู่รอบตัว เช่น การดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนแปลงไปของมนุษย์ สภาพอากาศที่แปรปรวน หรือการรับประทานอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เป็นต้น ทำให้ต้องมีการใช้ยารักษาโรคต่างๆ เพื่อบรรเทาอาการเจ็บป่วยทั้งหลายให้เบาบางลงและหายขาดไปในที่สุด

ทางเลือกหนึ่งที่มนุษย์นำมาใช้รักษาอาการผิดปกติตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันนั่นคือ สมุนไพร ซึ่งถูกนำมาใช้ในรูปของตำรับยาเพื่อบรรเทาและรักษาอาการเจ็บป่วยที่เกิดขึ้น เหตุที่สมุนไพรถูกนำมาใช้และยังคงเป็นที่นิยมนำมาศึกษาวิจัยนั้นเป็นเพราะสมุนไพรประกอบด้วยสารธรรมชาติหลากหลายชนิด ซึ่งสมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์ในการรักษาโดยถูกใช้มาตั้งแต่อดีต หาได้ง่ายและมีความปลอดภัยในการใช้สูง จึงเป็นที่สนใจอย่างยิ่งแก่นักวิจัยที่จะศึกษาค้นคว้าหาค่าประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์นั้นๆ ของสมุนไพร อีกทั้งพืชสมุนไพรไทยจัดเป็นแหล่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่น่าสนใจในระดับต้นๆ เนื่องจากความได้เปรียบเชิงภูมิศาสตร์ของประเทศไทยที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ดังนั้นพืชสมุนไพรไทยจึงเป็นแหล่งที่ดีสำหรับสารทุติยภูมิที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคต่างๆ

โกฐกระดูก (*Saussurea lappa* Clarke) เป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคอย่างยาวนานจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะส่วนรากซึ่งมีสรรพคุณทางยา ได้แก่ ขับพยาธิ ด้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ฤทธิ์ด้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร กระตุ้นการบีบตัวของกระเพาะและลำไส้ ด้านการอักเสบ¹ ด้านมะเร็ง ด้านการเกิดออกซิเดชัน² ด้านการเกิดพิษต่อตับ ฯลฯ จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่มเซสควิเทอพีน แลคโตน³ (sesquiterpene lactone) โดยเฉพาะสารที่มีชื่อว่า costunolide และ dehydrocostus lacton⁵ เป็นต้น

ดังนั้นรากต้นโกฐกระดูกจึงเป็นแหล่งของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทเซสควิเทอพีนที่น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะฤทธิ์ด้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ประกอบกับในประเทศไทยยังมีงานวิจัยเกี่ยวกับต้นโกฐกระดูกอยู่น้อย งานวิจัยนี้จึงสนใจสกัดและแยก

สารเซสควิเทอร์พีนที่เป็นองค์ประกอบของรากโกฐกระดูกและนำมาปรับปรุงโครงสร้างเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ โดยเฉพาะต่อการต้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปพัฒนาให้ได้สารที่มีฤทธิ์ดียิ่งขึ้นจนสามารถนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไปได้

1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของรากโกฐกระดูก



รูปที่ 1.1 ส่วนรากโกฐกระดูก⁶



รูปที่ 1.2 ต้นโกฐกระดูก⁷

ชื่อพืชที่ให้เครื่องยา	โกฐกระดูก
ชื่อพ้อง	บักเฮียง (จีนแต้จิ๋ว), มู่เซียง (จีนกลาง)
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Saussurea lappa</i> Clarke
ชื่อวงศ์	Compositae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

- **ต้น** จัดเป็นพรรณไม้ล้มลุก มีความสูงได้ประมาณ 1-2 เมตร ลำต้นมีขนาดเล็กและมีขนขึ้นปกคลุม ไม่แตกกิ่งก้านสาขา
- **ใบ** ใบมีขนาดใหญ่ เป็นใบเดี่ยวคล้ายรูปสามเหลี่ยม โคนใบเว้าเข้าหากัน ส่วนขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยลักษณะคล้ายหนาม หน้าใบเป็นสีเขียวและมีขนหยาบ ๆ ขึ้นปกคลุม ส่วนหลังใบเป็นสีเขียวอ่อนอมเหลือง
- **ดอก** ก้านดอกยาว ดอกเป็นสีม่วงเข้ม
- **ผล** ผลมีลักษณะเป็นเส้นแบนยาว เมื่อผลแก่จะแตกออก



รูปที่ 1.3 ผลโกฐกระดูก^๑

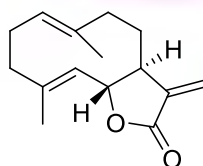
- **ราก** รากมีสีเทาถึงสีน้ำตาล ลักษณะแข็ง รูปทรงกระสวย หรือรูปทรงกระบอก คล้ายกระดูก ขนาดความยาว 5-10 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-5 เซนติเมตร ผิวนอกสีน้ำตาลอมเหลืองถึงสีน้ำตาลอมเทา มีรอยย่นชัดเจน มีร่องตามยาว ผิวนอกมีร่องไขว้ไปมาคล้ายร่างแห ด้านข้างมีรอยแผล เป็นรากแขนง เนื้อแข็ง หักยาก เมื่อผ่าตามแนวขวาง เนื้อรากจะแบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนนอกที่บางกว่า และส่วนในซึ่งเป็นเนื้อรากจะมีสีจางกว่า และมีลายเส้นตามแนวรัศมี เนื้อตรงกลางจะยุบตัวลง มีรูพรุน

สรรพคุณทางยา :

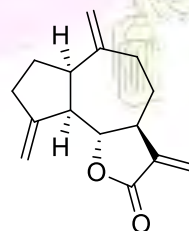
รากแก้เสมหะและลม แก้หืด หอบ แก้ลมในกองเสมหะ บำรุงหัวใจให้ชุ่มชื้น บำรุงกระดูก แก้ลมวิงเวียน หน้ามืด ตาลาย แก้ปวด ตำราสรรพคุณยาโบราณของไทยว่าโกฐกระดูกมีรสขม หวาน มัน ระคนกัน มีกลิ่นหอมเฉพาะ ตำรายาโบราณบางเล่มเรียกว่า “**โกฐหอม**” เพราะมีกลิ่นหอมชวนดมตำรายาไทยจึงใช้ปรุงเป็นยาหอมรับประทานแก้ลมวิงเวียนหน้ามืดตาลายขับลมในลำไส้ แก้โรคโลหิตจาง

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1984 R. S. Dhillon และคณะ² ได้รายงานการแยกสารเซสควิเทอปีนได้ 2 ชนิดจากรากโกฐกระดูก คือ costunolide (1) และ dehydrocostus lactone (2) ซึ่งสารทั้งสองชนิดมีหมู่ α -methylene- γ -lactone เป็นองค์ประกอบที่ ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้ดี



(1)



(2)

รูปที่ 1.4 costunoline และ dehydrocostuslactone

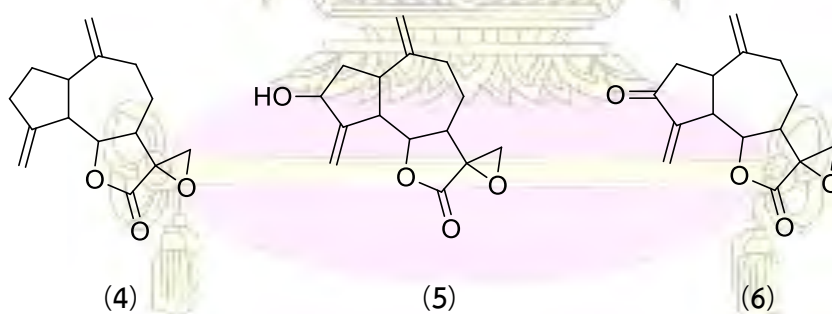
ในปี 1986 A. Kajiwara และคณะ³ พบว่าสารสกัดเมทานอลของรากโกฐกระดูกที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นโดย KCl ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ถูกกระตุ้นโดย Norepinephrine ได้

ในปี 1997 Y. Hui และคณะ⁴ นำรากโกฐกระดูกมาแยกได้สารเซสควิเทอพิน 13 ชนิดโดยเป็นสารที่ชนิดใหม่ 1 ชนิด (3) ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกับอาการปวดเกร็งช่องท้อง ช่วยลดความดันและสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย โดยสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีจะเป็นสารที่มีหมู่แอลดีไฮด์



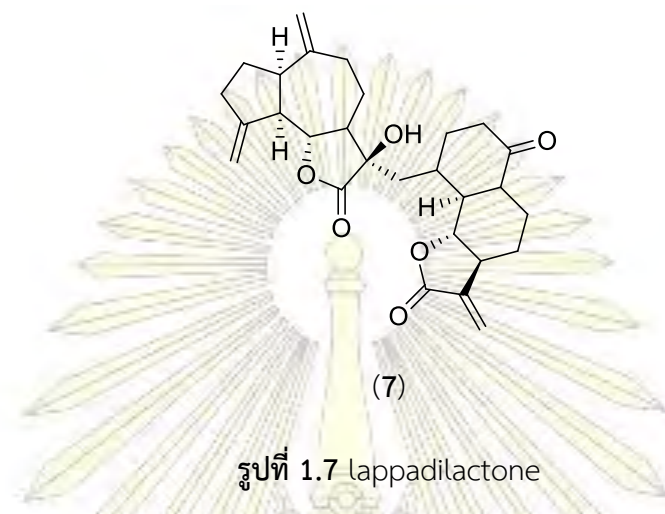
รูปที่ 1.5 สารเซสควิเทอพินที่พบใหม่

ในปี 1997 B. R. Chhabra⁵ และคณะ พบสารกลุ่ม guaianolide ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ 11,13-epoxydehydrocostuslactone (4), 11,13-epoxyisozaluzanin C (5) และ 11,13-epoxy-3-ketodehydrocostuslactone (6)

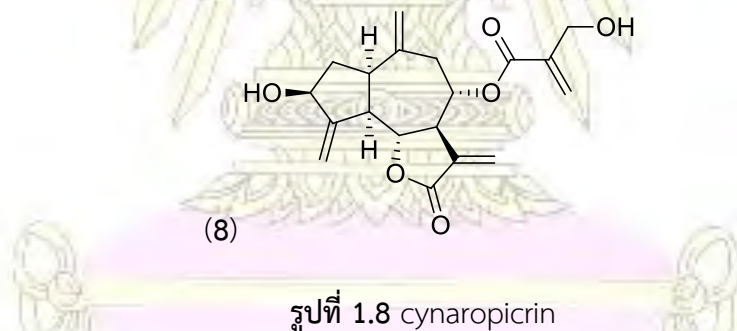


รูปที่ 1.6 11,13-epoxydehydrocostuslactone, 11,13-epoxyisozaluzanin C และ 11,13-epoxy-3-ketodehydrocostuslactone

ในปี 2003 C. M. Sun และคณะ⁹ ได้นำรากโกฐกระดูกมาสกัดแยกได้สารกลุ่มเซสควิเทอปีน ซึ่งมีสารที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพได้ดีต่อเซลล์มะเร็งคือ lappadilactone (7), costunolide (1) และ dehydrocostus lactone (2) โดยสารดังกล่าวมีหมู่ α -methylene- γ -lactone จะทำให้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้นแต่ประสิทธิภาพจะลดลงถ้ามีหมู่ hydroxyl

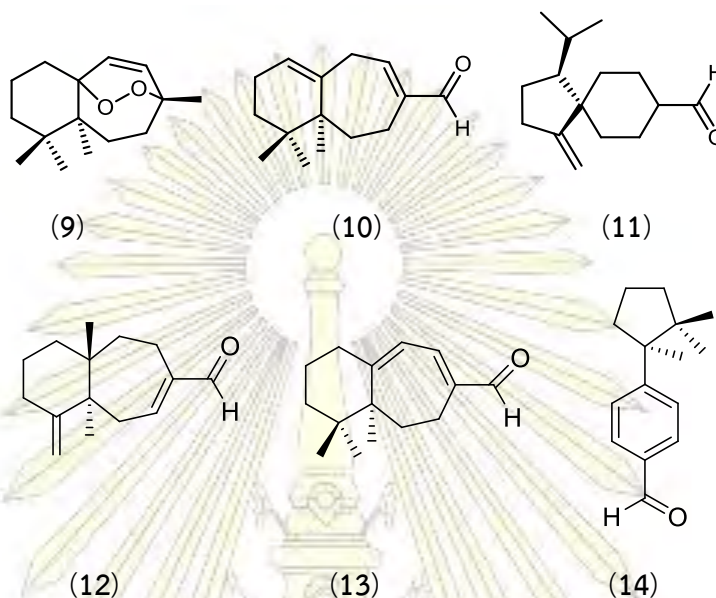


ในปี 2006 M. M. Pandey และคณะ¹⁰ ได้นำรากโกฐกระดูกมาแยกโดยใช้ เอทานอลเป็นตัวทำละลายได้สาร cynaropicrin (8) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี รวมถึงสาร dehydrocostus lactone (2) ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งไวรัสตับอักเสบบีได้



ในปี 2012 K. M. Chang และคณะ¹¹ พบว่ารากโกฐกระดูกเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอล และสารประกอบพลาโวนอยด์ ตรวจสอบโดยวิธี Folin ให้ปริมาณมากที่สุดเมื่อสกัดด้วย n-butanol โดยสารดังกล่าวมีผลยับยั้ง DPPH ซึ่งอาจช่วยลด oxidative stress ได้

ในปี 2015 B. Poornima และคณะ¹² พบว่าเมื่อนำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดูกมาแยกได้สารเซสควิเทอพีน 6 ชนิดซึ่งที่เคยมีการค้นพบมาแล้ว 3 ชนิด (9-11) และเป็นสารที่พบใหม่ 3 ชนิด (12-14) และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาคลิก (click reaction) ได้เป็นอนุพันธ์ไตรเอโซล ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น



รูปที่ 1.9 สารเซสควิเทอพีน 6 ชนิดที่แยกโดย B. Poornima และคณะ

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สกัดและแยกสารที่เป็นองค์ประกอบของรากโกฐกระดูกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี
2. พิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารที่แยกได้โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี
3. เตรียมอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ (semi-synthetic derivative) โดยการดัดแปรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาเคมีต่างๆ
4. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้และอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ที่ได้ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งบางชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สนใจของสารจากรากโกฐกระดูกซึ่งอาจนำไปเป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาต่อยอดต่อไปได้

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

รากโกฐกระดูกแห้ง (*Saussurea lappa* Clarke) หนัก 2 กิโลกรัม จากร้านเจ้ากรมเป๋อ กรุงเทพมหานคร

2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- บีกเกอร์
- หลอดทดลอง
- กระจกนาฬิกา
- สำลี
- ขวดไวแอล (Vial)
- กรวยแก้ว
- กรวยแยก
- กรวยบุชเนอร์
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42
- ไมโครเพลท 96 หลุม (96 well plates)
- TLC Aluminium Sheets Silica Gel 60 F254
- หลอดแคปิลลารี
- กระบอกตวง
- ขวดรูปกรวย
- แท่งแก้วคนสาร
- ซ้อนดักสาร
- ขวดกั้นกลม
- หลอดหยด
- คอลัมน์โครมาโตกราฟี
- ไมโครปิเปต

2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) รุ่น Eyela rotary evaporator N-1000 บริษัท Tokyo Rikakikai และ รุ่น Büchi rotavapor R-114, Switzerland
- เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น Sartorius Basic ของบริษัท Scientific promotion
- ปัม diaphragm (Büchi Vac® V-500, Switzerland)
- ตู้อบ (Mement UM 500, BEC, Thailand)

- Sonicator (Branson, USA)
- Safety Laboratory Hood (Asia chemical and engineering Co.,Ltd, Thailand)
- เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) ของบริษัท IKA Labortechnik
- Nuclear Magnetic Resonances Spectrophotometer YH 400 ของบริษัท Bruker
- Microplate reader ยี่ห้อ Biotek รุ่น POWERWAVE XS2

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการแยกสารบริสุทธิ์

- ซิลิกาเจล เบอร์ 9385 และเบอร์ 7734 จากบริษัท Merck
- Sephadex LH-20 จากบริษัท GE healthcare
- ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต, อะซิโตน และเมทานอล
- แอมโมเนียมโมลิบเดตใน 5% กรดซัลฟิวริก เป็นสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์บนแผ่น TLC เพื่อให้เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ได้ชัดเจน

2.3.2 สารเคมีที่ใช้ดัดแปรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

- เมทานอล (methanol)
- โลหะโซเดียม (Na)
- *m*-chloroperbenzoic acid (mCPBA)
- เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate, EtOAc)
- sodium bicarbonate (NaHCO₃)
- sodium sulphate (anh, Na₂SO₄)
- boron trifluoride diethyl etherate (BF₃·Et₂O)
- ไพริดีน (pyridine)
- acetic anhydride (Ac₂O)
- 4-dimethylaminopyridine (DMAP)
- ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)

- pyridinium dichromate (PDC)

- เบนซีน (benzene)

2.3.3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย NMR Spectrophotometer

- CDCl_3 (chloroform-d)

- acetone- d_6

2.3.4 สารเคมีที่ใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

- dimethyl sulfoxide (DMSO, cell culture grade)

- Griess reagent (1% sulfanilamide และ *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, NED)

2.4 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

- RAW-cell 264.7

- MCF-7 cell

- HeLa cell

- HTC116 cell

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography)¹³

เป็นเทคนิคการแยกสารที่ผสมกันอยู่ออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างในการกระจายตัวที่ไม่เท่ากันของสารในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวทำละลาย ในงานวิจัยนี้ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ซึ่งจะถูกรวบรวมในคอลัมน์แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยวิธีบรรจุแบบเปียก (wet packing) จากนั้นจึงเติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ ซึ่งสารผสมจะผ่านคอลัมน์อย่างช้าๆ ก่อนที่จะเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปเพื่อเป็นตัวพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับในคอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกของสารที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันเป็นแถบสารขึ้น สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี (สารมีขั้วต่ำ) หลังจากนั้นเก็บองค์ประกอบของสารที่แยกได้

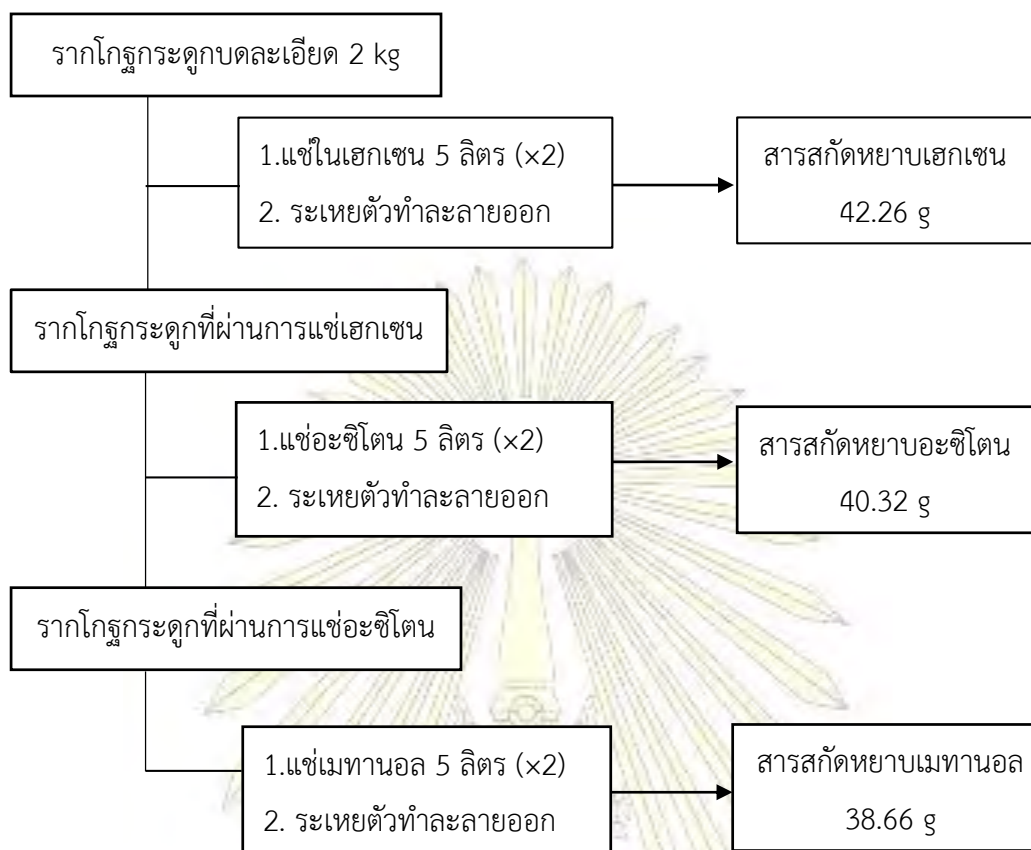
2.5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)¹³

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบสารที่รวดเร็วและสะดวก ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในแต่ละขั้นตอน และใช้เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ TLC aluminium sheets silica gel 60 F₂₅₄ ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วระบุระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ใช้หลอดแคปิลลารีแต้มสารลงไปบนแผ่น TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะปิดที่ใส่ตัวทำละลายที่เหมาะสมไว้อย่างเพียงเล็กน้อย ระดับตัวทำละลายไม่ควรสูงเกินระดับที่แต้มสาร เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะสามารถขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี คอยสังเกตรอยเปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC เมื่อมาถึงเกือบปลายด้านบนของแผ่น ห่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำมาส่องกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสาร จากนั้นนำมาจุ่มสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดตใน 5% กรดซัลฟิวริก แล้วนำไปให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อนประมาณ 1-2 นาที บันทึกตำแหน่งของสาร

2.6 ขั้นตอนการทดลอง

2.6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบเฮกเซน

1. นำรากโกฐกระดูกที่ผ่านการตากแห้งและบดละเอียดแล้วทั้งหมด 2 กิโลกรัมมาแช่เฮกเซนจำนวน 5 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน และทำซ้ำอีกครั้ง
2. ใช้ผ้าขาวบางกรองเอาส่วนที่เป็นสารละลาย จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกไปโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซนหนัก 42.26 กรัม ดังแผนภาพที่ 2.1
3. นำรากโกฐกระดูกมาแช่อะซิโตนและทำเช่นเดียวกันข้อ 1 และ 2 จะได้สารสกัดหยาบ อะซิโตนหนัก 40.32 กรัม
4. นำรากโกฐกระดูกมาแช่เมทานอลและทำเช่นเดียวกันข้อ 1 และ 2 จะได้สารสกัดหยาบ เมทานอลหนัก 38.66 กรัม



แผนภาพที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากรากโกฐกระดูก

2.6.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดูก

1. แบ่งสารสกัดหยาบเฮกเซนมาเล็กน้อย ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการหา ระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สำหรับลงคอลัมน์เพื่อแยกองค์ประกอบ ทางเคมี โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

2. นำสารสกัดหยาบเฮกเซนทั้งหมด มาทำ quick column chromatography (QCC) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่หรือตัวทำละลายคือ เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน อัตราส่วนตั้งแต่ 0%-100% เพิ่มอัตราส่วนเอทิลอะซิเตตขึ้นทีละ 10% จนสุดท้ายเป็นเอทิลอะซิเตต 100%

3. เก็บส่วนย่อยที่ออกมาจากคอลัมน์ นำมาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค TLC แล้วนำส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันมารวมกัน และระเหยตัวทำละลายออก ซึ่งได้ 8 ส่วนย่อย (1a-1h) จากนั้นนำส่วนย่อย d1 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซี

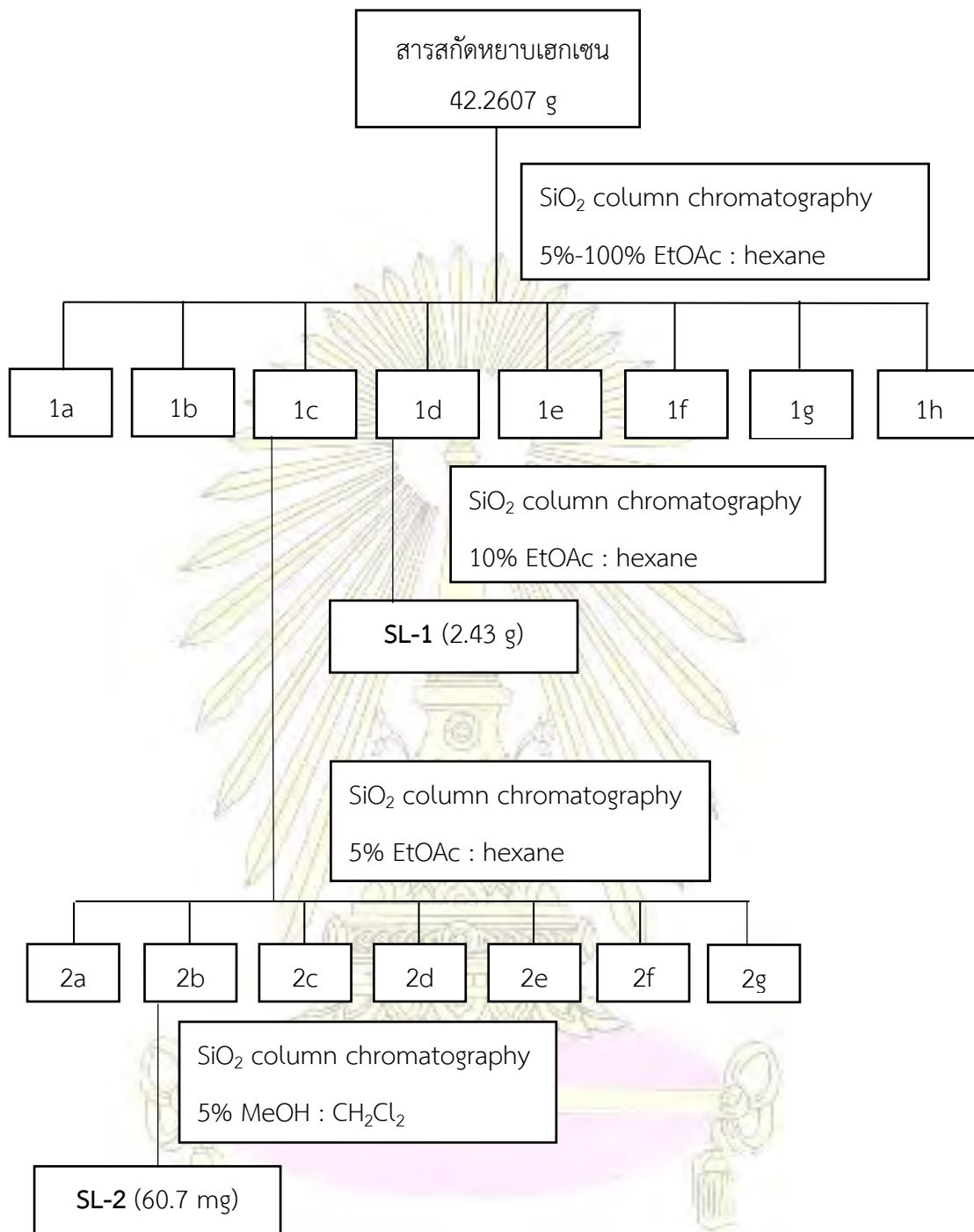
ลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่หรือตัวทำละลายคือ 10% เอทิลอะซิเตตในสารละลาย เฮกเซน **ดงแผนภาพที่ 2.2** และสารบริสุทธิ์ 1 ชนิดคือสารประกอบ **SL-1** หนัก 2.43 กรัม และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี

4. นำส่วนย่อย 1c มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีเช่นเดียวกับส่วนย่อย d1 โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 5% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน

5. ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของแต่ละส่วนย่อยที่แยกได้โดยเทคนิค TLC และรวมส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันเข้าด้วยกัน รวมกันได้ทั้งหมด 7 ส่วน คือ 2a-2g

6. นำส่วนประกอบทั้งหมดมาตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค H^1 NMR จากนั้นจึงเลือกส่วนย่อยมาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ 5% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้สารบริสุทธิ์ **SL-2** หนัก 60.7 mg และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี

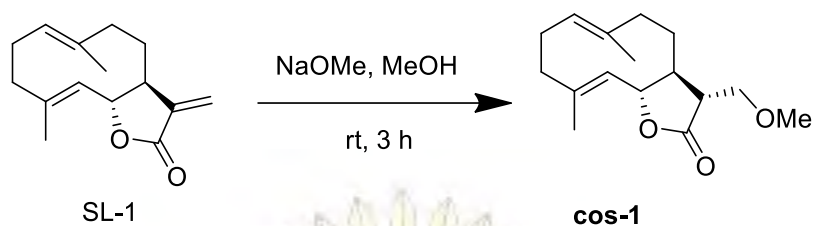




แผนภาพที่ 2.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนจากรากโกฐกระดูก

2.7 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร SL-1 (costunolide)¹⁴

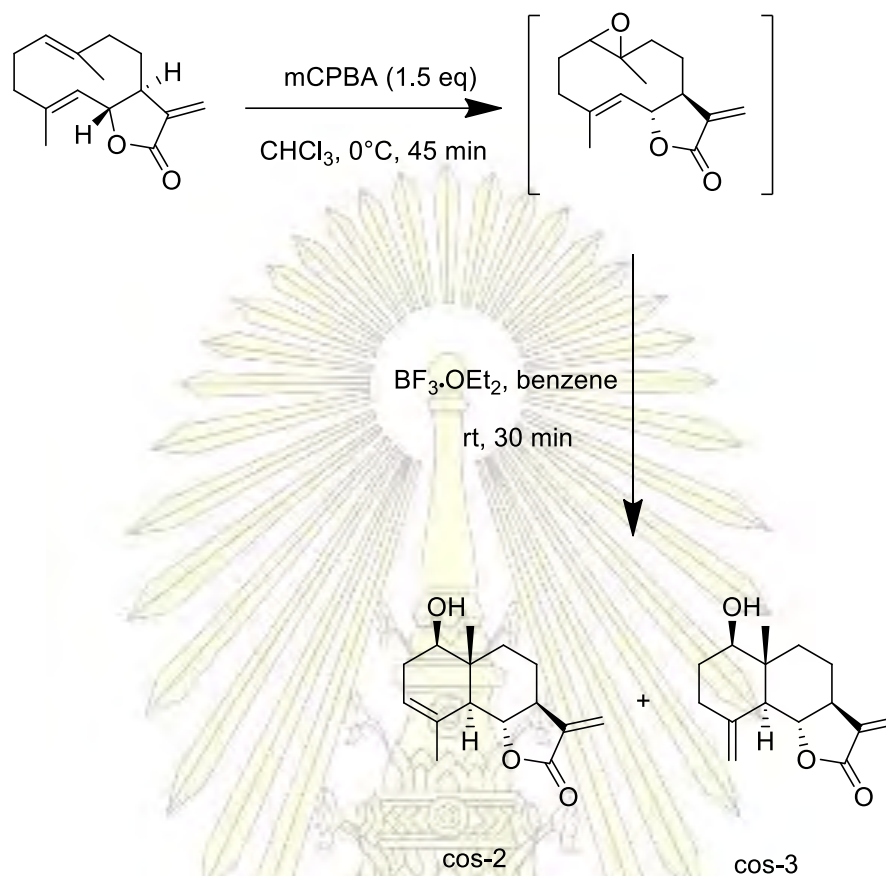
2.7.1 ปฏิกิริยาเมทอกซิเลชัน (methoxylation) ของสาร SL-1



แผนภาพที่ 2.3 การสังเคราะห์ cos-1

เติมเมทานอล (AR grade) 5 mL ลงในขวดก้นกลม ขนาด 50 mL จากนั้นใส่โลหะโซเดียม ประมาณ 10 mg คนจนโลหะโซเดียมทำปฏิกิริยากับเมทานอลจนหมดจะได้ sodium methoxide จากนั้นเติม costunolide (SL-1) 50 mg ลงไปและคนสารละลายให้เป็นสารเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่อง กวนแม่เหล็ก ตั้งปฏิกิริยาต่อไปอีก 3 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ทำการยุติปฏิกิริยา โดยเทสารละลายผสมใส่ลงในน้ำแข็งจากนั้นสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต 2 ครั้ง และล้างด้วย 5% NaHCO₃ (aq) และน้ำเกลือ ตามลำดับจากนั้นทำการกำจัดน้ำ ด้วย anhydrous Na₂SO₄ แล้วระเหยตัวทำละลาย ออกภายใต้การกลั่นแบบลดความดัน และแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และระเหยตัวทำละลายสารออก ได้สารประกอบ **cos-1** หนัก 31 mg (62% yield)

2.7.2 ปฏิกิริยาการปิดวง (ring closure) ของสารประกอบ **SL-1** โดยการอีพอกซิเดชัน (epoxidation)¹⁵

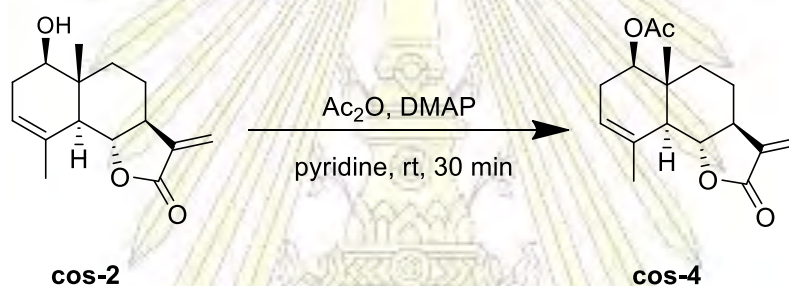


แผนภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์ **cos-2** และ **cos-3**

ละลาย costunolide (**SL-1**) 1 g ลงในคลอโรฟอร์ม 15 mL ในขวดรูปกรวย ขนาด 100 mL ภายใต้บรรยากาศไนโตรเจนที่ 0°C จากนั้นเติม *m*-chloroperbenzoic acid 1.115 g (1.5 eq) คนสารละลายให้เป็นสารเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก ตั้งปฏิกิริยาคนต่อไปอีก 45 นาที จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ทำการยุติปฏิกิริยาโดยนำสารที่ได้ให้ความเย็นโดยใส่ลงในน้ำแข็ง จากนั้นสกัดด้วย เอทิลอะซิเตต 2 ครั้งและล้างด้วย 5% $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ และน้ำเกลือ ตามลำดับจากนั้นทำการกำจัดน้ำ ด้วย anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายออกภายใต้การกลั่นแบบลดความดัน และแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง และใช้ 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และระเหยตัวทำละลายสารออกจะได้สารมัธยันต์

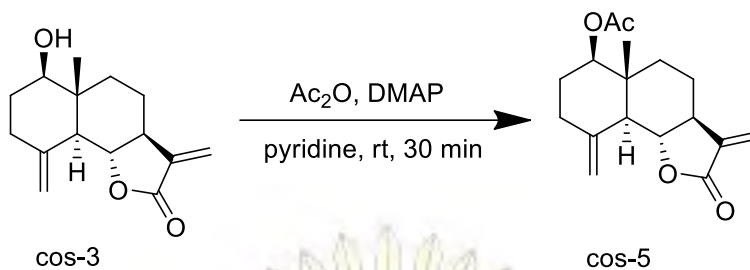
นำสารมัยยันต์ที่ได้มาทำปฏิกิริยาโดยละลาย ลงในเบนซีน 10 mL ที่อุณหภูมิห้อง ในขวดรูปกรวย ขนาด 50 mL จากนั้นเติม Boron trifluoride diethyl etherate จำนวน $100 \mu\text{L}$ โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก ตั้งปฏิกิริยาคนต่อไปอีก 30 นาที จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ทำการยุติปฏิกิริยาโดยนำสารที่ได้ให้ความเย็นโดยใส่ลงในน้ำแข็งจากนั้นสกัดด้วย เอทิลอะซิเตต 2 ครั้งและล้างด้วย 5% $\text{NaHCO}_3(\text{aq})$ และน้ำเกลือ ตามลำดับจากนั้นทำการกำจัดน้ำ ด้วย anhydrous Na_2SO_4 แล้วระเหยตัวทำละลายออกภายใต้การกลั่นแบบลดความดัน และแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ 40% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และระเหยตัวทำละลายสารออกจะได้สาร 2 ชนิด คือ **cos-2** หนัก 0.5 g (50% yield) และ **cos-3** หนัก 0.28 g (28% yield)

2.7.3 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ **cos-2**¹⁶

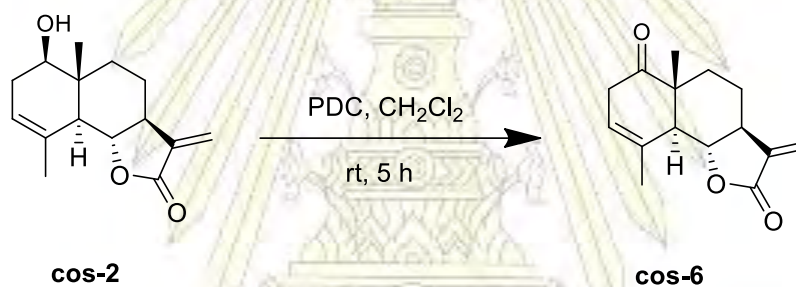


แผนภาพที่ 2.5 การสังเคราะห์ **cos-4**

ละลายสาร **cos-2** จำนวน 50 mg ลงในพีริดีน 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ในขวดรูปกรวย ขนาด 50 mL จากนั้นเติม acetic anhydride 0.3 mL มากเกินพอและ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 2 เกล็ดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา คนสารละลายด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก ตั้งปฏิกิริยาคนต่อไปอีก 30 นาที จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ทำการยุติปฏิกิริยาโดยนำสารที่ได้มากรองผ่านแผ่นซิลิกาแบบสั้น ล้างด้วย ethyl acetate จากนั้นระเหยสารแบบลดความดัน และแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยแบ่งสารที่สังเคราะห์ได้มาละลายในเฮกเซน แต่้มลงแผ่น TLC เพื่อหาระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สำหรับลงคอลัมน์เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) แบ่งสารที่สังเคราะห์ได้ มาลงคอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ 25% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และระเหยตัวทำละลายสารออก จะได้สาร **cos-4** หนัก 46 mg (92% yield)

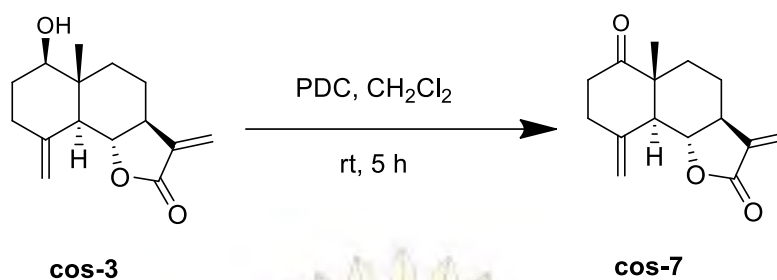
2.7.4 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ **cos-3**¹⁶แผนภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์ **cos-5**

ละลายสาร **cos-3** จำนวน 50 mg ลงในพิริดีน 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ในขวดรูปกรวย ขนาด 50 mL จากนั้นเติม acetic anhydride 0.3 mL มากเกินพอและ 4-dimethylaminopyridine (DMAP) 2 เกล็ดเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจากนั้นจึงตั้งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 2.7.3 จะได้สาร **cos-5** หนัก 45 mg (90% yield)

2.7.5 ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบ **cos-2**¹⁷แผนภาพที่ 2.7 การสังเคราะห์ **cos-6**

ละลายสาร **cos-2** จำนวน 100 mg ลงใน dichloromethane 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ในขวดรูปกรวย ขนาด 100 mL จากนั้นเติม pyridinium dichromate จำนวน 152.85 mg คนสารละลายให้เป็นสารเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็ก ตั้งปฏิกิริยาคนต่อไปอีก 5 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้ว ทำการยุติปฏิกิริยาโดยนำสารที่ได้มากรองผ่านแผ่นซิลิกาแบบสั้น ล้างด้วย ethyl acetate จากนั้นระเหยสารแบบลดความดัน และแยกสารที่สังเคราะห์ได้ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคหนึ่ง และใช้ 25% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่และระเหยตัวทำละลายสารออกจะได้สารประกอบ **cos-6** หนัก 72 mg (72% yield)

2.7.6 ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชันของสารประกอบ **cos-3**¹⁷



แผนภาพที่ 2.8 การสังเคราะห์ **cos-7**

ละลายสาร **cos-3** จำนวน 100 mg ลงใน dichloromethane 5 mL ที่อุณหภูมิห้อง ในขวดรูปกรวย ขนาด 100 mL จากนั้นเติม pyridinium dichromate จำนวน 151.61 mg จากนั้นจึงตั้งปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 2.7.5 จะได้สาร **cos-7** หนัก 68 mg (68% yield)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.8.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของเซลล์โดยวิธี Nitric oxide inhibitory assay¹⁸

1. เตรียมเซลล์มาโครฟาจ Raw-cell 264.7 ใน 96 well plate จำนวน 5×10^4 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ในตู้บ่ม เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับเพลท

2. ทำการ pre-treat เซลล์ใน well plate ที่ได้จากข้อ 1 ด้วยสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ หรือ DMSO สำหรับชุดควบคุม (control) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำการกระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) 1 μg/mL เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. เก็บ media จากแต่ละหลุมที่ทดสอบหลุมละ 50 μL จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent โดยเติม 1% sulfanilamide หลุมละ 50 μL บ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และเติม 0.1% N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED) 50 μL แล้วบ่มต่อในที่มืดอีก 10 นาที

4. วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader

5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งผลิตภัณฑ์ไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นและหาค่า IC₅₀

$$\% \text{ การยับยั้งผลิตภัณฑ์ไนตริกออกไซด์} = 100 - \left[\frac{A_N \times 100}{A_C} \right]$$

เมื่อ A_N คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร - ค่าการดูดกลืนแสงของชุด blank

A_C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม - ค่าการดูดกลืนแสงของชุด blank

2.8.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มาโครฟาจ โดยวิธี MTT assay¹⁸

1. ทำการเติมสารละลาย MTT (10 μ L, 5mg/mL ใน PBS) ลงในแต่ละหลุมของเซลล์จากข้อ 2.8.1 จากนั้นทำการบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง

2. นำ media ออกจากแต่ละหลุมและเติม DMSO (100 μ L/well) เพื่อละลายผลึกของฟอร์มazanที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader

3. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{OD_{test}}{OD_{Control}} \times 100$$

เมื่อ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร

$OD_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

2.8.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยวิธี MTT

1. ใส่เซลล์ 1×10^4 cell/well บ่ม 2-4 ชั่วโมง

2. ทดสอบโดยใส่สารที่ความเข้มข้น 10 μ M และ DMSO บ่มต่อ 72 ชั่วโมง

3. ทำการเติมสารละลาย MTT (10 μ L, 5mg/mL ใน PBS) ลงในแต่ละหลุมของเซลล์จากข้อ 2.8.1 จากนั้นทำการบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง

4. นำ media ออกจากแต่ละหลุมและเติม DMSO (100 μ L/well) เพื่อละลายผลึกของฟอร์มazanที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader

5. คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{OD_{test}}{OD_{Control}} \times 100$$

เมื่อ OD_{test} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสาร

$OD_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การเตรียมส่วนสกัดของรากโกฐกระดุก

ในการทดลองนี้ได้ทำการสกัดรากโกฐกระดุก 2 กิโลกรัมด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดตามลำดับความเข้มข้นของตัวทำละลาย คือ เฮกเซน อะซีโตน และเมทานอล โดยทำการแช่พืชตัวอย่างในตัวละลายแต่ละชนิดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน 2 ครั้ง ซึ่งน้ำหนักและผลผลิตของส่วนสกัดหยาบแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลผลิตของส่วนสกัดหยาบต่างๆ ของรากโกฐกระดุก

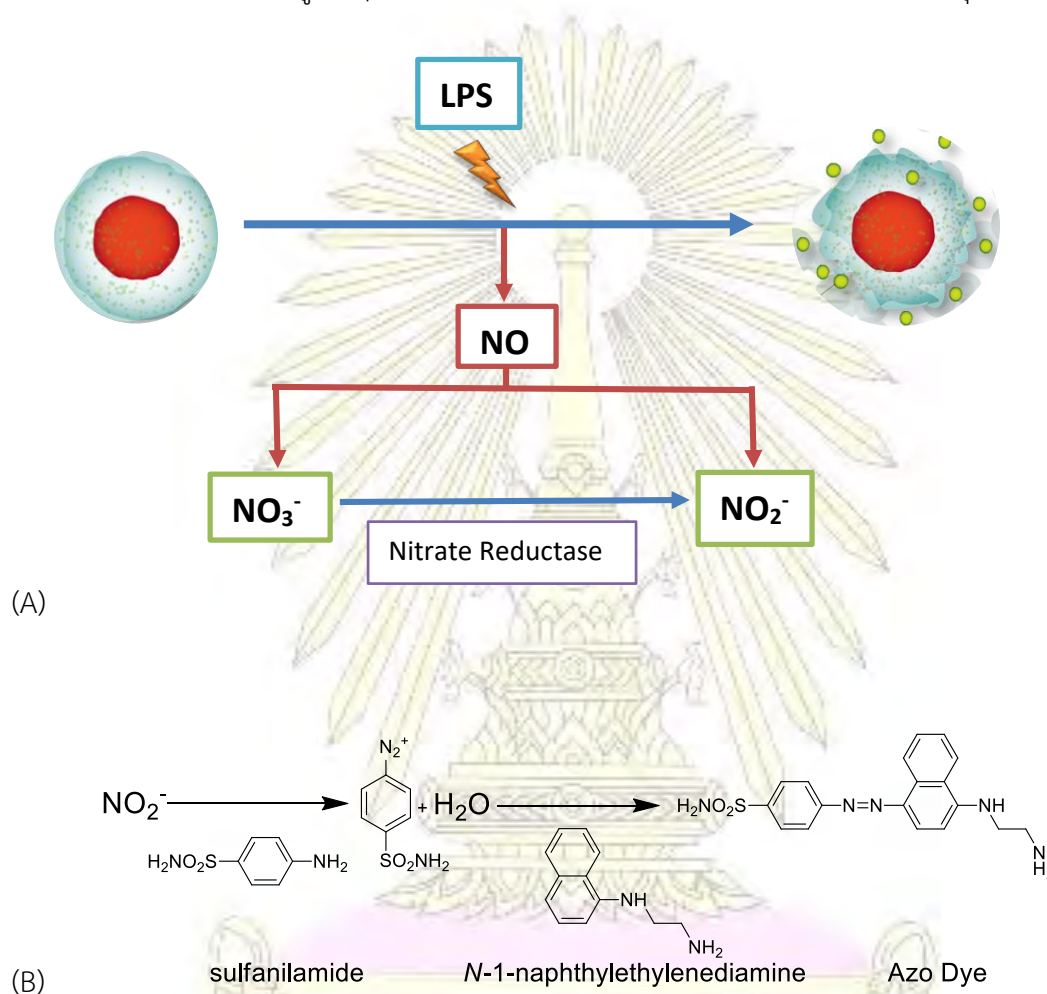
ชนิดส่วนสกัด	น้ำหนัก	% ผลผลิต*
เฮกเซน	42.26 g	2.11
อะซีโตน	40.32 g	2.02
เมทานอล	38.66 g	1.93

*เทียบกับน้ำหนักพืชตัวอย่างแห้ง 2 กิโลกรัม

3.2 การคัดเลือกส่วนสกัดหยาบด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

เนื่องจากงานวิจัยนี้สนใจสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับเซลล์และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งหนึ่งในสมมติฐานของการเกิดมะเร็งนั้นมาจากการที่เซลล์ปกติอยู่ในสภาวะที่มีการอักเสบเรื้อรัง ดังนั้นจึงทำการคัดกรองส่วนสกัดหยาบของรากโกฐกระดุกด้วยการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยการกระตุ้นให้เซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) ซึ่งเซลล์มาโครฟาจเหล่านี้จะปลดปล่อยไนตริกออกไซด์ (NO) ออกมาตามระดับความอักเสบที่เกิดขึ้น จึงทำให้สามารถบ่งชี้ระดับการอักเสบที่เกิดขึ้นหรือที่ถูกกดลงได้ด้วยการตรวจวัดปริมาณ NO ที่เกิดขึ้นด้วย Griess reagent ซึ่งประกอบด้วย 1% sulfanilamide ใน 5% กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) และ 0.1% *N*-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED) โดยมีหลักการดังนี้คือ NO ที่ปลดปล่อยออกมาเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร โดยธรรมชาติจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปไนไตรต์ (NO_2^-) ทันทีในอัตราส่วนโมล 1:1 และจะละลายอยู่ในอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเติม 1% sulfanilamide ใน 5% กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เพื่อทำปฏิกิริยากับ NO_2^- ที่เกิดขึ้นได้เป็น

เกลือ diazonium แล้วจึงเติม 0.1% NED เพื่อทำปฏิกิริยาคัปปลิงเกิดเป็นสารสีย้อม (azo dye) ซึ่งมีสีชมพูม่วง ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.1 จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารสีย้อมนี้ ก็จะสามารถบ่งชี้ระดับการอักเสบของเซลล์ที่ทดสอบได้ ดังนั้นถ้ามีระดับการอักเสบมากสารทดสอบสามารถตรวจการอักเสบได้ดี ปริมาณ NO ที่เกิดขึ้นจะน้อย ในการทดสอบควรเห็นเพียงสีชมพูจางๆ หรือใสไม่มีสี เนื่องจากไม่มีสารสีย้อมที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเกิดขึ้น

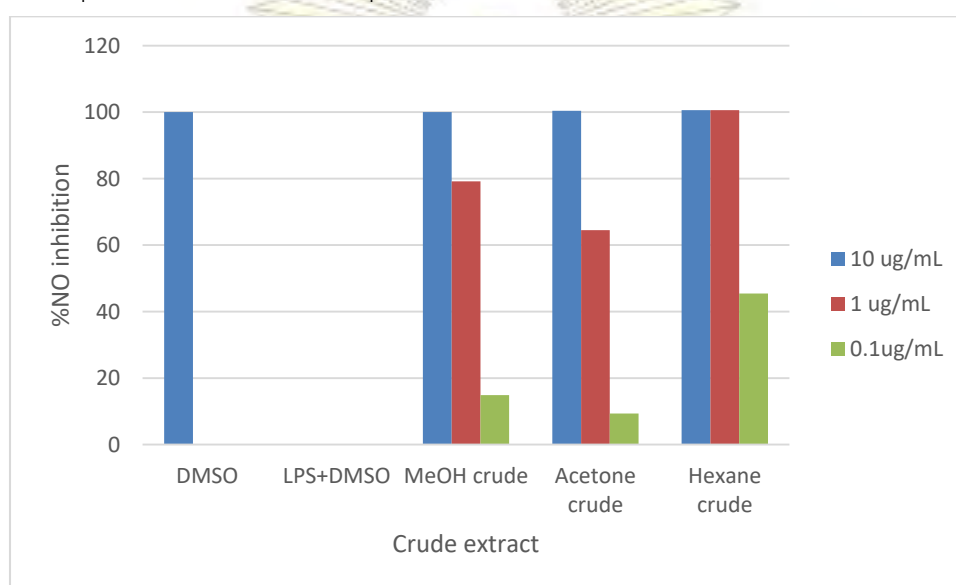


แผนภาพที่ 3.1 แสดงกระบวนการอักเสบของเซลล์มาโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS (A)และการตรวจวัดด้วย Griess reagent (B)

จากที่กล่าวมาข้างต้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองส่วนสกัดหยาบทั้งสามชนิดของรากโกฐกระดุก โดยทำการทดลองที่ 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 1 และ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนสกัดหยาบทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการผลิต NO ได้อย่างสมบูรณ์

อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการตรวจดูการรอดชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบ (cell viability) โดยการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ส่วนสกัดหยาบทั้งสามชนิดทำให้เซลล์ RAW 264.7 ที่ทดสอบตาย >90% แสดงว่า ส่วนสกัดหยาบทั้งสามชนิดนี้มีพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นนี้ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าส่วนสกัดหยาบที่ทดสอบมีฤทธิ์กีดการอักเสบได้จริงหรือไม่ที่ความเข้มข้นนี้ เนื่องจากเซลล์ที่ตายก็ไม่ผลิต NO เช่นกัน

เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นที่ต่ำลงมา จะเห็นได้ว่ามีเพียงส่วนสกัดหยาบเฮกเซนที่ยังให้การยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ที่ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และประมาณ 45% ที่ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เพราะยังพบเซลล์ที่รอดชีวิต >90% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีที่สุด ซึ่งจะนำมาแยกสารบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป



รูปที่ 3.1 ผลการยับยั้งการผลิต NO ของเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ของส่วนสกัดหยาบของรากโกฐกระดูกทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.3 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดูก

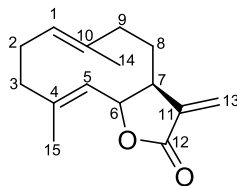
จากผลการคัดกรองด้วยฤทธิ์ต้านการอักเสบของส่วนสกัดหยาบของรากโกฐกระดูก และพบว่าส่วนสกัดหยาบเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีที่สุดในขั้นต่อมาจึงทำการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบนี้ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวซับ สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 ชนิดคือสาร SL-1 และ SL-2 ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของส่วนสกัดเฮกเซน โดยเฉพาะสารประกอบ SL-1 ซึ่งสามารถแยกได้ในปริมาณ 2.43 กรัม คิดเป็น 5.75% ของน้ำหนักของส่วนสกัดหยาบ ขณะที่สารประกอบ SL-2 แยกได้มากเป็นลำดับที่ 2 คือ 60.7 มิลลิกรัม คิดเป็น 0.14% ของ

น้ำหนักของส่วนสกัดหยาบ สำหรับสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นๆ นั้นพบว่ามีปริมาณน้อยมาก และแม้จะนำมาทำการแยกด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำหลายครั้ง ก็พบว่ายังไม่มีควมบริสุทธิ์มากพอที่จะนำมาศึกษาต่อได้

3.3.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบ SL-1

การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ทำได้โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูล NMR สเปกโทสโกปีเป็นหลัก

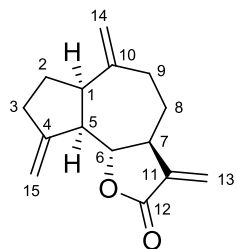
จากข้อมูล ^1H NMR ของสารประกอบ **SL-1** (ตารางที่ 3.2) พบสัญญาณโปรตอนแบบ singlet ของหมู่ tertiary methyl สองหมู่ที่ δ_{H} 1.41 และ 1.66, สัญญาณโปรตอนของ trisubstituted double bond สองตำแหน่งที่ δ_{H} 4.71 (1H, q, $J = 10.3$ Hz) และ 4.82 (1H, dd, $J = 3.4, 10.6$ Hz) สัญญาณโปรตอนแบบ doublet ของหมู่ exomethylene ที่ δ_{H} 5.50 และ 6.23 เนื่องจากการคัปปลิงซึ่งกันและกันและมีค่า $J = 3.4$ Hz และพบสัญญาณโปรตอนที่ต่ออยู่บนคาร์บอนที่มีออกซิเจนอะตอมต่ออยู่ (O) ที่ δ_{H} 4.58 (1H, t, $J = 10.9$ Hz) และจากข้อมูล ^{13}C NMR (ตารางที่ 3.2) พบสัญญาณคาร์บอนของพันธะคู่ 6 คาร์บอนที่ δ_{C} 119.7, 127.1, 127.4, 137.0, 140.2 และ 141.5, สัญญาณของหมู่เอสเทอร์คาร์บอนิลที่ δ_{C} 170.5 และสัญญาณของคาร์บอนที่มีออกซิเจนอะตอมต่ออยู่ที่ δ_{C} 82.0 จากข้อมูล ^1H และ ^{13}C NMR ข้างต้นและจากการสืบค้นข้อมูลที่มีการรายงานองค์ประกอบทางเคมีของโกลูกระดุก พบว่าสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือสาร costunolide ซึ่งเป็นสารประเภทเซสควิเทอเพินที่มีหมู่ α -methylene- γ -lactone และ trisubstituted double bond 2 หมู่ เป็นหมู่ฟังก์ชันหลัก ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูล 1D NMR ของสาร **SL-1** จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร **SL-1** คือ costunolide ซึ่งได้ทำการยืนยันโดยการเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสาร **SL-1** กับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนของ costunolide ดังแสดงในตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสารประกอบ SL-1

ตารางที่ 3.2 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ SL-1 และ Costunolide

ตำแหน่ง	costunolide ¹⁴		SL-1	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)
1	127.0	4.85 (dd, 10.5, 4.2 Hz)	127.1	4.82 (dd, 16.0, 3.4 Hz)
2	28.0		26.3	2.27 (m) 2.25 (m)
3	40.9		39.5	2.28 (m) 2.21 (m)
4	140.0		141.5	
5	127.2	4.74 (d, 9.6 Hz)	127.4	
6	81.9	4.58 (t, 11.0 Hz)	82.0	4.58 (t, 10.9 Hz)
7	50.3		50.0	2.55 (m)
8	26.2		28.1	2.23 (m) 1.65 (m)
9	39.4		41.1	2.43 (m) 2.24 (m)
10	137.0		137.0	
11	141.5		140.2	
12	170.5		170.7	
13	119.7	6.27 (d, 3.6Hz) 5.53 (d, 3.6Hz)	119.7	6.23 (d, 3.4Hz) 5.50 (d, 2.8Hz)
14	16.1	1.42 (s)	16.2	1.41 (s)
15	17.4	1.70 (s)	17.4	1.66 (s)



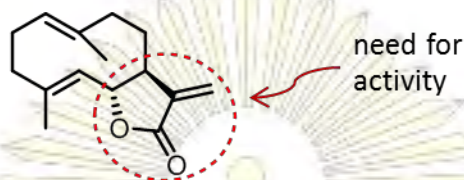
รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสารประกอบ SL-2

ตารางที่ 3.3 ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสารประกอบ SL-2 และ dehydrocostus lactone

ตำแหน่ง	dehydrocostus lactone ¹⁴		SL-2	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J)
1	47.9	2.94 (m)	47.7	2.89 (m)
2	30.5	1.95 (m)	31.0	2.23 (m)
		1.89 (m)		1.40 (m)
3	32.8		32.7	2.49 (m)
4	151.4	2.53 (m)	151.3	2.47(m)
5	52.3	2.88 (m)	52.1	2.87 (m)
6	85.5	3.98 (t, 9.3Hz)	85.3	3.93 (t, 8.9Hz)
7	45.4	2.89 (m)	45.2	2.84 (m)
8	31.2	2.25 (m)	30.0	1.91 (m)
		2.17 (m)		1.85 (m)
9	36.5	2.50 (m)	36.4	2.48 (m)
				2.14 (m)
10	149.5		149.3	
11	140.0		139.8	
12	170.5		170.3	
13	120.4	6.23 (d, 3.4Hz)	120.3	6.18 (d, 3.4Hz)
		5.50 (d, 2.9Hz)		5.47 (d, 2.7Hz)
14	112.9	4.91 (s)	112.7	4.87 (s)
		4.83 (s)		4.79 (s)
15	109.9	5.28 (d, 3.4Hz)	109.7	5.24 (s)
		5.08 (d, 3.4Hz)		5.04 (s)

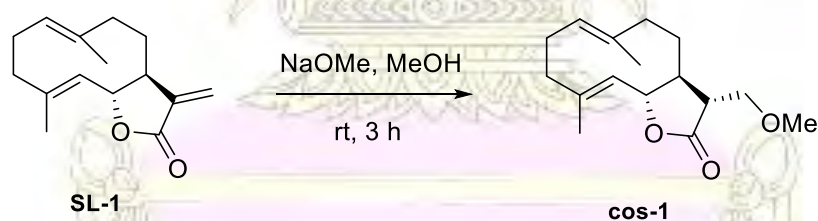
3.4 การเตรียมอนุพันธ์กึ่งสังเคราะห์ของ costunolide (SL-1)

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสาร costunolide มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในระดับเซลล์ที่ดีในระดับที่ยอมรับได้ โดยพบว่าหมู่ α -methylene- γ -lactone เป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 หมู่ α -methylene- γ -lactone ของ costunolide ซึ่งมีผลต่อการออกฤทธิ์

ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ว่าหมู่ α -methylene- γ -lactone เป็นหมู่ฟังก์ชันหลักที่มีผลต่อการออกฤทธิ์การอักเสบของสารนี้ ในงานวิจัยนี้จึงทำการสังเคราะห์สารอนุพันธ์ **cos-1** ซึ่งเป็นอนุพันธ์แลคโตนที่ไม่มีหมู่ exomethylene จากปฏิกิริยา methoxylation ด้วย NaOMe ในเมทานอล (Michael addition)¹⁴ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ซึ่งโครงสร้างของสาร **cos-1** ได้ทำการยืนยันด้วย ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในภาคผนวก (รูปที่ A.5 และ A.6)

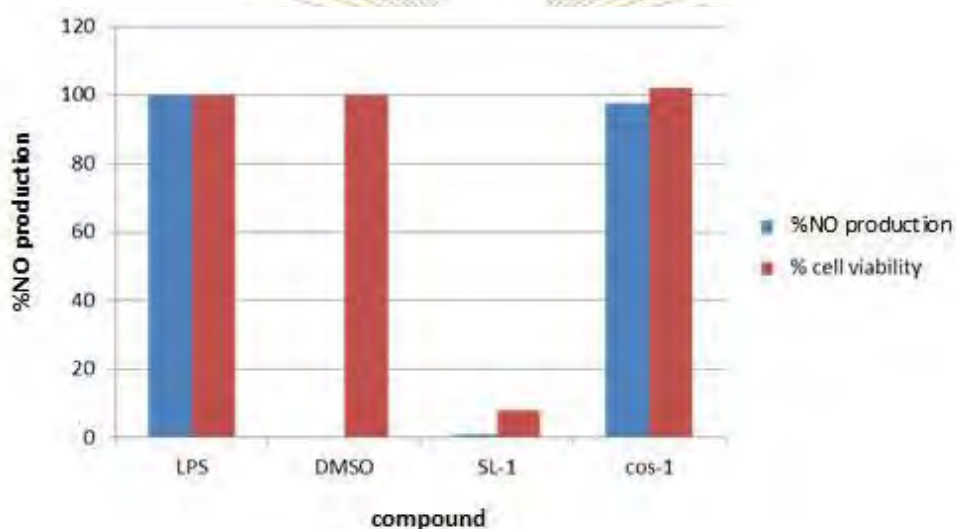


รูปที่ 3.5 ปฏิกิริยา methoxylation ด้วย NaOMe ของ costunolide

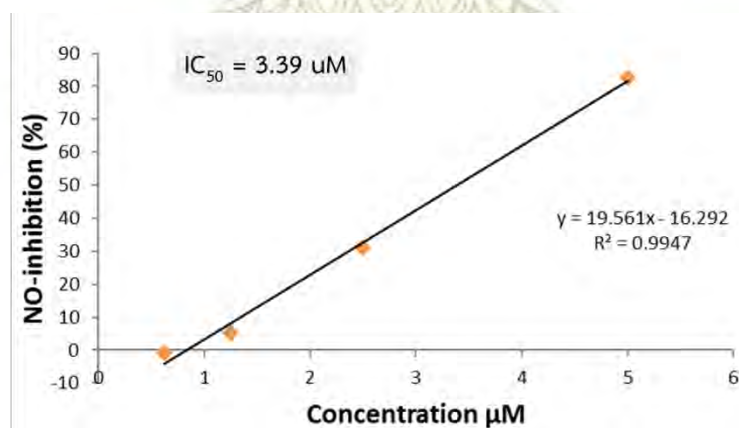
3.4.1 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของ costunolide และอนุพันธ์ **cos-1**

เมื่อนำสาร costunolide และอนุพันธ์ **cos-1** มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการผลิต NO ของเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย LPS ที่ $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ โดยทำการทดลอง

ที่ความเข้มข้น 10 μM พบว่าสาร **cos-1** ไม่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นนี้ ขณะที่ costunolide แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตายมากกว่า 80% ดังแสดงในรูปที่ 3.6 ต่อมาจึงลดความเข้มข้นของ costunolide ลงและทำการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 2.5, 1.25 และ 0.625 μM) พบว่า costunolide สามารถยับยั้งการผลิต NO ตามลำดับความเข้มข้นโดยไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ (%cell viability > 90%) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.39 μM (ดังรูปที่ 3.7) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า หมู่ α -methylene- γ -lactone ของ costunolide เป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์การอักเสบของสารกลุ่มนี้ ซึ่งเมื่อไม่มีหมู่นี้สารจะไม่มีความสามารถในการกดการอักเสบเลย



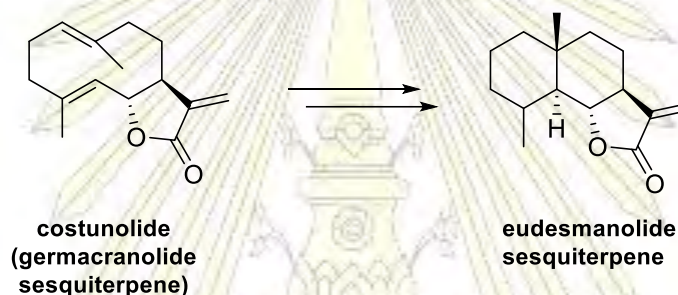
รูปที่ 3.6 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิต NO ของ SL-1 และอนุพันธ์ cos-1 ที่ 10 μM



รูปที่ 3.7 ฤทธิ์การยับยั้งการผลิต NO ของ SL-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.4.2 การสังเคราะห์อนุพันธ์ eudesmanolide จาก costunolide (SL-1)

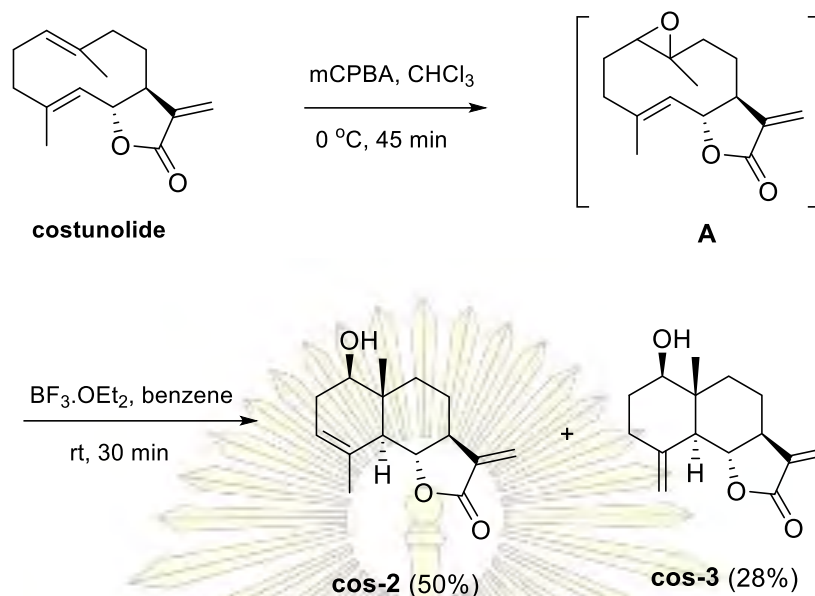
จากข้อมูลข้างต้นพบว่าหมู่ α -methylene- γ -lactone ของ costunolide เป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์การอักเสบ และเนื่องจากสามารถแยกสารนี้ได้ในปริมาณมาก ในงานวิจัยนี้จึงต้องการดัดแปลงโครงสร้างของ costunolide โดยยังคงให้โครงสร้างมีหมู่ α -methylene- γ -lactone อยู่ แล้วนำไปศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างต่อฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อไป จากการสืบค้นข้อมูล พบว่าการปิดวงของ costunolide ซึ่งเป็นเซสควิเทอพีนกลุ่ม germacranolide ระหว่างพันธะคู่สองพันธะในโครงสร้างเกิดเป็น 6-membered ring สามารถเกิดขึ้นได้ง่ายโดยผ่านการ epoxidation ของพันธะคู่หนึ่งพันธะในโครงสร้าง และจะทำให้สารประเภทเซสควิเทอพีนกลุ่มที่เรียกว่า eudesmanolide (ดังรูปที่ 3.8)¹⁴ ซึ่งฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารกลุ่มนี้ยังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก



รูปที่ 3.8 การเปลี่ยนจากสารเซสควิเทอพีนกลุ่ม germacranolide เป็นกลุ่ม eudesmanolide

3.4.2.1 การสังเคราะห์อนุพันธ์ cos-2 และ cos-3 จาก costunolide

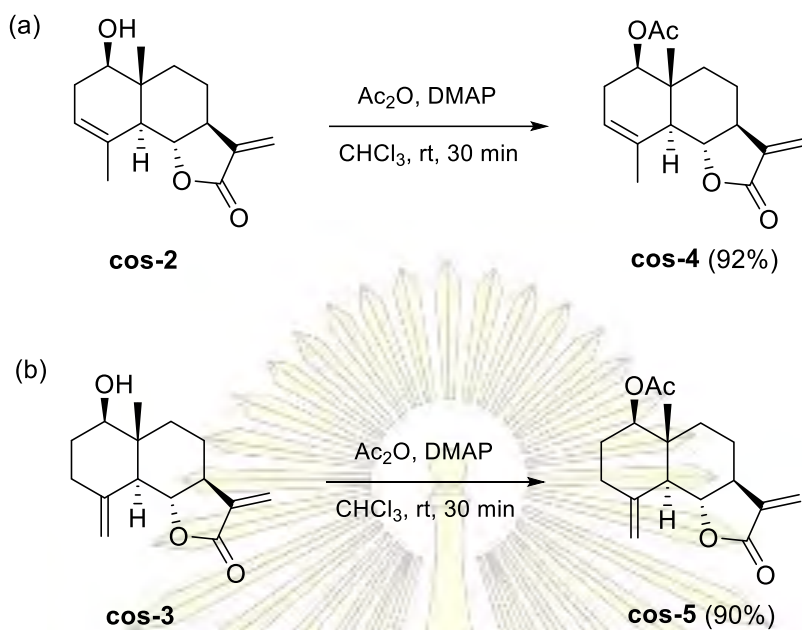
ดังที่กล่าวมาในข้างต้น costunolide สามารถเปิดวงได้เป็นสารกลุ่ม eudesmanolide ได้ โดยผ่านการ epoxidation ของพันธะคู่หนึ่งพันธะ ดังนั้นจึงนำ costunolide มาทำปฏิกิริยากับ mCPBA ในคลอโรฟอร์มได้สารอินเทอร์มีเดียต A แล้วนำสาร A นี้มาปิดวงโดยการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยากับ $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ พบว่าได้สารผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดคือ **cos-2** และ **cos-3** ในอัตราส่วนประมาณ 2:1 (รูปที่ 3.9)¹⁵ ซึ่งได้ทำการยืนยันโครงสร้างด้วย ^1H และ ^{13}C NMR ดังแสดงในภาคผนวก (รูปที่ A.1 และ A.2) ซึ่งเมื่อทำการสืบค้นข้อมูล พบว่าสาร **cos-2** คือ santamarine และสาร **cos-3** คือ reynosin



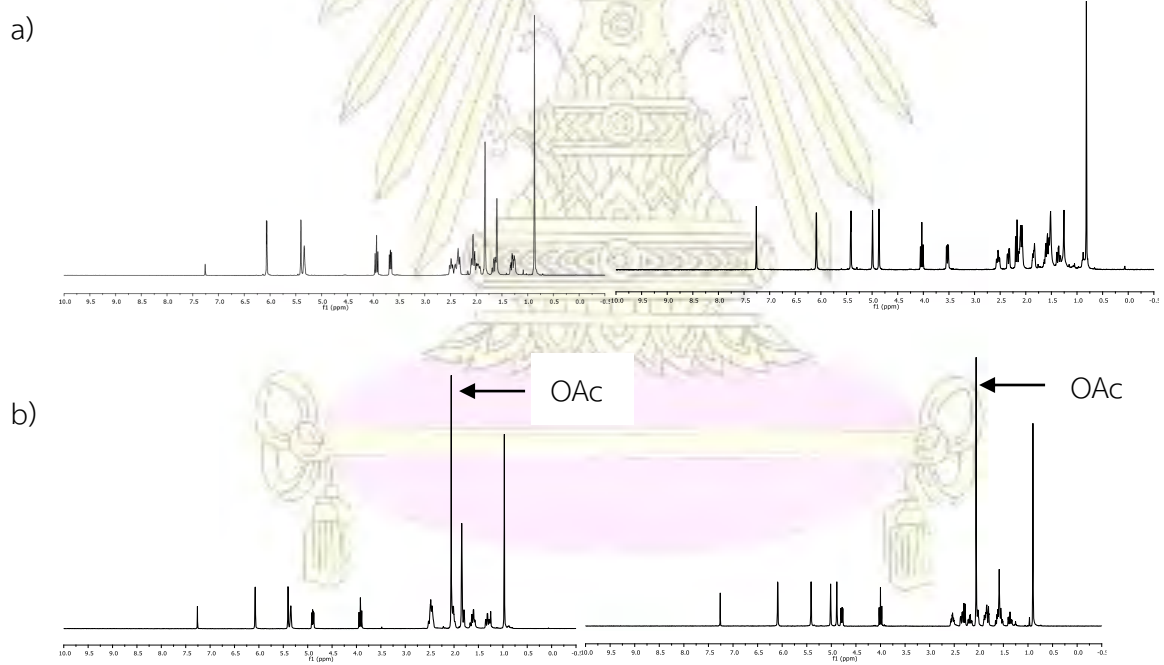
รูปที่ 3.9 การสังเคราะห์อนุพันธ์ **cos-2** และ **cos-3** จากสาร **SL-1** (costunolide)

3.4.2.2 ปฏิกิริยา acetylation ของสาร **cos-2** และ **cos-3**

ในการทดลองขั้นต่อมา เนื่องจากโครงสร้างของสาร **cos-2** และ **cos-3** มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 1 จึงนำมาสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์โดยนำสารทั้งสองมาทำปฏิกิริยา acetylation ด้วย acetic anhydride (Ac_2O) โดยมี DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้อนุพันธ์ acetoxy คือ **cos-4** และ **cos-5** ในผลผลิตที่สูง 92% และ 90% ตามลำดับ ดังรูปที่ 3.10 ซึ่งทำการยืนยันโครงสร้างของสารทั้งสองด้วย ^1H และ ^{13}C NMR จาก ^1H NMR สเปกตรัมของอนุพันธ์ acetoxy ทั้งสอง พบการปรากฏของสัญญาณของหมู่ acetyl ที่ δ_{H} 2.06 สำหรับ **cos-4** และที่ δ_{H} 2.07 สำหรับ **cos-5** ดังแสดงในรูปที่ 3.11 เปรียบเทียบกับ ^1H NMR สเปกตรัมของสารตั้งต้น **cos-2** และ **cos-3**



รูปที่ 3.10 ปฏิกิริยา acetylation ของสาร **cos-2** (a) และ **cos-3** (b)

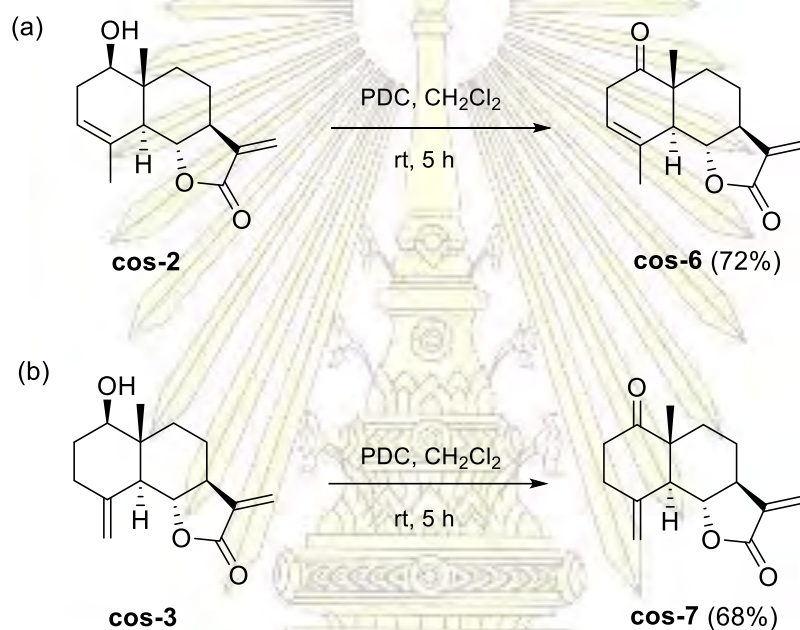


รูปที่ 3.11 (a) ^1H NMR สเปกตรัมของสาร **cos-2** และ **cos-3**

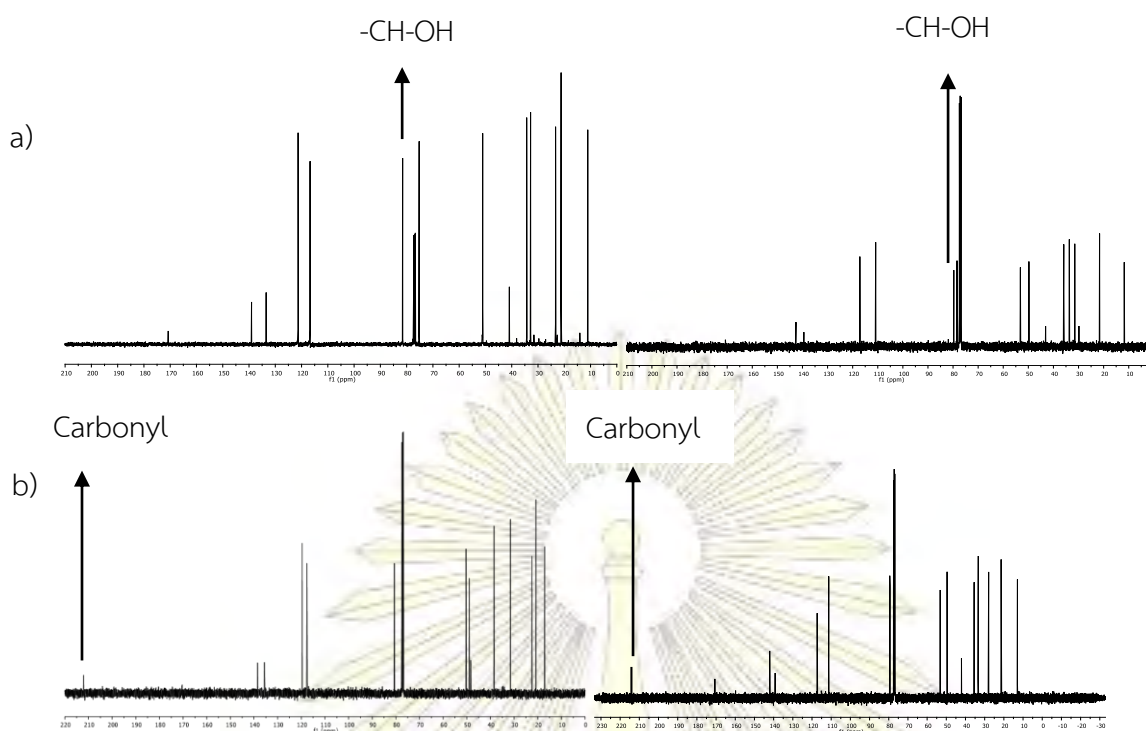
(b) ^1H NMR สเปกตรัมของสาร **cos-4** และ **cos-5**

3.4.2.3 ปฏิกิริยา oxidation ของสาร *cos-2* และ *cos-3*

นอกจากนี้ยังนำสาร *cos-2* และ *cos-3* มาทำปฏิกิริยา oxidation โดยใช้ PDC เป็นรีเอเจนต์ เพื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 1 ให้เป็นหมู่คีโตน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร *cos-6* และ *cos-7* ในปริมาณผลผลิต 72% และ 68% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.12 ซึ่งทำการยืนยันโครงสร้างของสารทั้งสองด้วย ^1H และ ^{13}C NMR โดยจะเห็นได้ชัดจาก ^{13}C NMR สเปกตรัม เนื่องจากพบสัญญาณคาร์บอนที่เป็นคีโตนที่ δ_c 212.0 สำหรับสาร *cos-6* และที่ δ_c 211.9 สำหรับสาร *cos-7* และไม่พบสัญญาณของ $-\text{CH}-\text{OH}$ ที่ตำแหน่ง C-1 ของสารตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.13



รูปที่ 3.12 ปฏิกิริยา oxidation ด้วย PDC ของสาร *cos-2* (a) และ *cos-3* (b)

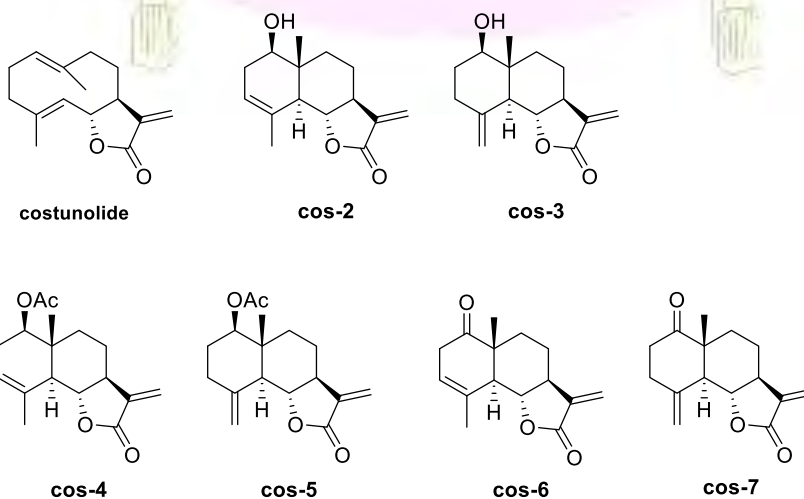


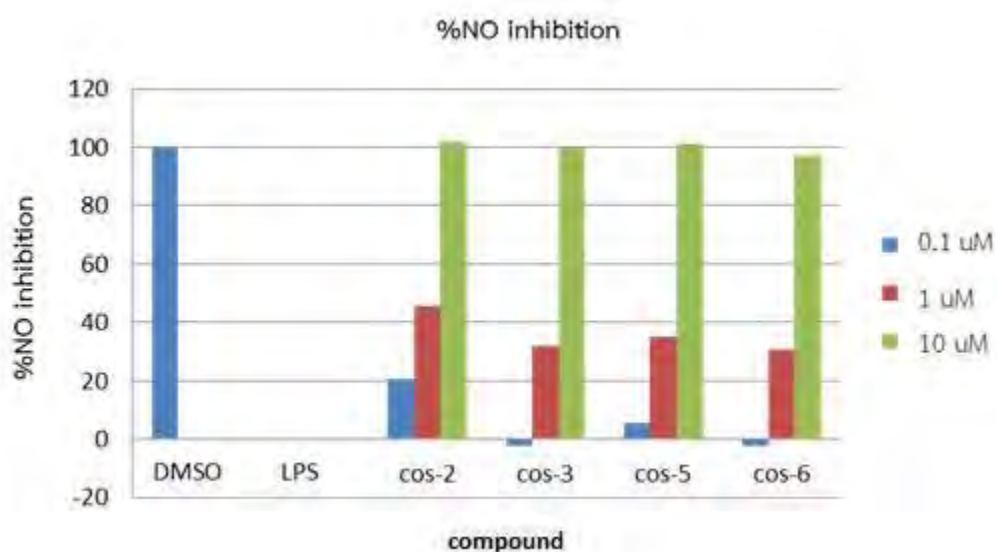
รูปที่ 3.13 (a) ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร *cos-2* และ *cos-6*

(b) ^{13}C NMR สเปกตรัมของสาร *cos-3* และ *cos-7*

3.5ฤทธิ์ต้านการอักเสบของอนุพันธ์ eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของสาร eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้ และเปรียบเทียบกับสาร costunolide จึงนำสารที่สังเคราะห์ได้มาทรีทกับเซลล์มาโครฟาจ RAW 264.7 ที่ 3 ความเข้มข้น คือ 0.1, 1 และ 10 μM พร้อมตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วย MTT ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.14 ซึ่งพบว่าสารทุกตัวที่สังเคราะห์สามารถยับยั้งการผลิต NO ในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้ และยับยั้งได้ดีกว่า costunolide เนื่องจากสารกลุ่มนี้ทุกตัวให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า costunolide ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และที่สำคัญคือสารอนุพันธ์ eudesmanolide ไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบแม้ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ





รูปที่ 3.14 กราฟแสดงการยับยั้งของอนุพันธ์ eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 3.4 แสดงค่า IC_{50} ของอนุพันธ์ eudesmanolide และ costunolide

สารประกอบ	IC_{50} (μM)
cos-2	1.81
cos-3	2.14
cos-4	-*
cos-5	2.01
cos-6	2.17
cos-7	-*
costunolide	3.39

* ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากปริมาณเซลล์ไม่พอ

จากผลการทดลองทำให้สรุปได้ว่าสารเซสควิเทอร์พีนกลุ่ม eudesmanolide ซึ่งมีการบิดวงเป็นแบบ tricyclic มีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ดีกว่า costunolide ซึ่งเป็นสารเซสควิเทอร์พีนกลุ่ม germacranolide และที่สำคัญไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทดสอบ

3.6 ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์

นอกจากนี้ยังได้นำสาร costunolide และอนุพันธ์ eudesmanolide ที่สังเคราะห์ได้มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7, เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa และเซลล์มะเร็งลำไส้ HCT116 พร้อมกับเซลล์ลำไส้ปกติ 1 ชนิดคือเซลล์ CCD841 ซึ่งทำการทดสอบเบื้องต้นที่ 20 μM โดยวิธี MTT พบว่า สาร costunolide มีความเป็นพิษอย่างจำเพาะต่อเซลล์มะเร็งเต้านมซึ่งให้ค่าการยับยั้งเกือบ 100% โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกน้อยและปานกลางสำหรับเซลล์มะเร็งตับ HCT116 ขณะที่สารกลุ่ม eudesmanolide มีความเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 และ HCT116 ที่อ่อนมาก และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa เลยที่ 20 μM ดังผลที่แสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 %ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติของ costunolide และอนุพันธ์ eudesmanolide ที่ความเข้มข้น 20 μM

สารประกอบ	Human cancer cell			Normal cell
	MCF-7	HeLa	HCT116	CCD841
costunolide	95.6	16.1	49.7	25.4
cos-2	10.4	0	7.6	0
cos-3	9.6	0	8.0	2
cos-4	19.8	0	6.1	0
cos-5	2.7	0	0	0
cos-6	11.4	0	2.0	0
cos-7	12.4	0	0	0

บทที่ 4

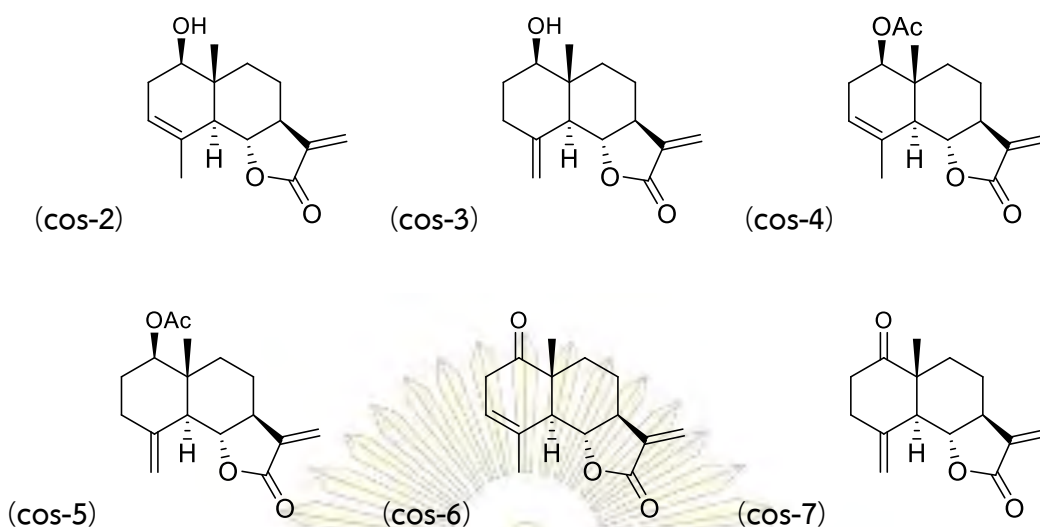
สรุปผลการทดลอง

จากการนำสารสกัดหยาบเฮกเซนของรากโกฐกระดูก มาแยกให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้สารละลายเฮกเซนซึ่งได้จากการคัดกรองและพบว่าสารสกัดหยาบรากโกฐกระดูกที่ได้จากสารละลายเฮกเซนสามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากสารละลายอะซิโตนและสารละลายเมทานอล สามารถแยกสารที่มีรายงานการค้นพบมาแล้ว 9 ชนิด โดยแบ่งเป็นสารที่ได้จากการแยก 2 ชนิด คือ Costunolide (SL-1) และ Dehydrocostus lactone (SL-2)



รูปที่ 4.1 สารที่ได้จากการแยกจากรากโกฐกระดูก

และสารที่ได้จากการดัดแปรโครงสร้างอีก 7 ชนิดจากสารประกอบ SL-1 คือ **cos-1**, Santamarine (**cos-2**), Reynosin (**cos-3**), Acetoxysantamarin (**cos-4**), Acetoxyreynosin (**cos-5**), **cos-6** และ **cos-7** โดยโครงสร้างทั้งหมดของสารที่ได้สามารถพิสูจน์ทราบด้วยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ร่วมกับการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้



รูปที่ 4.2 สารที่ได้จากการดัดแปรโครงสร้าง

จากผลการทดลองพบว่าการมีหมู่ α -methylene- γ -lactone ของ costunolide เป็นหมู่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์การอักเสบ และเนื่องจากสามารถแยกสารนี้ได้ปริมาณมาก ในงานวิจัยนี้จึงต้องการดัดแปลงโครงสร้างของ costunolide โดยยังคงให้โครงสร้างมีหมู่ α -methylene- γ -lactone อยู่เมื่อนำ costunolide มาทำปฏิกิริยา epoxidation และเร่งการปัดวงด้วยกรด จะได้ **cos-2**, **cos-3** ในผลผลิต 50% และ 28% เมื่อนำสารทั้งสองมาทำปฏิกิริยา acetylation ด้วย acetic anhydride (Ac_2O) โดยมี DMAP เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้อนุพันธ์ acetoxy คือ **cos-4** และ **cos-5** ในผลผลิตที่สูง 92% และ 90% ตามลำดับ และนำสาร **cos-2** และ **cos-3** มาทำปฏิกิริยา oxidation โดยใช้ PDC เป็นรีเอเจนต์ เพื่อเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 1 ให้เป็นหมู่คีโตน และได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร **cos-6** และ **cos-7** ในปริมาณผลผลิต 72% และ 68% ตามลำดับ ซึ่งสารประกอบทั้ง 6 ชนิด มีการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดีขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนจากสารเซสควิเทอร์พีนกลุ่ม germacranolide เป็นกลุ่ม eudesmanolide สามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีขึ้น ทำให้สรุปได้ว่าสารเซสควิเทอร์พีนกลุ่ม eudesmanolide ซึ่งมีการปัดวงเป็นแบบ tricyclic มีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดีกว่า costunolide ซึ่งเป็นสารเซสควิเทอร์พีนกลุ่ม germacranolide นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- (1) Cho, J.; Baik, K.; Jung, J.; Park, M. *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *398*, 399-407.
- (2) Chhabra, B.; Gupta, S.; Jain, M.; Kalsi, P. Sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 801-804.
- (3) Dhillon, R.; Kalsi, P.; Singh, W.; Gautam, V.; Chhabra, B. Guaianolide from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry.* **1987**, *26*, 1209-1210.
- (4) Chang, K.; Choi, S.; Kim, G. Anti-oxidant Activity of *Saussurea lappa* C.B. Clarke Roots. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2012**, *17*, 306-309.
- (5) Maurer, B.; Grieder, A. Sesquiterpenoids from Costus Root Oil (*Saussurea lappa* CLARKE). *Helv. Chim. Acta.* **1977**, *60*, 2177-2190.
- (6) โกรฐกระตูก. <http://www.panvasa.com/knowyourherbs/cinnamomum-verum> (accessed April 1, 2017).
- (7) โกรฐกระตูก สรรพคุณและประโยชน์ของรากโกรฐกระตูก 15 ข้อ. <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action> (accessed April 1, 2017).
- (8) โกรฐกระตูก. <http://www.panvasa.com/knowyourherbs/cinnamomum-verum> (accessed April 3, 2017).
- (9) Cho, J.; Baik, K.; Jung, J.; Park, M. *In vitro* anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone from *Saussurea lappa*. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *398*, 399-407.
- (10) Chandur, U.; Shashidhar, S.; Chandrasek, S.; Bhanumathy, M.; Midhun, T. Phytochemical Evaluation and Anti-Arthritic Activity of Root of *Saussurea lappa*. *Pharmacologia.* **2011**, *2*, 265-267.
- (11) Chhabra, B.; Gupta, S.; Jain, M.; Kalsi, P. Sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa*. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 801-804.

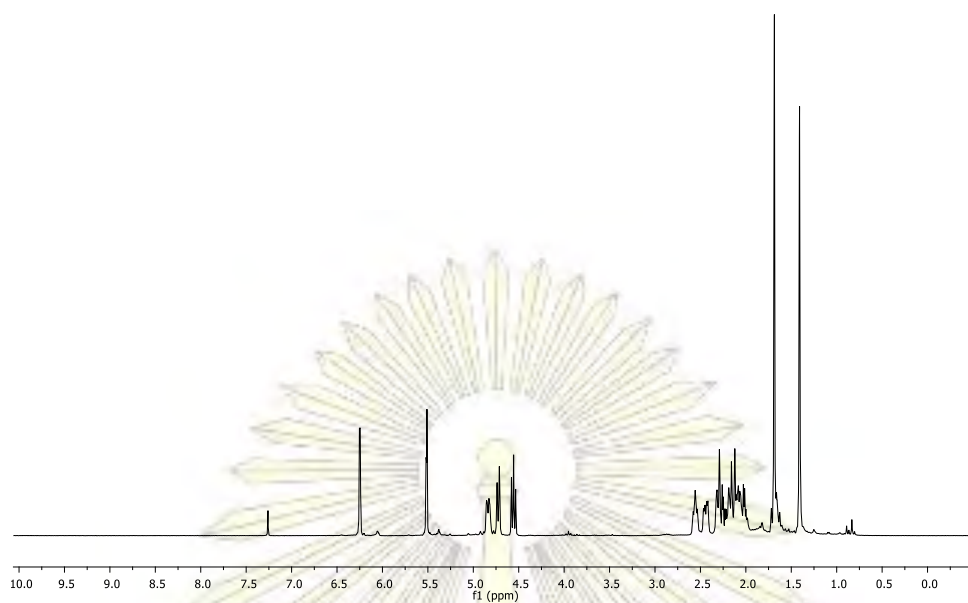
- (12) Shoji, N.; Umeyama, A.; Saito, N.; Takemoto, T.; Kajiwara, A.; Ohizumi, Y. Vasoactive Substances from *Saussurea lappa*. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1112-1113.
- (13) S. Rodrigues, A.; Garcia, M.; Rabi, J. Facile biomimetic synthesis of costunolide-1,10-epoxide, santamarin and reynosin. *Phytochemistry.* **1978**, *17*, 953-954.
- (14) El-Feraly, F.; Chan, Y. Isolation and characterization of the sesquiterpene lactones costunolide, parthenolide, costunolide diepoxide, santamarine, and reynosin from *Magnolia grandiflora* L. *Prev. Nutr. Food Sci.* **1978**, *67*, 347-350.
- (15) Park, H.; Lee, J.; Choi, S.; Baek, N.; Kim, S.; Yang, J. Cytotoxic germacranolide sesquiterpenes from the bark of *Magnolia kobus*. *Arch. Pharmacol Res.* **2010**, *33*, 71-74.
- (16) Kalsi, P.; Khurana, S.; Talwar, K. Chemistry of costunolide and biological activity of the derived lactones. *Phytochemistry.* **1985**, *24*, 103-109.
- (17) Zhao, F.; Xu, H.; He, E.; Jiang, Y.; Liu, K. Inhibitory effects of sesquiterpenes from *Saussurea lappa* on the overproduction of nitric oxide and TNF- α release in LPS-activated macrophages. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 1045-1053.
- (18) Yoshioka, H.; Renold, W.; Fischer, N.; Higo, A.; Mabry, T. Sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* (Compositae). *Phytochemistry.* **1970**, *9*, 823-832.
- (19) Coronado-Aceves, E.; Velázquez, C.; Robles-Zepeda, R.; Jiménez-Estrada, M.; Hernández-Martínez, J.; Gálvez-Ruiz, J. Reynosin and santamarine: two sesquiterpene lactones from *Ambrosia confertiflora* with bactericidal activity against clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 2623-2628.
- (20) Medjroubi, K.; Benayache, F.; Bermejo, J. Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. *Fitoterapia.* **2005**, *76*, 744-746.

- (21) เซลล์มะเร็งปากมดลูก Helah<http://keywordsuggest.org/gallery/361034.html>
(accessed April 22, 2017).

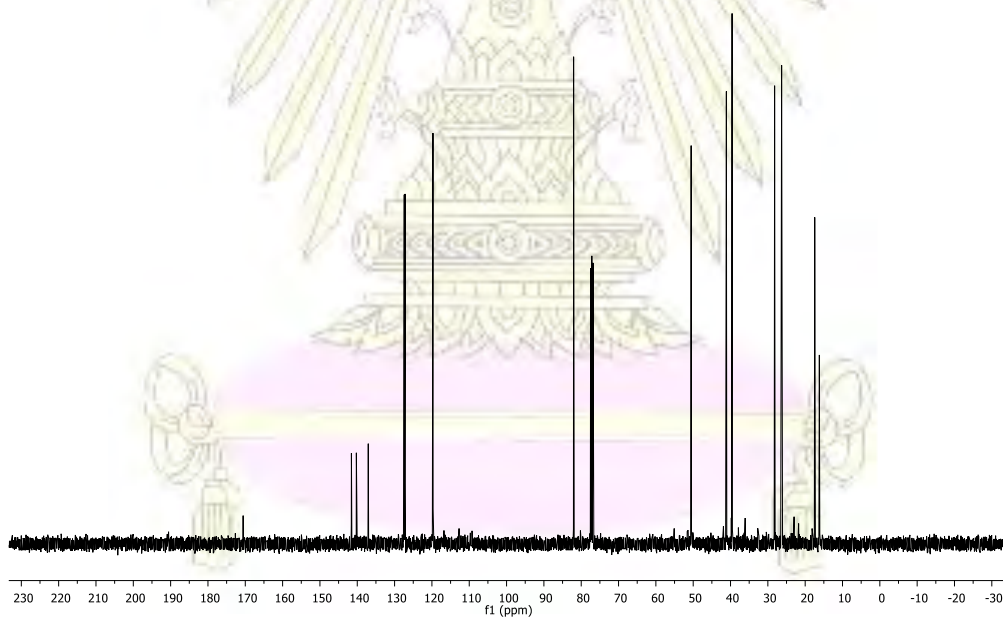




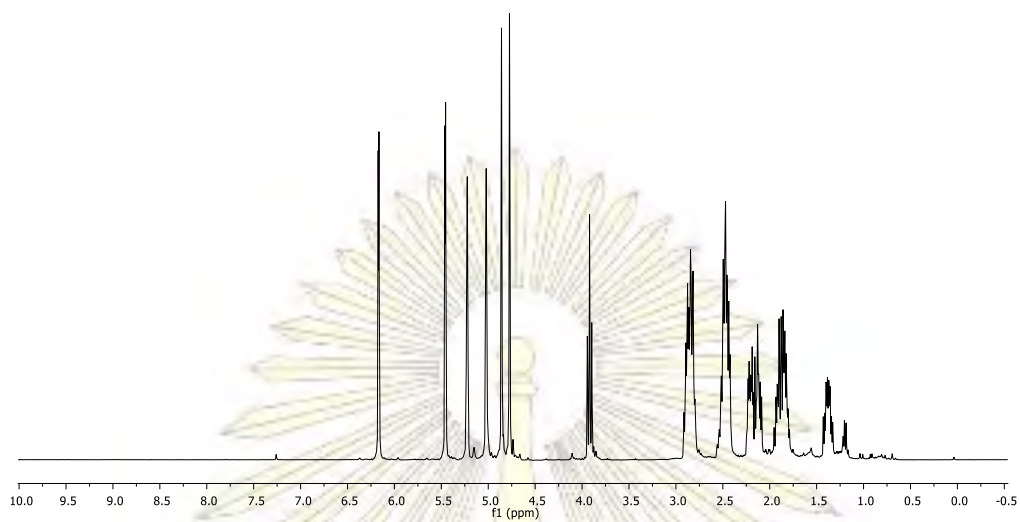
ภาคผนวก



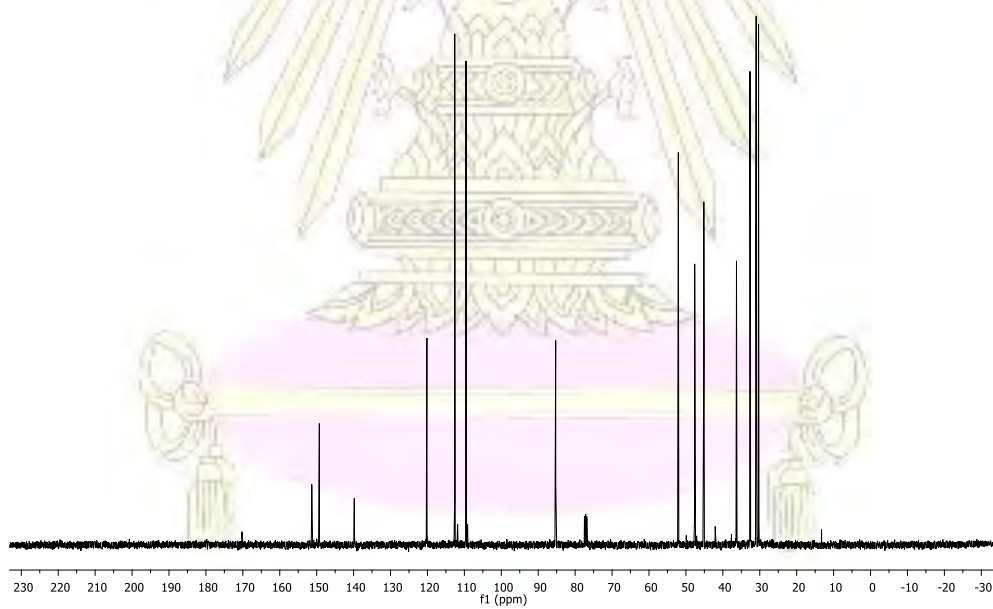
รูปที่ A.1 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ SL-1 ใน CDCl_3



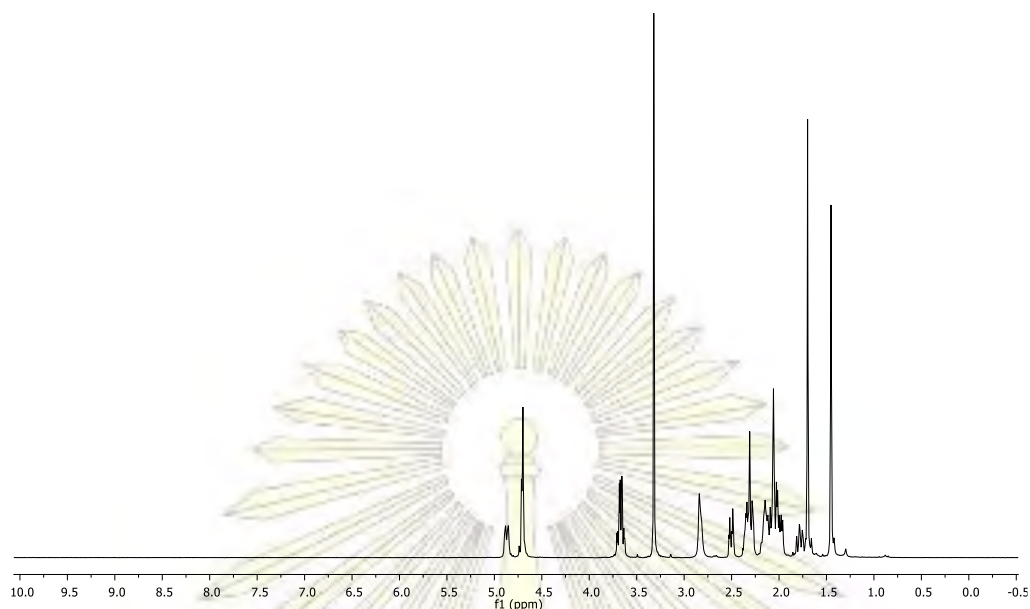
รูปที่ A.2 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ SL-1 ใน CDCl_3



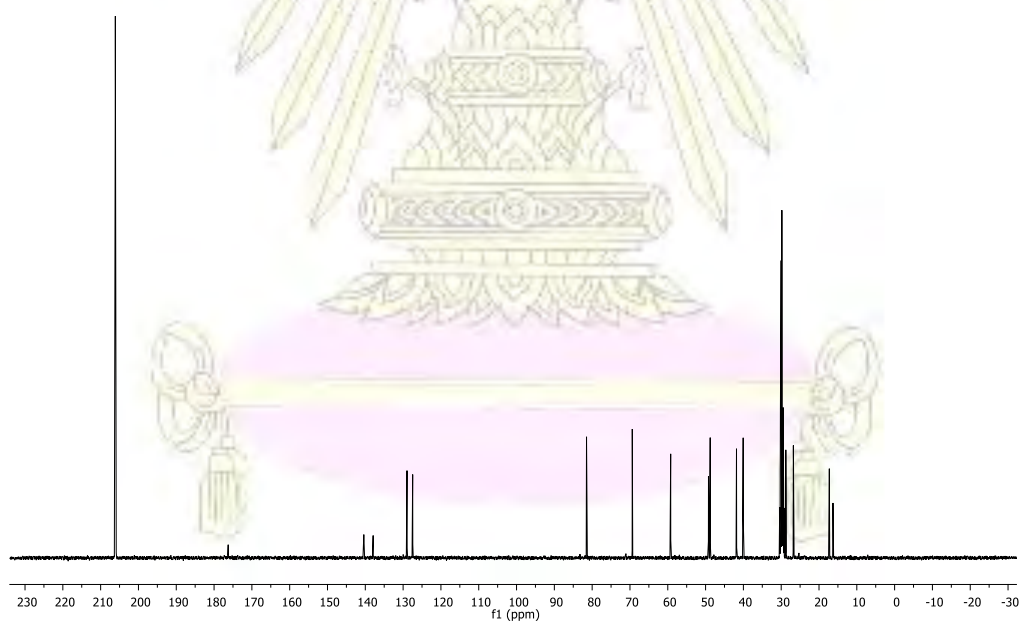
รูปที่ A.3 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ SL-2 ใน CDCl_3



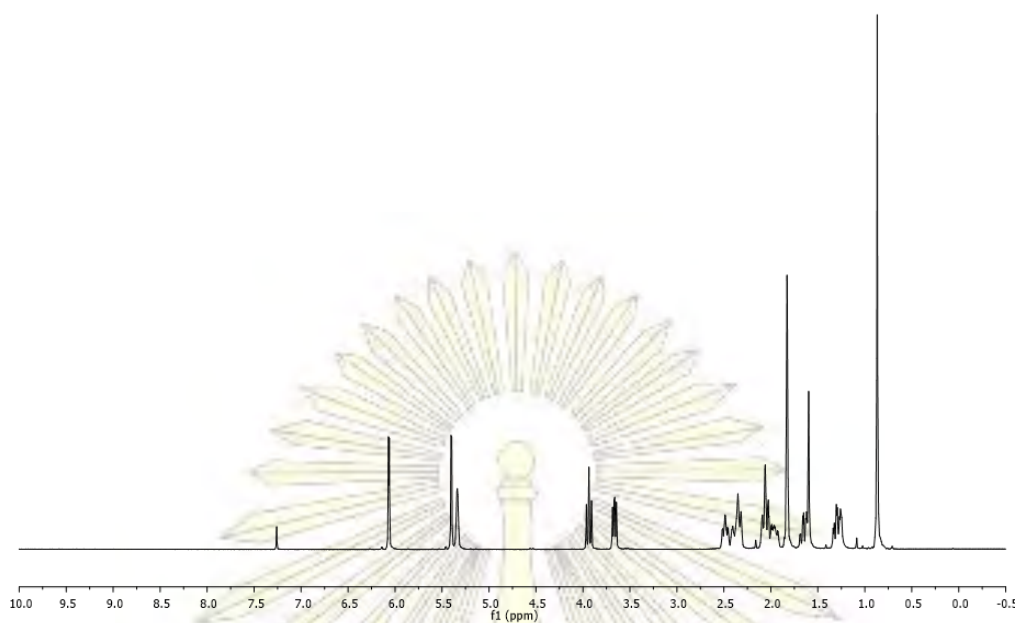
รูปที่ A.4 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ SL-2 ใน CDCl_3



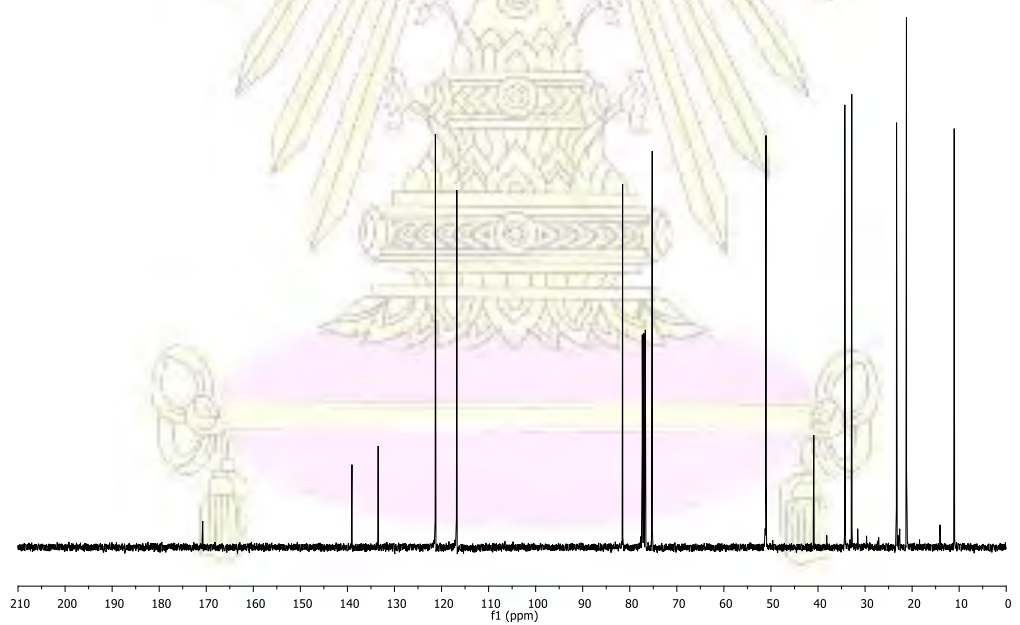
รูปที่ A.5 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-1* ใน CDCl_3



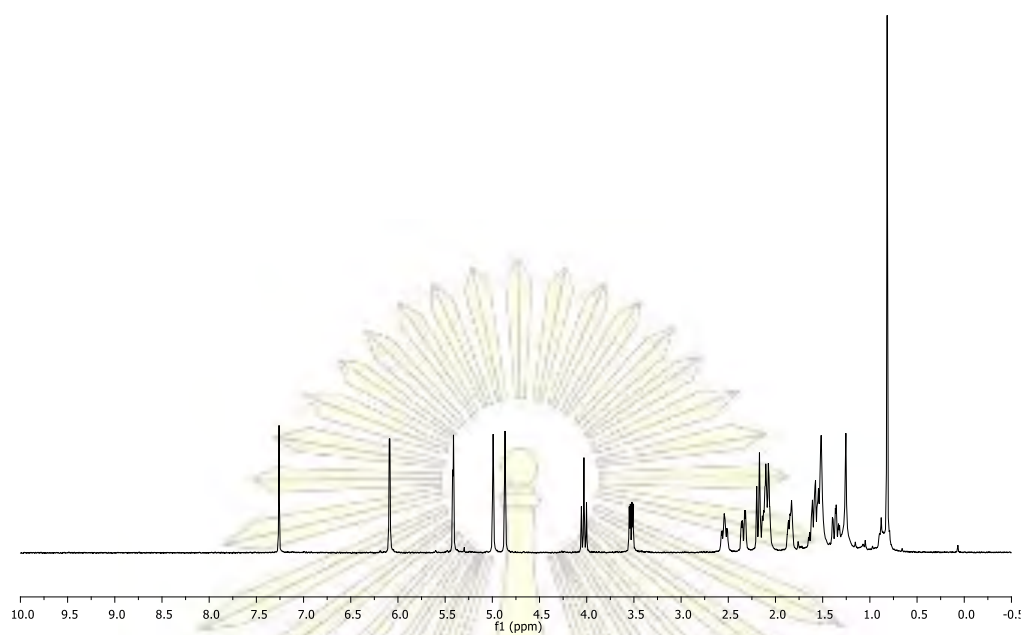
รูปที่ A.6 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-1* ใน CDCl_3



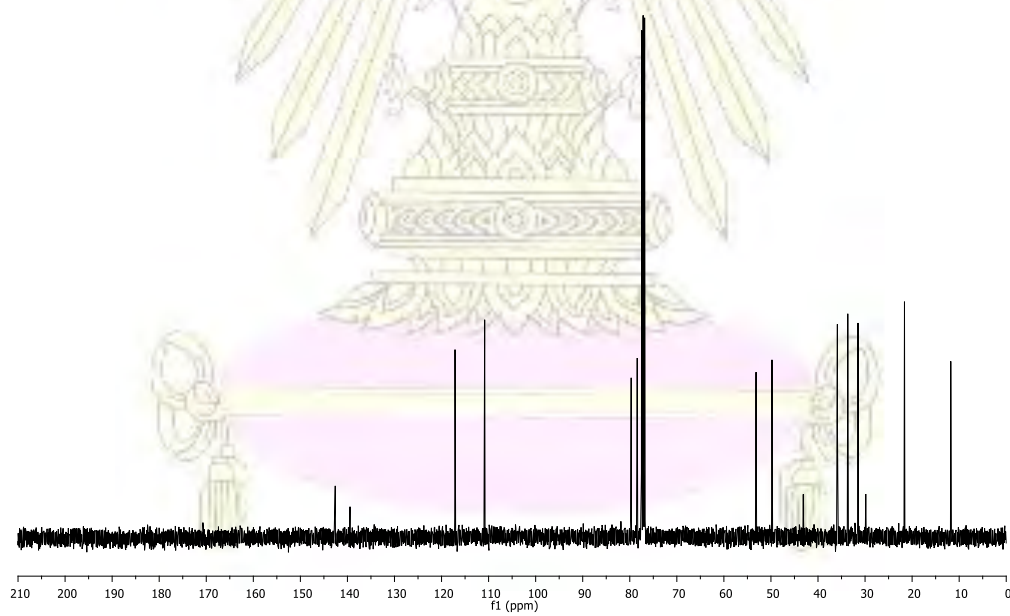
รูปที่ A.7 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-2 ใน CDCl_3



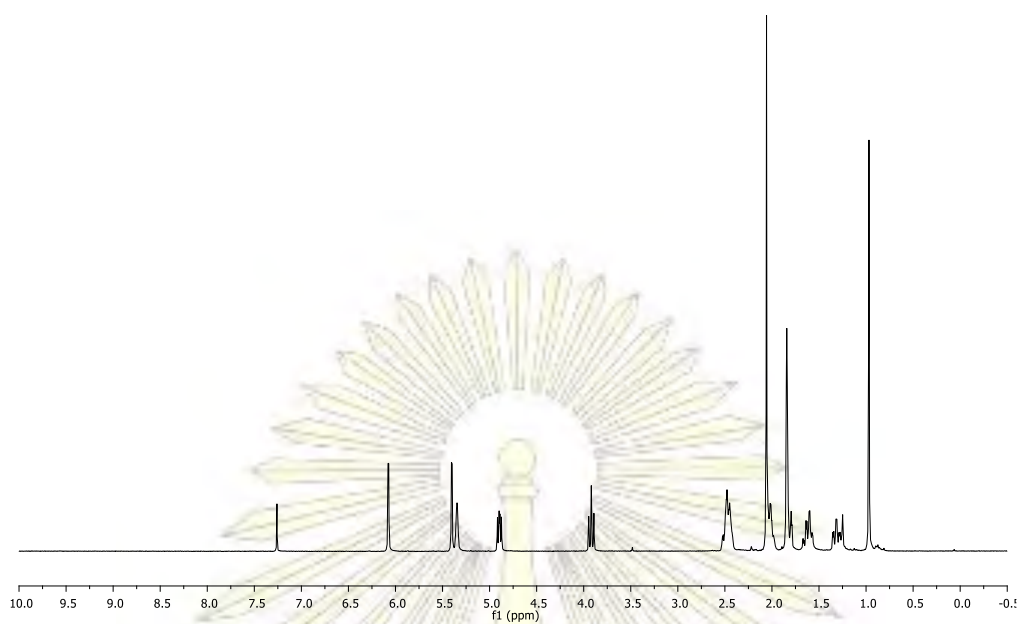
รูปที่ A.8 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-2 ใน CDCl_3



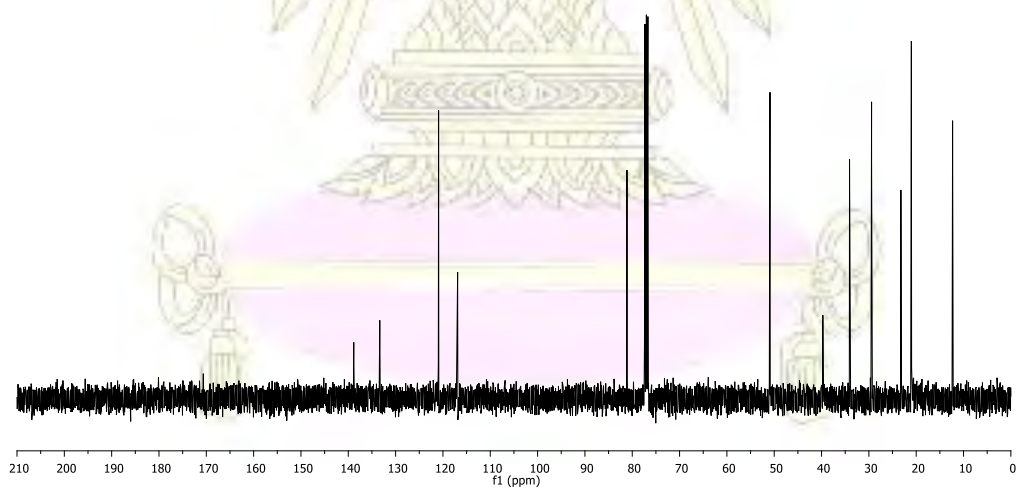
รูปที่ A.9 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-3* ใน CDCl_3



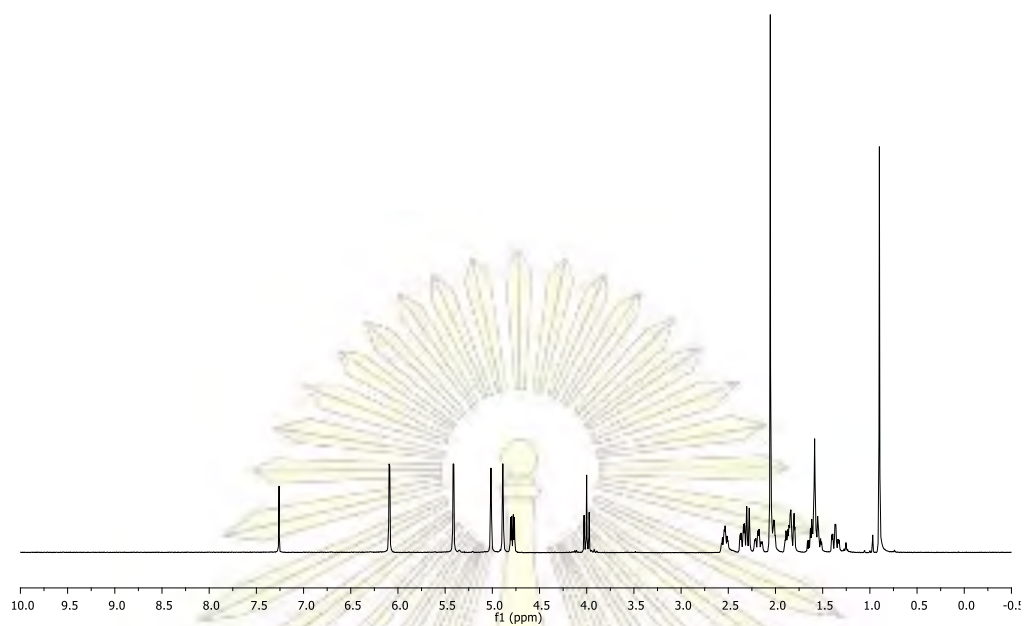
รูปที่ A.10 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-3* ใน CDCl_3



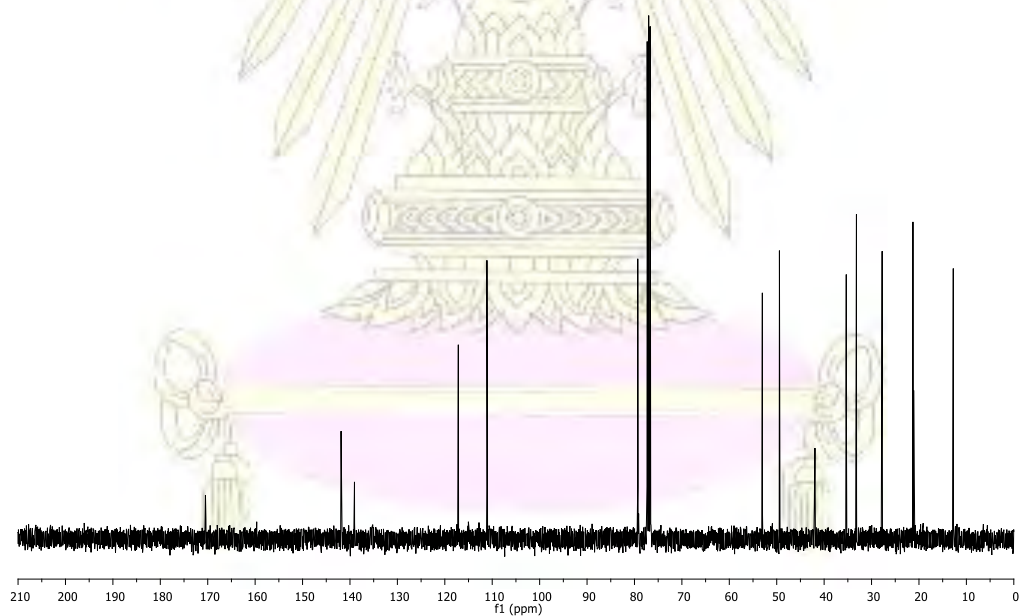
รูปที่ A.11 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-4* ใน CDCl_3



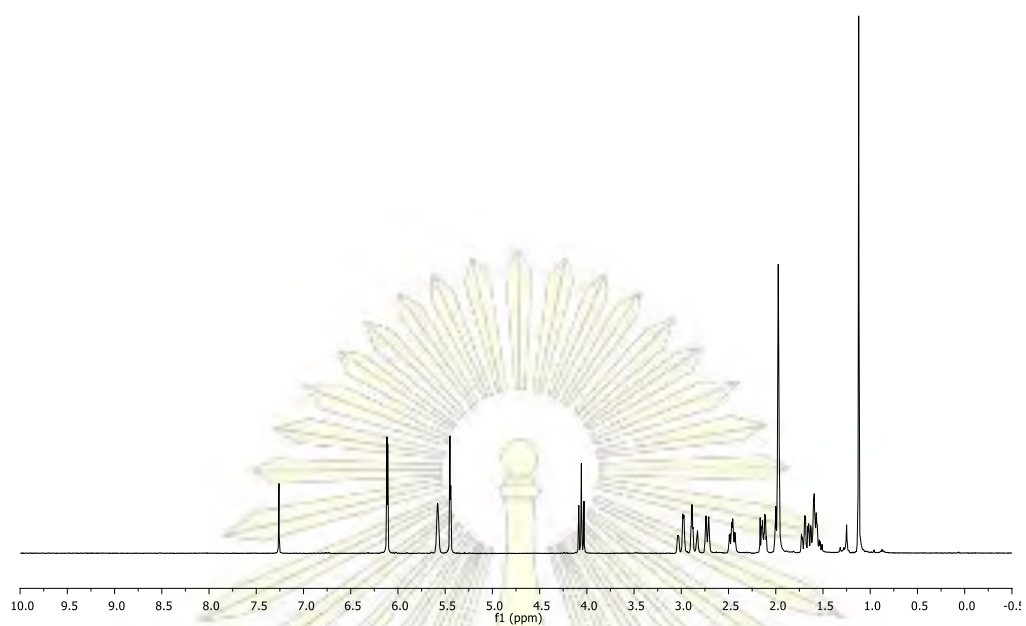
รูปที่ A.12 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-4* ใน CDCl_3



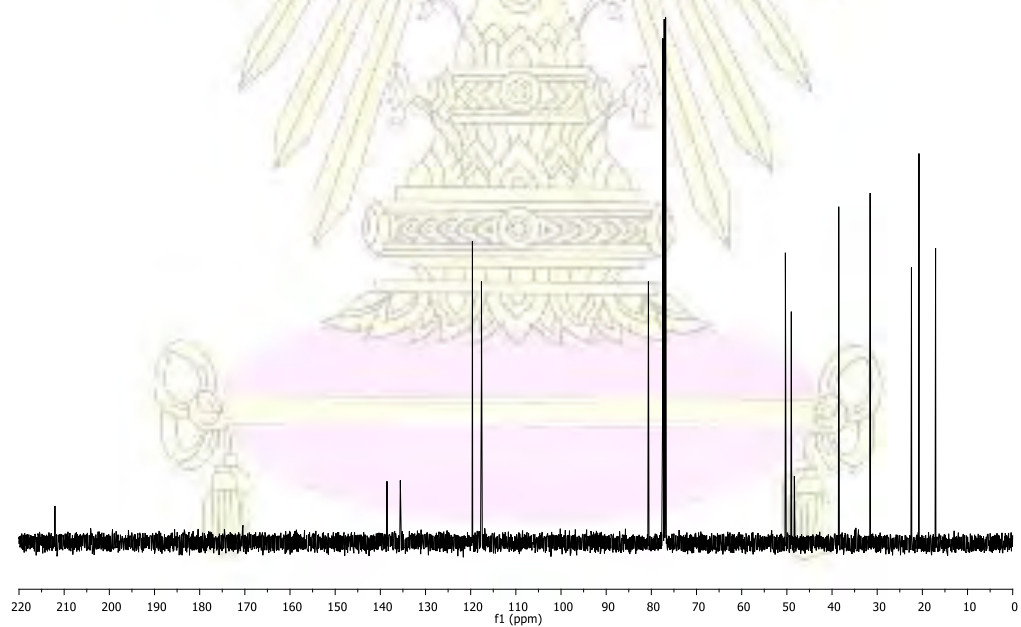
รูปที่ A.13 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-5* ใน CDCl_3



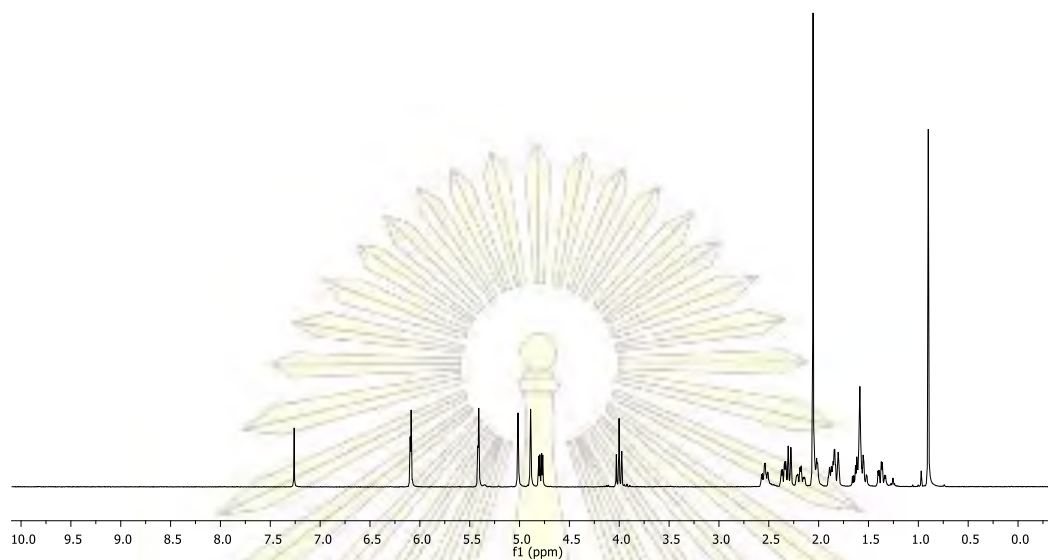
รูปที่ A.14 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-5* ใน CDCl_3



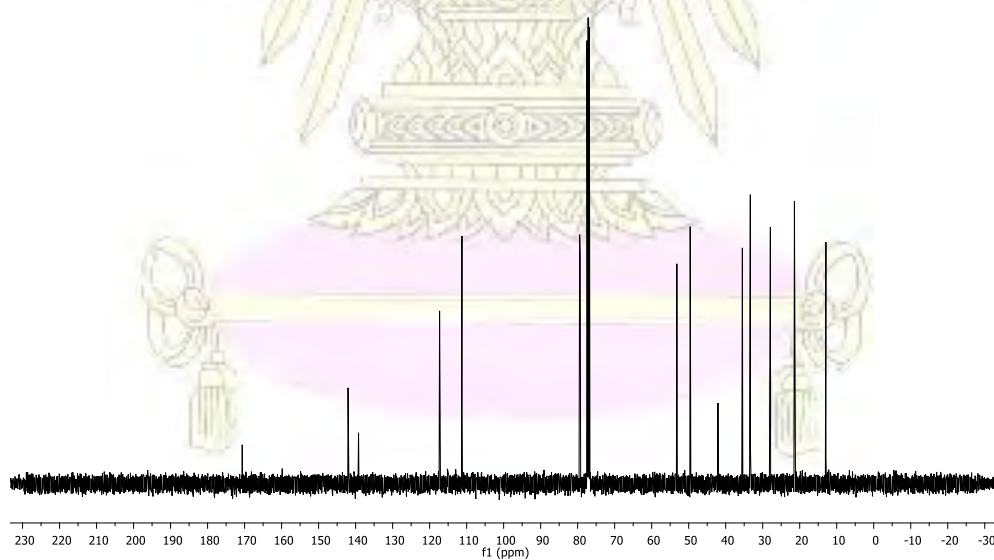
รูปที่ A.15 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-6* ใน CDCl_3



รูปที่ A.16 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ *cos-6* ใน CDCl_3



รูปที่ A.17 สเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารประกอบ cos-7 ใน CDCl_3



รูปที่ A.18 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของสารประกอบ cos-7 ใน CDCl_3

ประวัติผู้วิจัย

นาย สืบสกุล โทณแจ้ เกิดเมื่อวันที่ 7 กันยายน พุทธศักราช 2537 ที่พิษณุโลก สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย สายสามัญ แผนกวิทย์-คณิต จากโรงเรียนสาธิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2555 เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี การศึกษา 2556 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้หลังจากจบการศึกษาระดับปริญญาตรี 21/5 ถนนพิษณุโลก- แควน้อย ตำบลหัวรอ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

